

ELIZABETE CATAPAN

**CULTIVO "IN VITRO" E ANÁLISES FITOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE
*Phyllanthus***

FLORIANÓPOLIS

1999

ELIZABETE CATAPAN

**CULTIVO "IN VITRO" E ANÁLISES FITOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE
*Phyllanthus***

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção de grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Universidade Federal de Santa Catarina.
Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Maria Viana
Co-orientador: Prof. Valdir Cechinel Filho**

FLORIANÓPOLIS

1999

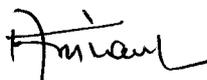
**"CULTIVO *IN VITRO* E ANÁLISES FITOQUÍMICAS DE ESPÉCIE DE
PHYLLANTHUS"**

POR

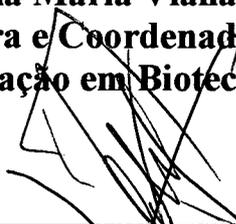
ELIZABETE CATAPAN

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

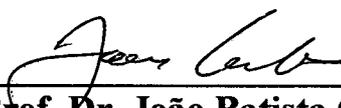
Comissão Examinadora:



**Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC
Orientadora e Coordenadora do Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**



**Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho - Co-orientador
Coordenador do Núcleo de Investigações
Químico-farmacêuticas - UNIVALI**



**Prof. Dr. João Batista Calixto
FMC/CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
FIT/CCA/UFSC**

Florianópolis, agosto de 1999

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui minha gratidão à Profª Dra. Ana Maria Viana por sua eficaz assistência e orientação dispensadas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, por sua orientação e estímulo e por sua capacidade de tornar este trabalho mais descontraído e objetivo.

A Araci, minha mãe, a qual foi, e é, a melhor orientadora que alguém poderia ter.

Ao meu pai, que na minha ausência soube respeitar e valorizar meu esforço.

Ao Alexandre, pelos momentos em que, em silêncio, transmitiu amor e compreensão.

A Elisângela e Paulo, pela paciência e apoio informático dedicados durante a realização deste trabalho.

Ao colega Michel, pelo constante estímulo e companheirismo nas incansáveis discussões sobre este trabalho.

Às amigas Sandra e Zeina, pelas interessantes sugestões e estímulo constante.

Ao Dr. Robert Verpoorte, pela colaboração e sugestões na realização das análises fitoquímicas.

Às Profas. Dras. Aurea M. Randi e Teresinha Paulilo, pela orientação, apoio e importantes sugestões.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto e Dr. Adair R. S. Santos, pelo estímulo e dedicação na realização dos testes farmacológicos.

Aos Profs. Nelson Gabilam, Rosendo Yunes, Rivaldo Niero, e aos alunos do Laboratório de Estrutura e Atividade do Departamento de Química, pelo auxílio na preparação do material para a realização das análises cromatográficas.

A Louisiane, pela paciência e dedicação, mas principalmente pelo tempo dispensado à realização das análises em cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Ademir Reis e Dra. Leila Graça do Amaral, pela valiosa colaboração na identificação taxonômica das espécies e pelo incentivo e apoio.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro.

**"Por vezes, senti minha alma se abater
e tu me deste coragem para prosseguir.
Hoje a vitória é minha....**

A ti, meu Deus, toda a Honra e toda a Glória, eternamente.

Amém."

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
Capítulo	
I. O GÊNERO <i>Phyllanthus</i> UMA REVISÃO DA BIOLOGIA, FARMACOLOGIA, FITOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA.....	05
1. Biologia.....	05
2. Propriedades farmacológicas.....	10
3. Estudos fitoquímicos.....	14
4. Atividades biológicas.....	17
5. Estudos clínicos.....	18
6. Biotecnologia.....	19
II. CULTIVO 'IN VITRO' DE <i>Phyllanthus caroliniensis</i> (EUPHORBIACEAE).....	23
1. Introdução.....	23
2. Material e métodos.....	23
3. Resultados.....	25
3.1. Indução de ramos.....	25
3.1.1. Efeito de citocininas.....	25
3.1.2. Efeito de meios de cultura.....	30
3.2. Enraizamento de microestacas.....	32
3.3. Aclimação.....	33
3.4. Cultura de calos.....	40
3.5. Cultura de raízes.....	41
III. CULTIVO 'IN VITRO' DE <i>Phyllanthus stipulatus</i> (EUPHORBIACEAE).....	45
1. Introdução.....	45
2. Material e métodos.....	46
3. Resultados.....	48
3.1. Indução de ramos.....	48
3.1.1. Efeito de citocininas.....	48
3.1.2. Efeito de meios de cultura.....	54
3.2. Enraizamento de microestacas.....	56
3.3. Aclimação.....	59
3.4. Cultura de calos e de raízes.....	59

IV. CULTIVO 'IN VITRO' DE <i>Phyllanthus urinaria</i> (EUPHORBIACEAE).....	67
1. Introdução.....	67
2. Material e métodos.....	67
3. Resultados.....	69
3.1. Micropropagação.....	69
3.1.1. Efeito de meios de cultura.....	69
3.2. Enraizamento de microestacas.....	73
3.3. Aclimação.....	76
3.4. Cultura de calos e de raízes.....	76
V. INDUÇÃO DE CALOS E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE <i>Phyllanthus fraternus</i> (EUPHORBIACEAE).....	83
1. Introdução.....	83
2. Material e métodos.....	83
3. Resultados.....	86
3.1. Micropropagação.....	86
3.1.1. Crescimento das microplantas.....	86
3.1.2. Enraizamento de microestacas.....	86
3.1.3. Aclimação.....	87
3.2. Cultura de calos e de raízes.....	89
VI. ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE CALOS E RAÍZES DE ESPÉCIES DE <i>PHYLLANTHUS</i> PRODUZIDOS 'IN VITRO'.....	94
1. Introdução.....	94
2. Material e métodos.....	94
3. Resultados.....	98
3.1. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de <i>P. caroliniensis</i>	99
3.2. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de <i>P. stipulatus</i>	101
3.3. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de <i>P. urinaria</i>	103
3.4. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de <i>P. fraternus</i>	105
VII. DISCUSSÃO GERAL.....	107
1. Micropropagação.....	107
1.1. Efeito das auxinas e citocininas.....	107
1.2. Efeito dos diferentes meios de cultura.....	113
1.3. Florescimento 'in vitro' e 'ex vitro'.....	117
1.4. Aclimação.....	120
2. Cultura de calos.....	123
3. Cultura de raízes.....	128
4. Análises fitoquímicas dos calos.....	131
5. Análises fitoquímicas das raízes.....	138
CONCLUSÕES.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXOS.....	160

LISTA DE ABREVIATURAS

MS	- Meio de Murashige & Skoog
B5	- Meio de Gamborg
AR	- Meio de Anderson
W	- Meio de White
S	- Meio de Shenk & Hildebrandt
K	- Meio de Kao & Michayluk
WPM	- Meio de Loyd & McCown (Wood Plant Medium)
BAP	- 6-benzilaminopurina
2iP	- 6- γ,γ dimetilalilaminopurina
CIN	- Cinetina
IAA	- Ácido indol 3 acético
NAA	- Ácido α -naftalenoacético
IBA	- Ácido indol 3 butírico
2,4-D	- 2,4-diclorofenoxiacético
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CG	- Cromatografia gasosa
HPLC	- Cromatografia líquida de alta resolução
BSTFA	- Bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamida (Sigma)
DCM	- Diclorometano

RESUMO

As plantas do gênero *Phyllanthus* têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, incluindo o cálculo renal e urinário, infecções intestinais, diabetes e hepatite. Dados da literatura demonstram que alguns constituintes isolados dessas plantas, incluindo flavonóides, taninos, alcalóides, lignanas e terpenos, parecem ser os princípios responsáveis por sua ação analgésica, antiinflamatória, antiviral, hipoglicemiante e antiespasmódica. Os objetivos deste estudo foram desenvolver sistemas de cultura 'in vitro' de *Phyllanthus caroliniensis*, *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fraternus* e proceder à análise fitoquímica do material vegetal produzido por estes sistemas, para detectar a presença de metabólitos secundários produzidos em diferentes condições de cultivo. Segmentos nodais e de raízes de microplantas foram utilizados para iniciar os sistemas de micropropagação, cultura de calos e de cultura de raízes. Os principais fatores testados para o estabelecimento destes sistemas 'in vitro' foram os reguladores de crescimento (2,4-D, NAA, IBA, IAA, BAP, 2iP, cinetina) e formulações salinas de meios de cultura (MS/2, MS, WPM, W, K, AR, S e B5). As análises fitoquímicas dos calos e de cultura de raízes foram realizadas através de técnicas de cromatografia em camada delgada e gasosa. Os resultados indicaram diferenças relacionadas com os genótipos com relação às várias condições de cultivo testadas. Taxas de multiplicação máximas (20-23) foram observadas em *P. caroliniensis* em meio MS suplementado com BAP a 0.5-1.0 mg.l⁻¹ e com cinetina e 2iP, nas concentrações de 0.25-1.0 mg.l⁻¹. Para *P. stipulatus* melhores resultados foram obtidos em meios contendo BAP a 0.06-0.12 mg.l⁻¹, cinetina 0.12 mg.l⁻¹ ou 2iP 1.0 mg.l⁻¹. Os melhores meios de cultura para a multiplicação de ramos de *P. caroliniensis* foram MS, K, WPM e AR, suplementados com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP, enquanto que, para *P. stipulatus*, os meios AR e MS/2, suplementados com 0.12 mg.l⁻¹ de BAP, foram os mais efetivos. Para *P. urinaria*, melhores resultados foram obtidos com os meios AR e MS suplementados com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP. Todas as espécies apresentaram de 80-100% de enraizamento em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento. As taxas máximas foram atingidas ao redor da segunda semana de cultivo, para *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fraternus*, e após 48 dias, para *P. caroliniensis*. NAA na concentração de 0.25 mg.l⁻¹ e IAA a 0.25-1.0 mg.l⁻¹ foram efetivas em promover o aumento do número de raízes por explante em *P. caroliniensis*, sendo que para *P. stipulatus* apenas o NAA 0.25 mg.l⁻¹ foi efetivo. A floração 'in vitro' foi observada para *P. caroliniensis*, na ausência de reguladores de crescimento ou na presença de cinetina, 2iP, NAA, IAA e IBA. As plantas micropropagadas foram aclimatadas com sucesso e as taxas de sobrevivência 'ex vitro' após 9 semanas variaram entre 86-91% para *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. urinaria*, sendo no máximo de 52% para *P. fraternus*. A floração 'ex vitro' iniciou-se após 3-4 semanas de aclimação, em *P. caroliniensis* e *P. urinaria*, atingindo 100% após 9 semanas, e em *P. stipulatus* 81%, após 12 semanas. Altas frequências na indução e significativo crescimento dos calos foram encontradas em meio MS contendo auxinas ou citocininas. As condições ótimas para a formação dos calos em *P. caroliniensis* foram com explantes na posição vertical e 2,4-D a 1.0 mg.l⁻¹, para *P. stipulatus*, explante em posição vertical e NAA a 1.0 mg.l⁻¹, para *P. urinaria*, explante em posição vertical e NAA a 0.25-1.0 mg.l⁻¹ ou em posição horizontal e 2iP a 1.0 mg.l⁻¹ e para *P. fraternus*, explante em posição horizontal e 2,4-D 0.25-1.0 mg.l⁻¹ ou IAA a 1.0 mg.l⁻¹. As citocininas BAP e 2iP em concentrações de 0.25-1.0 mg.l⁻¹ foram efetivas na indução e crescimento dos calos a partir de segmentos

nodais em *P. stipulatus* colocados na posição horizontal no meio. Cultura de raízes foram estabelecidas com sucesso para *P. caroliniensis* e *P. urinaria* em meio MS suplementado com NAA a 0.2 mg.l⁻¹. As análises fitoquímicas dos extratos metanólicos dos calos e das raízes de todas as espécies de *Phyllanthus* estudadas demonstraram a ausência de alcalóides e compostos fenólicos e a presença de compostos de natureza terpênica e esteróides através dos testes com reveladores específicos. Detectou-se a presença de glochidonol em todos os extratos de calos analisados, de glochidona em *P. caroliniensis* e *P. fraternus*, e estigmasterol em todos os extratos com exceção de *P. caroliniensis*. Nos extratos de raízes foi detectada a provável presença de glochidona em *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*, de estigmasterol em *P. stipulatus* e *P. fraternus* e de glochidonol em *P. stipulatus*. A presença destes compostos nos extratos dos calos e raízes indica a possibilidade do aperfeiçoamento e incremento da produção dos mesmos 'in vitro'. A otimização de protocolos de micropropagação, cultura de calos e raízes oferece a possibilidade de utilizar as técnicas de cultura de células para a propagação vegetativa e abre as portas para maiores estudos em metabólitos secundários.

SUMMARY

The plants of genus *Phyllanthus* have been used in folk medicine to treat kidney and urinary bladder disturbances, intestinal infections, diabetes and hepatitis B. Data available in the literature strongly support the idea that some constituents isolated from these plants, including flavonoids, tannins, alkaloids, coumarins, lignans and terpenes, could be the active principles responsible for antinociceptive, antiinflammatory, antiviral, hypoglycaemic, antispasmodic properties. This study is focussed on the development of 'in vitro' culture systems for *Phyllanthus caroliniensis*, *P. stipulatus*, *P. urinaria* and *P. fraternus*, and on the phytochemical analysis of the plant material raised by these systems in order to detect the main classes of secondary metabolites produced under different culture conditions. Nodal and root segments of microplants were used for axillary shoot proliferation, callus and root culture initiation. The main factors tested for initiation of these *in vitro* systems were growth regulators (2,4-D, NAA, IBA, IAA, BAP, 2iP, kinetin) and basal salt medium formulations (MS/2, MS, WPM, W, K, AR, SH, B5). The phytochemical analysis of the extracts were carried out by TLC and gas chromatography. The results show genotype linked responses to the various culture conditions tested. Maximum multiplication rates (20-23) were achieved for *P. caroliniensis* in MS supplemented with 0.5-1.0 mg.l⁻¹ BAP, 0.25-1.0 mg.l⁻¹ kinetin or 2iP. For *P. stipulatus*, the best conditions were medium containing 0.06-0.12 mg.l⁻¹ BAP, 0.12 mg.l⁻¹ kinetin or 1.0 mg.l⁻¹ 2iP. The best basal media for axillary shoot proliferation of *P. caroliniensis* were MS, K, WPM and AR, supplemented with 1.0 mg.l⁻¹ BAP, whilst, for *P. stipulatus*, AR and MS/2, supplemented with 0.12 mg.l⁻¹ BAP were the most effective. For *P. urinaria*, best results were obtained with AR and MS supplemented with 1.0 mg.l⁻¹ BAP. Rooting was achieved with 80-100% of the microshoots in MS media deprived of growth regulators. Maximum rooting rates were achieved in the second week of culture for *P. stipulatus*, *P. urinaria* and *P. fraternus*, and after 48 days, for *P. caroliniensis*. NAA in concentration of 0.25 mg.l⁻¹ and IAA at 0.25-1.0 mg.l⁻¹ were the most effective to promote significant increase in the number of roots per explant in *P. caroliniensis* shoot cultures, whilst for *P. stipulatus*, only 0.25-1.0 mg.l⁻¹ NAA was effective. *In vitro* flowering was observed in *P. caroliniensis* plantlets raised in the absence of growth regulators or in the presence of kinetin, 2iP, NAA, IAA and IBA. Micropropagated plants were successfully acclimatized to the *ex vitro* conditions, and the surviving rates after 9 weeks were ca. 86-91%, for *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* and *P. urinaria*, and maximum of 52% for *P. fraternus*. *Ex vitro* flowering started soon after 3-4 weeks of acclimatization, reaching 100% after 9 weeks, for *P. caroliniensis* and *P. urinaria*, and 81% after 12 weeks for *P. stipulatus*. High frequency of callus production and significant growth was achieved on MS medium containing auxins or cytokinins. The best culture conditions for callus formation in *P. caroliniensis* were explant in the vertical position and 1.0 mg.l⁻¹ 2,4-D; for *P. stipulatus*, explant in the vertical position and 1.0 mg.l⁻¹ NAA; for *P. urinaria*, explant in the vertical position and 0.25-1.0 mg.l⁻¹ NAA or explant in the horizontal position and 1.0 mg.l⁻¹ 2iP and for *P. fraternus*, explant in the horizontal position and 0.5-1.0 mg.l⁻¹ 2,4-D or 1.0 mg.l⁻¹ IAA. The cytokinins BAP and 2iP in concentrations ranging from 0.25-1.0 mg.l⁻¹ were effective for callus induction and growth from nodal segments of *P. stipulatus* placed in the horizontal position in the media. Root cultures were successfully established for *P. caroliniensis* and *P. urinaria* in MS medium supplemented with 0.2 mg.l⁻¹ NAA. The phytochemical analyses of metanolic extracts from callus and root cultures of *Phyllanthus* species have

demonstrated the absence of alkaloids and fenolic compounds and have shown the presence of terpenoids and steroids through specific reagent. We observed the presence of glochidonol in callus extracts, glochidone from *P. caroliniensis* and *P. fraternus*, and stigmasterol at all extracts with the exception of *P. caroliniensis*. The root extracts demonstrated the probable presence of glochidona from *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* and *P. fraternus*, of stigmasterol from *P. stipulatus* and *P. fraternus* and glochidonol from *P. stipulatus*. The presence of these compounds in their composition indicate the possibility to improve and increase the production 'in vitro'. The optimized micropropagation, callus culture and root culture protocols now offer the possibility to use cell culture techniques for vegetative propagation and open the door for further studies on secondary metabolites.

INTRODUÇÃO GERAL

Uma grande quantidade de compostos bioativos são elaborados pelas plantas, dos quais já foram isolados e estruturalmente caracterizados cerca de 10.000 compostos. Muitos dos compostos são metabólitos secundários e estão separados em vários grupos, principalmente alcalóides, compostos fenólicos e terpenóides (POLYA & WANG, 1997). Tais compostos podem estar envolvidos na defesa contra o ataque de animais herbívoros e patógenos microbianos, e demonstram, em certos casos, efeitos alelopáticos (POLYA et al., 1995).

Além do Taxol®, muitos outros princípios ativos valiosos são obtidos a partir do cultivo das plantas, como por exemplo a morfina (analgésico, narcótico e sedativo potente) e a codeína (usado contra a tosse), que provêm das plantações de *Papaver somniferum* (Papaveraceae) da Austrália; a digoxina (usada no tratamento de doenças cardíacas), que provém da *Digitalis lanata* (Scrophulariaceae), cultivada principalmente na Holanda; a pilocarpina (usada no tratamento do glaucoma) que se origina das plantações de *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) no Brasil; e a vincristina e a vimblastina (usadas no tratamento da leucemia), extraídas da planta ornamental *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), que é cultivada na Tanzânia e Estados Unidos (PLETSCH, 1998).

A tecnologia apropriada para a obtenção de fármacos a partir de plantas depende do tipo de substância química considerada. Existem quatro processos de produção de compostos naturais de plantas: a síntese química total, a extração e purificação de compostos a partir de plantas silvestres ou cultivadas, os processos biotecnológicos e os processos combinados de técnicas. A síntese química total apenas é viável economicamente quando o composto de interesse possui uma estrutura simples, com nenhum ou poucos centros quirais, o que não é o caso de muitos produtos naturais. As reservas vegetais nativas, apesar de serem a única opção para certas drogas, são esgotáveis, e o extrativismo puro e simples tem conseqüências nefastas no que diz respeito á conservação das espécies de interesse (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

A biotecnologia representa uma alternativa de produção de plantas e compostos de importância medicinal, e portanto as técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos de plantas são alternativas em circunstâncias em que a planta em estudo apresenta dificuldades

de reprodução e/ou de cultivo, tendo um período longo de crescimento, produzindo pequena quantidade do metabólito de interesse, ou quando a síntese química é tecnicamente problemática (PLETSCH, 1998).

Desta forma, as técnicas de cultura de ramos, células, raízes e de embriões somáticos têm sido empregadas com sucesso nas pesquisas com várias espécies de interesse medicinal, permitindo que células e/ou plantas sejam produzidas em condições padronizadas controladas e reproduzíveis, independente de fatores sazonais, o que garante a homogeneidade da biomassa produzida (STAFFORD, 1993). As técnicas de micropropagação têm sido utilizadas principalmente para a seleção e clonagem de indivíduos altamente produtores. O sucesso da multiplicação rápida, utilizando-se meristemas ou segmentos nodais, tem produzido um grande impacto na produção de plantas economicamente importantes e que apresentam problemas de reprodução por métodos convencionais (MANTELL et al., 1985). Além disso, as culturas de ramos têm sido utilizadas em vários casos, pois produzem produtos específicos de caules e folhas, que podem não estar presentes nas suspensões celulares e nos demais sistemas mencionados acima, como por exemplo os óleos essenciais, que são sintetizados por culturas diferenciadas (STAFFORD, 1993).

As técnicas de cultura de células têm sido utilizadas para estudos de biossíntese e acumulação de produtos do metabolismo secundário das plantas, assim como em estudos de biotransformação (STAFFORD, 1993). Possibilitam ainda que sejam conduzidos experimentos de engenharia genética e de seleção de linhagens celulares altamente produtoras. As variações nas técnicas de cultura de células através de sistemas de imobilização ou de cultivo de suspensões em biorreatores têm possibilitado estudos visando a produção de metabólitos secundários em nível industrial para várias espécies (SCRAGG, 1993a,b). Estas técnicas podem ser a única opção de produção de material vegetal, no caso de substâncias que são produzidas pela casca, folhas ou raízes de árvores em extinção. Um exemplo é o taxol, substância anticâncer que é produzida pela casca do tronco de *Taxus brevifolia*, uma espécie que cresce no Pacífico. Para produzir 1 kg de taxol são necessárias mil árvores com cem anos de idade. Em vista disto, estão sendo estudados outros métodos para a produção desta substância, e entre eles, processos semi-sintéticos, que utilizam o taxano, extraído das árvores como precursor, e a cultura de células. Para um número

pequeno de espécies de plantas existem processos industriais patenteados, envolvendo a cultura de células vegetais para a produção de chiconina, a partir de *Lithospermum erythrorhizon* de berberina, a partir de *Coptis japonica* e de ginsenosídeos, produzidos por *Panax ginseng*. As maiores restrições com relação ao cultivo em larga escala são devidas principalmente à compreensão incompleta sobre as vias biossintéticas, e as interações entre a cinética do crescimento celular, a morfologia e as interações entre as células. Problemas causados pela agregação celular, a viscosidade, aeração, sensibilidade de suspensões ao estresse da agitação, são os principais impedimentos ao sucesso das culturas em biorreatores (KIERAN et al., 1997).

As plantas do gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) têm sido intensamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, incluindo o cálculo renal e urinário, infecções intestinais, diabetes e hepatites (MORTON, 1981). Ao longo dos anos, vários estudos químicos e farmacológicos bem como alguns estudos clínicos têm sido descritos para algumas espécies de *Phyllanthus*. Os resultados demonstram que alguns constituintes isolados destas plantas, incluindo flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas, lignanas e terpenos, parecem ser os princípios responsáveis pelas ações analgésica, antiinflamatória, antiviral, hipoglicemiante e antiespasmódica das mesmas. O complexo mecanismo de ação destes compostos pode explicar, pelo menos em parte, o uso terapêutico das plantas do gênero *Phyllanthus* na medicina popular (CALIXTO et al., 1997 e 1998). Além disso, há a necessidade de um maior aprofundamento dos estudos farmacológicos desses compostos, uma vez que os resultados obtidos até então demonstraram que os compostos que apresentam ações antinociceptivas quando administrados via i.p. (intraperitoneal) não apresentam os mesmos resultados quando administrados por via oral. Uma análise mais apurada sobre o mecanismo de ação dos princípios ativos e uma avaliação da possível ação sinérgica dos compostos presentes nas plantas são também questões que ainda permanecem sem respostas adequadas (CALIXTO et al., 1998). Além disso, apesar dos estudos conduzidos, ainda não foi identificado o composto responsável pelas ações farmacológicas supracitadas.

O uso destas espécies visando a obtenção de novos fitofármacos depende, portanto, do estabelecimento de metodologias analíticas sensíveis para a detecção dos numerosos compostos resultantes do metabolismo secundário presente nestas plantas, bem como de um

maior aprofundamento dos estudos fitoquímicos e efeitos farmacológicos desses compostos.

Segundo UNANDER (1996), além dos problemas encontrados na identificação taxonômica correta do gênero *Phyllanthus*, poucos estudos têm sido desenvolvidos sobre cultura de células, tecidos e órgãos destas espécies. A produção de calos e subsequente análise fitoquímica dos compostos por eles produzidos foi investigada apenas em algumas espécies, tais como: *P. emblica* (KHANNA & NAG, 1973), *P. urinaria* (HAICOUR 1974), *P. amarus*, *P. abnormis* e *P. urinaria* (UNANDER, 1991), *P. niruri* (ISHIMARU et al., 1992) e *P. tenellus*, *P. corcovadensis* e *P. niruri* (SANTOS et al., 1994). O desenvolvimento de técnicas de cultura de raízes e suas transformações genéticas foram recentemente realizados por ISHIMARU et al. (1992) em apenas uma espécie de *Phyllanthus* (*P. niruri*). Nenhum estudo tem sido conduzido sobre o emprego de técnicas de biologia molecular para caracterização da biodiversidade genética. Do mesmo modo, nenhum registro foi encontrado com relação à seleção de clones mais produtivos e ao desenvolvimento de suspensões celulares para estas espécies. Assim, o desenvolvimento de técnicas adequadas para tal seria interessante, pois poderia viabilizar investigações mais detalhadas sobre a possibilidade de otimização da produção de compostos secundários por sistemas de cultivo 'in vitro' e fornecer subsídios para os estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Os objetivos deste estudo foram desenvolver sistemas de micropropagação, de cultura de calos e de raízes e determinar o perfil fitoquímico dos extratos de calos e de raízes de *P. caroliniensis*, *P. urinaria*, *P. fraternus* e *P. stipulatus*, no sentido de desenvolver técnicas para a multiplicação rápida de indivíduos altamente produtores de princípios ativos, e investigar o potencial dos calos e raízes em produzir os metabólitos secundários de interesse farmacológico.

A literatura relativa ao gênero *Phyllanthus* é revisada no Capítulo 1. As metodologias para o desenvolvimento dos sistemas de cultura 'in vitro' para as diferentes espécies estão descritas nos Capítulos 2, 3, 4 e 5, e os resultados das análises fitoquímicas dos calos e raízes produzidas 'in vitro' no Capítulo 6.

CAPÍTULO I

O GÊNERO *Phyllanthus*: UMA REVISÃO DA BIOLOGIA, FARMACOLOGIA, FITOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

1. Biologia

O gênero *Phyllanthus* pertence à família Euphorbiaceae, que é uma das maiores e mais diversificadas famílias de Angiospermas, com cerca de 7.500 espécies, distribuídas em mais de 300 gêneros (WEBSTER & BURG, 1967/68; UNANDER et al., 1991). As 550 a 750 espécies do gênero *Phyllanthus* estão subdivuídas em 10-11 subgêneros, e este gênero foi analisado e descrito pela primeira vez por Linnaeus em 1737. Encontram-se espécies nativas deste gênero em todos os continentes, exceto na Europa e Antártica, e um maior número de espécies está disperso nos trópicos (UNANDER et al., 1990 e 1994). Este gênero compreende árvores, arbustos ou ervas, anuais ou perenes, terrestres ou aquáticas (BACHI, 1984). As plantas apresentam caule geralmente glabro e cilíndrico, com ramos persistentes ou decíduos. As folhas são geralmente alternas, inteiras, variando no tamanho e textura, e as flores de sexos separados, solitárias ou reunidas em reduzidas cimeiras unissexuais ou bissexuais, monoclamídeas e gamossépalas. O fruto é geralmente capsular, deiscente, explosivo, com cocos separando-se de uma columela persistente, em alguns casos drupáceos ou bagáceos, e as sementes geralmente duas por lóculo (LOURTEIG & O'DONELL, 1943).

Constatou-se a presença, na Ilha de Santa Catarina, de *P. fraternus*, *P. tenellus*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. caroliniensis* e *P. stipulatus*. Ao gênero *Phyllanthus* pertencem plantas conhecidas com 'quebra-pedra', 'erva-pombinha', 'arrebenta-pedra', 'filanto' e 'sarandi branco', amplamente empregadas na medicina popular. São espécies referidas como naturais de regiões tropicais e subtropicais, espalhadas pelos mais variados ambientes (ULYSSEÁ & AMARAL, 1997).

O *P. caroliniensis* apresenta-se na forma herbácea ou subarborescente, encontrada nas margens dos rios, raramente em campos arenosos ou outros locais exutos ou rupestres. Esta espécie pertence ao grupo das reófitas, ou seja, plantas com caules e ramos rijos mas

flexíveis, que podem resistir às correntezas das águas (SMITH et al., 1988). WEBSTER (1970) refere-se ao *P. caroliniensis* como a mais variável das espécies de *Phyllanthus* do Novo Mundo, com o que HUNZIKER (1967) concorda, citando como exemplo o disco da flor pistilada totalmente inteiro em exemplares na Argentina e, por outro lado, profundamente 6-lobado em exemplares do Brasil, Porto Rico e até mesmo na Argentina. Sua distribuição geográfica é ampla, e inclui desde os Estados Unidos até a Argentina, sendo latitudinalmente a espécie de *Phyllanthus* de mais ampla distribuição (ULYSSEÁ & AMARAL, 1997). UNANDER et al.(1990 e 1991) registram uma variada metodologia quanto ao modo de utilização desta planta na medicina popular. No México, esta espécie é utilizada em forma de infusão para amenizar a tosse e para o tratamento de bronquite. Na França e na Índia a infusão é utilizada como diurética, laxativa e contra a febre e diabete. Nos Estados Unidos as folhas frescas banhadas em água fria são utilizadas como preparações antibacterianas.

O *P. fratermus* é aparentemente nativo de regiões do Paquistão e da Índia, esporadicamente introduzido na África e América (WEBSTER, 1970). Segundo esse mesmo autor (comunicação pessoal) esta espécie não tem sido encontrada muito freqüentemente na América do Sul, e sua identificação e coleta no Brasil são inéditas (ULYSSEÁ & AMARAL, 1997). UNANDER et al.(1991) citam a utilização desta espécie na medicina popular para o tratamento de diarreias, tumores abdominais, problemas gênito-urinários, e como diurética, antisséptica, antifúngica e contraceptiva pela população da Índia, Paquistão, Nepal, Estados Unidos, Sudão, França e Blangladesh. A Índia é, dentre os países acima citados, o país que utiliza esta planta em todo o seu território, das mais variadas formas, para o tratamento de muitas doenças. Esse mesmo autor também alerta para a correta identificação desta espécie, que muitas vezes é confundida com *P. amarus* ou citada como *P. niruri*, mas pela sua localização geográfica provavelmente é na verdade *P. fratermus*.

O *P. stipulatus* encontra-se disperso pelas três Américas, vegetando preferencialmente em lugares úmidos, sendo bastante comum encontrá-lo em lavouras de arroz (ALLEM, 1977). O epítelo *stipulatus*, segundo SMITH et al. (1988), provém de suas estípulas coloridas. Estes autores informam que esta espécie apresenta ampla, porém descontínua, distribuição na floresta pluvial da encosta Atlântica. ULYSSÉA & AMARAL

(1997) observaram que esta espécie tanto pode apresentar-se em uma forma vigorosa e bastante ramosa, com folhas grandes e de cor verde intensa, como de forma mais delgada, com ramos e folhas reduzidas e de coloração avermelhada, conforme sua distribuição geográfica. A identificação correta desta espécie, no trabalho realizado pelas autoras acima citadas, foi baseada na morfologia das sementes e confirmada por WEBSTER. UNANDER et al. (1991) citam a utilização de *P. stipulatus* na República Dominicana, Porto Rico, Guianas e Brasil, para o tratamento de malária, diabetes, hepatites e como diurética.

O *P. urinaria* é referido por SMITH et al. (1988), para o Brasil, como erva invasora, sendo exclusivamente encontrada na floresta pluvial da encosta Atlântica. Originária do Velho Mundo, encontra-se atualmente distribuída nas regiões tropicais como erva daninha, preferencialmente em locais mais úmidos (WEBSTER & BURCH, 1967/68). Seu nome é alusão ao seu uso em infecções das vias urinárias. UNANDER et al. (1991) cita a utilização desta espécie no tratamento de problemas digestivos na Nigéria, Peru, Argentina e Indonésia e como diurética nos Estados Unidos, Porto Rico, Guiana Francesa, Argentina, Índia, Nepal, Nigéria, China e França. Esta espécie é também utilizada no tratamento de febres em Porto Rico e Sri Lanka e apresenta propriedades antibacterianas segundo estudos realizados na França, Suriname e Peru.

ULYSSÉA & AMARAL (1997) comentam que o gênero *Phyllanthus* apresenta aspectos anatômicos particulares e é formado por plantas muito semelhantes umas às outras, dificultando a identificação. Sugerem também um atento estudo comparativo entre *P. stipulatus* e *P. fraternus* devido à forte semelhança entre eles. UNANDER (1998) também comenta a utilização incorreta da nomenclatura de *P. niruri* para espécies encontradas na Ásia e África, que provavelmente não estão corretamente identificadas, o que complica a documentação dos resultados e aplicações de patentes. Exemplares de "*P. niruri*" provenientes da Índia foram examinados por UNANDER (1998), que confirmou o erro de denominação desta espécie, que certamente era *P. amarus*. Com o objetivo de esclarecer e prevenir futuros erros na identificação taxonômica, por problemas atuais nas bases de dados de espécies de *Phyllanthus*, UNANDER (1998) e colaboradores estão trabalhando num projeto de organização dos registros por subgêneros e seções afins, de forma que se possa detectar possíveis grupos taxonômicos através dos usos e efeitos.

AMARAL & ULYSSÉA (1993) constataram, em coletas realizadas no Campus da UFSC, em um mesmo agrupamento, aparentemente homogêneo, a presença de mais de uma espécie de *Phyllanthus*. Tal fato é da maior importância, pois vem demonstrar que coletas feitas em grande quantidade, para a extração e análise de substâncias, devem ser efetuadas de forma bastante criteriosa, pois facilmente poderão ocorrer misturas de material, podendo comprometer seriamente a confiabilidade dos resultados.

A atividade farmacológica e a qualidade das plantas medicinais são fatores sensíveis às variações ambientais, como fertilidade do solo, pH, temperatura, luminosidade e outros fatores (SCHUMUTTERER & ZEBITZ, 1983; FRANZ, 1983). Porém, não foram encontradas informações sobre as condições ótimas de produção de *Phyllanthus*, apenas a recomendação de utilização de altos níveis de N e K na produção de *P. urinaria* na China e a preferência por solos calcários e áreas úmidas para o cultivo do gênero *Phyllanthus* em áreas tropicais (UNANDER et al. 1991 e 1993). Por isso, UNANDER et al. (1991) testaram a influência de algumas variáveis como a fertilidade do solo, pH, temperatura e diferenças genéticas, na atividade da DNA polimerase (DNAP) do vírus da hepatite B em *P. debilis* e *P. urinaria*. Os resultados indicaram que diferenças na fertilidade do solo, pH e disponibilidade de cálcio não afetaram significativamente a atividade da DNAP 'in vitro'. Quando os efeitos foram detectados, eram menores do que aqueles observados em relação às diferenças genéticas. No entanto, os resultados obtidos indicaram que baixas temperaturas diminuem significativamente a produção de substâncias que atuam na atividade da DNAP. UNANDER et al. (1993) estabeleceram condições ótimas para o cultivo de *P. amarus* através da utilização de 560 ou 1.120 Kg/ha de N P K (6-12-12) em solo com 0.5% de matéria orgânica. As plantas eram irrigadas em períodos secos e mantidas sob cobertura de polietileno na altura de 1m. A produção máxima de biomassa foi alcançada aos 6 meses de cultivo, obtendo-se um rendimento de 40.5 Kg/ha. Os resultados demonstraram que o tamanho da planta e os diferentes níveis de fertilização apresentam um pequeno efeito na atividade antiviral da DNAP e no rendimento da planta.

Outros estudos sobre a biologia de *P. tenellus* foram desenvolvidos na UFSC com o objetivo de determinar os níveis de açúcares solúveis e proteínas totais em plantas de diferentes idades, no sentido de definir a melhor época de coleta das plantas cultivadas no campo e também para verificar a possível relação entre o metabolismo primário e a

produção de compostos secundários. Os resultados demonstraram que níveis mais elevados, em termos de peso seco (1.253 Kg/ha) e de açúcares solúveis (50.63 µg/mg), foram obtidos em torno de 3.5 meses de cultivo, e níveis mais elevados de proteínas totais (156.81 µg/mg) aos 3 meses de cultivo. Estes efeitos sazonais foram comprovados através de cromatografia gasosa, em que as frações de clorofórmio dos extratos metanólicos apresentaram picos mais elevados de esteróides e terpenos neste período (Randi, A. M. comunicação pessoal).

A produtividade obtida com espécies de *P. amarus* (40.5 kg/ha) foi bem menor que a obtida com *P. tenellus* (1253 Kg/ha). Estes resultados provavelmente são devidos aos diferentes espaçamentos utilizados no seu cultivo, e também demonstram a necessidade de se estabelecer métodos de cultivo para estas diferentes espécies. O tempo de cultivo e as condições adequadas para tal são fatores que também devem ser considerados, já que a produção de algumas classes de compostos, como os esteróides e terpenos, está relacionada com as condições de cultivo.

Pouco se conhece sobre as formas reprodutivas deste gênero, e este aspecto é crucial para viabilizar a produção de mudas em larga escala. Segundo VENTURI & RANDI (1997a), foram identificados problemas na germinação de sementes de *P. niruri* e *P. tenellus*, e verificou-se que as sementes destas espécies apresentam polimorfismo. Esta forma de polimorfismo está relacionada com a coloração das sementes, normalmente encontradas nas cores marrom e amarela. As sementes marrons apresentaram maior massa e porcentagem de germinação mais alta, quando comparada com as amarelas, para as duas espécies estudadas. Este mesmo problema foi observado em sementes de *P. stipulatus*, *P. fraternus*, *P. caroliniensis* e *P. urinaria* (OLIVEIRA et al., 1997).

UNANDER et al. (1995) também verificaram a heteromorfia em sementes de *P. amarus*, bem como uma redução drástica na viabilidade das sementes armazenadas a 10°C durante o período de um ano. As melhores condições para armazenamento foram a sua manutenção em temperatura ambiente, ou em temperaturas alternadas, com um período de permanência a -20°C. Nestas condições as sementes mantiveram-se viáveis por mais de um ano. Já para sementes de *P. tenellus*, OLIVEIRA et al. (1997) aconselham o seu armazenamento sob refrigeração, pois ocorreu perda de viabilidade das sementes quando estocadas em condições ambientais, após oito meses de armazenamento. Outros fatores avaliados por UNANDER et al. (1995) foram o efeito da luz na germinação e na

viabilidade das sementes de *P. amarus*. Os resultados demonstraram que as sementes desta espécie são fotoblásticas positivas, isto é, necessitam de luz para germinar, o que implica em não cobrir as sementes após a sementeira. Tais resultados foram confirmados por OLIVEIRA et al. (1997) com sementes de *P. niruri* e *P. tenellus*. UNANDER et al. (1995) verificaram também que a porcentagem de viabilidade das sementes de *P. amarus* foi baixa, obtendo-se uma média de 50%, e diminuiu com o tempo. As sementes mais jovens germinaram mais lentamente do que as mais velhas. Estes resultados ajudam a explicar a baixa germinação observada a campo.

Entende-se que a heteromorfia é caracterizada pela redução na porcentagem de germinação das sementes, bem como pela germinação lenta e heterogênea. A heteromorfia, polimorfia ou heteroblastia são termos utilizados para expressar os diferentes graus de dormência das sementes; geralmente estas variações estão refletidas no tamanho, cor e espessura da casca das sementes (BEWLEY & BLACK, 1994). Isto implica em problemas de reprodução e conseqüentemente na produção de mudas em larga escala das espécies de *Phyllanthus*.

Estudos preliminares realizados por VENTURI & RANDI (1997b) a respeito de parâmetros fenológicos e de crescimento de *P. niruri* em diferentes estações do ano demonstram uma variação no crescimento das plantas. O crescimento foi mais rápido e maior durante os meses mais quentes. A produção de flores e frutos foi bastante variável entre as plantas e entre os períodos de análise, mas as plantas foram capazes de florescer e frutificar mesmo durante o outono. Estes mesmos autores afirmam que as sementes coletadas no final da primavera apresentaram teores mais elevados de proteínas e açúcares solúveis, enquanto teores menores destas substâncias de reserva foram encontrados em sementes coletadas no outono (VENTURI & RANDI, 1997a). No 'Fox Chase Cancer Center', vários estudos sobre o crescimento da planta, sua etnobotânica e outras características estão em andamento (VENKATESWARAN et al., 1987).

2. Propriedades farmacológicas

Como alguns dos outros membros da Família Euphorbiaceae, as espécies do gênero *Phyllanthus* apresentam compostos com relevantes atividades biológicas. Os resultados de

testes pré-clínicos realizados com extratos destas plantas têm demonstrado vários tipos de ações biológicas.

Estudos conduzidos pelos Departamentos de Química e Farmacologia da UFSC visando determinar as propriedades farmacológicas e os constituintes químicos das espécies de *Phyllanthus* demonstram a existência de uma pronunciada atividade antiespasmódica em extratos hidroalcoólicos de folhas, caules e raízes de *P. sellowianus* e *P. niruri* (RAE et al., 1984; CALIXTO et al., 1984 e 1987).

É também importante ressaltar os efeitos antivirais apresentados pelo gênero *Phyllanthus*, particularmente para as espécies *P. amarus* e *P. urinaria* (UNANDER, 1996). Na Filadélfia, no 'Fox Chase Cancer Center', têm sido realizados inúmeros testes para comprovar a ação contra o vírus da hepatite B (HBV) a partir de extratos, frações e compostos isolados de *P. amarus*. Estes estudos devem-se ao fato de algumas espécies apresentarem atividade contra o HBV (VENKATESWARARAM et al., THYAGARAJAN et al., BLUMBERG et al., apud UNANDER et al., 1990) e contra linhagens de células cancerígenas (PETTIT et al., 1990; UNANDER et al., 1994). Mais recentemente, LEE et al. (1996a) demonstraram que extratos de *P. amarus* inibem o vírus da hepatite B através da inibição da atividade da polimerase. No entanto, DOSHI et al. (1994) já haviam demonstrado que a administração de extratos de *P. amarus* inibia o antígeno HbsAg em pacientes infectados com o vírus da hepatite B. Efeitos antivirais também têm sido investigados em espécies de *P. myrtifolius* e *P. abnormis*. Algumas lignanas isoladas de *P. myrtifolius* demonstraram uma inibição na atividade de uma enzima relacionada ao vírus HIV (CHANG et al., 1995). Elagitaninos isolados desta espécie e de *P. urinaria* também apresentaram atividade contra a DNA polimerase do vírus EBV (Vírus da herpes) (LIU et al., 1999).

Como os resultados alcançados causaram muitas controvérsias, que podem estar relacionadas com as variações do material analisado, ou com as metodologias empregadas, CALIXTO et al. (1998) sugerem que novos testes pré-clínicos e clínicos devem ser realizados e controlados para demonstrar a efetiva ação destes extratos, pois algumas questões ainda necessitam de respostas adequadas, como por exemplo: a reavaliação dos resultados dos testes clínicos utilizando um número maior de pacientes, o que é necessário para provar a eficácia e possível efeito colateral; uma análise mais precisa do mecanismo de

ação dos princípios ativos; e uma avaliação da possível ação sinérgica dos princípios ativos presentes nas plantas antes que elas sejam usadas em práticas clínicas.

O extrato hidroalcoólico obtido de folhas, caules e raízes de *P. caroliniensis* e *P. corcovadensis* demonstrou ação antinociceptiva em diferentes modelos experimentais de dor em camundongos (GORSKI et al., 1993; CECHINEL FILHO et al., 1996a). Esta atividade foi confirmada pela ação de uma mistura de esteróides isolados de *P. corcovadensis* (SANTOS et al., 1995) e também por flavonóides e esteróis de *P. caroliniensis* (CECHINEL FILHO et al., 1996a). Ações antinociceptivas também têm sido demonstradas em extratos de calos produzidos por cultura 'in vitro' de algumas espécies de *Phyllanthus*, incluindo *P. tenellus*, *P. niruri*, *P. corcovadensis* e *P. urinaria* (SANTOS et al., 1994). Alguns constituintes químicos presentes nos extratos de calos, com atividade farmacológica, são flavonóides, taninos e fenóis, isolados e caracterizados através de HPLC (ISHIMARU et al., 1992; SANTOS et al., 1994; DE CAMPOS et al., 1996). MIGUEL et al. (1995b) demonstraram um efeito analgésico do extrato etanólico de *P. sellowianus* contra as contrações abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Muitas propriedades antinociceptivas têm sido identificadas em outras espécies de *Phyllanthus*. Estas propriedades encontram-se em ordem de intensidade decrescente nas seguintes espécies: *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. niruri*, *P. sellowianus*, *P. caroliniensis*, *P. fraternus* e *P. amarus* (CALIXTO et al., 1984 e 1997; GORSKI et al., 1993; SANTOS et al., 1995 e 1996).

Na Índia, outras espécies do gênero *Phyllanthus* estão sendo estudadas quanto ao seus efeitos farmacológicos. Algumas pesquisas foram desenvolvidas com as espécies de *P. debilis* e *P. amarus*, as quais demonstraram ser efetivas como hepatoprotetoras no tratamento de fígado de camundongos afetados por tetracloreto de carbono (SANE et al., 1995).

Efeitos hipoglicêmicos dos extratos de plantas do gênero *Phyllanthus* também foram detectados por testes farmacológicos realizados por HIGASHINO et al. (1992). Estes autores realizaram alguns testes com ratos diabéticos (diabetes induzida por estreptozotocina) e obtiveram uma redução de 50% da glicose no sangue destes animais quando tratados com extratos de *P. urinaria*.

Extratos de *P. emblica* e *P. amarus* inibiram significativamente a hepatocarcinogênese induzida por N-nitrosodietilamina (NDEA). As atividades dos extratos foram avaliadas por seus efeitos na incidência do tumor, pelos níveis de metabolismo enzimático cancerígeno, pelos níveis de marcadores de câncer de fígado e marcadores de injúrias no fígado. A morfologia do tecido do fígado e os níveis de marcadores enzimáticos indicaram que estes extratos ofereceram proteção contra a carcinogênese química (JEENA et al., 1999). Testes semelhantes foram realizados anteriormente com extratos de *P. amarus* por JOY & KUTTAN (1998), e nenhum dos animais utilizados nos testes desenvolveram o tumor durante um período de 32 semanas, após a indução do câncer hepático, enquanto que todos os animais do grupo-controle morreram.

As propriedades farmacológicas de compostos isolados de plantas do gênero *Phyllanthus* estão demonstradas na Tabela 1, recentemente atualizada pelo grupo de pesquisa dos Departamentos de Química e Farmacologia da UFSC com estas espécies.

Tabela1. Efeitos farmacológicos de compostos isolados de espécies de *Phyllanthus*

Espécies	Composto	Atividade farmacológica
<i>P. corcovadensis</i> , <i>P. caroliniensis</i> , <i>P. flexuosus</i> , <i>P. sellowianus</i>	Estigmasterol	Analgésica
<i>P. sellowianus</i> , <i>P. urinaria</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. emblica</i> , <i>P. orbiculatus</i> , <i>P. amarus</i>	Rutina	Antiinflamatória e analgésica
<i>P. urinaria</i> , <i>P. acidus</i> , <i>P. flexuosus</i>	β -amirina	Analgésica e antilipoxigenase
<i>P. sellowianus</i>	Ácido cafeico	Analgésica, antialérgica e bloqueadora da nitrosamina
<i>P. niruri</i> , <i>P. urinaria</i> , <i>P. emblica</i> , <i>P. reticulatus</i>	Ácido elágico	Inibidor da aldose redutase
<i>P. urinaria</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. caroliniensis</i> , <i>P. flexuosus</i>	Geranina	Inibidor da ACE, antialérgica e analgésica
<i>P. urinaria</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. caroliniensis</i> , <i>P. flexuosus</i>	Quercetina	Inibidor das enzimas: ATPase mitocondrial, da fosfodiesterase, da ciclooxigenase, da fosforilase e da tirosina kinase. Efeito mutagênico em bactérias. Analgésica
<i>P. niruri</i>	Niruside	Inibidor da transcriptase reversa do HIV-1
<i>P. myrtifolius</i>	Filamycina e Retrojusticidina	Inibidor da transcriptase reversa do HIV-1
<i>P. acuminatus</i> , <i>P. anisolbulus</i> , <i>P. verminatus</i>	Filostantin 1, 2 e 3	Antineoplásica
<i>P. flexuosus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. discoideus</i>	Filantina, Hipofilantina e Hirtetralina	Inibidor da transcriptase reversa do HIV-1, antihepatóxico, antagonista da endotelina
<i>P. corcovadensis</i> , <i>P. caroliniensis</i> , <i>P. flexuosus</i> , <i>P. reticulatus</i> , <i>P. sellowianus</i> , <i>P. muellerianus</i> , <i>P. emblica</i> , <i>P. watsonii</i> , <i>P. urinaria</i>	β -sitosterol	Analgésica e antiinflamatória

Fonte: CALIXTO et al.,1998.

3. Estudos fitoquímicos

As plantas do gênero *Phyllanthus* têm sido intensivamente estudadas do ponto de vista fitoquímico, o que tem resultado no isolamento e caracterização de muitas classes de compostos orgânicos de interesse medicinal incluindo os alcalóides, flavonóides, lactonas,

esteróides, terpenóides, lignanas, taninos entre outros (Tabela 2). Isto porque muitas espécies de *Phyllanthus*, incluindo *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. emblica* e *P. sellowianus*, produzem grande número de metabólitos secundários. Alguns destes compostos são mais abundantes neste gênero, como as lignanas, triterpenos, alcalóides e taninos, sendo que alguns deles já foram isolados e identificados, como os flavonóides quercetina e rutina (MIGUEL et al., 1995a), taninos como a geranina e a furosina (MIGUEL et al., 1996), benzenóides como o galato de metila e galato de etila (MIGUEL et al., 1995b), que apresentaram efeitos antinociceptivos em camundongos. Isto sugere que há uma possibilidade da existência de um efeito sinérgico entre algumas moléculas presentes nos extratos deste gênero (CALIXTO et al., 1998). Muitos desses compostos são conhecidos quimicamente, porém suas propriedades farmacológicas não estão ainda completamente determinadas.

As folhas e caules de *P. sellowianus* demonstraram a existência de um alcalóide com ação antiespasmódica, o qual foi denominado filantimida (TEMPESTA et al., 1988). Esta molécula foi utilizada como modelo para a síntese de análogos mais potentes (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Outros compostos identificados em extratos de raízes desta espécie foram triterpenos, que atualmente estão sendo investigados farmacologicamente (CECHINEL FILHO et al., 1998).

Pesquisas realizadas por MIGUEL et al. (1995b e 1996) levaram ao isolamento e identificação de elagitaninos (furosina e geranina) em *P. sellowianus*, que poderiam estar envolvidos, em parte, com a ação antinociceptiva já conhecida nesta espécie. Estes compostos demonstraram ser de 6 a 7 vezes mais potentes como analgésicos quando comparados com a aspirina e o acetaminofeno, respectivamente.

Estudos químicos conduzidos com o extrato etanólico de folhas, caules e raízes de *P. caroliniensis* demonstraram a presença de fitoesteróis, quercetina (flavonóide), ácido gálico (benzenóide) e geranina (tanino) nestes extratos (CECHINEL FILHO et al., 1996a).

Estudos fitoquímicos realizados com os extratos de *P. myrtifolius* e *P. abnormis* demonstraram a presença de lignanas em sua composição. Seis lignanas foram isoladas de *P. myrtifolius*, sendo que um dos compostos inibe a atividade da transcriptase reversa do vírus HIV-1 em 65% (LEE et al., 1996b). Outras duas lignanas pesquisadas por CHANG et al.

(1995), de *P. myrtifolius*, também demonstraram uma inibição na transcriptase reversa do vírus HIV .

Análises químicas realizadas por FOO (1995), de extratos das partes aéreas de *P. amarus*, levaram ao isolamento e identificação de um novo elagitanino denominado ácido amarínico, juntamente com outros compostos. Investigações sobre os constituintes químicos do extrato metanólico de *P. tenellus* levaram à identificação e elucidação de dois novos taninos ainda não relatados para a espécie. HUANG et al. (1998) comprovaram a ausência de lignanas nestes extratos.

Durante os estudos dos metabólitos secundários produzidos por *P. fraternus*, SITTIE et al. (1998) isolaram do extrato etanólico desta espécie uma grande quantidade de alcadienamidas, um grupo de produtos naturais com propriedade antimalárica.

Alguns compostos foram isolados de tecidos específicos da planta (folhas) e não da planta completa. Extratos de folhas de *P. amarus* apresentaram dois novos alcalóides em sua composição, que foram isolados e identificados, juntamente com outros alcalóides já conhecidos: phyllanthina, securinina e norsecurinina (HOUGHTON et al., 1996). Outro exemplo foi o isolamento e identificação do niruroidina, um alcalóide também isolado de folhas de *Phyllanthus*, neste caso de *P. niruroides* (BILA et al., 1996).

Outro aspecto de interesse, no que se refere ao estudo de plantas medicinais, é a utilização de compostos naturais ativos como modelo para a síntese de substâncias análogas, mais potentes e seletivas, que podem ser obtidas de forma fácil e talvez a custos menores. Muitos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em produtos naturais ativos (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Tabela 2. Constituintes químicos isolados de plantas do gênero *Phyllanthus*

Espécies	Classes de compostos
<i>P. acidus</i>	Triterpenos
<i>P. acuminatus</i>	Lignanas
<i>P. amarus</i>	Benzenóides, flavonóides e taninos
<i>P. anisobulos</i>	Lignanas
<i>P. caroliniensis</i>	Benzenóides, flavonóides, esteróides e taninos
<i>P. corcovadensis</i>	Benzenóides, monoterpénos e esteróis
<i>P. discoideus</i>	Alcalóides, lignanas e triterpenos
<i>P. emblica</i>	Alcalóides, benzenóides, cumarinas, diterpenos, flavonóides e esteróis
<i>P. engleri</i>	Poliprenóides e triterpenos
<i>P. flexuosus</i>	Benzenóides, cumarinas, esteróis, taninos e triterpenos
<i>P. maderaspatensis</i>	Lipídios
<i>P. muellerianus</i>	Esteróis e triterpenos
<i>P. myrtifolius</i>	Lignanas
<i>P. niruri</i>	Alcalóides, benzenóides, cumarinas, flavonóides, lignanas, lipídios, esteróis, taninos e triterpenos
<i>P. niruroidine</i>	Alcalóides
<i>P. orbiculatus</i>	Flavonóides
<i>P. reticulatus</i>	Benzenóides, cumarinas, esteróis e triterpenos
<i>P. sellowianus</i>	Alcalóides, acetofenóis, ácidos, benzenóides, cumarinas, flavonóides, triterpenos, esteróis e açúcares
<i>P. simplex</i>	Alcalóides
<i>P. urinaria</i>	Ácidos, benzenóides, cumarinas, esterés, flavonóides, fitatos, esteróis, taninos e terpenos
<i>P. verminatus</i>	Sesquiterpenos
<i>P. virgatus</i>	Lignanas e ácidos
<i>P. watsonii</i>	Esteróis e triterpenos

Fonte: CALIXTO et al., 1998.

4. Atividades biológicas

Algumas espécies de *Phyllanthus* demonstraram ser efetivas contra processos infecciosos, principalmente contra bactérias. Constatou-se que extratos aquosos de *P. emblica* apresentaram uma atividade antibacteriana 'in vitro' contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyphosa* e *Cândida albicans* (KHANNA & NAG, 1973). HAÏCOUR (1974) preparou extratos aquosos de calos de *P. urinaria* e de outros tecidos da planta para utilizar em ensaios de inibição de crescimento da *Bacillus subtilis* (causador de

diarreia), encontrando efeitos mais significativos quando utilizou extratos das folhas desta espécie. Em experimentos posteriores, determinou que as substâncias com efeito antibacteriano apresentavam características semelhantes aos taninos hidrolizáveis encontrados nos extratos da planta (HAICOUR, 1975). Resultados semelhantes foram obtidos por MORETTO et al. (1994) em extratos de *P. urinaria*. Estes extratos apresentaram uma atividade antibacteriana efetiva contra bactérias geralmente encontradas no trato urinário, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*.

5. Estudos clínicos

Alguns testes clínicos com pacientes já estão sendo realizados na Índia para confirmação dos efeitos diuréticos, hipotensivos e hipoglicêmicos de infusões de *P. amarus*. As infusões foram testadas por 10 dias em pacientes hipertensos, sendo que quatro deles também sofriam de diabetes mellitus. Observou-se uma redução significativa na glicose sanguínea e na pressão sistólica sanguínea, em pacientes não-diabéticos hipertensos. Estas observações indicam que *P. amarus* é um potente diurético, hipotensivo e hipoglicêmico (SRIVIDYA & PERIWAL, 1995).

No Brasil, alguns estudos foram realizados por SANTOS (1990), que investigou a ação do extrato aquoso de partes aéreas e raízes de *P. niruri* em pacientes com cálculo renal (5g por dia durante 45 dias). Os resultados obtidos foram muito parecidos com os estudos em ratos, sendo que após 45 dias um significativo número de pacientes apresentou resultados positivos quanto à eliminação dos cálculos.

Estudos em laboratório realizados por THYAGARAJAN et al. em 1988, demonstraram ações positivas de extratos aquosos de *P. amarus* ('in vitro' e 'in vivo') contra o vírus da hepatite B. Num primeiro estudo, estes autores demonstraram que a administração oral de extratos de *P. amarus* não provocou efeito tóxico nos pacientes. Posteriormente, os extratos de *P. amarus* foram efetivos na redução do antígeno em 59% dos indivíduos tratados, comparados com 4% do controle. Dez anos depois, UNANDER (1998) questionou os efeitos dos extratos das espécies de *Phyllanthus* como antivirais (HBV) e sugeriu alguns aprofundamentos nestes estudos, levando em consideração alguns aspectos,

como por exemplo a influência de fatores ambientais e genéticos das plantas do gênero *Phyllanthus* sobre os efeitos antivirais, o estudo dos extratos contra outros vírus de hepatite, como o vírus da hepatite A e a determinação dos efeitos psicossomáticos sobre os pacientes estudados. Este autor também sugere que os dados obtidos até o momento não são efetivos para apoiar o uso da planta na cura da hepatite B crônica, mas que se deve considerar a presença de alguma atividade biológica nestas plantas.

Estudos realizados por UNANDER et al. (1995) sugerem que algumas espécies do gênero *Phyllanthus* podem apresentar atividade contraceptiva e abortiva. Uma possível existência de efeito para indução do aborto é importante, para alertar a população contra algumas recomendações com relação ao uso de remédios caseiros.

Diversos registros a respeito do uso das espécies de *Phyllanthus* para tratamento de espasmos intestinais, contrações menstruais e uterinas, na pressão sanguínea e no relaxamento muscular estão disponíveis na literatura (CALIXTO et al., 1984; UENO et al., 1988 e CALIXTO et al., 1998).

6. Biotecnologia

Segundo UNANDER (1996), poucos estudos têm sido desenvolvidos até o momento sobre cultura de tecidos de espécies de *Phyllanthus*. Na Tabela 3 estão indicados os trabalhos realizados com extratos de calos destas plantas.

KHANNA & STABA (1968) estabeleceram cultura de calos a partir de plantas de *P. emblica* produzidas 'in vitro' através da germinação de sementes. Para a produção dos calos os autores utilizaram o meio de cultura MS suplementado com 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D, e as culturas cresceram em condições de luz natural a uma temperatura de 26°C.

HAÏCOUR (1974) desenvolveu cultura de calos de folhas, caules e raízes de *P. urinaria* utilizando o meio MS suplementado com 0.1 mg.l⁻¹ de NAA, 0.1 mg.l⁻¹ de cinetina e 8% de água de coco. Neste processo as culturas foram mantidas a 28°C em fotoperíodo de 16 horas.

UNANDER (1991) induziu formação de calos de *P. amarus*, *P. abnormis* e *P. urinaria* a partir de segmentos esterilizados retirados das plantas cultivadas em casa de vegetação. A indução e crescimento dos calos realizou-se numa temperatura de 28°C sob

luz contínua. Este mesmo autor comparou meios de cultura de várias combinações para otimizar a produção dos calos e obteve melhores resultados com o meio MS modificado, suplementado com 1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D ou IBA em combinação com 0.5 a 1.0 mg.l⁻¹ de BAP. A adição de cálcio no meio de cultura, testado devido ao ambiente calcário no qual se encontram as espécies do gênero *Phyllanthus*, ou a substituição de IBA por 2,4-D, não demonstrou efeito significativo na massa de calos produzida. Experimentos posteriores confirmaram um crescimento máximo dos calos quando a taxa de proporção auxina:citocinina foi mantida em 1:1. Os extratos aquosos de plantas mantidas no campo foram mais ativos 'in vitro', contra a DNA polimerase viral e a transcriptase reversa, do que os extratos dos calos. Os testes com *P. caroliniensis* indicaram dificuldades na indução de calos, e nenhuma resposta foi obtida com *P. myrtifolius*, *P. debilis* e *P. mimicus* (subgênero *Phyllanthus*) ou *P. arbuscula* (subgênero *Xylophylla*).

ISHIMARU et al. (1992) produziram calos e realizaram a transformação de raízes com *Agrobacterium rhizogenes* e *A. tumefaciens* em *P. niruri*. As fontes de explante para a realização dos experimentos foram segmentos de caule retirados de plantas germinadas assepticamente em meio sólido MS/2 suplementado com 30 g.l⁻¹ de sacarose. As culturas de raízes transformadas foram mantidas no escuro em meio MS/2 líquido, desprovido de reguladores de crescimento, em agitador horizontal rotatório. As análises fitoquímicas dos calos, de cultura de raízes e de plantas demonstraram a presença de ácido gálico, catecol e de cinco compostos fenólicos. As quantidades de compostos fenólicos produzidos em cultura de raízes não transformadas foram menores do que em cultura de raízes transformadas (0.05% do peso seco).

MORENO (1993) iniciou e manteve cultura de calos a partir de segmentos nodais e de folhas de *P. tenellus*, *P. corcovadensis* e *P. niruri* em meio MS suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose, 2,4-D, IBA, IAA e NAA nas concentrações de 2, 4 e 8 mg.l⁻¹. As culturas foram mantidas a 25°C em fotoperíodo de 16 h. Melhores resultados, em termos de incremento de peso fresco nos calos, para as três espécies estudadas, foram obtidos através da utilização de segmentos nodais como explantes e de meios suplementados com IBA a 4.0 mg.l⁻¹. As citocininas (Cinetina, 2iP e BAP) também foram testadas com este propósito, mas não apresentaram resultados tão relevantes quanto os obtidos com as auxinas para *P. tenellus*, *P. corcovadensis* e *P. niruri*. Nesse mesmo trabalho foi comprovada a eficiência

do meio MS sobre os meios AR, B, K, WPM, S e W em relação à indução e crescimento dos calos para a espécie de *P. tenellus*. SANTOS et al. (1994) realizaram análises fitoquímicas e farmacológicas dos extratos metanólicos dos calos destas três espécies de *Phyllanthus* cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D, IBA e IAA nas concentrações de 2, 4 e 8 mg.l⁻¹ e determinaram, através de análises cromatográficas (HPLC e CCD), a presença de compostos fenólicos e a ausência de alcalóides e flavonóides nos extratos dos calos. Os testes farmacológicos indicaram similar e potente atividade analgésica nos extratos metanólicos dos calos de *P. tenellus*, *P. corcovadensis* e *P. niruri*.

SILVA (1995) estabeleceu técnicas para a multiplicação de ramos 'in vitro' em *P. tenellus*, *P. corcovadensis*, *P. niruri* e *P. urinaria* e para a produção de calos em *P. urinaria*. As citocininas BAP, cinetina e 2iP foram testadas na multiplicação de ramos e 2,4-D, NAA, IAA e IBA na indução e crescimento de raízes e de calos nas concentrações de 0.25, 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹ respectivamente. Diferentes meios de cultura foram testados na multiplicação de ramos em *P. tenellus* e indicaram variações significativas na formação múltipla de ramos nas diferentes espécies estudadas. O BAP 0.25 mg.l⁻¹ foi eficiente na multiplicação de ramos de *P. tenellus* e *P. niruri*, o 2iP 0.25 mg.l⁻¹ e a cinetina 1.0 mg.l⁻¹ foram eficientes na multiplicação de ramos de *P. corcovadensis* e *P. urinaria* respectivamente. Além disto, os efeitos das auxinas IBA, NAA e 2,4-D no enraizamento de *P. corcovadensis* e *P. urinaria* também foram testados, demonstrando a superioridade do NAA em aumentar o número de raízes produzidas e sua capacidade de indução em ambas as espécies. Quanto à produção de calos em *P. urinaria*, as concentrações de 4 e 8 mg.l⁻¹ de IBA foram mais eficientes na indução e crescimento dos mesmos.

SARADHI & ISLAMIA (1997) estabeleceram alguns procedimentos para a micropropagação de *P. fraternus* utilizando segmentos nodais como explante. As plantas foram cultivadas em meio B5 suplementado com 4.4x10⁻⁶, 4.4x10⁻⁵ e 4.4x10⁻⁴ mg.l⁻¹ de BAP ou cinetina. A presença de BAP no meio de cultura promoveu a formação múltipla de ramos, obtendo-se em torno de 14-16 ramos por explante durante um período de 28 dias de cultivo em 4.4x10⁻⁴ mg.l⁻¹ de BAP. O enraizamento das plantas foi obtido em meio B5/2 suplementado com 4.4x10⁻⁵ mg.l⁻¹ de IBA. O estabelecimento das condições de cultura adequadas para a formação múltipla de ramos é importante para a multiplicação de

genótipos com altos níveis de princípios ativos e potencial terapêutico e de alto valor comercial.

Tabela 3- Resumo dos trabalhos realizados com os metabólitos secundários produzidos por culturas 'in vitro' de calos e raízes de espécies de *Phyllanthus*.

Espécies	Explante	Observações	Referências
<i>P. emblica</i>	Plantas obtidas a partir da germinação de sementes	Extração de taninos e de galato de etila dos calos com efeito antibacteriano	KHANNA & NAG (1973)
<i>P. urinaria</i>	Folhas, caules e raízes	Extratos aquosos de calos inibiram o crescimento de bactérias	HAÏCOUR (1974)
<i>P. amarus</i>	Segmentos de caule	Extratos aquosos de calos inibiram a DNAP viral e a transcriptase reversa	UNANDER (1991)
<i>P. abnormis</i> e <i>P. urinaria</i>	Segmentos de caule	Extratos aquosos de calos inibiram a DNAP viral	UNANDER (1991)
<i>P. niruri</i>	Segmentos de caule, raízes transformadas e não transformadas	Extrato metanólico dos calos e das raízes transformadas permitiu o isolamento de ácido gálico e outros compostos fenólicos	ISHIMARU et al. (1992)
<i>P. tenellus</i> , <i>P. niruri</i> e <i>P. corcovadensis</i>	Segmentos de caule	Extrato metanólico dos calos apresentou compostos fenólicos e açúcares e demonstrou atividade analgésica	SANTOS et al. (1994)
<i>P. fraternus</i>	Segmentos nodais	Extratos aquosos das plantas demonstraram inibição da DNAP viral	SARADHI & ISLAMIA (1997)

Fonte: UNANDER, D. W., 1996. (modificada)

CAPÍTULO II

CULTIVO 'IN VITRO' DE *Phyllanthus caroliniensis* (EUPHORBIACEAE)

1. Introdução

O *P. caroliniensis* (Euphorbiaceae), por suas propriedades antibacteriana, diurética e laxativa, é utilizado na medicina popular para o tratamento de bronquite, febre e diabetes (UNANDER et al., 1990 e 1991).

CECHINEL FILHO et al. (1996a) determinaram a presença de flavonóides (Quercetina), taninos (Geranin) e esteróides (β -sitosterol, stigmasterol e campesterol) nos extratos de *P. caroliniensis*. Estes compostos podem ser responsáveis por ações analgésicas e antiinflamatórias apresentadas em testes farmacológicos realizados com extratos desta espécie (SANTOS et al., 1995; MIGUEL et al., 1996; CECHINEL FILHO et al., 1996b).

Poucos estudos desenvolvidos sobre cultura de tecidos de *P. caroliniensis* indicaram dificuldades na indução de calos, e o desenvolvimento de técnicas adequadas para tal seria interessante, pois poderia viabilizar investigações mais detalhadas com relação à otimização da produção de compostos secundários por esta espécie (UNANDER et al., 1991 e 1996). O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos de cultivo 'in vitro' de *P. caroliniensis* que possam ser utilizados na multiplicação em larga escala e nas análises fitoquímicas e farmacológicas para a detecção de seus princípios ativos e determinação das respectivas ações biológicas.

2. Material e métodos

Segmentos nodais (0.8-1.2 cm), utilizados nos experimentos de indução de ramos e de calos, e segmentos de raízes contendo os ápices (3-4cm), utilizados nos experimentos de cultura de raízes, foram obtidos a partir de plantas axênicas de *P. caroliniensis* com 30-40 dias de idade. Estas plantas foram cultivadas em meio Murashige & Skoog (MS, Sigma Co., USA), suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 2 g.l⁻¹ de fitagel (Phytigel, Sigma Co., USA), e mantidas a 25°C em fotoperíodo de 16h provido por lâmpadas fluorescentes Philips LD (22.3 $\mu\text{mol fotons.s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$).

Nos experimentos para testar os efeitos isolados dos reguladores de crescimento na indução de ramos e formação de calos, NAA, 2,4-D, IAA, IBA, BAP, 2iP ou cinetina foram adicionados ao meio MS suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 6 g.l⁻¹ de agar (Agar Type, Sigma Co.), nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ou 8.0. Para avaliar os efeitos de diferentes formulações salinas na micropropagação, os meios MS, B5 (GAMBORG et al., 1968) AR (ANDERSON, 1978), W (WHITE, 1963), S (SCHENK & HILDEBRANDT, 1972), K (KAO & MICHAYLUK, 1975) e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981) foram suplementados com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP. Para a iniciação de cultura de raízes os segmentos de raízes foram inoculados em frascos erlenmeyers de 125 ml contendo alíquotas de 20 ml de meio MS líquido suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 0.2 mg.l⁻¹ de NAA. Em todos os casos os valores do pH dos meios de cultura foram ajustados para 5.8, com NaOH 0.1M ou HCl 0.1N, antes da distribuição em tubos de ensaio de 20 x 150 mm, no caso dos meios sólidos, e autoclavagem a 121°C por 18 minutos.

Os experimentos de indução de ramos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa já mencionadas, e os de indução de calos foram mantidos na ausência de luz. Foram utilizadas 30 repetições por tratamento. Após 50 dias as culturas foram avaliadas com relação às frequências das respostas morfogênicas apresentadas, tais como formação de ramos, raízes, flores e/ou calos, e quanto aos seguintes parâmetros: peso da matéria fresca total das culturas, peso da matéria fresca dos calos, número de ramos principais, número de ramos laterais, número de ramos totais, comprimento do ramo principal, número de nós, comprimento da raiz principal e número de raízes. A análise da dinâmica do enraizamento das microestacas em meio desprovido de reguladores de crescimento foi conduzida durante 40 dias, e em intervalos periódicos de quatro dias as culturas foram avaliadas com relação à frequência de enraizamento e ao número de raízes formadas. As culturas de raízes foram mantidas a 25°C no escuro, em agitador rotatório horizontal a 100 r.p.m. Os valores dos pesos da matéria fresca das raízes foram avaliados após 30, 45 e 60 dias e foram utilizadas três repetições por tratamento.

A aclimação de plantas completas, produzidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, foi realizada após 30 dias, ocasião em que foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas em água destilada para remoção do agar e tiveram os ramos principais reduzidos, de forma a conter apenas duas gemas axilares por planta. Em seguida foram

transferidas para bandejas de plástico de 150x250x50 mm, contendo areia esterilizada e cobertas com filme de PVC perfurado. Após a primeira semana foram gradualmente expostas à atmosfera com 70% de umidade relativa e depois de 20 dias foram transferidas para copos plásticos de 250 ml contendo mistura de areia e terra não esterilizadas, na proporção de 1:1 (v.v). As culturas foram mantidas nas mesmas condições utilizadas para os estudos de cultivo 'in vitro'. Foram utilizadas três repetições com 12 plantas cada. As plantas foram avaliadas periodicamente durante nove semanas quanto à frequência de sobrevivência, de floração, comprimento da parte aérea e número de ramos.

As diferenças entre os valores das médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) com um fator e pelo teste-t. A separação das médias foi realizada pela DMS ou pelo teste-t de Tukey ao nível de significância de 5% (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

3. Resultados

3.1. Indução de ramos

3.1.1. Efeito de citocininas

Os efeitos das citocininas na morfogênese de segmentos nodais de *P. caroliniensis* são apresentados na Tabela 1. Em todos os tratamentos a indução de calos foi inibida e ramos foram induzidos, mas efeitos diversificados das citocininas com relação às respostas morfológicas de floração e indução de raízes podem ser observados. O BAP inibiu completamente a formação de raízes nos explantes em relação à cinetina e 2iP, que apresentaram raízes em cerca de 86-100% das culturas. A formação de flores foi observada nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹ de cinetina, em cerca de 26.6 % e 3% das culturas, respectivamente, e de 0.25 mg.l⁻¹ de 2iP, em 6.7% das culturas. O padrão de formação de ramos laterais parece ter sido estimulado nos tratamentos com BAP a 1.0 mg.l⁻¹, cinetina a 0.25 e 2iP a 0.25-1.0 mg.l⁻¹, em pelo menos 70% das culturas.

Os dados apresentados na Tabela 2 indicam que o BAP, cinetina e 2iP foram eficientes em promover a multiplicação de ramos, uma vez que induziram o aumento

significativo do número total de nós produzidos por explante (Figura 1_{CapII} A). Por outro lado inibiram o crescimento em comprimento dos ramos produzidos além de inibirem e/ou reduzirem o crescimento das raízes em relação ao controle. As diferentes concentrações de BAP testadas não produziram diferenças estatísticas significativas nos valores de pesos frescos das culturas; no entanto, os números de ramos produzidos por explante, em todas as concentrações, foram significativamente maiores que o controle, sendo em média de 4.2 ramos na concentração de 1.0 mg.l⁻¹. O crescimento em comprimento destes ramos diminuiu significativamente na presença de BAP, mas as concentrações de 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ promoveram significativamente o número total de nós por explante, ao redor de 21. A concentração de 1.0 mg.l⁻¹ de cinetina e 2iP promoveram a formação de 5.2 e 4.5, ramos por explante, respectivamente, apesar de estes valores não serem significativos em relação ao controle, e apresentaram um efeito inibitório crescente no comprimento dos ramos à medida que as concentrações foram aumentadas, atingindo a inibição máxima na concentração de 1.0 mg.l⁻¹. O efeito promotor destas citocininas, com relação ao número total de nós produzidos por explante, em todas as concentrações testadas, foi equivalente ao verificado com a aplicação de BAP a 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹, ao redor de 20-23. A cinetina e o 2iP inibiram o desenvolvimento do sistema radicular das culturas através da redução drástica do número de raízes formadas por explante e da inibição do seu crescimento em quase 50%, principalmente na concentração de 1.0 mg.l⁻¹ quando comparadas ao controle.

Resultados semelhantes foram obtidos por SILVA (1995), o qual demonstrou a eficiência do BAP na concentração de 0.25 mg.l⁻¹ na multiplicação de ramos em *P. niruri*. MONIER & OCHATT (1995) também obtiveram ótimos resultados na multiplicação de ramos em meio MS suplementado com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP em cinco diferentes genótipos de *Cotoneaster* (planta ornamental comercialmente importante na França). O BAP também inibiu a formação de raízes, da mesma forma que em *P. caroliniensis*, sendo necessária a suplementação de auxinas ao meio para posterior aclimatação das plantas.

Tabela 1. Efeito de citocininas na frequência (%) de respostas morfogênicas de segmentos nodais de *Phyllanthus caroliniensis* cultivados 'in vitro'. Dados obtidos de 30 repetições.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Ramos laterais	Raízes	Flores	Calos
BAP	0.00	100	30	100	0	0
	0.25	100	50	0	0	0
	0.50	100	50	0	0	0
	1.00	100	76.6	0	0	0
CIN	0.00	100	53.3	93.3	0	0
	0.25	100	70	100	0	0
	0.50	100	63.3	93.3	26.6	0
	1.00	100	60	86.6	3.0	0
2iP	0.00	100	63.3	100	0	0
	0.25	100	70	90	6.7	0
	0.50	100	70	90	0	0
	1.00	100	80	93	0	0

Tabela 2. Efeito de citocininas na micropropagação de *Phyllanthus caroliniensis* a partir de segmentos nodais.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco das cultura (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
BAP	0.00	^z 87.16a	2.76b	4.78a	12.90b	4.35	2.59
	0.25	74.93a	3.80a	2.38b	16.20b	*	*
	0.50	89.50a	3.60a	2.49b	21.00a	*	*
	1.00	75.80a	4.20a	2.21b	22.56a	*	*
CIN	0.00	95.66a	3.30b	6.58a	12.82b	3.82a	2.78a
	0.25	125.63a	4.70ab	5.05b	23.63a	1.96b	2.16b
	0.50	113.90a	4.50ab	3.88c	20.46a	2.14b	2.07b
	1.00	121.70a	5.20a	2.86d	20.10a	1.52b	1.92b
2iP	0.00	86.23b	3.27b	6.34a	12.75c	3.18a	2.66a
	0.25	105.40ab	3.86ab	3.87b	17.63b	1.71b	2.44ab
	0.50	115.36a	4.46a	3.68bc	21.40a	1.44b	2.03bc
	1.00	92.93ab	4.56a	2.90c	21.70a	1.66b	1.92c

^zValores (N = 30) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

*Tratamentos que não formaram raízes.

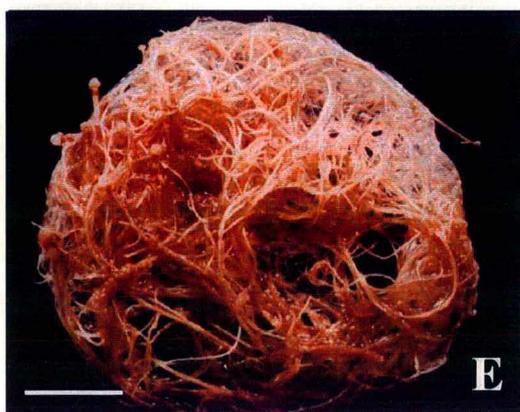
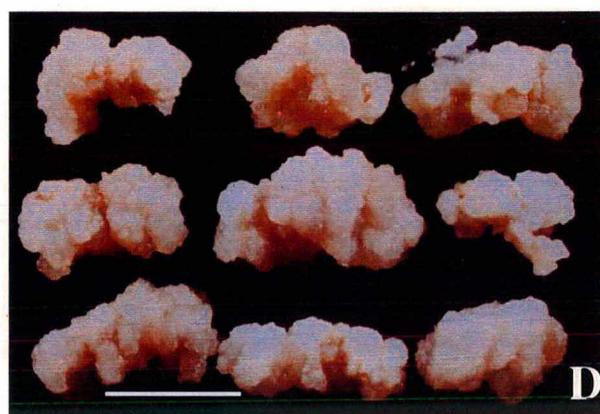
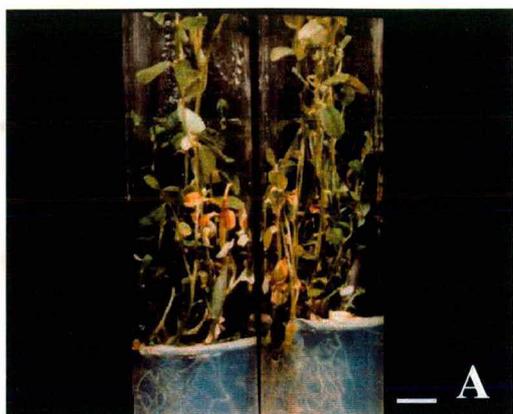


Figura 1_{Cap II}. Cultura de ramos de *P. caroliniensis* iniciadas a partir de segmentos nodais em meio MS (A). Plantas aclimatadas (B). Flores em plantas aclimatadas (C). Calos produzidos a partir de segmentos de caule em meio MS suplementado com 1.0 mg.l^{-1} de 2,4-D (D). Raízes produzidas a partir de segmentos de ápices de raízes em meio MS suplementado com 0.2 mg.l^{-1} de NAA (E). Barras = 1 cm.

3.1.2. Efeito de meios de cultura

Os efeitos das diferentes formulações de meios de cultura na morfogênese dos segmentos nodais apresentados na Tabela 3 indicam que 100% dos explantes, em todos os meios testados, formaram ramos. Apenas os meios de cultura B5 e S propiciaram a formação de calos em 50% e 43% dos explantes e a indução de raízes ocorreu em 11% dos explantes cultivados no meio MS. Os meios B5, S e W reduziram significativamente o crescimento dos explantes em termos do número total de ramos produzidos, dos comprimentos dos ramos principais e do número total de nós originados, de forma similar ao MS/2 (Tabela 4). As formulações salinas efetivas na indução e multiplicação de ramos foram MS, K, WPM e AR, uma vez que induziram de 4-6 ramos/explante, contendo de 12-22 nós em 45 dias, entretanto os meios WPM e K apresentaram alta taxa de mortalidade (50%, dados não apresentados) e redução no desenvolvimento dos ramos respectivamente, destacando-se a eficiência dos meios MS e AR. A redução, pela metade, da concentração salina do meio MS provocou redução drástica no crescimento, sendo de 47% no número total de ramos, de 67% no comprimento dos ramos principais e de 56% no número de nós por planta (Tabela 4). CARDOSO & OLIVEIRA (1996) testaram alguns meios de cultura para iniciar o cultivo de calos em *Hypericum brasiliense*, dentre eles, o meio B5 promoveu significativamente o desenvolvimento dos mesmos, porém para a multiplicação dos ramos utilizou-se o meio MS.

Tabela 3. Efeito de meios de cultura suplementados com 1 mg.l⁻¹ de BAP na frequência (%) de respostas morfológicas de segmentos nodais de *Phyllanthus caroliniensis*. Dados obtidos de pelo menos 10 repetições.

Meios	Ramos	Ramos laterais	Raiz	Calos	Plantas normais	Peso fresco de calo (mg)
MS	100	100	11	0	11	*
B5	100	77.77	0	50	0	68.20a
S	100	85.71	0	43	0	102.00a
W	100	100	0	0	0	*
K	100	100	0	0	0	*
WPM	100	44.44	0	0	0	*
AR	100	100	0	0	0	*
MS/2	100	85.71	0	0	0	*

Valores (N 10-20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

*Tratamentos que não formaram calos.

Tabela 4. Efeito de meios de cultura suplementados com 1 mg.l⁻¹ de BAP na micropropagação de *Phyllanthus caroliniensis* a partir de segmentos nodais.

Meios	Peso fresco das culturas (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
MS	^z 108.00a	6.55a	2.38a	22.00a	15.00	20.00
B5	13.14b	2.71b	0.82b	9.57bc	*	*
S	21.28b	2.71b	1.90ab	8.28c	*	*
W	8.75b	2.00b	1.00b	5.50c	*	*
K	45.50b	4.80ab	0.95b	13.90abc	*	*
WPM	35.80b	4.60ab	1.80ab	12.60abc	*	*
AR	41.33b	6.44a	1.77ab	18.88ab	*	*
MS/2	22.57b	3.42ab	0.78b	9.57bc	*	*

^zValores (N= 10-20) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

*Tratamentos que não formaram raízes.

3.2. Enraizamento de microestacas

As respostas morfogênicas induzidas pelas auxinas 2,4-D, IBA, NAA e IAA em segmentos nodais de *P. caroliniensis* estão apresentadas na Tabela 5. O 2,4-D e o NAA induziram a formação de calos em 100% das culturas, e inibiram e/ou reduziram drasticamente a formação de ramos principais e/ou laterais e as freqüências de culturas com raízes, apresentando efeitos opostos ao IAA e ao IBA. A floração foi completamente inibida pelo 2,4-D, em todas os tratamentos, ou reduzida pelo menos a 50% pelo IAA, nas concentrações de 0.25, 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹ e pelo NAA, a 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹. Os pesos frescos médios dos calos induzidos com o 2,4-D e o NAA aumentaram significativamente com o aumento da concentração testada, atingindo, com 1.0 mg.l⁻¹, valores ao redor de 718 mg e 258 mg, respectivamente, o que indica a eficiência do 2,4-D no processo.

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam que as auxinas não promoveram significativamente o desenvolvimento da parte aérea das plantas originadas 'in vitro'. O NAA, em todas as concentrações, inibiu o número total de ramos por planta, o comprimento do ramo principal em pelos menos 66%, e o número total de nós, de 12.79 no controle para valores abaixo de 6.7, dependendo da concentração testada. O IBA e o IAA, exceto na concentração 1.0 mg.l⁻¹, não reduziram significativamente o número total de ramos produzidos e não inibiram a produção de nós, mas apresentaram, em determinadas concentrações, efeito inibitório no crescimento do ramo principal. Em termos do crescimento do sistema radicular, tanto o NAA na concentração de 0.25 mg.l⁻¹ como o IAA promoveram a indução de um número maior de raízes por explante, entretanto inibiram, da mesma forma que o IBA, o seu crescimento. Nos tratamentos com IAA, a média do número de raízes formadas em todas as concentrações testadas foi superior a 3.0 e a taxa de indução em torno de 94% (Tabela 5). Todas as concentrações de IBA testadas não foram significativas em promover o aumento de número de raízes, apesar de as taxas de enraizamento estarem acima de 75%. O NAA na concentração de 0.25 mg.l⁻¹ foi eficiente em aumentar o número de raízes em relação ao controle, produzindo em média de 4.18 raízes/explante, mas a taxa de indução foi apenas de 50% e nas demais concentrações inibiu completamente a indução de raízes.

Desta forma, entre as auxinas testadas apenas o IBA e o IAA, em todas as concentrações, induziram a formação de plantas completas em taxas médias que variaram

de 70-100% das plantas. YUAN et al (1994) testaram várias auxinas e citocininas na multiplicação de ramos de *Catharanthus roseus* e obtiveram resultados semelhantes, nos quais os meios suplementados com 2,4-D, inibiram a formação de ramos e promoveram a formação de calos.

Na ausência de reguladores de crescimento, as microestacas de *P. caroliniensis* iniciaram a formação de raízes a partir de oito dias do início do experimento, atingindo valores médios superiores a 60% na taxa de enraizamento a partir do 28º dia de cultivo, e a taxa média máxima de enraizamento de 84% ao redor de 40-48 dias (Tabela 7, Figura 2). O número médio máximo de raízes formadas por planta aumentou progressivamente em função do tempo aumentando de 1.04 ± 0.2 , por volta da terceira semana de cultivo para 2.66 ± 0.4 , na sexta semana (Tabela 8, Figura 3).

3.3. Aclimação

A porcentagem de sobrevivência das microplantas foi de 100%, durante o período inicial de aclimação de três semanas, permanecendo neste valor por duas semanas após a transferência para os copos plásticos contendo a mistura de areia e solo (Figura 1_{CapII} B). A partir da sexta semana de cultivo a porcentagem média de sobrevivência diminuiu para 88.8%, e para 86% na nona semana (Tabela 9). É importante ressaltar que entre os três experimentos realizados, em pelo menos dois deles as porcentagens finais de sobrevivência estiveram ao redor de 91% (Figura 4). A floração ocorreu em média em 30.5 % das microplantas e a partir da terceira semana após iniciado o processo de aclimação, período em que se encontravam em condição de alta umidade relativa (Figura 1_{CapII} C). A partir da quinta semana a porcentagem média de floração aumentou para 38.9%, atingindo 68.2% na sexta semana e 100% após 9 semanas (Tabela 10, Figura 5). O crescimento inicial das microplantas nas três primeiras semanas de aclimação foi lento, de maneira que em média apresentaram 2.13 ± 0.07 cm de altura e 7.47 ± 0.49 folhas. Entretanto, nas seis semanas seguintes estes valores aumentaram para 20.2 ± 2.9 com relação à altura e 10 ± 1.3 ramos foram produzidos, o que significou um incremento de 89% em altura (Tabela 11).

Tabela 5. Efeito de auxinas na frequência (%) de respostas morfogênicas em segmentos nodais de *Phyllanthus caroliniensis*. Dados obtidos a partir de 24 repetições.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Ramos laterais	Raízes	Flores	Calos	Plantas normais	Peso fresco de calo (mg)
2,4-D	0.00	100	45.83	91.67	58.33	0	91.67	*
	0.25	0	0	0	0	100	0	^z 308.56c
	0.50	0	0	0	0	100	0	510.38b
	1.00	0	0	0	0	100	0	718.35a
IBA	0.00	100	45.83	91.67	58.33	0	91.67	*
	0.25	100	86.36	72.72	90.90	0	72.72	*
	0.50	100	66.67	79.16	70.83	0	79.16	*
	1.00	100	91.67	87.50	54.17	0	87.50	*
NAA	0.00	100	45.83	91.67	58.33	0	91.67	*
	0.25	100	8.69	47.82	43.47	100	0	66.29c
	0.50	100	10.52	0	5.26	100	0	214.37b
	1.00	100	25.00	6.25	0	100	0	258.00a
IAA	0.00	100	45.83	91.67	58.33	0	91.67	*
	0.25	100	66.67	100	25.00	0	100	*
	0.50	100	63.63	100	16.63	0	100	*
	1.00	100	54.45	95.45	18.18	0	95.45	*

^z Valores (N = 24) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

*Tratamentos que não formaram calos.

Tabela 6. Efeito de auxinas na micropropagação de *Phyllanthus caroliniensis* a partir de segmentos nodais.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco das culturas (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
2,4-D	0.00	35.54	1.91	4.22	12.79	5.38	2.50
	0.25	*	*	*	*	*	*
	0.50	*	*	*	*	*	*
	1.00	*	*	*	*	*	*
IBA	0.00	^z 35.54a	1.91a	4.22a	12.79a	5.38a	2.50a
	0.25	31.50ab	2.27a	3.68ab	13.33a	3.65b	2.68a
	0.50	27.58ab	2.04a	3.33b	11.75a	3.05b	2.63a
	1.00	26.25b	2.16a	3.56ab	12.41a	2.90b	2.09a
NAA	0.00	35.84a	1.91a	4.22a	12.79a	5.38a	2.50b
	0.25	13.08b	1.08b	2.80b	6.78b	1.13b	4.18a
	0.50	9.78b	1.10b	2.13c	5.42b	*	*
	1.00	6.87b	1.31b	1.65c	5.31b	*	*
IAA	0.00	35.54ab	1.91ab	4.22a	12.79a	5.38a	2.50b
	0.25	40.75a	1.95ab	4.33a	14.91a	4.61ab	3.90a
	0.50	41.13a	2.27a	3.72a	14.77a	5.77a	3.87a
	1.00	28.18b	1.59b	3.86a	12.45a	3.61b	3.57a

^z Valores (N = 24) seguidos pela da mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

*Tratamentos que não formaram raízes e/ou ramos.

Tabela 7. Frequência (%) de enraizamento de microestacas de *Phyllanthus caroliniensis* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento durante 48 dias. Dados obtidos de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)							
	0	4	8	16	24	32	40	48
1	0	0	6.67	20.00	40.00	66.60	93.30	93.30
2	0	0	13.30	13.30	53.30	66.60	86.60	93.30
3	0	0	0	6.67	33.30	66.60	66.60	66.60
Média±DP	0	0	6.65±6.6	13.3±6.6	42.2±10.2	66.6±0	82.1±13.8	84.4±15.4

Tabela 8. Número de raízes produzidas por microestaca de *Phyllanthus caroliniensis* durante 48 dias. Médias de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)							
	0	4	8	16	24	32	40	48
1	0	0	0.06	0.26	1.13	1.93	2.93	3.06
2	0	0	0.13	0.40	1.20	1.46	2.06	2.66
3	0	0	0	0.06	0.80	1.53	2.20	2.66
Média±DP	0	0	0.06±0.06	0.24±0.1	1.04±0.2	1.64±0.2	2.39±0.4	2.66±0.4

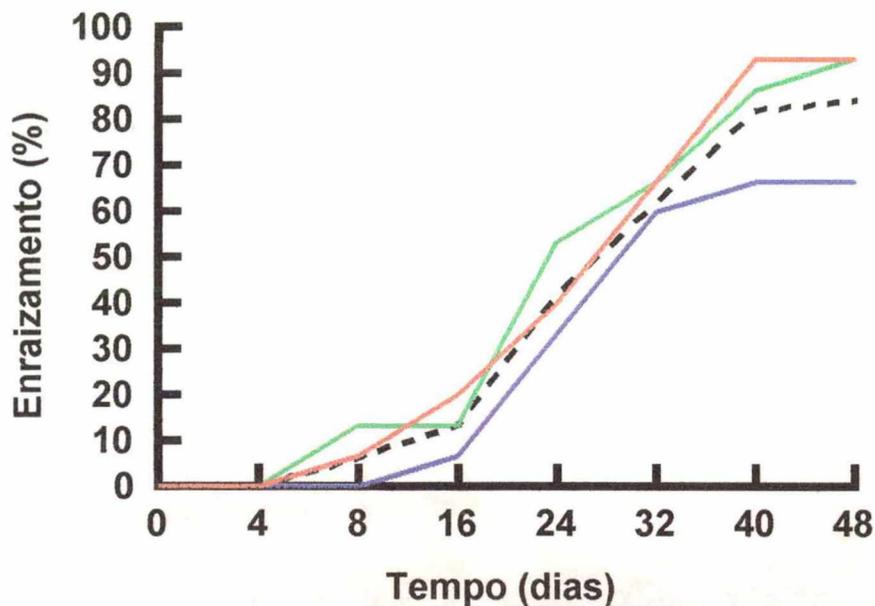


Figura 2. Enraizamento 'in vitro' de microplantas de *Phyllanthus caroliniensis* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados da média de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

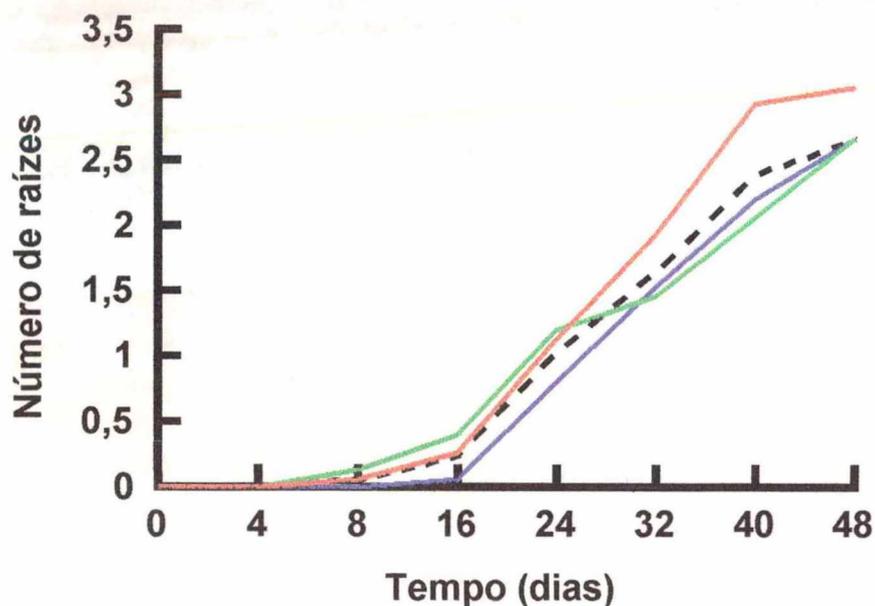


Figura 3. Número de raízes formadas 'in vitro' por microplanta de *Phyllanthus caroliniensis* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são as médias dos resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 9. Frequência (%) de sobrevivência 'ex vitro' de plantas micropropagadas de *Phyllanthus caroliniensis* durante 9 semanas. Dados de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	100	100	100	100	75	75	75	75
2	100	100	100	100	100	100	100	91.6	91.6
3	100	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6
Média±DP	100	100	100	100	100	88.8±12	88.8±12	86±9.5	86±9.5

Tabela 10. Frequência (%) de floração 'ex vitro' de plantas micropropagadas de *Phyllanthus caroliniensis* durante nove semanas. Dados de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	0	33.3	33.3	33.3	33.3	55.5	77.7	100
2	0	0	41.6	41.6	41.6	41.6	58.3	83.3	100
3	0	0	16.6	16.6	41.6	66.6	91	100	100
Média±DP	0	0	30.5±12	30.5±12	38.9±4.8	47.1±17	68.2±19	87±11	100

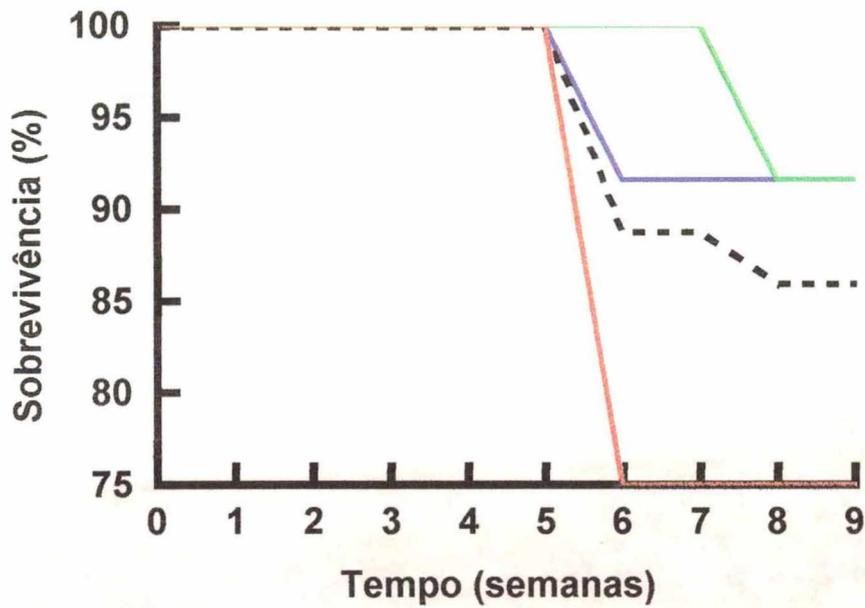


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência de microplantas de *P. caroliniensis* em função do tempo. As linhas contínuas representam os resultados de três repetições. A linha pontilhada representa a média.

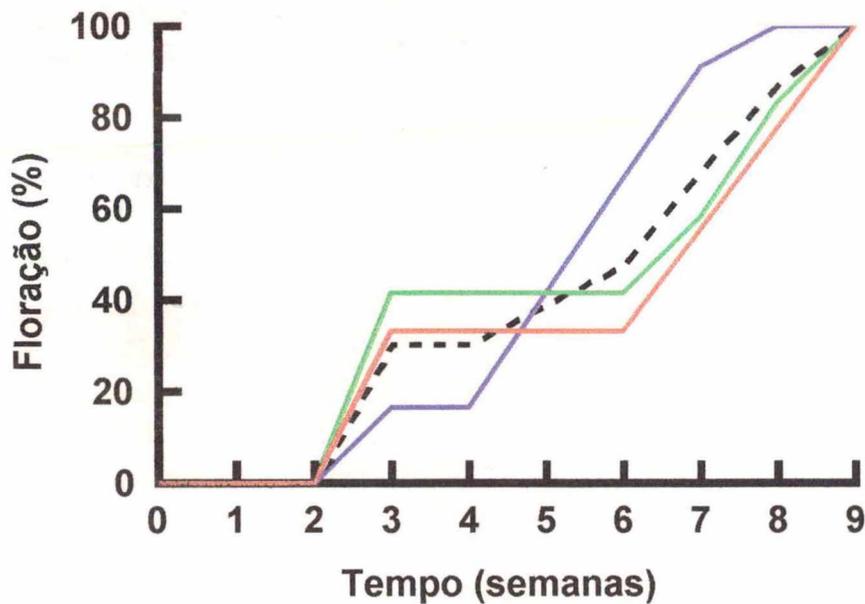


Figura 5. Floração em microplantas aclimatadas de *P. caroliniensis* em função do tempo. As linhas contínuas são os resultados de três repetições. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 11. Crescimento 'ex vitro' em altura (cm) (a), número de folhas (b) e número de ramos (c) de plantas micropropagadas de *Phyllanthus caroliniensis* após três e nove semanas.

Experimentos	Tempo (semanas)			
	3		9	
	(a)	(b)	(a)	(c)
1	2.05	6.50	17.37	9.22
2	2.15	8.25	20.18	9.36
3	2.20	7.66	23.18	11.54
Média±DP	2.13±0.07	7.47±0.49	20.2±2.9	10.0±1.3

3.4. Cultura de calos

O 2,4-D, IBA, NAA e IAA foram igualmente eficientes em induzir formação de calos em 100% dos explantes. Flores foram produzidas nos segmentos de caule mantidos no escuro, na maioria dos controles em porcentagens de 12.5-50% e em 4% dos explantes no tratamento com 2,4-D 0.25 mg.l⁻¹. O IBA, em todas as concentrações, induziu a rizogênese em 100% dos calos produzidos, mas da mesma forma que as demais auxinas foi inefetivo na indução de ramos (Tabela 12). Os calos eram amarelados, friáveis e apresentavam estruturas globulares (Figura 1_{CapII D}).

Os dados apresentados na Tabela 13 indicam que todas as auxinas testadas nas concentrações variando de 0.25 a 8 mg.l⁻¹ promoveram significativamente os pesos frescos médios dos calos em relação ao controle. No entanto, certas auxinas como o IBA nas concentrações de 2.0, 4.0 e 8.0 mg.l⁻¹ e o NAA nas concentrações de 0.5, 1.0, 2.0 e 4.0 estimularam a formação de calos com pesos frescos variando de 100 a 327 mg, correspondendo a incrementos variando de 26 a 113 vezes o peso fresco dos controles. Por exemplo, o IBA na concentração de 8.0 mg.l⁻¹ promoveu a formação de calos com pesos frescos médios de 327.08 mg por explante. O 2,4-D e o IAA não foram efetivos no

crescimento dos calos uma vez que os pesos frescos dos mesmos não ultrapassaram 55 mg em todos os tratamentos quando comparados com o NAA e o IBA.

Os resultados de experimentos preliminares para verificar o efeito de luz/escuro na indução e crescimento dos calos indicaram que apesar de as porcentagens de indução terem sido de 100% em ambas as condições, a luz promoveu significativamente o peso fresco dos calos crescidos em 2,4-D a 1.0 mg.l^{-1} em relação ao escuro. O peso fresco médio dos calos produzidos na luz foi 261% maior do que no escuro, cerca de 351.05 mg (Tabela 14).

3.5. Cultura de raízes

Os resultados da Figura 6 indicam que o padrão de crescimento das raízes apresentou três fases distintas, sendo que nos primeiros 30 dias de cultivo o crescimento foi lento, com taxas médias de 17.5 mg.dia^{-1} (Figura 1_{CapII} E). Entre 30 e 45 dias o crescimento foi em média pelo menos cinco vezes mais rápido que no período anterior, com taxas de 94.7 mg.dia^{-1} , alcançando um incremento médio máximo em peso fresco de 1.422 mg aos 45 dias de cultivo. No período entre 45 e 60 dias houve um decréscimo drástico no peso fresco das culturas, em média de 75.1 mg.dia^{-1} devido ao início do processo de senescência, acompanhado visualmente pela alteração na coloração das raízes devido à intensa oxidação.

Tabela 12. Efeito de auxinas nas respostas morfogênicas de segmentos nodais de *Phyllanthus caroliniensis* mantidos em posição horizontal no meio de cultura. Dados de 24 repetições.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Flores	Calos
2,4-D					
	0.00	100	100	50	0
	0.25	0	0	4	100
	0.50	0	0	0	100
	1.00	0	0	0	100
	2.00	0	0	0	100
	4.00	0	0	0	100
	8.00	0	0	0	100
IBA					
	0.00	100	100	12.5	0
	0.25	0	100	0	100
	0.50	0	100	0	100
	1.00	0	100	0	100
	2.00	0	100	0	100
	4.00	0	100	0	100
	8.00	0	100	0	100
NAA					
	0.00	100	100	12.5	0
	0.25	0	0	0	100
	0.50	0	0	0	100
	1.00	0	0	0	100
	2.00	0	0	0	100
	4.00	0	0	0	100
	8.00	0	0	0	100
IAA					
	0.00	100	100	0	0
	0.25	0	0	0	100
	0.50	0	0	0	100
	1.00	0	0	0	100
	2.00	0	0	0	100
	4.00	0	0	0	100
	8.00	0	0	0	100

Tabela 13. Efeito de auxinas na formação de calos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus caroliniensis* mantidos em posição horizontal no meio de cultura.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco (mg)	Concentração (mg/l)	Peso fresco (mg)
2,4-D	0.00	^z 4.08c	0.00	^z 2.87c
	0.25	57.21a	2.00	54.83a
	0.50	39.71b	4.00	19.70b
	1.00	43.17b	8.00	12.29bc
IBA	0.00	4.37d	0.00	2.87d
	0.25	28.92c	2.00	119.25c
	0.50	49.04b	4.00	294.16b
	1.00	61.92a	8.00	327.08a
NAA	0.00	4.00c	0.00	2.87d
	0.25	78.71b	2.00	207.33a
	0.50	107.75b	4.00	166.16b
	1.00	215.58a	8.00	69.12c
IAA	0.00	6.75c	0.00	2.87c
	0.25	20.17b	2.00	21.08b
	0.50	30.75a	4.00	24.29ab
	1.00	43.92a	8.00	27.16a

^zValores (N = 24) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

Tabela 13. Efeito de luz e escuro na formação de calos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus caroliniensis* mantidos na posição horizontal em meio MS suplementado com 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

Tratamentos	Peso fresco (mg)	Indução (%)
Luz	^z 351.05 a	100
Escuro	134.45 b	100

^zValores (N = 20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente a nível de 5% pelo teste *t*.

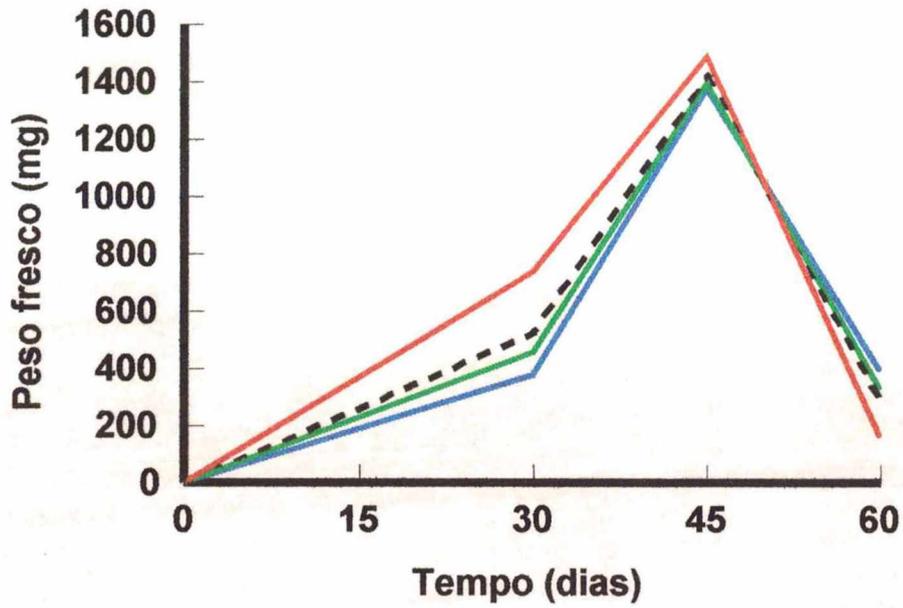


Figura 6. Crescimento 'in vitro' de raízes de *Phyllanthus caroliniensis*. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com três repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

CAPÍTULO III

CULTIVO 'IN VITRO' DE *Phyllanthus stipulatus* (EUPHORBIACEAE)

1. Introdução

O *P. stipulatus* (Raf) Webster. (Euphorbiaceae) é utilizado na medicina popular para o tratamento de distúrbios estomacais, infecções urinárias e hepatites (UNANDER et al., 1991). Outras espécies deste gênero também são utilizadas para o tratamento do aparelho gênito-urinário e intestinal, diabetes e hepatite B (UNANDER et al., 1990; 1991 e 1995; SRIVIDYA & PERIWAL, 1995; MIGUEL et al., 1996; CALIXTO et al., 1997; 1998).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos de uma grande variedade de espécies deste gênero comprovam a presença de vários compostos e seus efeitos biológicos. Diferentes classes de compostos orgânicos de interesse medicinal foram determinadas, incluindo alcalóides, flavonóides, lactonas, esteróides, terpenóides, lignanas, taninos e outros (TEMPESTA et al., 1988; ISHIMARU et al., 1992; POLYA et al., 1995; MIGUEL et al., 1996; HOUGHTON et al., 1996; HUANG et al., 1998 e SITTE et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 1998).

UNANDER (1991) desenvolveu técnicas para a indução e crescimento de calos de algumas espécies de *Phyllanthus* com o objetivo de testar a inibição de enzimas da hepatite B (DNAP e Transcriptase reversa) pelos extratos dos calos produzidos. Os extratos aquosos obtidos de plantas crescidas no campo foram mais ativos 'in vitro' contra as enzimas da hepatite B do que os extratos de calos testados. SANTOS et al. (1994) testaram os efeitos analgésicos dos extratos metanólicos dos calos de *P. tenellus*, *P. corcovadensis* e *P. niruri* produzidos "in vitro". Os resultados indicaram que os extratos dos calos exibiram potentes propriedades analgésicas contra a dor neurogênica e inflamatória em camundongos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos de cultivo "in vitro" de *P. stipulatus* que possibilitem a utilização deste sistema como ferramenta para a otimização da produção dos princípios ativos.

2. Material e métodos

Sementes de *P. stipulatus* foram desinfectadas superficialmente através de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (Clorisol) contendo 2.5% de cloro ativo e duas gotas de detergente neutro, por 30 minutos. Posteriormente as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada e inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS, Sigma Co., USA), suplementado com 20 g.l⁻¹ e 6 g.l⁻¹ agar (Agar Type, Sigma Co.). As culturas foram mantidas a 25°C, em fotoperíodo de 16h provido por lâmpadas fluorescentes Philips LD (22.3 μmol fotons.s⁻¹.m⁻²), condições estas também utilizadas nos experimentos de micropropagação e aclimatação. Após 60 dias as plantas axênicas produzidas foram multiplicadas, através da cultura de segmentos nodais, em meio MS suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 2 g.l⁻¹ de fitagel (Phytigel, Sigma Co., USA), desprovido de reguladores de crescimento, de forma a produzir plantas como fontes de explantes para os experimentos.

Segmentos nodais de 0.8-1.2 cm, desprovidos de folhas e contendo apenas uma gema lateral, foram removidos de plantas axênicas com 30-40 dias de idade e utilizados, respectivamente, nos experimentos de micropropagação e formação de calos. Exceto quando mencionado, os explantes foram inoculados na posição vertical no meio de cultura.

Para estudar os efeitos isolados dos reguladores de crescimento na micropropagação e formação de calos, NAA, 2,4-D, IAA, IBA, BAP, 2iP ou cinetina foram adicionados ao meio MS, suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 6 g.l⁻¹ de agar, nas concentrações de 0.0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, mg.l⁻¹. Nos experimentos para avaliar os efeitos de diferentes formulações salinas na micropropagação, os meios MS, B5, AR, W, S, K e WPM foram suplementados com 0.12 mg.l⁻¹ de BAP. Para a iniciação de cultura de raízes os segmentos de raízes foram inoculados em frascos erlenmeyers de 125 ml contendo alíquotas de 20 ml de meio MS líquido suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 0.2 mg.l⁻¹ de NAA. Em todos os casos os valores do pH dos meios de cultura foram ajustados para 5.8, com NaOH 0.1M ou HCl 0.1N, antes da distribuição em tubos de ensaio de 20x150 mm e autoclavagem a 121°C por 18 minutos.

Nos experimentos de indução de calos os explantes foram inoculados na posição horizontal sobre o meio de cultura e as culturas foram mantidas a 25°C, no escuro. Em

todos os experimentos foram utilizadas de 10 a 30 repetições por tratamento. Após 50 dias as culturas foram avaliadas com relação às frequências das respostas morfogênicas apresentadas, tais como formação de ramos, raízes, calos, e quanto aos seguintes parâmetros: peso da matéria fresca total das culturas, peso da matéria fresca dos calos, número de ramos principais, número de ramos laterais, número de ramos totais, comprimento do ramo principal, número de nós, comprimento da raiz principal e número de raízes. A análise da dinâmica do enraizamento das microestacas, desprovidas de folhas e contendo apenas uma gema axilar, em meio MS não suplementado com reguladores de crescimento, foi conduzida durante 40 dias. Foram utilizadas três repetições contendo 15 explantes cada e em intervalos periódicos de quatro dias as culturas foram avaliadas com relação à frequência de enraizamento e o número de raízes formadas. As culturas de raízes foram mantidas a 25°C no escuro, em agitador rotatório horizontal a 100 r.p.m. Os valores dos pesos da matéria fresca das raízes foram avaliados 50 dias.

A aclimação de plantas completas, produzidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, foi realizada após 15 dias, ocasião em que foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas com água destilada para remoção do agar, e tiveram os ramos principais reduzidos, de forma a conter apenas duas gemas axilares por planta. Em seguida foram transferidas para bandejas de plástico de 150x250x50 mm contendo areia esterilizada e cobertas com filme de PVC perfurado. Após a primeira semana foram gradualmente expostas à atmosfera com 70% de umidade relativa e depois de 20 dias foram transferidas para copos plásticos de 250 ml contendo mistura de areia e terra não esterilizadas, na proporção de 1:1. As culturas foram mantidas nas mesmas condições utilizadas para os estudos de cultivo 'in vitro'. Foram utilizadas três repetições com 12 plantas cada. As plantas foram avaliadas periodicamente durante nove semanas quanto à frequência de sobrevivência, de floração, comprimento da parte aérea, número de folhas e número de ramos.

As diferenças entre os valores das médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) com um fator e pelo teste-t. A separação das médias foi realizada pela DMS ou pelo teste-t de Tukey ao nível de significância de 5% (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

3. Resultados

3.1. Indução de ramos

3.1.1. Efeito de citocininas

Nas Tabelas 1 e 2 estão representadas as respostas morfogênicas apresentadas pelos segmentos nodais. A porcentagem de culturas que formaram ramos foi de 100% em todas as concentrações de citocininas testadas incluindo o controle (Figura 1A). Apenas as concentrações de BAP e 2iP superiores a 0.25 mg.l^{-1} inibiram totalmente e/ou reduziram a formação de raízes em 82 a 95% dos explantes. Todas as citocininas, com exceção da cinetina nas concentrações variando de 0 a 0.12 mg.l^{-1} e BAP 1.0 mg.l^{-1} , promoveram a formação de calos na base de 95 a 100% dos explantes. Por esta razão apenas a cinetina, nesta faixa de concentração, propiciou a produção de plantas normais. Dentre todas as citocininas o BAP nas concentrações de 0.25 e 0.5 mg.l^{-1} apresentou efeito promotor relevante no crescimento dos calos, já que os calos produzidos por cada explante nestas condições apresentaram em média de 279 a 370 mg de peso fresco. O 2iP nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg.l^{-1} e o BAP a 0.12 mg.l^{-1} estimularam o crescimento de calos na faixa de 100 a 150 mg de peso fresco, e a cinetina, em concentrações variando de 0.25 a 1.0 mg.l^{-1} , promoveu o crescimento de calos com pesos frescos menores que 100 mg.

As Tabelas 3 e 4 mostram os dados de proliferação de ramos por explante. Os valores de peso fresco total das culturas foram inibidos significativamente pelo BAP, cinetina e 2iP em todas as concentrações testadas, com exceção da cinetina a 0.06 mg.l^{-1} . O número total de ramos produzidos por explante foi significativamente maior (1.5-1.8 ramos/explante) com o BAP de 0.06 a 0.12 mg.l^{-1} e cinetina a 0.12 mg.l^{-1} , condições que também promoveram significativamente o número total de nós formados por explante (5.0-5.3) da mesma maneira que o 2iP a 1.0 mg.l^{-1} . O crescimento em comprimento dos ramos produzidos foi significativamente inibido por todas as citocininas, em todas as concentrações, exceto com a cinetina a 0.25 mg.l^{-1} , quando comparado com o controle (Figura 1_{CapIII} A).

Efeitos inibitórios maiores que 70% em relação ao controle foram observados com o BAP nas concentrações de 0.25 a 1.0 mg.l⁻¹. A cinetina nas concentrações de 0.06 a 0.25 mg.l⁻¹, entretanto, causou inibição de no máximo 11% no crescimento dos ramos, que mediram em média 11.0 cm.

O número total de raízes formadas por explante foi significativamente reduzido pelo BAP e 2iP em todas as concentrações testadas e promovido apenas pela cinetina a 0.25 mg.l⁻¹ (6.22 raízes/explante). Nas concentrações de 0.06 e 0.12 mg.l⁻¹ o BAP, o 2iP e a cinetina não interferiram no crescimento das raízes, apenas o 2iP a 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ inibiu drasticamente o processo de forma que nestas condições as raízes apresentaram em média apenas 0.4 a 1.7 cm de comprimento.

A cinetina também foi eficiente na multiplicação de ramos em *P. urinaria*. SILVA (1995) testou várias concentrações de citocininas, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 1.0 mg.l⁻¹ de cinetina, porém não ocorreu a formação de calos nesta espécie.

Tabela 1. Efeito de citocininas em concentrações de 0 a 0.12 mg. l⁻¹ na frequência (%) de respostas morfogênicas e no crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus stipulatus* cultivados 'in vitro'. Dados obtidos de 22 a 24 repetições.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Calos	Plantas normais	Peso fresco dos calos (mg)
BAP	0.00	100	100	0	100	*
	0.06	100	100	100	0	^z 66.50b
	0.12	100	79.16	100	0	110.95a
CIN	0.00	100	100	0	100	*
	0.06	100	100	0	100	*
	0.12	100	100	0	100	*
2iP	0.00	100	100	0	100	*
	0.06	100	95.83	100	0	74.04b
	0.12	100	100	100	0	105.37a

^z Valores (N=22-24) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

* Tratamentos onde não ocorreu a formação de calos

Tabela 2. Efeito de citocininas na frequência (%) de respostas morfogênicas e no crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus stipulatus* cultivados 'in vitro'. Dados obtidos de 13–23 repetições.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Calos	Plantas normais	Peso fresco Dos calos (mg)
BAP						
	0.00	100	100	0	100	*
	0.25	100	5.26	100	5.26	^z 370.55a
	0.50	100	0	100	0	279.53a
	1.00	100	0	0	0	*
CIN						
	0.00	100	95.65	0	95.83	*
	0.25	100	100	100	0	86.59a
	0.50	100	95.45	100	0	65.00a
	1.00	100	86.36	100	0	93.09a
2iP						
	0.00	100	95.65	0	100	*
	0.25	100	21.74	100	0	77.43a
	0.50	100	18.18	100	0	139.54b
	1.00	100	0	95.45	0	157.23b

^z Valores (N =13-23) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

* Tratamentos onde não ocorreu a formação de calos

Tabela 3. Efeito de citocininas em concentrações de 0 a 0.12 mg l⁻¹ na micropropagação de *Phyllanthus stipulatus* a partir de segmentos nodais.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco da cultura (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
BAP	0.00	^z 247.45a	1.08c	13.39a	4.33b	2.31a	11.83a
	0.06	78.79b	1.50b	8.29b	5.08a	2.16a	5.70b
	0.12	70.66b	1.83a	7.83b	5.08a	2.05a	2.05b
CIN	0.00	247.45a	1.08b	13.39a	4.33b	2.31a	11.83a
	0.06	218.18a	1.12b	11.90b	4.45b	2.02a	10.66a
	0.12	175.75b	1.54a	11.85b	5.33a	2.31a	9.59a
2iP	0.00	247.45a	1.08a	13.39a	4.33a	2.31a	11.83a
	0.06	79.37b	1.12a	10.08b	3.95a	2.04a	2.95b
	0.12	67.04b	1.29a	9.43b	3.37b	2.00a	3.50b

^zValores (N= 22–24) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

Tabela 4. Efeito de citocininas em concentrações de 0 a 1.0 mg.l⁻¹ na micropropagação de *Phyllanthus stipulatus* a partir de segmentos nodais.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco da cultura (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
BAP	0.00	^z 216.37a	1.33a	12.10a	6.54a	2.62	10
	0.25	37.26b	1.84a	3.39b	5.63a	*	*
	0.50	27.80b	1.73a	1.86c	5.73a	*	*
	1.00	54.53b	1.61a	1.53c	5.23a	*	*
CIN	0.00	216.37a	1.21a	10.45a	4.04ab	2.88a	4.00b
	0.25	75.32b	1.22a	9.36a	4.18a	2.40ab	6.22a
	0.50	52.54b	1.13a	6.79b	3.36c	1.76b	4.47b
	1.00	57.95b	1.31a	7.22b	3.40bc	2.21ab	3.68b
2iP	0.00	216.37a	1.21ab	10.45a	4.04b	2.88a	4.00a
	0.25	33.82b	1.08b	5.76b	3.52b	0.46b	1.20b
	0.50	34.13b	1.41ab	5.02b	4.04b	0.87b	1.50b
	1.00	22.68b	1.50a	3.02c	5.22a	*	*

^zValores (N =13–23) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

* Tratamentos onde não ocorreu a formação de raízes

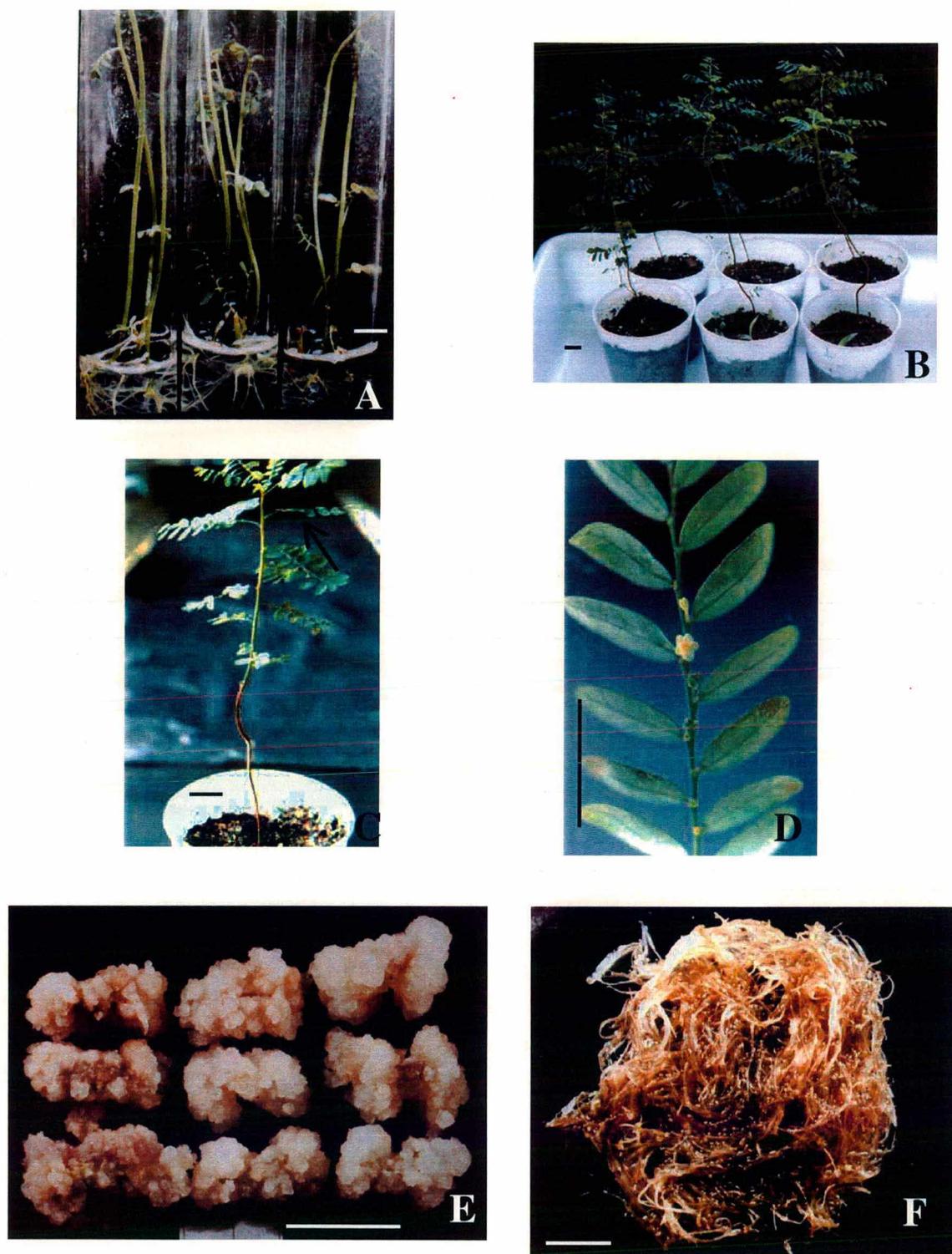


Figura 1_{CapIII}. Cultura de ramos de *P. stipulatus* iniciadas a partir de segmentos nodais em meio MS (A). Plantas aclimatadas (B). Flores e frutos em plantas aclimatadas (C). Detalhe das flores (D). Calos produzidos a partir de segmentos de caule em meio MS suplementado com 1 mg.l^{-1} de 2,4-D (E). Raízes produzidas a partir de segmentos de ápices de raízes em meio MS suplementado com 0.2 mg.l^{-1} de NAA (F). Barras = 1 cm.

3.1.2. Efeito de meios de cultura

As diferentes formulações salinas de meios de cultura promoveram diferenças nas respostas morfogênicas dos explantes (Tabela 5). A porcentagem de segmentos nodais que formaram ramos variou de 70 a 100% e apenas os meios WPM, MS e MS/2 induziram a formação de raízes em 50 a 90% dos explantes. Calos foram induzidos na base dos explantes em 90% somente no meio MS/2. Este meio também produziu resultados superiores em relação aos demais quanto ao incremento em peso fresco das culturas e ao número total de ramos produzidos por explante (3.4 ramos) (Tabela 6). O comprimento destes ramos assim como o número total de nós foram significativamente inibidos nos meios B5 e W. Os meios AR e MS/2 estimularam a formação de gemas axilares nos ramos (5.3-5.7 gemas/explante) e os meios MS, WPM e MS/2 promoveram significativamente o comprimento médio dos ramos produzidos (6-7 cm). O número de raízes produzidas por explante nos meios indutores variou de 2 a 3.2 e não foi influenciado pelos meios de cultura. Entretanto o meio MS/2 destacou-se na promoção significativa do crescimento em comprimento das raízes produzidas (3.6 cm).

PARRA & AMO-MARCO (1996) obtiveram resultados semelhantes na multiplicação de ramos de *Myrtus communis*, em que ótimas taxas de multiplicação foram obtidas em meio MS/4 e o número máximo de nós foi produzido com MS/2, ambos suplementados com 1 mg.l^{-1} de BAP além de serem muito superiores aos resultados obtidos com o meio S. Resultados significativos no aumento do comprimento dos ramos de *Paraserianthes falcataria* também foram obtidos com a utilização do meio MS/2 (BON et al., 1998), e esta mesma formulação promoveu o enraizamento de *Cleistanthus collinus* 'in vitro' (QURAIISHI et al., 1996).

Tabela 5. Efeito de diferentes meios de cultura suplementados com 0.12 mg.l⁻¹ de BAP na frequência (%) de respostas morfogênicas de segmentos nodais de *Phyllanthus stipulatus*. Dados obtidos de 10 repetições.

Meios	Ramos	Raiz	Calos	Plantas normais
MS	100	90	0	90
B5	90	0	0	0
S	70	0	0	0
W	90	0	0	0
K	100	0	0	0
WPM	90	50	0	50
AR	100	0	0	0
MS/2	100	80	90	0

Tabela 6. Efeito de diferentes meios de cultura suplementados com 0.12 mg.l⁻¹ de BAP na micropropagação de *Phyllanthus stipulatus* a partir de segmentos nodais.

Meios	Peso fresco da cultura (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Número de Raízes	Comprimento da raiz principal (cm)
MS	^z 95.70b	1.40cd	7.00a	4.30bc	3.22a	1.77b
B5	51.44bc	1.33cd	1.88c	2.77d	*	*
S	83.42b	1.14cd	3.92bc	3.42cd	*	*
W	12.00c	1.00d	1.16c	1.22e	*	*
K	51.70bc	1.00d	5.35ab	3.40cd	*	*
WPM	71.22b	1.66c	7.16a	4.30bc	2.00a	1.20b
AR	61.10bc	2.30b	3.65bc	5.70a	*	*
MS/2	241.40a	3.40a	6.75a	5.30ab	2.85a	3.62a

^z Valores (N=10) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam os meios.

*Meios de cultura onde não ocorreu a formação de raízes.

3.2. Enraizamento de microestacas

As auxinas 2,4-D, IBA, NAA e IAA provocaram diferentes respostas morfológicas nos segmentos nodais (Tabela 7). O 2,4-D inibiu totalmente a indução de ramos enquanto que os tratamentos com IBA e IAA apresentaram uma taxa de 100% de indução de ramos nos explantes, em todas as concentrações, sendo que nos tratamentos com NAA, esta porcentagem diminuiu progressivamente para 45 e 0% com o aumento da concentração. A formação de raízes, e portanto de plantas normais, foi completamente inibida com o 2,4-D e o NAA. O IBA e o IAA inibiram drasticamente a formação de calos e as auxinas mais efetivas na indução foram o 2,4-D e o NAA, que induziram calos em 100% dos explantes. As concentrações de 2,4-D a 1.0 mg.l^{-1} e de NAA a 0.5 e 1.0 mg.l^{-1} promoveram significativamente o crescimento em peso fresco dos calos de maneira que o peso fresco médio do calo produzido por explante em 2,4-D foi de 373.15 mg e em NAA de 400.5 a 628 mg. Apenas nos tratamentos com diferentes concentrações de NAA, ocorreu rizogênese nos calos. Os resultados da Tabela 8 indicam que o IBA a 1.0 mg.l^{-1} induziu a mais eficiente taxa de proliferação pois promoveu significativamente o número total de ramos, o comprimento dos mesmos e o número total de gemas axilares, sendo que foram produzidos nestas condições 2.2 ramos/explante, medindo em média 16.6 cm e possuindo 9.8 nós cada. As demais auxinas, com exceção do 2,4-D, não afetaram significativamente a produção de ramos e em certos casos tiveram efeito inibitório sobre o crescimento em comprimento dos mesmos e/ou reduziram o número de gemas axilares presentes, como o NAA e o IAA a 0.25 e 0.5 mg.l^{-1} . As auxinas IBA e IAA não aumentaram significativamente a produção de raízes em relação ao controle. Entretanto, o NAA, em todas as concentrações, induziu proliferação intensa do sistema radicular (>20 raízes/explante), porém as raízes produzidas foram originadas nos calos. O peso fresco destas raízes foi significativamente maior no tratamento com NAA 0.25 mg.l^{-1} , alcançado em média 178.8 mg (Tabela 7). Portanto, apenas o IBA e o IAA propiciaram a formação de plantas completas e normais. Resultados semelhantes foram obtidos por DOBOS et al. (1994) na micropropagação de *Sempervivum tectorum*, em que 0.5 mg.l^{-1} de IBA ou 0.2 mg.l^{-1} de IAA e 0.5 mg.l^{-1} de BAP foram os reguladores mais eficientes na multiplicação dos ramos daquela espécie.

O enraizamento das microestacas em meio desprovido de reguladores de crescimento foi em média de 48.8% no quarto dia a partir do início do experimento, atingindo 95.5 % já no oitavo dia, e 100% na segunda semana (Tabela 9, Figura 2). O número médio de raízes formadas por microplanta aumentou de 2.77 ± 0.6 , no oitavo dia, para valores de 5.48 ± 0.3 e 6.66 ± 0.06 respectivamente após 16 e 28 dias de cultivo (Tabela 10, Figura 3).

Tabela 7. Efeito de auxinas na frequência (%) de respostas morfogênicas e no crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus stipulatus* cultivados 'in vitro'. Dados obtidos de 12-20 repetições.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Calos	Raízes	Plantas normais	Peso fresco das raízes dos calos (mg)	Peso fresco dos calos (mg)
2,4-D	0.00	100	0	100	100	*	*
	0.25	0	100	0	0	*	209.75c
	0.50	0	100	0	0	*	296.85b
	1.00	0	100	0	0	*	373.15a
IBA	0.00	100	0	100	100	*	*
	0.25	100	0	100	100	*	*
	0.50	100	0	100	100	*	*
	1.00	100	0	100	100	*	*
NAA	0.00	100	0	100	100	*	*
	0.25	90	100	0	0	^z 178.80a	203.95c
	0.50	45	100	0	0	127.05ab	400.50b
	1.00	0	100	0	0	86.52b	628.00a
IAA	0.00	100	0	100	100	*	*
	0.25	100	0	100	100	*	*
	0.50	100	0	100	100	*	*
	1.00	100	0	100	100	*	*

^z Valores (N=12-20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

*Tratamentos onde não houve produção de raízes ou calos.

Tabela 8. Efeito de auxinas na micropropagação de *Phyllanthus stipulatus* a partir de segmentos nodais.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco da cultura (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
2,4-D	0.00	168.63	1.57	14.65	7.63	3.65	7.73
	0.25	*	*	*	*	*	*
	0.50	*	*	*	*	*	*
	1.00	*	*	*	*	*	*
IBA	0.00	^z 168.63b	1.57b	14.65bc	7.63bc	3.65a	7.73a
	0.25	170.64b	1.52b	13.23c	6.64c	3.41ab	7.58a
	0.50	207.15ab	2.47a	15.03b	8.78ab	3.00b	7.05a
	1.00	251.05a	2.22a	16.63a	9.83a	3.19ab	8.11a
NAA	0.00	168.63a	1.57a	14.65a	7.63a	3.65a	7.73
	0.25	155.27a	1.55a	12.05b	5.88b	3.77a	>7.73
	0.50	112.11a	1.11a	11.77b	4.44b	3.22a	>7.73
	1.00	*	*	*	*	*	*
IAA	0.00	168.63b	1.57a	14.65a	7.63a	3.65a	7.73a
	0.25	160.64ab	1.52a	13.91a	6.23b	2.50a	6.47a
	0.50	123.83ab	1.41a	13.50a	5.50b	2.48a	6.16a
	1.00	162.91a	1.58a	14.45a	8.08a	2.58a	7.75a

^z Valores (N=12-20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. Valores não seguidos por letras não foram estatisticamente comparados.

* Tratamentos onde não ocorreu o desenvolvimento de microplantas.

3.3 Aclimação

A porcentagem de sobrevivência das microplantas aclimatadas permaneceu em 100% até a quarta semana após o início do experimento, declinando para valores de 94.4% após a sexta semana e 88.8% após a nona semana (Tabela 11, Figura 4). O florescimento ocorreu em 81% (dados não apresentados) das plantas aclimatadas após 12 semanas (Figuras 1_{CapIII} C e D). O crescimento das microplantas nas três primeiras semanas de aclimação foi lento, de forma que apresentaram em média 3.8 ± 0.01 cm de altura e 4.6 ± 0.47 folhas. Por volta da nona semana, entretanto, os valores aumentaram para 13.4 ± 0.41 quanto à altura e 1.36 ± 0.39 ramos foram produzidos, o que representa um incremento em altura de 71.6 % (Tabela 12, Figura 1_{CapIII} B).

3.4. Cultura de calos e de raízes

As auxinas 2,4-D, IBA, NAA e IAA e as citocininas BAP, cinetina e 2iP induziram respostas morfogênicas diversas nos segmentos nodais, apresentando diferenças quanto à capacidade de indução de calos e à promoção do crescimento dos mesmos (Tabelas 13 e 14). As auxinas e as citocininas BAP e 2iP, em todas as concentrações, induziram a formação de calos de 90 a 100% dos explantes, sendo que apenas com a cinetina a porcentagem de indução foi inferior, de 65 a 80%. Em nenhuma condição testada houve a formação de ramos, e a indução de raízes nos explantes restringiu-se apenas aos tratamentos com as auxinas IBA, NAA e IAA, que induziram o processo em 100% dos explantes. O crescimento dos calos foi significativamente promovido, em diferentes níveis, por todas as auxinas e citocininas testadas. O IBA e a cinetina nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹ promoveram significativamente, mas em fraca intensidade, o crescimento dos calos, que apresentaram em média pesos frescos entre 60 e 100 mg. O IAA promoveu a formação de calos com pesos frescos de 129 a 154 mg, sendo as concentrações de 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ as mais efetivas, ao passo que os pesos frescos dos calos produzidos em 2,4-D variaram de 230 a 266 mg, havendo neste caso promoção significativa a 0.25 mg.l⁻¹. Os calos formados nestas condições eram friáveis, de coloração avermelhada e apresentavam estruturas globulares (Figura 1_{CapIII} E). O efeito promotor de crescimento do NAA, contudo,

foi o mais evidente entre as auxinas: em todas as concentrações os calos tiveram em média de 268 a 398 mg, mas a concentração de 1.0 mg.l⁻¹ foi a mais eficiente. Entre as citocininas, o BAP foi efetivo em estimular o crescimento dos calos, pois em todas as concentrações induziu a formação de calos com 345 a 393 mg de peso fresco, enquanto os calos produzidos pelo 2iP atingiram em média 286 a 311 mg. O IBA, NAA e IAA apresentaram efeitos significativos na promoção do crescimento das raízes produzidas nos calos em todas as concentrações, em diferentes intensidades. O NAA induziu crescimento intenso das raízes de forma que seus pesos frescos médios produzidos em cada calo variaram de 179 a 211 mg, nas diferentes concentrações. Nos tratamentos com IBA e IAA a 1.0 mg.l⁻¹ o peso fresco produzido foi significativamente superior, cujos valores foram de 103.36 mg e 58.68 mg, respectivamente.

O objetivo da produção das culturas de raízes de *P. stipulatus* foi a realização de suas análises fitoquímicas, e os valores da matéria fresca das raízes obtidos após 50 dias de cultivo 'in vitro' foram de 1.250±0.33 mg por frasco (Figura 1_{CapIII} F).

Tabela 9. Frequência (%) de enraizamento de microestacas de *Phyllanthus stipulatus* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento durante 20 dias. Dados obtidos de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)					
	0	4	8	12	16	20
1	0	26.6	100	100	100	100
2	0	66.6	86.7	93.3	100	100
3	0	53.3	100	100	100	100
Média±DP	0	48.83±20.3	95.56±7.6	97.76±3.8	100	100

Tabela 10. Número de raízes produzidas por microestaca de *Phyllanthus stipulatus* durante 36 dias. Médias de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)								
	0	4	8	12	16	20	24	28	36
1	0	0.26	2.00	3.60	5.60	5.93	6.53	6.66	6.66
2	0	0.66	3.13	4.86	5.73	5.86	6.53	6.73	6.73
3	0	0.53	3.20	4.53	5.13	5.60	6.53	6.60	6.60
Média±DP	0	0.48±0.2	2.77±0.6	4.33±0.6	5.48±0.3	5.79±0.1	6.53±1.7	6.66±0.06	6.66±0.06

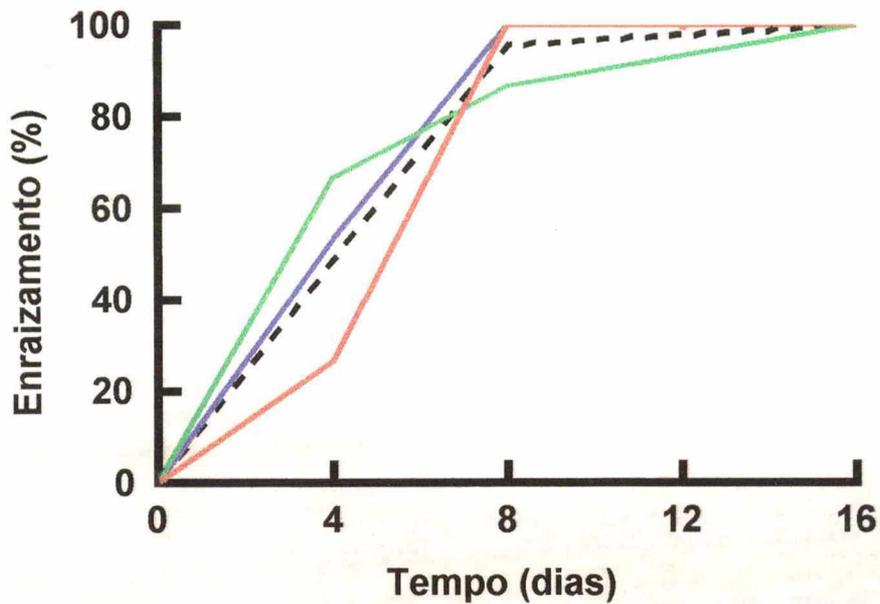


Figura 2. Enraizamento 'in vitro' de microplantas de *Phyllanthus stipulatus* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A Linha pontilhada representa a média.

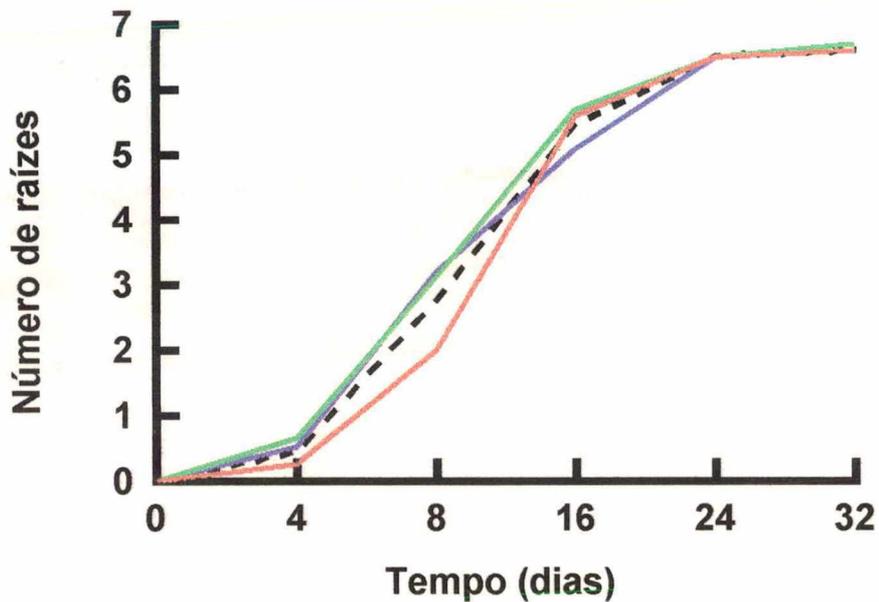


Figura 3. Número de raízes formadas 'in vitro' por microplantas de *Phyllanthus stipulatus* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 11. Frequência (%) de sobrevivência 'ex vitro' de plantas micropropagadas de *Phyllanthus stipulatus* durante nove semanas. Dados de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	100	100	100	100	100	100	83.3	83.3
2	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6
3	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6
Média±DP	100	100	100	100	94.4±4.8	94.4±4.8	94.4±4.8	88.8±4.7	88.8±4.7

Tabela 12. Crescimento 'ex vitro' em altura (cm) (a), número de folhas (b) e número de ramos (c) de plantas micropropagadas de *Phyllanthus stipulatus* após três e nove semanas. Médias de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)			
	3		9	
	(a)	(b)	(a)	(c)
1	3.79	4.91	13.91	1.81
2	3.80	4.91	13.09	1.18
3	3.81	5.09	13.47	1.09
Média±DP	3.8±0.01	4.6±0.47	13.49±0.41	1.36±0.39

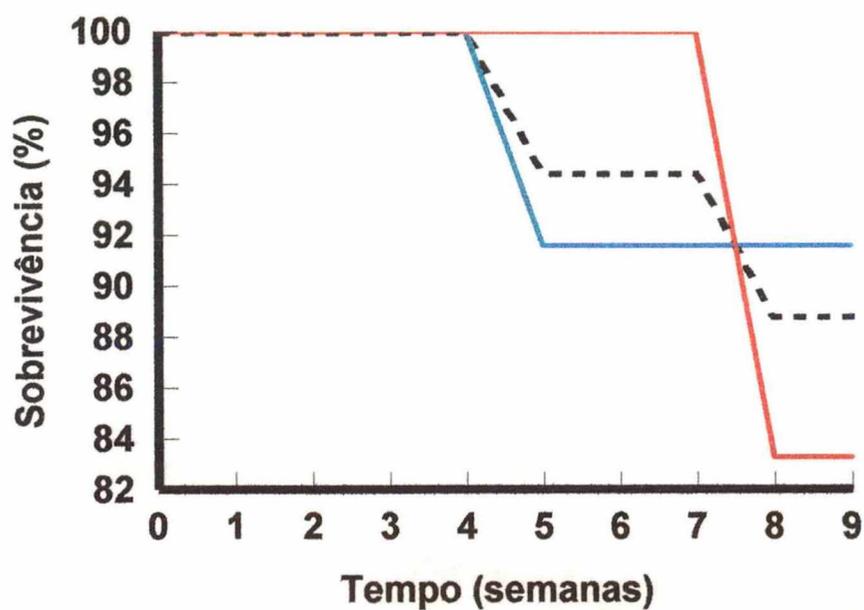


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência de microplantas de *Phyllanthus stipulatus* em função do tempo. As linhas contínuas representam os resultados de três repetições. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 13. Efeito de auxinas na frequência (%) de respostas morfogênicas e no crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus stipulatus* mantidos em posição horizontal no meio de cultura. Dados obtidos de 18-24 repetições.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Calos	Peso fresco do calo (mg)	Peso fresco das raízes (mg)
2,4-D	0.00	0	100	0	^z 51.65c	*
	0.25	0	0	100	266.41a	*
	0.50	0	0	100	252.27ab	*
	1.00	0	0	100	230.04b	*
IBA	0.00	0	100	0	51.65c	*
	0.25	0	100	100	40.28c	42.57c
	0.50	0	100	100	71.31b	67.59b
	1.00	0	100	100	101.23a	103.36a
NAA	0.00	0	100	0	51.65c	*
	0.25	0	100	100	268.31b	179.18a
	0.50	0	100	100	277.04b	211.13a
	1.00	0	100	100	398.45a	185.86a
IAA	0.00	0	100	0	27.09c	*
	0.25	0	100	100	154.27a	33.59b
	0.50	0	100	100	165.80a	24.94b
	1.00	0	100	100	129.50b	58.68a

^z Valores (N = 30) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

* Tratamentos onde não ocorreu a formação de raízes nos calos

Tabela 14. Efeito de citocininas na frequência (%) das respostas morfogênicas e no crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus stipulatus* mantidos em posição horizontal no meio de cultura.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Calos	Plantas normais	Peso fresco do calo (mg)
BAP	0.00	0	0	0	0	^z 27.60b
	0.25	0	0	90	0	345.22a
	0.50	0	0	100	0	369.42a
	1.00	0	0	95	0	393.85a
CIN	0.00	0	0	0	0	27.60b
	0.25	0	0	80	0	44.62b
	0.50	0	0	80	0	77.00a
	1.00	0	0	65	0	66.76a
2iP	0.00	0	0	0	0	27.60b
	0.25	0	0	90	0	294.61a
	0.50	0	0	100	0	286.90a
	1.00	0	0	100	0	311.16a

^zValores (N=20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

CAPÍTULO IV

CULTIVO 'IN VITRO' DE *Phyllanthus urinaria* (EUPHORBIACEAE)

1. Introdução

P. urinaria (Euphorbiaceae) é utilizado na medicina popular para o tratamento de distúrbios do aparelho urinário e intestinal, hepatite B e diabetes, apresentando também propriedades analgésicas, antiinflamatória e diurética. Estudos conduzidos com esta espécie permitiram o isolamento e identificação de vários compostos como flavonóides, taninos, esteróides, cumarinas, triterpenos e benzenóides, que podem estar envolvidos com as ações antinociceptivas e antiinflamatórias (NARA et al., 1977; YAO et al., 1993; SATYAN et al., 1995; SANTOS et al., 1995; CALIXTO et al., 1997). Atividades antibacterianas efetivas também foram determinadas em diferentes extratos de *P. urinaria*, contra bactérias geralmente encontradas no trato urinário (MORETTO et al., 1994). Estas atividades antibacterianas já haviam sido constatadas por HAÏCOUR (1974) em extratos aquosos de calos desta espécie.

UNANDER (1991) detectou efeito inibitório de extratos de calos de *P. urinaria* sobre as atividades da DNAP e da transcriptase reversa do vírus da hepatite B. SANTOS et al. (1995) analisaram extratos hidroalcoólicos de calos desta mesma espécie, os quais apresentaram efeito analgésico contra a dor neurogênica e inflamatória em camundongos. Uma análise fitoquímica preliminar dos calos demonstrou a ausência de alcalóides e flavonóides e indicou a presença de açúcares e compostos fenólicos nestes calos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos para otimizar a micropropagação, a produção de calos e de cultura de raízes de *P. urinaria* no sentido de possibilitar a multiplicação rápida e proceder a análises fitoquímicas e farmacológicas para a detecção de princípios ativos.

2. Material e métodos

Segmentos nodais (0.8-1.2 cm), utilizados nos experimentos de micropropagação e indução de calos, e segmentos de raízes contendo os ápices (3-4cm), utilizados nos

experimentos de cultura de raízes, foram obtidos a partir de plantas axênicas de *P. urinaria* com 30-40 dias de idade. Estas plantas foram cultivadas em meio Murashige & Skoog (MS, Sigma Co., USA) suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 2 g.l⁻¹ de fitagel (Phytigel, Sigma Co., USA) e mantidas a 25°C, em fotoperíodo de 16h provido por lâmpadas fluorescentes Philips LD (22.3 μmol fotons.s⁻¹. m⁻²).

Nos experimentos para testar os efeitos isolados de auxinas na micropropagação, e de citocininas na formação de calos, NAA, 2,4-D, IAA, IBA, BAP, 2iP ou cinetina foram adicionados ao meio MS suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 6 g.l⁻¹ de agar (Agar Type, Sigma Co.), nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹. Para avaliar os efeitos de diferentes formulações salinas na micropropagação, os meios MS, B5, AR), W, S, K e WPM foram suplementados com 0.25 mg.l⁻¹ de BAP. Para a iniciação de cultura de raízes, os segmentos de raízes foram inoculados em frascos erlenmeyers de 125 ml contendo alíquotas de 20 ml de meio MS líquido suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 0.2 mg.l⁻¹ de NAA. Em todos os casos os valores do pH dos meios de cultura foram ajustados para 5.8, com NaOH 0.1M ou HCl 0.1N, antes da distribuição em tubos de ensaio de 20 x 150 mm, no caso dos meios sólidos, e autoclavagem a 121°C por 18 minutos.

Os experimentos de micropropagação foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa mencionadas acima; e os de indução de calos e cultura de raízes, nas mesmas condições de temperatura mas no escuro. Nos experimentos de formação de calos os explantes foram colocados em posição horizontal na superfície do meio de cultura. Foram utilizadas 30 repetições por tratamento. Após 50 dias as culturas foram avaliadas com relação às frequências das respostas morfogênicas apresentadas, tais como formação de ramos, raízes, calos, e quanto aos seguintes parâmetros: peso da matéria fresca total das culturas, peso da matéria fresca dos calos, número de ramos principais, número de ramos laterais, número de ramos totais, comprimento do ramo principal, número de nós, comprimento da raiz principal e número de raízes.

A análise da dinâmica do enraizamento das microestacas em meio desprovido de reguladores de crescimento foi conduzida durante 36 dias, e em intervalos periódicos de quatro dias os experimentos foram avaliados com relação à frequência de enraizamento e o

número de raízes formadas. Foram realizados três experimentos simultâneos com 15 explantes cada.

As culturas de raízes foram mantidas a 25°C no escuro, em agitador rotatório horizontal a 100 r.p.m. Os valores dos pesos da matéria fresca das raízes foram avaliados após 30, 45 e 60 dias e foram utilizadas três repetições por tratamento.

A aclimação de plantas completas, produzidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, foi realizada após 30 dias, ocasião em que foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas em água destilada para remoção do agar e tiveram os ramos principais reduzidos, de forma a conter apenas duas gemas axilares por planta. Em seguida foram transferidas para bandejas de plástico de 150x250x50 mm contendo areia esterilizada e cobertas com filme de PVC perfurado. Após a primeira semana foram gradualmente expostas à atmosfera com 70% de umidade relativa e depois de 20 dias foram transferidas para copos plásticos de 250 ml contendo mistura de areia e terra não esterilizadas, na proporção de 1:1. As culturas foram mantidas nas mesmas condições utilizadas para os estudos de cultivo 'in vitro'. Foram utilizadas três repetições com 12 plantas cada. As plantas foram avaliadas periodicamente durante nove semanas quanto à frequência de sobrevivência, de floração, comprimento da parte aérea e número de ramos.

As diferenças entre os valores das médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) com um fator e pelo teste-t. A separação das médias foi realizada pela DMS ou pelo teste-t de Tukey ao nível de significância de 5% (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

3. Resultados

3.1. Micropropagação

3.1.1. Efeito de meios de cultura

Na Tabela 1 estão representadas as frequências de respostas morfogênicas dos segmentos nodais às diferentes formulações salinas utilizadas. Todos os meios testados induziram a formação de ramos em 100% dos explantes, mas apenas nos meios MS, K,

WPM e AR houve formação de raízes em taxas que variaram de 25 a 75%, originando, como consequência, plantas normais (Figura 1_{CapIV} A). Não houve formação de calos em nenhuma das condições testadas. Entretanto os diferentes meios atuaram de forma diferenciada no crescimento das culturas (Tabela 2). Os meios MS, K, WPM e AR estimularam significativamente os pesos frescos totais das culturas em relação aos demais, enquanto o meio W provocou drástica inibição no seu crescimento também em relação ao número total de ramos, comprimento do ramo principal e número total de nós. O número de ramos formados por explante (2.75-3.35 ramos) foi superior nos meios MS e AR, que também promoveram significativamente a formação de nós (9.35-10.0 gemas axilares), seguidos dos meios K e WPM (7-8.5 gemas axilares) (Figura 1_{CapIV} B). Os meios MS e WPM foram eficientes em estimular o crescimento em comprimento dos ramos, enquanto nos meios B5, S e W houve inibição de 60-86% do crescimento máximo observado no meio WPM. A produção de raízes por explante foi significativamente superior nos meios K e WPM (9.0-12.4 raízes) contra apenas 2.7-3.1 raízes produzidas nos meios MS e AR. Algumas plantas lenhosas apresentam taxa de multiplicação maior em meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981; GOH et al., 1988). A eficiência do meio WPM na multiplicação de ramos foi comprovada em *Cornus florida* (árvore ornamental) demonstrando a maior sensibilidade dessas espécies (DECLERK & KORBAN, 1994), porém isto não é uma regra.

Tabela 1. Efeito de meios de cultura suplementados com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP na frequência (%) de respostas morfogênicas de segmentos nodais de *Phyllanthus urinaria*. Dados obtidos de 20 repetições.

Meios	Ramos	Raízes	Calos	Plantas Normais
MS	100	25	0	25
B5	100	0	0	0
S	100	0	0	0
W	100	0	0	0
K	100	15	0	15
WPM	100	75	0	75
AR	100	25	0	25

Tabela 2. Efeito de meios de cultura suplementados com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP na micropropagação na multiplicação de ramos de *Phyllanthus urinaria* a partir de segmentos nodais.

Meios	Peso fresco das culturas (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento raiz principal (cm)	Número de raízes
MS	^z 222.60a	3.35a	4.37a	9.35a	2.10a	2.70b
B5	185.75b	2.75ab	1.84c	5.60cd	*	*
S	163.45b	1.95cd	1.48c	4.55d	*	*
W	35.40c	1.45d	0.61d	1.84e	*	*
K	207.50a	2.40bc	3.72ab	8.55ab	1.00ab	9.00ab
WPM	212.10a	1.90cd	4.50a	7.00bc	2.06a	12.46a
AR	222.60a	3.25a	3.17b	10.00a	0.32b	3.60b

^z Valores (N = 20) da mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa.

* Tratamentos que não produziram raízes.

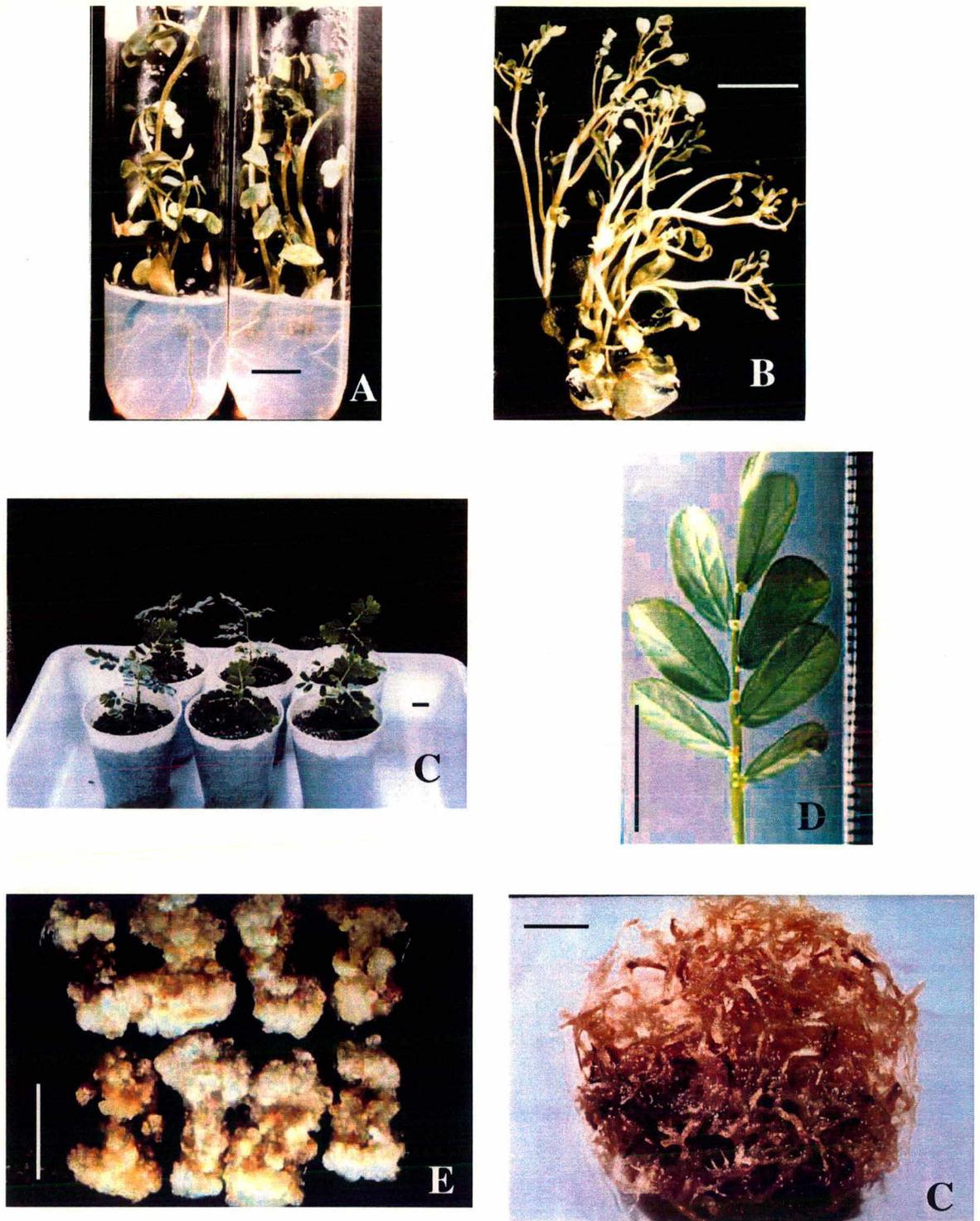


Figura 1_{CapIV}. Cultura de ramos de *P. urinaria* a partir de segmentos nodais em meio MS (A). Ramos múltiplos formados em meio MS suplementado com 0.25 mg.l⁻¹ de BAP (B). Plantas aclimatadas (C). Flores produzidas em plantas aclimatadas (D). Calos produzidos em meio MS suplementado com 2 mg.l⁻¹ de BAP e 8 mg.l⁻¹ de IBA (E). Raízes produzidas a partir de segmentos de ápices de raízes em meio MS suplementado com 0.2 mg.l⁻¹ de NAA (F). Barras = 1 cm.

3.2. Enraizamento de microestacas

As respostas morfogênicas induzidas pelas auxinas 2,4-D, IBA, NAA e IAA nos segmentos nodais foram diferenciadas (Tabela 3). Todas as auxinas induziram a formação de ramos em 100% dos explantes, mas a sua eficiência em induzir raízes variou entre 75 e 100%, com exceção do 2,4-D, que induziu o processo em apenas 5 a 10% dos explantes, inibindo-o totalmente a 1.0 mg.l⁻¹. Desta forma, apenas o IBA, NAA e IAA produziram plantas normais. Todavia o 2,4-D induziu, em todas as concentrações testadas, a formação de calos nas bases de 100% dos explantes, ao passo que com o NAA as porcentagens de indução foram apenas de 10 a 30% em todos os tratamentos. Os pesos frescos médios dos calos produzidos por explante em NAA foram de 89 a 198 mg e de 147 mg em 2,4-D a 1.0 mg.l⁻¹, concentração que promoveu crescimento significativamente superior às demais. Os pesos frescos das culturas foram significativamente inibidos pelo 2,4-D 0.5 mg.l⁻¹ e promovidos pelo IBA e NAA, em todas as concentrações, e pelo IAA a 1.0 mg.l⁻¹ variando de 214.9 a 270.3 mg (Tabela 4). O 2,4-D inibiu significativamente o número total de ramos e de gemas axilares produzidas por explante, assim como o crescimento do ramo principal e das raízes, não interferindo, contudo, no número de raízes induzidas por explante. Efeito inibitório significativo no número total de ramos foi também observado na concentração de 1.0 mg.l⁻¹ de NAA em relação às demais concentrações. Contudo esta auxina promoveu significativamente o número total de gemas axilares (6.1 gemas/explante) a 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ e o número de raízes (7.5-7.9 raízes/explante), não afetando o seu crescimento. A maior taxa de proliferação foi obtida quando os explantes foram mantidos em IBA a 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹, condições que promoveram significativamente o número total de ramos (3.0-3.3 ramos/explante) e o número total de gemas axilares presentes nestes ramos (7.8-8.8 gemas/explante). Com exceção do 2,4-D e do NAA, as demais auxinas não interferiram no desenvolvimento do sistema radicular das microplantas. O IAA não apresentou qualquer efeito no crescimento da parte aérea ou do sistema radicular. Em meio desprovido de reguladores de crescimento a porcentagem de microestacas que enraizaram a partir do quarto dia do início do experimento foi de apenas 15.5%, alcançando 60% após o oitavo dia, e a porcentagem máxima de 93.3% após 16 dias de cultura (Tabela 5, Figura 5). O número de raízes produzidas por explante nestas condições foi baixo, de 1.31±0.2 no oitavo

dia, atingindo o valor máximo de 5.93 ± 0.6 após 32 dias (Tabela 6, Figura 3). PUROHIT et al. (1994) testaram estas mesmas auxinas na multiplicação de ramos de *Chlorophytum borivilianum* (planta medicinal), e obtiveram resultados semelhantes com relação à formação de calos e número de ramos.

Tabela 3. Efeito de auxinas na frequência (%) de respostas morfogênicas e no peso fresco de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus urinaria*. Dados obtidos de 20 repetições.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Ramos laterais	Raízes	Calos	Plantas normais	Peso fresco do calo (mg)
2,4-D	0.00	100	25	100	0	100	*
	0.25	100	20	10	100	0	^z 112.60ab
	0.50	100	0	5	100	0	103.40b
	1.00	100	0	0	100	0	147.45a
IBA	0.00	100	15	85	0	85	*
	0.25	100	20	80	0	80	*
	0.50	100	30	95	0	95	*
	1.00	100	20	100	0	100	*
NAA	0.00	100	40	95	0	95	*
	0.25	100	50	100	10	90	89.00a
	0.50	100	45	100	10	90	114.00a
	1.00	100	0	100	30	30	198.00a
IAA	0.00	100	25	80	0	80	*
	0.25	100	25	75	0	75	*
	0.50	100	40	80	0	80	*
	1.00	100	10	75	0	75	*

^z Valores (N = 20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

* Tratamentos que não formaram calos.

Tabela 4. Efeito de auxinas na micropropagação de *Phyllanthus urinaria* a partir de segmentos nodais.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Peso fresco das culturas (mg)	Número total de ramos	Comprimento do ramo principal (cm)	Número total de nós	Comprimento da raiz principal (cm)	Número de raízes
2,4-D	0.00	^z 205.05a	1.85a	4.72c	7.00a	2.58a	3.23a
	0.25	184.00ab	1.30b	1.75b	3.00b	0.85b	2.50a
	0.50	162.05b	1.20b	1.43ab	2.30bc	0.50b	2.00a
	1.00	187.15ab	1.10b	1.03a	1.50c	*	*
IBA	0.00	153.00c	2.35bc	4.95a	6.15b	2.32a	3.76a
	0.25	216.70b	2.15c	5.76a	6.00b	2.67a	3.50a
	0.50	268.20ab	3.35a	6.36a	8.80a	2.94a	3.10a
	1.00	287.35a	3.00ab	6.56a	7.85a	3.78a	3.42a
NAA	0.00	179.85c	1.40ab	6.60a	5.80ab	2.84a	5.05b
	0.25	210.55bc	1.50a	6.57a	6.15a	2.82a	7.90a
	0.50	247.80ab	1.45a	6.77a	6.15a	2.22a	7.50a
	1.00	270.30a	1.00b	5.15a	4.75b	2.17a	7.94a
IAA	0.00	151.35b	1.90a	3.51a	4.80a	1.56a	3.06a
	0.25	190.10ab	1.90a	4.27a	6.45a	1.65a	4.46a
	0.50	202.95ab	2.40a	4.11a	6.80a	2.00a	5.18a
	1.00	214.90a	2.35a	3.39a	5.85a	1.71a	4.33a

^z Valores (N = 20) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

*Tratamentos que não formaram raízes.

3.3. Aclimação

A porcentagem de sobrevivência 'ex vitro' das microplantas foi de 100% durante as cinco primeiras semanas de aclimação e estabilizou em 91.6% a partir da sexta semana (Tabela 7, Figura 1_{CapIV} C). O início do processo de floração ocorreu a partir da quarta semana de cultivo 'ex vitro', período em que as plantas já se encontravam em substrato constituído de areia e solo (Figura 1_{CapIV} D). A porcentagem de floração atingiu 61% na quarta semana e permaneceu em 93.9% a partir da oitava semana (Tabela 8, Figura 4).

3.4. Cultura de calos e de raízes

A Tabela 10 mostra os efeitos de BAP, cinetina e 2iP na morfogênese de segmentos nodais mantidos em posição horizontal no meio de cultura. Nestas condições as citocininas não foram efetivas em induzir a formação de ramos e raízes nos explantes e induziram a formação de calos em porcentagens que variaram de 39.1 a 54.2%, em meio suplementado com BAP, e de 8 a 41.6% com a cinetina. Apenas o 2iP apresentou taxas de indução de calos superiores, entre 87.5 e 100%. A cinetina e o BAP não foram eficientes em promover o crescimento dos calos induzidos, pois o incremento em peso fresco máximo alcançado com o BAP a 0.5 mg.l⁻¹, apesar de significativo, foi de apenas 50.08 mg. Entretanto o 2iP estimulou significativamente o incremento em peso fresco dos calos em todas as concentrações, sendo que na concentração de 1.0 mg.l⁻¹ o valor médio do peso fresco do calo produzido por explante foi de 188.54 mg, valor este significativamente superior aos observados nas demais concentrações, de 104.50 a 107.91 mg. Os calos produzidos eram friáveis e apresentavam estruturas globulares na superfície (Figura 1_{CapIV} E).

Os resultados da Figura 6 indicam que o padrão de crescimento das raízes consistiu de duas fases distintas, sendo que nos primeiros 30 dias de cultivo o crescimento foi rápido, com taxa média de crescimento de 28.0±7.76 mg.dia⁻¹, alcançando valor médio máximo de 852.0±9.4 mg aos 30 dias e declinando entre 30 e 60 dias, em taxa média de 18.4±7.5 mg mg.dia⁻¹, devido ao processo de senescência das culturas (Figura 1_{CapIV} F). Este processo ocorreu de forma moderada entre 30 e 45 dias, período em que a taxa de redução no

crescimento foi de $14.9 \pm 6.65 \text{ mg.dia}^{-1}$, tornando-se intenso entre 45 e 60 dias, com taxa de redução no crescimento de $22.3 \pm 7.45 \text{ mg.dia}^{-1}$

Tabela 5. Frequência (%) de enraizamento de microestacas de *Phyllanthus urinaria* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento durante 36 dias. Dados obtidos de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)							
	0	4	8	12	16	24	32	36
1	0	13.30	53.30	73.30	86.70	86.70	86.70	86.70
2	0	20.00	66.70	66.70	100	100	100	100
3	0	13.30	60.00	73.30	93.30	93.30	93.30	93.30
Média±DP	0	15.53±3.8	60±6.7	77.76±7.7	93.3±6.6	93.3±6.6	93.3±6.6	93.3±6.6

Tabela 6. Número de raízes produzidas por microestaca de *Phyllanthus urinaria* durante 36 dias. Médias de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)								
	0	4	8	12	16	20	24	28	36
1	0	0.13	1.26	2.20	3.53	4.00	4.33	4.53	5.20
2	0	0.20	1.53	3.06	4.33	4.60	5.53	6.00	6.40
3	0	0.30	1.13	2.20	3.80	4.13	4.80	5.73	6.20
Média±DP	0	0.15±0.03	1.31±0.2	2.48±0.5	3.88±0.4	4.24±0.3	4.88±0.6	5.42±0.78	5.93±0.6

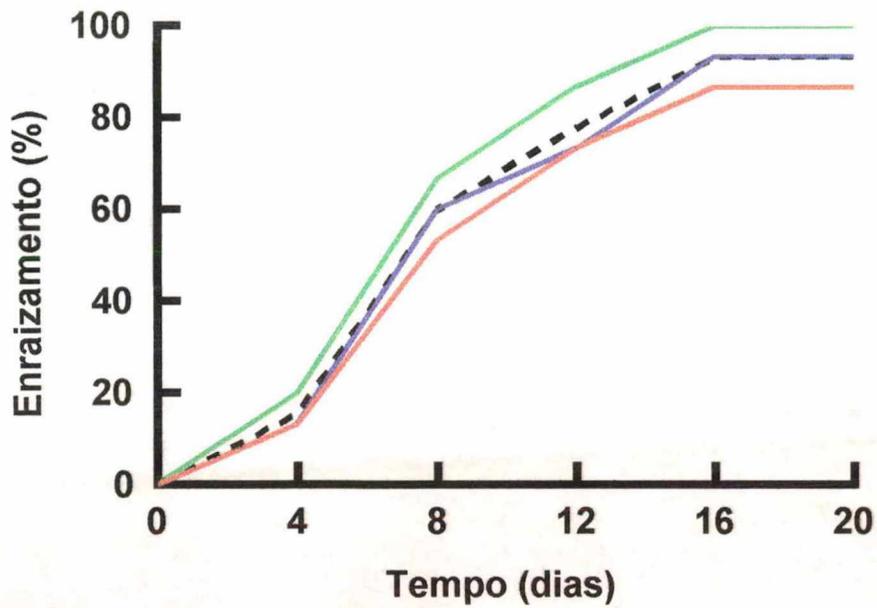


Figura 2. Enraizamento 'in vitro' de microplantas de *Phyllanthus urinaria* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

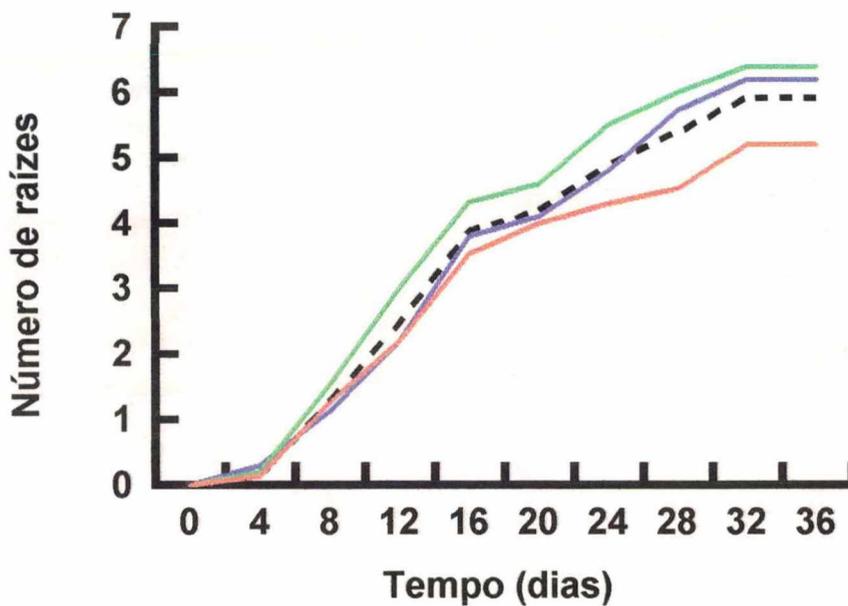


Figura 3. Número de raízes formadas 'in vitro' por microplantas de *Phyllanthus urinaria* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 7. Frequência (%) de sobrevivência 'ex vitro' de plantas micropropagadas de *Phyllanthus urinaria* durante 9 semanas. Dados de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6
2	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6
3	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6	91.6
Média±DP	100	100	100	100	100	91.6	91.6	91.6	91.6

Tabela 8. Frequência (%) de floração 'ex vitro' de plantas micropropagadas de *Phyllanthus urinaria* durante nove semanas. Dados de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	0	0	41.6	45.4	81.8	100	100	100
2	0	0	0	75	81.8	90.9	90.9	90.9	90.9
3	0	0	0	66.6	81.8	81.8	81.8	90.9	90.9
Média±DP	0	0	0	61±17.3	69.8±21	84.8±5	90.9±9	93.9±5	93.9±5

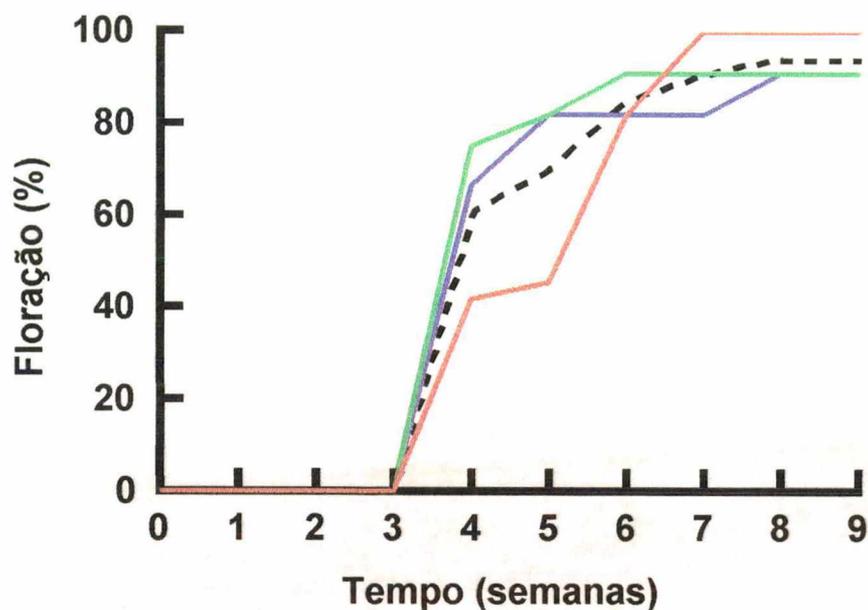


Figura 5. Floração em microplantas aclimatadas de *Phyllanthus urinaria* em função do tempo. As linhas contínuas são os resultados de três repetições. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 9. Crescimento 'ex vitro' em altura (cm) (a), número de folhas (b) e número de ramos (c) de plantas micropropagadas de *Phyllanthus urinaria* após três e nove semanas. Médias de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)			
	3		9	
	(a)	(b)	(a)	(c)
1	2.42	3.58	9.81	6.36
2	2.57	3.91	9.09	5.63
3	2.20	3.91	9.81	6.54
Média±DP	2.39±0.18	3.8±0.19	9.57±0.4	6.17±0.4

Tabela 10. Efeito de citocininas na frequência (%) de respostas morfogênicas e crescimento em peso fresco dos calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus urinaria* mantidos em posição horizontal no meio de cultura. Dados de 24 repetições.

Citocininas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Calos	Peso fresco do calo (mg)
BAP	0.00	0	0	0	^z 24.37b
	0.25	0	0	41.6	35.00ab
	0.50	0	0	54.2	50.08a
	1.00	0	0	39.1	29.72ab
CIN	0.00	0	0	0	24.37a
	0.25	0	0	8.3	15.08a
	0.50	0	0	41.6	22.62a
	1.00	0	0	12.5	24.20a
2iP	0.00	0	0	0	24.37c
	0.25	0	0	100.0	104.50b
	0.50	0	0	95.8	107.91b
	1.00	0	0	87.5	188.54a

^z Valores (N = 24) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

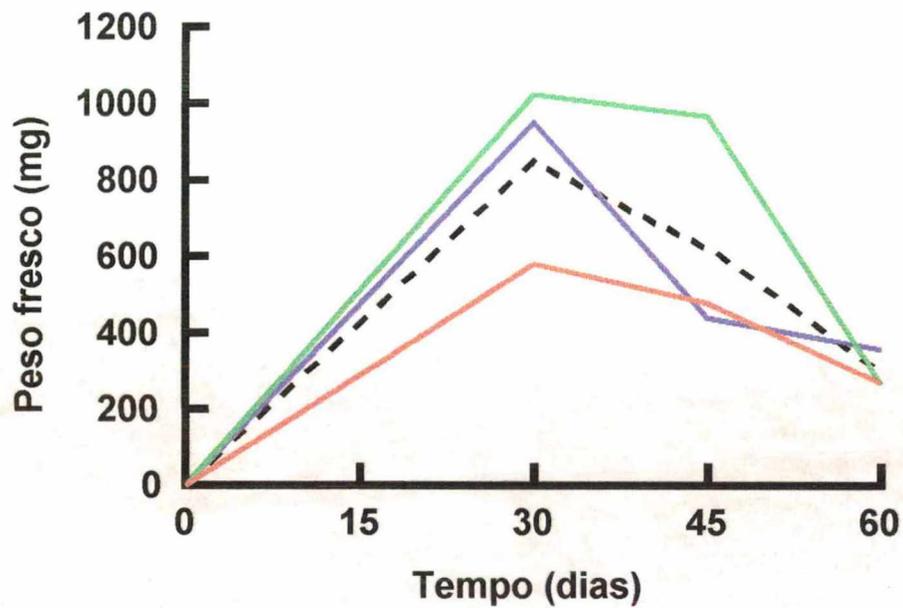


Figura 6. Crescimento 'in vitro' de raízes de *Phyllanthus urinaria*. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com três repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

CAPÍTULO V

INDUÇÃO DE CALOS E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Phyllanthus fraternus* (EUPHORBIACEAE)

1. Introdução

O *P. fraternus* (Euphorbiaceae) é utilizado na medicina popular para o tratamento de diarreias e distúrbios do aparelho urinário e digestivo e apresenta compostos com atividade antiespasmódica (CALIXTO et al., 1984) analgésica (MIGUEL et al., 1995; SANTOS et al., 1994, 1995 e 1996), antiviral (UNANDER et al., 1993; CHANG et al., 1995; QIANCUTRONE et al., 1996), diurética e hipotensiva (SRIVIDYA & PERIWAL, 1995). As prováveis classes de compostos relacionados a estas ações biológicas e já identificados para estas espécies são: flavonóides, lactonas, esteróides, terpenóides, lignanas, taninos e outros (TEMPESTA et al., 1988; ISHIMARU et al., 1992; POLYA et al., 1995; MIGUEL et al., 1996; HOUGHTON et al., 1996; HUANG et al., 1998 e SITTIE et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 1998). Esta espécie também apresenta em seu extrato etanólico algumas amidas. SITTIE et al. (1998) identificaram e isolaram duas alcanidas que poderão explicar a utilização desta espécie pela população de Ghana para o tratamento da malária.

SARADHI & ISLAMIA (1997) desenvolveram um sistema de multiplicação 'in vitro' de *P. fraternus* para a multiplicação de genótipos selecionados com altos níveis de princípios ativos ou valor terapêutico. Este sistema proporcionou a obtenção de uma taxa de multiplicação de 14-16 plantas por explante.

O objetivo deste trabalho foi determinar as condições básicas para o estabelecimento 'in vitro', aclimatação e produção de calos de *P. fraternus* para a multiplicação rápida e análises fitoquímicas.

2. Material e métodos

Sementes de *P. fraternus* foram desinfectadas superficialmente através de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (Clorisol) contendo 2.5% de cloro ativo e

duas gotas de detergente neutro, por 30 minutos. Posteriormente as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada e inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS, Sigma Co., USA), suplementado com 20 g.l⁻¹ e 6 g.l⁻¹ agar (Agar Type, Sigma Co.). As culturas foram mantidas a 25°C, em fotoperíodo de 16h provido por lâmpadas fluorescentes Philips LD (22.3 μmol fotons.s⁻¹.m⁻²), condições estas também utilizadas nos experimentos de aclimação. Após 50 dias as plantas axênicas produzidas foram multiplicadas através da cultura de segmentos nodais, em meio MS suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 2 g.l⁻¹ de fitagel (Phytigel, Sigma Co., USA), desprovido de reguladores de crescimento, de forma a produzir plantas como fonte de explantes para os experimentos. Nesta fase de desenvolvimento as culturas foram avaliadas com relação aos seguintes parâmetros: peso da matéria fresca total das culturas, número de ramos principais, número de ramos laterais, número de ramos totais, comprimento do ramo principal, número de nós, comprimento da raiz principal e número de raízes.

Segmentos nodais de 0.8 a 1.2 cm, desprovidos de folhas e contendo apenas uma gema lateral, foram removidos de plantas axênicas com 30 a 40 dias de idade e utilizados nos experimentos de enraizamento e formação de calos. Exceto quando mencionado, os explantes foram inoculados na posição vertical no meio de cultura.

Para estudar os efeitos isolados dos reguladores de crescimento na formação de calos, NAA, 2,4-D, IAA e IBA foram adicionados ao meio MS suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 6 g.l⁻¹ de agar, nas concentrações de 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, mg.l⁻¹. Para a iniciação de cultura de raízes os segmentos de raízes foram inoculados em frascos erlenmeyers de 125 ml contendo alíquotas de 20 ml de meio MS líquido suplementado com 20 g.l⁻¹ de sacarose e 0.2 mg.l⁻¹ de NAA. Os valores do pH do meio de cultura foram ajustados para 5.8, com NaOH 0.1M ou HCl 0.1N, antes da distribuição em tubos de ensaio de 20 x 150 mm e autoclavagem a 121°C por 18 minutos.

Nos experimentos de indução de calos os explantes foram inoculados na posição horizontal sobre o meio de cultura e as culturas foram mantidas a 25°C, no escuro. Em todos os experimentos foram utilizadas 24 repetições por tratamento. Após 50 dias as culturas foram avaliadas com relação às frequências das respostas morfogênicas apresentadas, tais como formação de ramos, raízes e calos, e quanto aos seguintes

parâmetros: peso da matéria fresca dos calos e peso da matéria fresca das raízes produzidas pelos calos.

A análise da dinâmica do enraizamento das microestacas, desprovidas de folhas e contendo apenas uma gema axilar, em meio MS não suplementado com reguladores de crescimento, foi conduzida durante 40 dias. Foram utilizadas três repetições contendo 15 explantes cada e em intervalos periódicos de quatro dias as culturas foram avaliadas com relação à frequência de enraizamento e ao número de raízes formadas. As culturas de raízes foram mantidas a 25°C no escuro, em agitador rotatório horizontal a 100 r.p.m. Os valores dos pesos da matéria fresca das raízes foram avaliados 50 dias.

A aclimação de plantas completas, produzidas em meio desprovido de reguladores de crescimento, foi realizada após 30 dias, ocasião em que foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas com água destilada para remoção do agar, e tiveram os ramos principais reduzidos, de forma a conter apenas duas gemas axilares por planta. Em seguida foram transferidas para bandejas de plástico de 150x250x50 mm contendo areia esterilizada e cobertas com filme de PVC perfurado. Após a primeira semana foram gradualmente expostas à atmosfera com 70% de umidade relativa e depois de 20 dias foram transferidas para copos plásticos de 250 ml contendo mistura de areia e terra não esterilizadas, na proporção de 1:1. As culturas foram mantidas nas mesmas condições utilizadas para os estudos de cultivo 'in vitro'. Foram utilizadas três repetições com 12 plantas cada. As plantas foram avaliadas periodicamente durante nove semanas quanto à frequência de sobrevivência, comprimento da parte aérea, número de folhas e número de ramos.

As diferenças entre os valores das médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA) com um fator. A separação das médias foi realizada ao nível de significância de 5% (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

3. Resultados

3.1. Micropropagação

3.1.1. Crescimento das microplantas

Após 50 dias as microplantas crescidas em meio MS desprovido de reguladores de crescimento, a partir de segmentos nodais, apresentaram peso fresco médio de 322.66 ± 142.26 mg, comprimento médio do ramo principal de 10.8 ± 2.4 cm, 1.6 ± 0.8 ramos por planta e 9.3 ± 2.6 gemas axilares. A taxa de enraizamento obtida após 50 dias de cultivo foi de 93.33%, produzindo 5.6 ± 2.4 raízes por planta, com um comprimento médio da raiz principal de 2.95 ± 0.9 cm (Figura 1_{CapV} A).

3.1.2. Enraizamento de microestacas

A porcentagem de enraizamento das microestacas em meio desprovido de reguladores de crescimento foi em média de 24.9%, no quarto dia a partir do início do experimento, atingindo o máximo de 80.4% no décimo sexto dia e mantendo-se neste nível até a nona semana (Tabela 1, Figura 2). O número médio de raízes formadas por microplanta aumentou de 1.86 ± 0.6 , no oitavo dia, para valores de 4.47 ± 1.3 e 4.91 ± 1.29 , respectivamente, após 16 e 32 dias de cultivo (Tabela 2, Figura 3). Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que as microestacas de *P. fraternus* apresentaram uma fase rápida de enraizamento a partir do quarto dia de cultivo, estabilizando-se a partir do 12-16º dia. Este aspecto é importante pelo fato de que algumas plantas necessitam da suplementação de auxinas no meio de cultura para iniciarem o processo de enraizamento (SÁEZ et al., 1994; BERGER & SHAFFNER, 1995; FERNÁNDEZ et al., 1996; BHATTACHARYA & BHATTACHARYA, 1997), ao contrário de *P. fraternus*.

Quanto à dinâmica do aumento do número de raízes em função do tempo, observa-se uma fase lenta no aumento do número de raízes (entre 0-4 dias) e uma fase rápida (entre 4-12 dias), estabilizando-se a partir de 16-20 dias (Figura 2).

Tabela 1. Freqüência (%) de enraizamento de microestacas de *Phyllanthus fraternus* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento durante 36 dias. Dados obtidos de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)							
	0	4	8	12	16	20	32	36
1	0	25.00	66.67	75.00	91.33	91.33	91.33	91.33
2	0	16.60	50.00	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67
3	0	33.30	58.30	75.00	83.33	83.33	83.33	83.33
Média±DP	0	24.9±8.3	58.3±8.3	72.2±4.8	80.4±12.6	80.4±12.6	80.4±12.6	80.4±12.6

Tabela 2. Número de raízes produzidas por microestaca de *Phyllanthus fraternus* durante 36 dias. Médias de 15 explantes por experimento.

Experimentos	Tempo (dias)									
	0	4	8	12	16	20	24	28	36	
1	0	0.25	2.33	3.91	5.25	5.33	5.58	5.66	5.66	
2	0	0.16	1.16	2.50	2.91	3.25	3.33	3.33	3.41	
3	0	0.33	2.08	4.66	5.25	5.41	5.50	5.66	5.66	
Média±DP	0	0.24±0.08	1.86±0.6	3.69±1.1	4.47±1.3	4.66±1.2	4.80±1.2	4.88±1.3	4.91±1.2	

3.1.3. Aclimação

A porcentagem de sobrevivência das microplantas aclimatadas permaneceu em 100% até a quarta semana após o início do experimento, declinando para valores de 83.33% após a sexta semana e 52.5% após a nona semana (Tabela 3 Figura 4). O crescimento das microplantas após as três primeiras semanas de aclimação foi lento, de forma que apresentaram em média 2.73 ± 0.04 cm de altura e 2.58 ± 0.06 folhas. Por volta da nona semana, entretanto, os valores aumentaram em relação à altura das plantas para 7.76 ± 3.2 cm e produziram em média 4.80 ± 2.72 ramos, o que representou um incremento em altura de 64.8 % (Tabela 4, Figura 1_{CapV} B). Todas as plantas sobreviventes floresceram e frutificaram após 11 semanas de aclimação (Figura 1_{CapV} C e D)

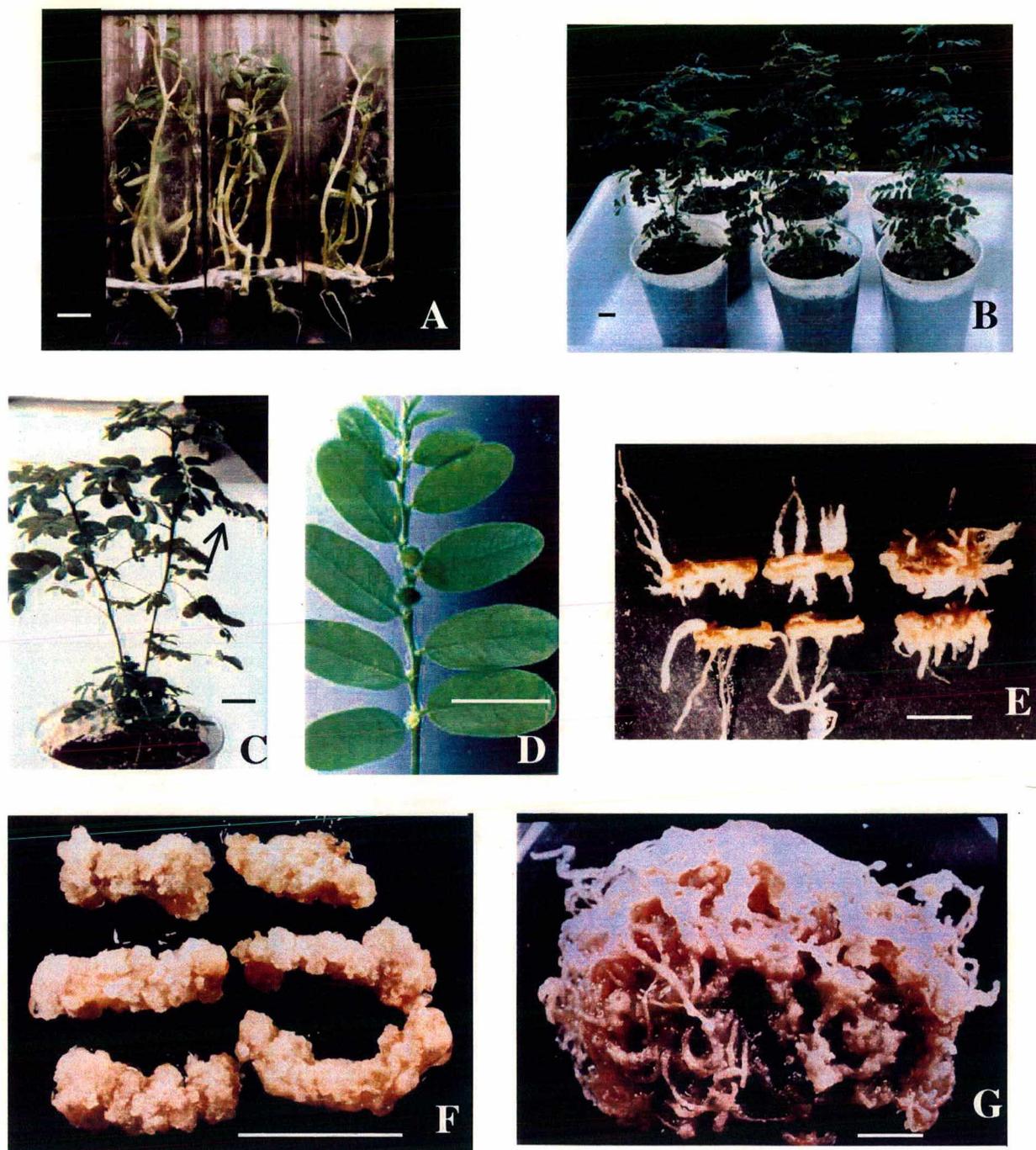


Figura 1_{CapV}. Cultura de ramos de *P. fraternus* iniciadas a partir de segmentos nodais em meio MS (A). Plantas aclimatadas (B). Flores e Frutos produzidos nas plantas aclimatadas (C, D). Rizogênese em segmentos de caule cultivados em meio MS suplementado com 0.25 mg.l^{-1} de NAA (E). Calos produzidos em meio MS suplementado com 1 mg.l^{-1} de 2,4-D (F). Raízes produzidas a partir de segmentos de ápices de raízes em meio MS suplementado com 0.2 mg.l^{-1} de NAA (G). Barras = 1 cm.

3.2. Cultura de calos e de raízes

O 2,4-D, IBA, NAA e IAA induziram respostas morfogênicas diversas nos segmentos nodais mantidos em posição horizontal no meio de cultura (Tabela 5). Todas as auxinas induziram a formação de calos em 100% dos explantes, em todas as concentrações testadas, e inibiram a formação de ramos. A indução de raízes nos explantes restringiu-se apenas aos tratamentos com IBA, NAA e IAA, que induziram o processo em 100% dos explantes, exceto nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹ de IAA, onde ocorreu uma redução de 95 e 79% na formação de raízes (Figura 1_{CapV} E). O crescimento dos calos foi significativamente promovido, em diferentes níveis, por 2,4-D, IBA e IAA. O NAA não apresentou resultados significativos no crescimento dos calos promovendo um peso fresco de 31 a 35 mg. O 2,4-D promoveu significativamente, em todas as concentrações, a formação de calos com pesos frescos de 90 a 97 mg, com estruturas globulares e friáveis (Figura 1_{CapV} F). O efeito promotor do IBA, no entanto, foi significativo a 1.0 mg.l⁻¹, pois os calos apresentaram em média de 40 a 59 mg de peso fresco. O IBA, NAA e IAA apresentaram efeitos significativos na promoção do crescimento das raízes produzidas nos calos em certas concentrações, em diferentes intensidades. O IAA induziu a formação de raízes com pesos frescos médios de 29 a 42 mg, sendo as concentrações de 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ significativamente superiores. Nos tratamentos com IBA a 0.5 mg.l⁻¹ e em NAA a 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ estes valores foram de 36.13 mg e 37.65 mg, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos com *Rauwolfia micrantha*, uma planta medicinal rara, cultivada em meio MS suplementado com NAA (SUDHA & SEENI, 1996). Geralmente o desenvolvimento de raízes é promovido através da suplementação de auxinas ao meio de cultura (CHO & SOH, 1989; DREW et al., 1991), e este processo também pode ocorrer em cultura de calos (CHEN et al., 1985; GONZALEZ et al., 1991; JAY-ALLEMAND et al., 1995).

Os valores da matéria fresca das culturas de raízes obtidos após 50 dias de cultivo 'in vitro' foram de 1.310±0.72 mg por frasco (Figura 1_{CapV} G). O desenvolvimento das raízes 'in vitro' de *P. fraternus* teve como objetivo a realização das análises fitoquímicas.

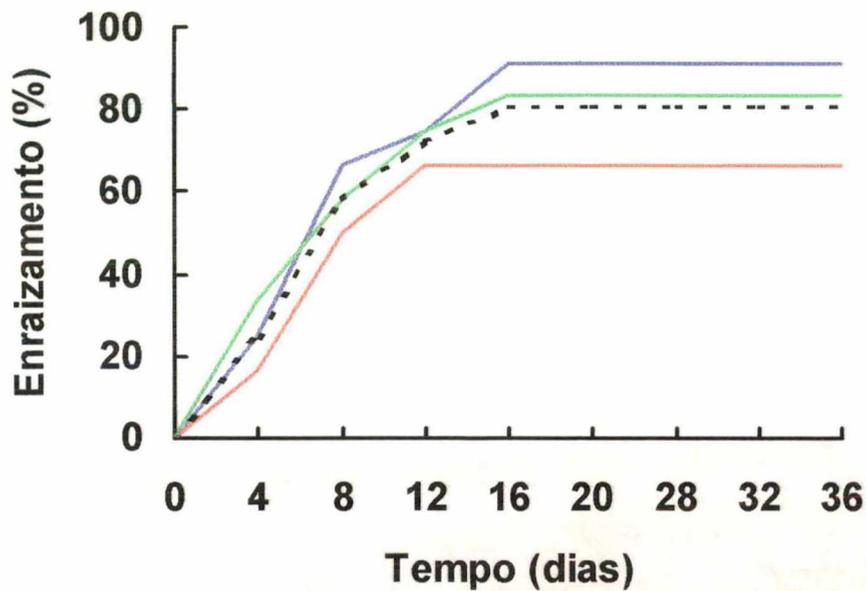


Figura 2. Enraizamento 'in vitro' de microplantas de *Phyllanthus fraternus* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

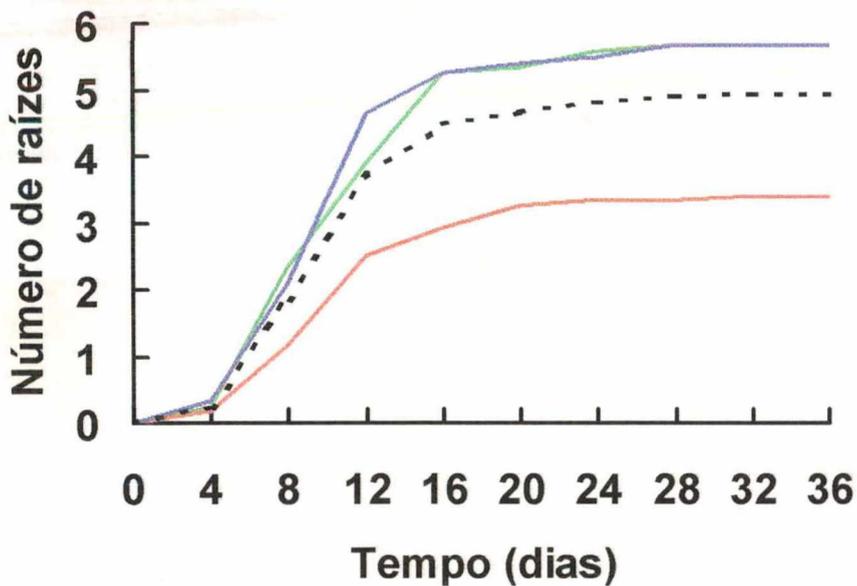


Figura 3. Número de raízes formadas 'in vitro' por microplantas de *Phyllanthus fraternus* em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As linhas contínuas são os resultados de três experimentos com 12 repetições cada. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 3. Frequência (%) de sobrevivência 'ex vitro' de plantas micropropagadas de *Phyllanthus fraternus* durante nove semanas. Dados de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	100	100	100	91.60	83.33	75.00	66.67	58.33
2	100	100	100	100	100	83.33	66.67	50.00	50.00
3	100	100	100	100	100	83.33	66.67	50.00	50.00
Média±DP	100	100	100	100	97.2±4.8	83.33	69.4±4.8	55.5±9.6	52.5±4.8

Tabela 4. Crescimento 'ex vitro' em altura (cm) (a), número de folhas (b), e número de ramos (c) de plantas micropropagadas de *Phyllanthus fraternus* após três e nove semanas. Médias de 12 repetições por experimento.

Experimentos	Tempo (semanas)			
	3		9	
	(a)	(b)	(a)	(c)
1	2.70	2.50	12.30	8.66
2	2.80	2.58	6.00	3.00
3	2.69	2.66	5.00	2.75
Média±DP	2.73±0.04	2.58±0.06	7.76±3.2	4.80±2.72

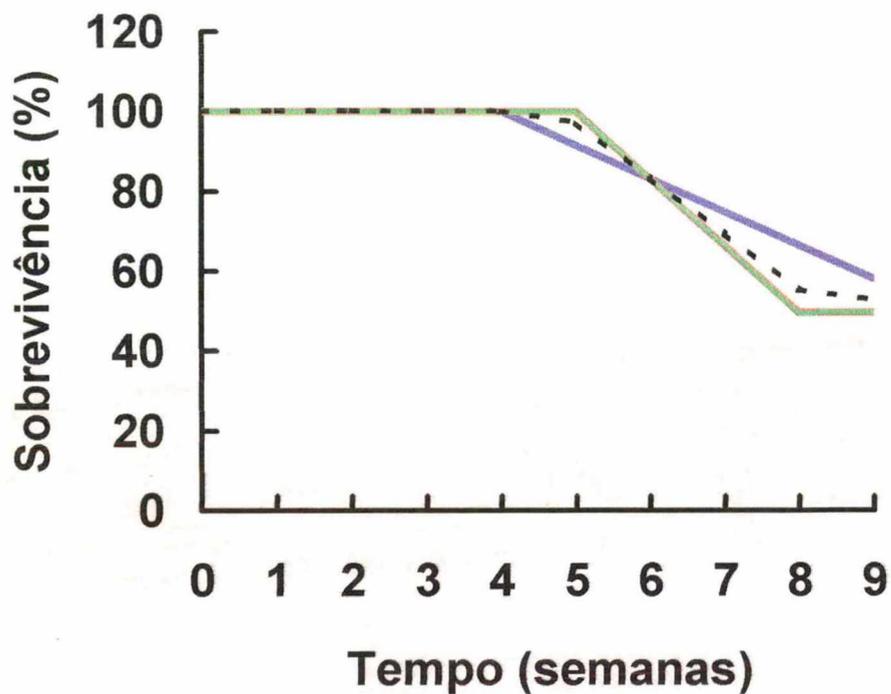


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência de microplantas de *Phyllanthus fraternus* em função do tempo. As linhas contínuas representam os resultados de três repetições. A linha pontilhada representa a média.

Tabela 5. Efeito de auxinas na frequência (%) de respostas morfológicas e no crescimento de calos produzidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus fraternus* mantidos em posição horizontal no meio de cultura. Dados obtidos de 22 a 24 repetições.

Auxinas	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ramos	Raízes	Calos	Peso fresco do calo (mg)	Peso fresco das raízes (mg)
2,4-D	0.00	0	100	0	29.25b	*
	0.25	0	0	100	97.00a	*
	0.50	0	0	100	90.95a	*
	1.00	0	0	100	91.83a	*
IBA	0.00	0	100	0	29.25c	*
	0.25	0	100	100	40.45b	26.45b
	0.50	0	100	100	48.59b	36.13a
	1.00	0	100	100	59.04a	16.54c
NAA	0.00	0	100	0	29.25a	*
	0.25	0	100	100	32.45a	37.65a
	0.50	0	100	100	35.13a	29.22ab
	1.00	0	100	100	31.04a	27.09b
IAA	0.00	0	100	0	29.25c	*
	0.25	0	100	100	68.59b	42.40a
	0.50	0	95.83	100	65.72b	40.28ab
	1.00	0	79.16	100	96.59a	29.05b

^z Valores (N=22-24) seguidos pela mesma letra não diferem significativamente em nível de 5% pelo teste da Diferença Mínima Significativa. As letras comparam as concentrações.

* Tratamentos onde não ocorreu a formação de raízes nos calos

CAPÍTULO VI

ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE CALOS E RAÍZES DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus* PRODUZIDOS 'IN VITRO'

1. Introdução

Segundo UNANDER (1996), existem poucos estudos dos compostos produzidos em cultura de tecidos de espécies de *Phyllanthus* e dos efeitos farmacológicos de seus extratos. Os estudos já desenvolvidos concentram-se na determinação da atividade antiviral, analgésica e antibacteriana dos extratos dos calos, bem como na determinação de alguns compostos por eles produzidos em espécies de *P. emblica*, *P. urinaria*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. abnormis* e *P. niruri*.

No presente trabalho procuramos verificar, através de distintos procedimentos cromatográficos, os principais metabólitos secundários produzidos em cultura de raízes e de calos de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fraternus*. Verificamos também a produção de alguns compostos já identificados em análises anteriormente realizadas em extratos de plantas produzidas no campo em relação aos extratos produzidos 'in vitro' através de CCD e CG.

2. Material e métodos

Os explantes utilizados para iniciar a produção dos calos foram segmentos nodais desprovidos de folhas com 0.8-1.2 cm, retirados da parte mediana do caule de plantas axênicas (*P. caroliniensis*, *P. urinaria*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*) cultivadas 'in vitro' em meio MS, com idade de 40 dias de cultivo. O meio de cultura utilizado nos experimentos foram preparações comerciais em pó, produzidas pela Sigma Chemical Co., suplementado com sacarose (20g.l⁻¹), agar (6g.l⁻¹) e 2,4-D na concentração de 1.0 mg.l⁻¹ exceto para o cultivo de *P. urinaria*, em que os reguladores de crescimento utilizados foram o IBA e o BAP na concentração de 8.0 e 2.0 mg.l⁻¹ respectivamente. O pH do meio foi ajustado para 5.8 e autoclavado por 18 min a 1Kgf.cm⁻², em temperatura de 120°C. Os explantes foram

inoculados na posição horizontal sobre o meio de cultura e as culturas foram mantidas a 25°C, no escuro.

Segmentos de raízes de plantas axênicas de *P. caroliniensis*, *P. urinaria*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*, com idade de 40 dias, cultivadas em meio MS desprovido de reguladores de crescimento, foram utilizados para iniciar o cultivo 'in vitro' de raízes. As raízes foram inoculadas em 20 ml de meio MS líquido suplementado com 20g.l⁻¹ de sacarose e 0.2 mg.l⁻¹ de NAA. Os frascos utilizados para o cultivo foram erlemeyers de 125 ml. As culturas foram mantidas a 25°C no escuro, em agitador rotatório de 100 r.p.m.

Após um período de cultivo de 40 a 50 dias, os calos (5-72 g) e as raízes (14-29 g) foram liofilizados ou secados em estufa por 48 h (40-50°C), macerados e mergulhados em 25 a 40 ml de metanol. O volume de metanol utilizado variou conforme a quantidade de extrato disponível. Os frascos contendo metanol e extrato foram mantidos fechados por cinco dias, para a extração dos compostos. Após esse período procedeu-se à filtração dos extratos através da utilização de papel-filtro, os quais foram mantidos na capela para evaporação do metanol em temperatura ambiente por um período de 7 a 8 dias. Após este período foram transferidos para o dessecador para a retirada da água e obtenção do extrato bruto. O parâmetro avaliado foi o rendimento (%), o qual foi obtido através do peso seco de calos e raízes utilizados em relação ao extrato bruto produzido por eles após a extração com metanol.

As análises fitoquímicas dos extratos produzidos 'in vitro' foram realizadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (CG).

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para definir algumas classes de constituintes químicos existentes nos extratos, como flavonóides, terpenóides e alcalóides, através de reações com diferentes reveladores específicos. As placas cromatográficas utilizadas foram placas pré-fabricadas, no tamanho de 20x20cm com 2 mm de espessura, de sílica (SiO₂) 60S da Merck. Para a realização da CCD, foram pesadas alíquotas de 10 mg do extrato dos calos e raízes de cada espécie de *Phyllanthus* analisada e diluídas em metanol numa concentração de 100 mg/ml. Foram retirados desta amostra 2 µl de cada extrato, sendo este o volume dos 'spots' aplicados nas placas cromatográficas, tanto dos extratos quanto dos padrões. A fase móvel e os reveladores utilizados foram pré-determinados em estudos anteriores realizados com as espécies de *Phyllanthus* e são

baseados na metodologia desenvolvida por UGAZ (1994) e NIERO (1993). A fase móvel utilizada constituiu-se numa mistura de clorofórmio e metanol, numa proporção de 90:10 respectivamente. Os reveladores utilizados foram: UV (luz ultravioleta), cloreto férrico (FeCl_3) para identificação de compostos fenólicos, anisaldeído sulfúrico para a identificação de esteróides e terpenos, e reativo de Dragendorff para identificação de alcalóides (UGAZ, 1994; Niero, 1993).

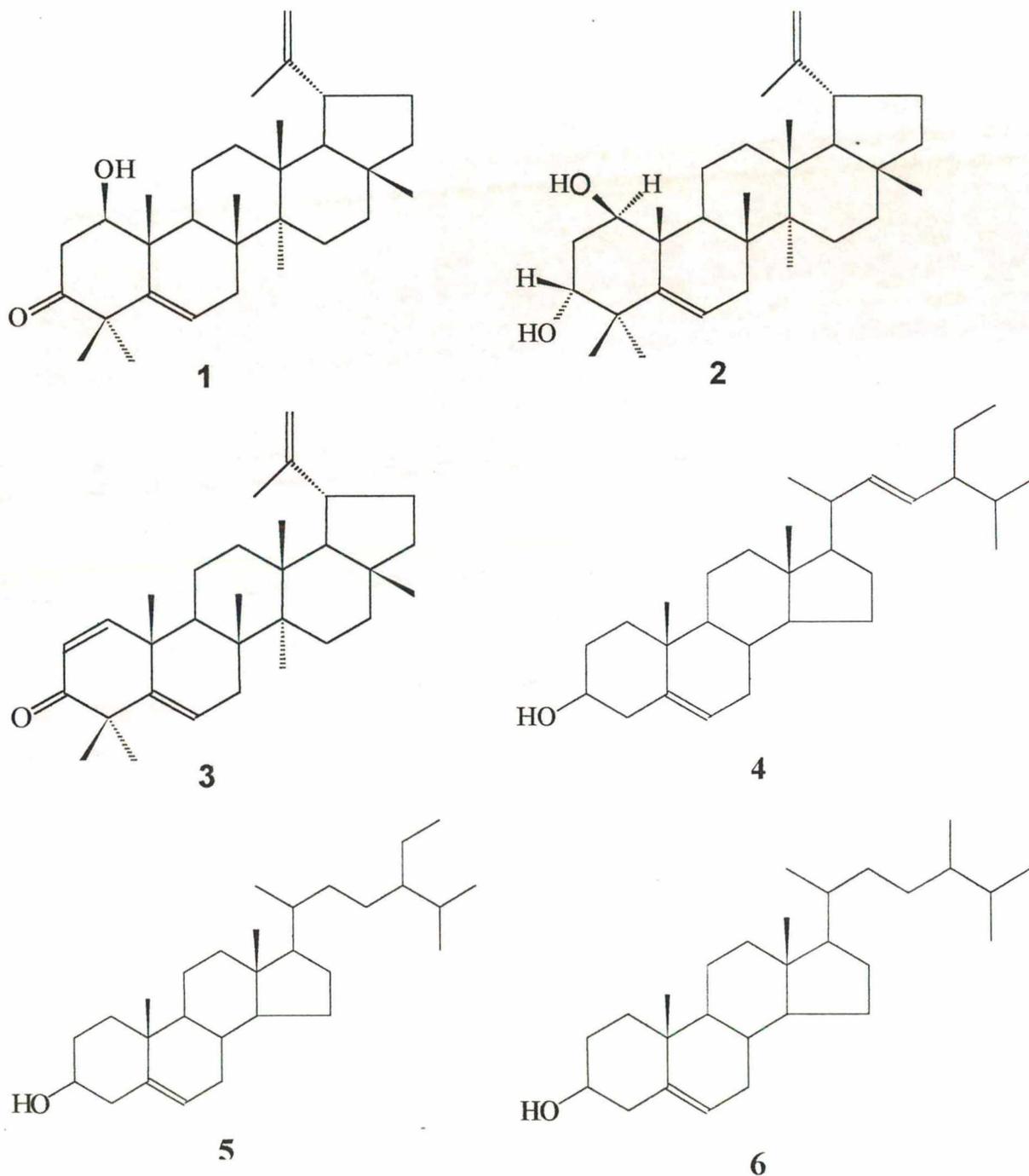
Os padrões utilizados para Co-CCD foram alguns compostos já identificados e purificados a partir de extratos de plantas de *Phyllanthus* crescidas no campo (CALIXTO et al., 1997 e 1998). Esta técnica também foi utilizada para identificar compostos já conhecidos (esteróis, terpenos e alcalóides), através de Co-CCD com amostras-padrão. Na Figura 1 estão apresentadas as estruturas moleculares dos compostos utilizados como padrão.

A Cromatografia Gasosa (CG), além de possibilitar um estudo qualitativo da amostra isolada, permite quantificar diversos compostos presentes no extrato utilizando co-injeções com amostras-padrão (BONATO, 1988). A metodologia para análise cromatográfica foi baseada em estudos desenvolvidos com espécies de *Phyllanthus* por NIERO (1993). Os calos e cultura de raízes foram preparados utilizando-se 5-10 mg do mesmo extrato preparado para a CCD. As alíquotas foram diluídas em 5 ml de clorofórmio (CHCl_3) por um período de duas horas. Após a evaporação do solvente, adicionou-se 30 μl de BSTFA a cada amostra, passando-se em seguida um fluxo de nitrogênio. As amostras foram então deixadas na estufa por uma hora à temperatura de 50 a 60 °C. Logo após, foi evaporado o restante do reagente com nitrogênio, procedendo-se à adição de diclorometano. As amostras foram mantidas no freezer até serem analisadas por CG (JAFFÉ et al., 1995).

As análises foram executadas em um coluna capilar (30m) de fase ligada do tipo LM-1 (polimetilsiloxano), hidrogênio como gás carregador (vazão de 1-2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, taxa de divisão de fluxo 40 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). A temperatura do injetor foi de 280°C e a do detector, 320°C. O período sem divisão de fluxo, quando utilizado, foi de um minuto. As condições de análise foram: temperatura inicial de 40°C, temperatura final de 310°C, a programação de temperatura foi de 40 a 240°C, a 12°C $\cdot\text{min}^{-1}$ e de 240 a 310°C a 5°C $\cdot\text{min}^{-1}$. O tempo de isoterma final foi de 20 minutos. O cromatógrafo a gás utilizado foi Shimadzu (modelo

CG-14B). Os cromatogramas foram armazenados e em seguida processados com auxílio de um 'software' da Microquímica

Figura 1. Estruturas moleculares dos triterpenos e esteróides isolados das raízes de *P. sellowianus* e presentes nos extratos de cultura de calos de outras espécies do gênero *Phyllanthus*.



Legenda: 1-Glochidonol; 2-Glochidiol; 3-Glochidona; 4-Stigmasterol; 5- β -sitosterol; 6-Campesterol

3. Resultados e discussão

A reação dos extratos de calos e raízes frente aos reveladores cloreto férrico, e reativo de Dragendorff e anisaldeído sulfúrico estão representados na Tabela 1. Observou-se a ausência de compostos fenólicos e alcalóides através das reações negativas dos extratos de calos e raízes frente aos reveladores cloreto férrico e reativo de Dragendorff, respectivamente. O revelador anisaldeído sulfúrico demonstrou a presença de esteróides e terpenos nos extratos, e tem sido utilizado em todos os testes em CCDs.

Tabela 1. Reação dos extratos de calos e raízes de espécies de *Phyllanthus* cultivados 'in vitro' frente aos diferentes reveladores utilizados na CCD.

Teste	<i>P. caroliniensis</i>	<i>P. stipulatus</i>	<i>P. urinaria</i>	<i>P. fraternus</i>
Cloreto férrico	-	-	-	-
Dragendorff	-	-	-	-
Anisaldeído sulfúrico	+	+	+	+

(-) negativo

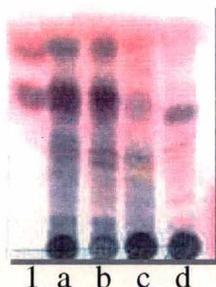
(+) positivo

Utilizou-se separadamente o glochidonol como padrão, por se ter observado que a análise de CCD para os extratos das raízes das espécies de *Phyllanthus* indicou a presença de um composto majoritário com $r_f \sim 0.8$, similar ao r_f do glochidonol. Os resultados confirmaram que nos extratos de raízes de *P. stipulatus* e *P. fraternus* (a e b), o glochidonol é o triterpeno presente em maiores concentrações, como pode ser observado na Figura 2.

É importante ressaltar que todos os extratos de calos apresentaram alguns compostos ainda não identificados em quantidades significativas em todas as placas (CCDs) e nos cromatogramas (CG) dos extratos dos calos. Estes compostos encontram-se com tempo de retenção de ± 15 min nos cromatogramas de CG e $r_f \sim 0.4$ nas CCDs, e poderão ser objeto de investigações posteriores (Figura 1 no anexo). Estas investigações também poderão ser realizadas em extratos de raízes através de CG, bem como através de

CCDs destes extratos com diferentes sistemas de solventes para a confirmação da presença de compostos já identificados ou não.

Figura 2. Cromatografia em camada delgada de extratos metanólicos de raízes de espécies de *Phyllanthus*.



- 1- Glochidonol
- a- Extrato de raízes de *P. stipulatus*
- b- Extrato de raízes de *P. fraternus*
- c- Extrato de raízes de *P. caroliniensis*
- d- Extrato de raízes de *P. urinaria*

3.1. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de *P. caroliniensis*

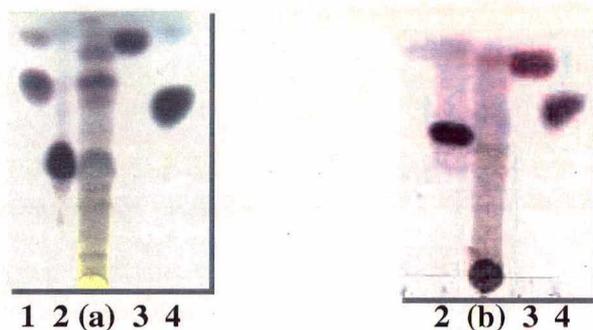
Na Tabela 2 estão representados os rendimentos de massa seca dos extratos de calos e de raízes de *P. caroliniensis* em relação ao peso seco original do material de partida. O rendimento obtido nos calos e na cultura de raízes foi semelhante, mantendo-se em torno de 13%. O cromatogramas dos extratos de calos e de raízes de *P. caroliniensis* e o cromatograma (CG) do extrato dos calos estão representados nas Figura 3 e 4 respectivamente.

A presença de esteróides e terpenos nos extratos dos calos foi confirmada através de CCD com padrões. Nos cromatogramas de CCD dos extratos de calos, observou-se a provável presença de glochidonol em maiores quantidades e glochidona em menores quantidades. A presença destes compostos nos extratos foi confirmada posteriormente através de CG (Figura 4). Nos extratos de raízes observou-se apenas a possibilidade da presença de glochidona em menores quantidades do que nos calos.

Tabela 2. Rendimentos de massa seca dos extrato metanólicos de calos e de raízes de *P. caroliniensis* em relação ao peso seco original de partida.

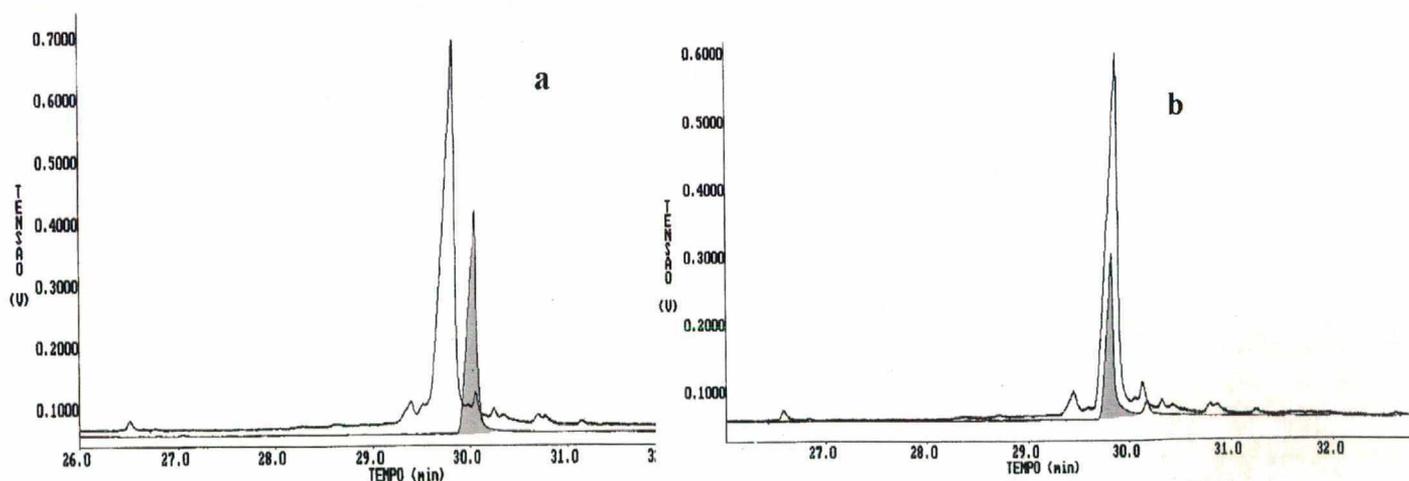
Material vegetal (<i>P. caroliniensis</i>)	Peso seco (mg)	Peso seco do extrato (mg)	Rendimento (%)
Calos	4.940	730	14.77
Raízes	2.060	259	12.57

Figura 3. Cromatografia em camada delgada de extratos metanólicos de calos (a) e de raízes (b) de *P. caroliniensis* cultivados 'in vitro'.



- 1-Glochidonol
- 2-Glochidiol
- (a)-Extrato dos calos de *P. caroliniensis*
- (b)-Extrato das raízes de *P. caroliniensis*
- 3-Glochidona
- 4-Stigmasterol

Figura 4. Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de calos de *P. caroliniensis* com sobreposição dos padrões: glochidona (a) e glochidonol (b).



3.2. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de *P. stipulatus*

Na Tabela 3 estão representados os rendimentos de massa seca dos extratos de calos e de raízes de *P. stipulatus* em relação ao peso seco original de partida. Os rendimentos obtidos foram semelhantes aos obtidos em *P. urinaria*: o rendimento dos extratos de calos foi maior do que o rendimento dos extratos de raízes.

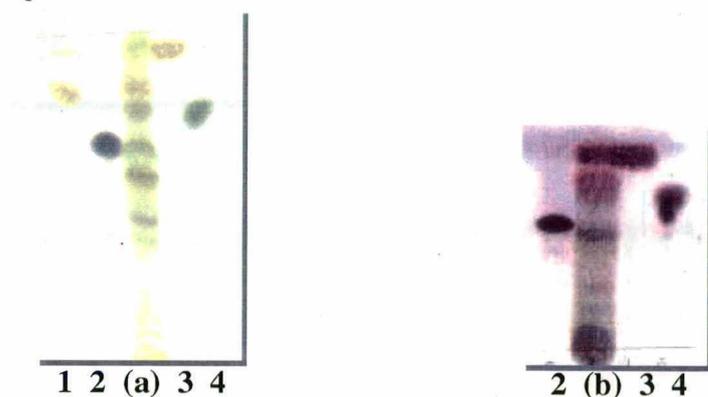
Nas Figuras 5 e 6 estão representadas as placas cromatográficas (CCD) contendo os extratos de calos e de raízes de *P. stipulatus* comparados com os padrões e o perfil cromatográfico obtido em CG (cromatograma), respectivamente. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados nas espécies de *P. caroliniensis* em relação às reações dos extratos aos reveladores.

A presença de esteróides e terpenos foi confirmada através de CCD com padrões em extratos de calos e de raízes. Nos extratos de calos observou-se a provável presença de compostos como o glochidiol e estigmasterol em maiores quantidades, e glochidonol em menores quantidades. Porém, apenas a presença de glochidonol e estigmasterol foi confirmada através de CG nestes extratos. Nos extratos de raízes observou-se a provável presença de glochidona e de estigmasterol em maiores e em menores quantidades, respectivamente.

Tabela 3. Rendimentos de massa seca dos extratos metanólicos de calos e de raízes de *P. stipulatus* em relação ao peso seco original de partida

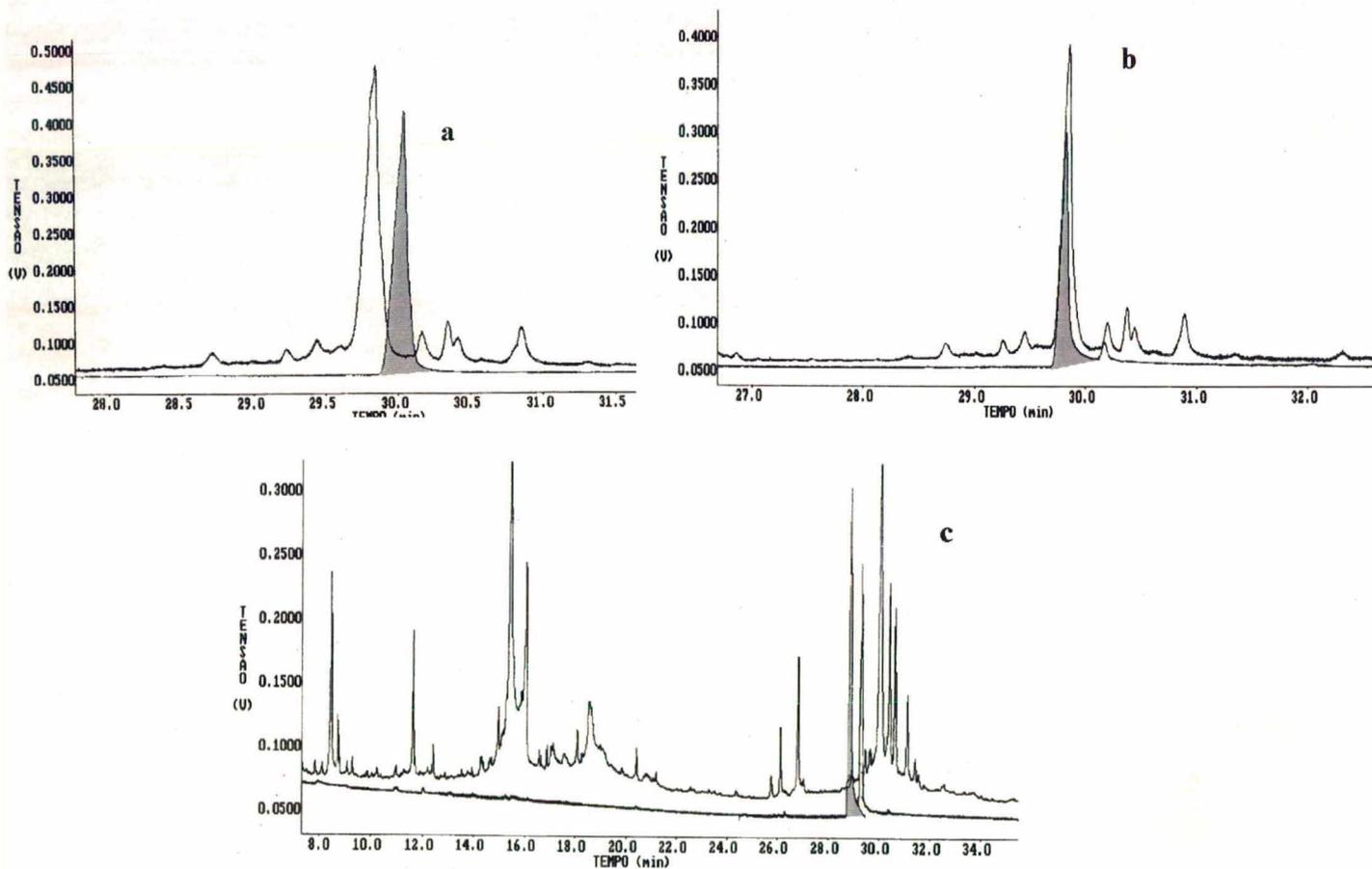
Material vegetal (<i>P. stipulatus</i>)	Peso seco (mg)	Peso seco do extrato (mg)	Rendimento (%)
Calos	3.936	498	12.65
Raízes	1.580	110	6.96

Figura 5. Cromatografia em camada delgada de extratos metanólicos de calos e de raízes de *P. stipulatus* cultivados 'in vitro'



- 1-Glochidonol
- 2-Glochidiol
- (a)-Extrato dos calos de *P. stipulatus*
- (b)-Extrato das raízes de *P. stipulatus*
- 3-Glochidona
- 4-Stigmasterol

Figura 6. Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de calos de *P. stipulatus* com sobreposição dos padrões: glochidona (a), glochidonol (b) e estigmasterol (c)



3.3. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de *P. urinaria*

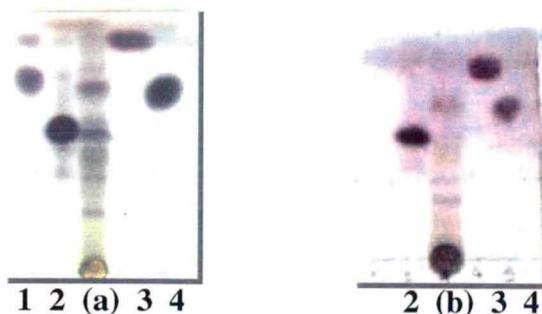
Os valores de rendimento de massa seca dos extratos de calos e de raízes de *P. urinaria* em relação ao peso seco original de partida estão representados na Tabela 4. Os rendimentos obtidos foram maiores em extratos de calos do que nos extratos de raízes.

As placas cromatográficas contendo os extratos de calos e de raízes de *P. urinaria* comparados com os padrões estão representadas na Figura 7. A presença de esteróides e terpenos foi confirmada através de CCD com padrões em extratos de calos e raízes. Nos extratos de calos observou-se a provável presença de compostos como o estigmasterol em maiores quantidades, e glochidiol em menores quantidades, porém nos cromatogramas de CG apenas a presença de estigmasterol e glochidonol foi confirmada (Figura 8). Nos extratos de raízes observou-se a provável presença de estigmasterol e a ausência dos outros compostos.

Tabela 3. Rendimentos de massa seca dos extratos metanólicos de calos e de raízes de *P. urinaria* em relação ao peso seco original de partida.

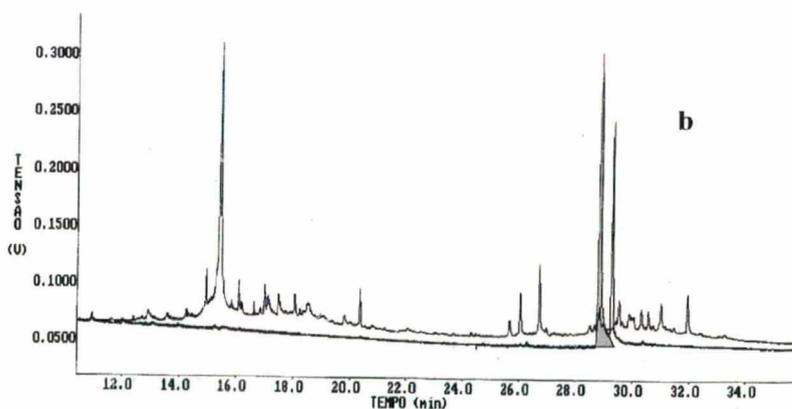
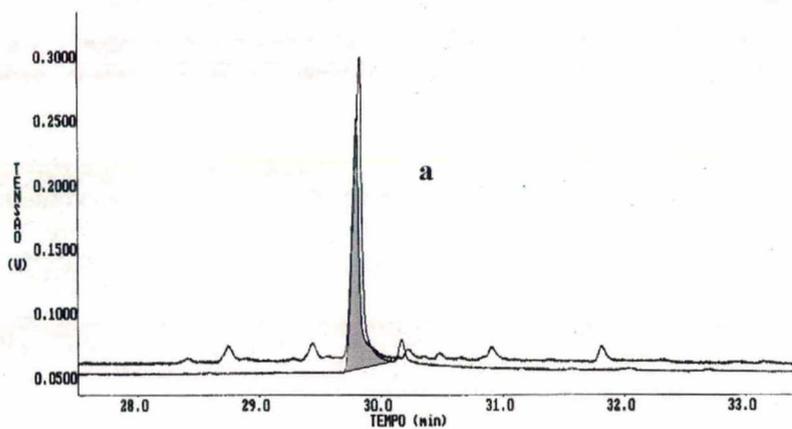
Material vegetal (<i>P. urinaria</i>)	Peso seco (mg)	Peso seco do extrato (mg)	Rendimento (%)
Calos	3.953	592	14.97
Raízes	1.990	121	6.08

Figura 7. Cromatografia em camada delgada de extratos metanólicos de calos e de raízes de *P. urinaria*



- 1-Glochidonol
- 2-Glochidiol
- (a)-Extrato dos calos de *P. urinaria*
- (b)-Extrato das raízes de *P. urinaria*
- 3-Glochidona
- 4-Stigmasterol

Figura 8. Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de calos de *P. urinaria* com sobreposição dos padrões: glochidonol (a) e estigmasterol (b).



3.4. Análise fitoquímica dos calos e das raízes de *P. fraternus*

Na Tabela 4 estão representados os rendimentos de massa seca dos extratos de calos e de raízes de *P. fraternus* em relação ao peso seco original de partida. O rendimento obtido para calos e raízes foi diferente: os calos apresentaram um bom rendimento de 42.02 %, enquanto que apenas 8.93% do peso seco das raízes foram obtidos nos extratos das mesmas.

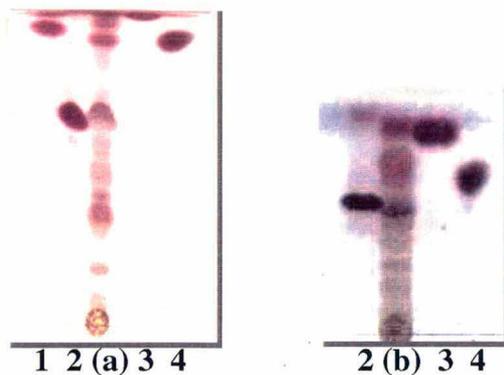
Na Figura 9 e 10 estão representados os cromatogramas de extratos de calos e de raízes de *P. fraternus* e os cromatogramas (CG) do extrato dos calos comparado com os padrões, respectivamente.

A presença de esteróides e terpenos foi confirmada através de CCD com padrões em extratos de calos, nos quais se observou a provável presença de compostos como glochidiol e estigmasterol e pouca quantidade de glochidona. Porém, a presença de glochidonol, glochidona e estigmasterol foi posteriormente confirmada através de CG nestes extratos (Figura 10). Nos extratos de raízes observou-se a provável presença de glochidona e pequenas quantidades de estigmasterol.

Tabela 5. Rendimentos de massa seca dos extratos metanólicos de calos e de raízes de *P. fraternus* em relação ao peso seco original de partida

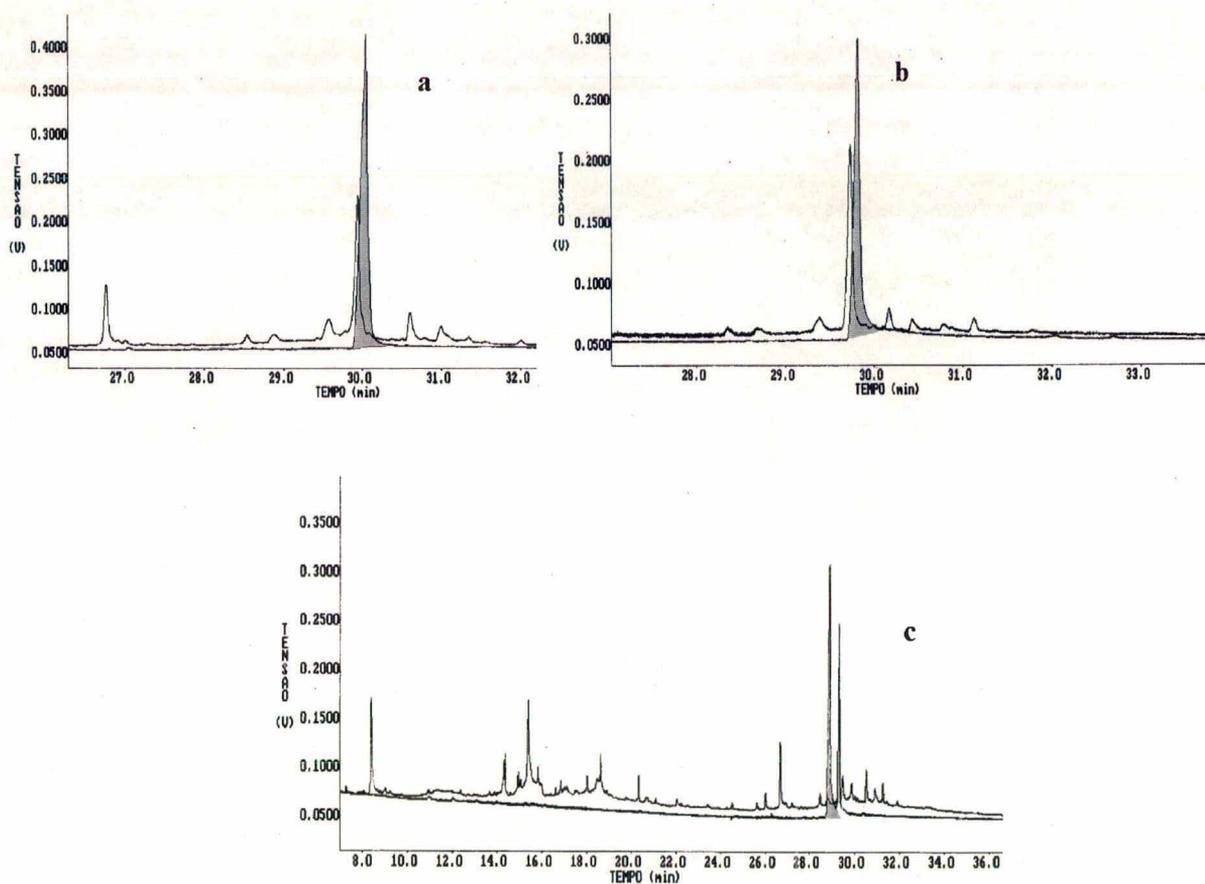
Material vegetal (<i>P. fraternus</i>)	Peso seco (mg)	Peso seco do extrato (mg)	Rendimento (%)
Calos	376	158	42.02
Raízes	2.340	209	8.93

Figura 9. Cromatografia em camada delgada de extratos metanólicos de calos e de raízes de *P. fraternus* 'in vitro'



- 1-Glochidonol
- 2-Glochidiol
- (a)-Extrato dos calos de *P. fraternus*
- (b)-Extrato das raízes de *P. fraternus*
- 3-Glochidona
- 4-Stigmasterol

Figura 10. Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de calos de *P. fraternus* com sobreposição dos padrões: glochidona (a), glochidonol (b) e estigmasterol (c).



CAPÍTULO VII

DISCUSSÃO GERAL

1. Micropropagação

1.1. Efeito das auxinas e citocininas

As citocininas podem atuar na micropropagação através da formação de ramos múltiplos, a partir das gemas axilares preexistentes ou pela indução da brotação das gemas axilares. O resultado esperado de qualquer protocolo de micropropagação consistente é que sejam desenvolvidas condições para a obtenção do máximo número possível de gemas axilares.

Nos experimentos de micropropagação de *P. caroliniensis* e *P. stipulatus* realizados neste trabalho foram testadas diferentes concentrações de citocininas e auxinas para a formação múltipla de ramos e enraizamento, respectivamente. Em *P. urinaria* foram testados apenas os efeitos das auxinas na micropropagação, pois as citocininas já haviam sido utilizadas em estudos realizados anteriormente por SILVA (1995).

Os resultados indicaram que a multiplicação dos ramos, por cultura 'in vitro', das diferentes espécies de *Phyllanthus* estudadas foi influenciada pelas citocininas e auxinas. Diferenças ligadas aos genótipos estudados em relação à morfogênese e às taxas de multiplicação de ramos em diferentes reguladores de crescimento foram detectadas. Assim, as diferentes espécies responderam de forma variada às concentrações de reguladores de crescimento utilizadas. As citocininas testadas em *P. caroliniensis* e *P. stipulatus* promoveram a formação de ramos em 100% dos explantes. Porém o BAP, em concentrações superiores a 0.25 mg.l^{-1} , inibiu a formação de raízes nestas duas espécies. As citocininas testadas não promoveram a formação dos calos em *P. caroliniensis*, no entanto 100% dos explantes de *P. stipulatus* formaram calos, exceto com BAP 1.0 mg.l^{-1} , que inibiu completamente sua formação nesta espécie. Outro aspecto interessante foi a floração 'in vitro' ocorrida em *P. caroliniensis* e a ausência do processo em *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fratermus*.

P. stipulatus apresentou baixa proliferação de ramos quando cultivada 'in vitro' e quando comparada com outras espécies de *Phyllanthus*. Por este motivo, somente para esta

espécie foram testadas concentrações mais baixas de citocininas do que as freqüentemente utilizadas para a formação múltipla de ramos, o que não causou inibição drástica no crescimento em comprimento de ramo principal e propiciou melhores condições de aproveitamento das gemas axilares produzidas durante o processo de repicagem das culturas. Uma outra alternativa para viabilizar o aumento da produção de ramos nesta espécie poderia ser a utilização de mais de uma citocinina no meio de cultura, ou até mesmo da utilização de concentrações ainda mais elevadas do que as testadas. Esta alternativa poderá ser realizada em experimentos posteriores.

A produção de biomassa de *P. caroliniensis* e de *P. stipulatus* é um aspecto interessante, pelo fato de indicar a possibilidade de se produzir biomassa de *Phyllanthus*, em larga escala, 'in vitro', como forma de fornecimento de matéria-prima para fins farmacológicos. Com relação à produção de biomassa total, as citocininas influenciaram de forma diferenciada as duas espécies. Em *P. stipulatus* ocorreu redução de no mínimo duas a três vezes o peso fresco e esta redução tendeu a aumentar nas concentrações maiores de citocininas, que em *P. caroliniensis* a produção de biomassa total manteve-se igual e/ou aumentou nas mesmas condições. Assim, resultados significativos no incremento de peso fresco das culturas de *P. caroliniensis* foram obtidos com 2iP 0.5 mg.l⁻¹; no entanto, em *P. stipulatus* houve, de fato, redução significativa no crescimento em peso fresco das culturas em todas as concentrações de citocininas testadas. SILVA (1995) encontrou resultados significativos quanto ao incremento de biomassa em *P. tenellus* e *P. corcovadensis*, sendo a produção de biomassa dependente do tempo de cultivo. Para *P. tenellus*, o pico de produção máxima de biomassa foi aos 60 dias, e para *P. corcovadensis* a permanência das culturas por mais de 45 dias causou um decréscimo da biomassa em consequência da senescência. Incrementos significativos no peso fresco das culturas de *P. tenellus* e *P. corcovadensis* foram obtidos com 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹ de BAP e 0.25 a 1.0 mg.l⁻¹ de 2iP. O 2iP na concentração de 1.0 mg.l⁻¹, também promoveu um aumento significativo no peso fresco das culturas de *P. urinaria*.

P. caroliniensis e *P. stipulatus* demonstraram diferentes sensibilidades em relação às concentrações ótimas de BAP utilizadas na multiplicação de ramos. Assim, o número total de ramos produzidos em *P. caroliniensis* foi maior quando comparado com *P. stipulatus*. Em *P. caroliniensis*, resultados significativos foram obtidos com BAP 0.25 a 1.0 mg.l⁻¹, em que o

número de ramos produzidos foi de 3.8 a 4.2 e o número total de nós/explante de 21 a 22.5, ao passo que os melhores resultados obtidos com *P. stipulatus* foram com o BAP a 0.06 a 0.12 mg.l⁻¹ e cinetina 0.12 mg.l⁻¹ em que o número de ramos produzidos foi de 1.5-1.8, e o número total de nós/explante de 5.3. Ambas as espécies, contudo, apresentaram respostas semelhantes com relação ao efeito inibitório das citocininas (0.25-1.0 mg.l⁻¹) no crescimento dos ramos em altura, com exceção da cinetina, na concentração de 0.25 mg.l⁻¹, que também promoveu aumento significativo no número de raízes produzidas em *P. stipulatus*. Esta diferença de sensibilidade aos reguladores pode ser explicada pelos níveis endógenos dos explantes. Além do BAP a 1.0 mg.l⁻¹, para a espécie de *P. caroliniensis*, outros tratamentos - como a cinetina na concentração de 0.25 mg.l⁻¹, e o 2iP, de 0.5 a 1.0 mg.l⁻¹ - promoveram taxas ótimas de multiplicação, ao passo que para *P. stipulatus* apenas a cinetina, a 0.12 mg.l⁻¹, apresentou semelhante resultado. SILVA (1995) testou a influência de várias concentrações de citocininas na multiplicação de ramos de *P. urinaria*, *P. tenellus* e *P. niruri*. Os resultados obtidos demonstraram que para *P. urinaria* o regulador de crescimento mais eficiente foi a cinetina (1.0 mg.l⁻¹), com taxa de multiplicação de 20 ramos por explante; para o *P. tenellus* e *P. niruri* o regulador mais eficiente foi o BAP (0.25 mg.l⁻¹), com taxa de multiplicação de oito e 20, respectivamente, e para o *P. corcovadensis* o regulador mais eficiente foi o 2iP (0.25 mg.l⁻¹), com taxa de multiplicação de nove.

Dentre as espécies selecionadas, verifica-se que apenas a espécie de *P. fraternus* tem sido estudada com relação à micropropagação. SARADHI & ISLAMIA (1997) utilizaram segmentos nodais desta espécie como explantes, para testar o efeito de diferentes concentrações de citocininas (BAP e Cinetina) na micropropagação. Na presença de BAP houve a formação de múltiplos ramos, e os melhores resultados (14-16 ramos por explante) foram obtidos na concentração de 2.25 mg.l⁻¹, após 28 dias de cultivo, os quais possibilitaram a multiplicação de genótipos desejáveis, de importância comercial.

Experimentos semelhantes, de indução de ramos com citocininas, foram desenvolvidos com outras espécies de plantas, e o BAP, em especial, também demonstrou ser eficiente no processo. BINCKNELL (1994) desenvolveu métodos adequados para multiplicação de ramos de *Hieracium aurantiacum*. Em seus estudos, demonstrou que o uso de uma citocinina isoladamente, BAP a 0.5 mg.l⁻¹, foi o melhor método para otimização da multiplicação de ramos. Resultados semelhantes foram encontrados por PEREIRA et al.

(1995), em que foram testadas várias concentrações de citocininas, isoladamente, na multiplicação de ramos de *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão), uma árvore nativa brasileira usada na medicina popular como agente cicatrizante. O meio que apresentou maior proliferação de ramos foi o meio MS suplementado com 3.0 mg.l⁻¹ de BAP. Outro trabalho em que as citocininas testadas isoladamente apresentaram bom resultado foi o de micropropagação de *Cleistanthus collinus*, árvore que apresenta compostos medicinais em seu extrato foliar. Neste caso, o meio MS suplementado com BAP 0.25 mg.l⁻¹ apresentou ótimas condições para a multiplicação dos ramos desta espécie (MISHRA et al., 1996).

Alguns trabalhos utilizam combinações de citocininas no mesmo meio de cultura, como alternativa para aumentar as taxas de multiplicação de ramos em espécies que não respondem muito bem à aplicação destes reguladores isoladamente. RAJAM (1994) testou o efeito de várias concentrações de duas citocininas BAP e cinetina na multiplicação de ramos de *Capsicum spp.* (pimenta vermelha) e obteve a taxa de multiplicação máxima quando testou 15 mg.l⁻¹ de BAP conjuntamente com 25 mg.l⁻¹ de cinetina. Uma outra espécie de planta medicinal, *Feronia limonia* (importante economicamente, por apresentar grande quantidade de vitamina C em seus frutos), também necessitou da adição de duas citocininas para o desenvolvimento do protocolo de micropropagação. Taxas ótimas de multiplicação 'in vitro' foram obtidas neste caso, quando se utilizou meio MS suplementado com 0.94 mg.l⁻¹ de cinetina e 1.0 mg.l⁻¹ de BAP (HOSSAIN et al., 1994).

As auxinas são testadas na micropropagação para induzir o enraizamento dos ramos produzidos. Neste trabalho, os resultados indicaram que a eficiência das auxinas na indução, no número e no crescimento das raízes nos explantes variou com a espécie de *Phyllanthus* estudada e nem sempre as auxinas que induziram ótimas taxas de enraizamento apresentaram a mesma eficácia em promover o crescimento e o número em raízes/explante, o que indica que a otimização do processo de enraizamento depende de investigação mais detalhada em relação ao efeito dos reguladores na indução e no posterior crescimento das raízes produzidas.

Estas diferenças entre os genótipos são provavelmente devidas ao balanço hormonal dos explantes no momento da inoculação no meio de cultura. Estudos realizados por SANCHEZ et al. (1996) com espécies de *Quercus robur* e *Q. rubra* demonstraram uma diferença significativa na capacidade de enraizamento dos explantes, até mesmo dentro de

clones da mesma espécie. Este fato foi atribuído às diferenças genéticas entre as espécies e a uma diferença qualitativa decorrente do estado fisiológico do explante utilizado. Um outro aspecto importante é que o enraizamento também tenha ocorrido, em todas as espécies, na ausência de reguladores de crescimento, o que indica que no caso de *Phyllanthus* é possível suprimir o tratamento com auxinas, para o enraizamento, o que pode diminuir o custo, no caso de se considerar a propagação sob o aspecto comercial. Um fato que respalda esta conclusão é que o nível de enraizamento que ocorre em meio sem auxinas foi suficiente para garantir, com sucesso, a aclimação das microplantas, o que indica que estas condições de cultura foram suficientes para induzir o porte mínimo de sistema radicular, necessário para o estabelecimento 'ex vitro' das plantas micropropagadas. Entretanto os efeitos promotores das auxinas no enraizamento devem ser considerados como potencial para o estabelecimento de cultura de raízes a partir de segmentos nodais. Resultados semelhantes foram obtidos por HOSOKI & KATAHIRA (1994), que desenvolveram um protocolo para a micropropagação de *Verbena tenera* (uma planta nativa brasileira mas cultivada também no Japão por produzir belíssimas flores) utilizando meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento com taxas de enraizamento significativas.

Geralmente as microplantas necessitam de uma suplementação de auxinas no meio de cultura para induzir a formação de raízes. BRASSARD et al.(1996) utilizaram auxinas como indutoras no enraizamento de uma espécie de Conífera (*Larix X eurolepis*), para posterior aclimação. A utilização de 0.3 mg.l⁻¹ de IBA e 0.2 mg.l⁻¹ de NAA promoveu o desenvolvimento das raízes, que ainda passaram por uma fase de subcultivo para promover sua alongação, para então serem as microplantas aclimatadas. KOROCH et al. (1997) desenvolveram um método para a micropropagação da *Hedeoma multiflorum*, que é uma planta aromática utilizada na indústria cosmética e farmacêutica. No protocolo desenvolvido também foi necessária a suplementação, com 0.1 mg.l⁻¹ de IAA, no meio de cultura, para a formação das raízes antes da aclimação das microplantas.

Em *P. caroliniensis* o número de raízes produzidas foi estimulado por IAA, e em *P. stipulatus* e *P. urinaria* por NAA, sendo que o comprimento das raízes foi reduzido ou permaneceu igual ao controle em todas as espécies. A relevância do acréscimo na quantidade de raízes produzidas em *P. stipulatus*, quando se testou o NAA nas concentrações de 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹, está no fato de que esta auxina poderá ser uma ótima indutora de raízes, quando o

objetivo principal for a iniciação de cultura de raízes. Resultados semelhantes foram observados com *P. urinaria*, e SILVA (1995), também obteve resultados significativos na indução e número de raízes quando testou NAA a 0.25 e 0.5 mg.l⁻¹, em *P. tenellus*, e a 1.0 mg.l⁻¹, em *P. corcovadensis*. O NAA é, dentre as auxinas, o regulador mais utilizado como promotor de enraizamento em vários trabalhos de micropropagação de plantas. Estudos conduzidos por SHARMA et al (1991) mostraram o efeito dos reguladores de crescimento, adicionados ao meio MS, na micropropagação 'in vitro' de uma erva medicinal (*Gentiana kurroo*) utilizada na Índia. Segmentos contendo nós desta planta foram inoculados em meio MS, suplementado com reguladores de crescimento, 3% de sacarose e 0.8% de agar. Os resultados apontados no referido trabalho indicaram a superioridade do BAP, isoladamente ou em combinação com o NAA, na indução e formação de raízes e na formação de ramos múltiplos naquela espécie.

É importante observar que, além de apresentarem efeitos no enraizamento, as auxinas também induziram a formação de calos e até mesmo promoveram a formação de ramos e incremento no número de gemas axilares, nas espécies de *Phyllanthus* estudadas. As auxinas também foram testadas por SILVA (1995), com o propósito de verificar os efeitos no enraizamento dos ramos de *P. tenellus* e *P. corcovadensis*, e os resultados obtidos demonstraram que as auxinas também influenciaram as taxas de multiplicação 'in vitro'. Os valores, contudo, foram inferiores aos obtidos com as citocininas, o que demonstrou a superioridade destes reguladores em promover a multiplicação 'in vitro' daquelas espécies.

Assim, o 2,4-D inibiu a produção de ramos em *P. caroliniensis* e *P. stipulatus*, mas não em *P. urinaria*, e o NAA apenas inibiu a formação de ramos em *P. stipulatus* com o aumento da concentração. É interessante salientar a produção de ramos laterais em *P. caroliniensis* e *P. urinaria*, que variou de 10 a 90% conforme a concentração e tipo de auxina utilizada. Nas espécies de *P. stipulatus*, contudo, não ocorreu a formação de ramos laterais em nenhuma das condições testadas. A indução de raízes nos explantes apresentou um comportamento semelhante à produção de ramos, onde o 2,4-D inibiu a indução em todas as espécies. O NAA também demonstrou inibição, mas apenas em *P. caroliniensis* e *P. stipulatus*. A floração também foi inibida por 2,4-D e reduzida por concentrações crescentes de NAA em *P. caroliniensis*.

O incremento de biomassa e o número de ramos produzidos foram significativamente maiores nos tratamentos com IBA a 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹, nas espécies de *P. stipulatus* e *P. urinaria*, do que com citocininas. Em *P. caroliniensis* não ocorreu aumento significativo na biomassa e no número de ramos produzidos com a utilização das auxinas. O crescimento do ramo principal foi reduzido ou não sofreu alterações significativas em todas as espécies, mas foi estimulado em *P. stipulatus* na concentração de 1.0 mg.l⁻¹ de IBA. O número de nós produzidos também foi promovido nas concentrações de 0.5 e 1.0 mg.l⁻¹ de IBA nas espécies de *P. stipulatus* e *P. urinaria*.

Desta forma, para *P. stipulatus*, resultados mais relevantes em termos de micropropagação foram obtidos com IBA (1.0 mg.l⁻¹), condições em que a taxa de multiplicação foi de nove e o número de ramos produzidos foi em média de 2.2, do que com as citocininas, que induziram taxas máximas de multiplicação de cinco e 1.8 ramos/explante. Resultados semelhantes e significativos foram obtidos na indução de ramos em *P. tenellus* e em *P. corcovadensis* na presença de IBA 0.25 mg.l⁻¹ (SILVA, 1995).

Em *P. caroliniensis* o destaque foi para a indução de calos, ocorrida nos explantes no tratamento com 2,4-D. Neste tratamento esta espécie produziu um peso fresco de calo (718 mg) maior do que quando os explantes foram mantidos em posição horizontal, condição em que o peso máximo obtido foi de 215 mg (NAA 1.0 mg.l⁻¹). Resultados semelhantes foram obtidos com *P. stipulatus*, que produziu um peso fresco de calo de 628 mg na concentração de 1.0 mg.l⁻¹ de NAA.

1.2. Efeito dos diferentes meios de cultura

Os efeitos de diferentes meios de cultura na multiplicação 'in vitro' das espécies de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. urinaria* indicaram, neste trabalho, a influência da composição salina na morfogênese e micropropagação destas espécies. Assim, em termos de indução de raízes apenas o meio MS foi efetivo em *P. caroliniensis*, enquanto que MS, WPM, AR e K também foram efetivos para *P. urinaria*, e MS, WPM e MS/2 para *P. stipulatus*. Na presença de BAP, a 1.0 mg.l⁻¹, calos foram produzidos apenas em meio B5 e S em *P. caroliniensis*, e em MS/2 em *P. stipulatus*. Nestas condições, nenhum dos meios testados produziu calos em *P. urinaria*.

A produção de biomassa em *P. caroliniensis* e *P. urinaria* foi maior em meio MS e duplicou, em *P. stipulatus*, no meio MS/2. Quanto ao número total de ramos, melhores resultados foram obtidos em meio MS, AR, K e WPM para *P. caroliniensis*, em meio MS/2, para *P. stipulatus*, e os meios MS, AR e B5 para *P. urinaria*. Com relação ao número de gemas axilares, os meios MS, K, WPM e AR foram os mais eficientes para *P. caroliniensis*, enquanto que para *P. stipulatus* foram os meios AR e MS/2 e para *P. urinaria* os meios MS, K e AR. Quanto ao comprimento do ramo principal, os meios MS, S, WPM e AR apresentaram resultados significativamente melhores para *P. caroliniensis*, enquanto que MS, K, WPM e MS/2 para *P. stipulatus* e MS, K, e WPM para *P. urinaria*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SILVA (1995), que testou a influência de diversos meios de cultura no crescimento e produção de plantas completas em *P. tenellus*, sem adição de reguladores de crescimento. Os resultados indicaram que o MS foi o meio mais eficiente em promover o incremento de peso fresco das culturas e que os meios WPM e AR foram os mais eficientes na indução de ramos. Conclui-se, também, que os meios W e S foram ineficientes para a manutenção de estoques desta espécie 'in vitro'.

As composições salinas dos meios testados apresentam muitas diferenças entre si. O nitrogênio é um componente importante do meio de cultura, e o nível de nitrogênio inorgânico é um parâmetro que tende a variar dependendo da formulação utilizada. Portanto, há meios que apresentam altos níveis de nitrogênio inorgânico e meios com baixos níveis. A relação amônia:nitrato também é um fator crítico para o estabelecimento das culturas 'in vitro'. O meio W foi, dentre os meios testados, o que promoveu uma redução significativa em todos os parâmetros testados, reduzindo o crescimento das culturas de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. urinaria*. O meio W apresenta três sais (sulfato férrico, cloreto de potássio e sulfato de sódio) que a maioria dos outros meios testados não apresenta, além de não possuir nenhuma fonte de amônia, sendo que as únicas fontes de nitrogênio disponíveis são nitrato de cálcio e nitrato de potássio, que conferem ao meio uma quantidade final de 3.33 mM de nitrogênio. Além disso a concentração iônica total deste meio é de apenas 19.04 mM. (FRANKLIN & DIXON, 1994). Esta pode ter sido a razão do baixo crescimento das culturas de todas as espécies nesta composição salina.

De modo geral, os meios MS, WPM e AR proporcionaram resultados significativos em termos de multiplicação de ramos quando comparados com os demais.

Os meios MS e AR apresentam, respectivamente, 94.75 e 86.48 mM de íons provenientes de nutrientes inorgânicos, dos quais 60.01 mM, para o meio MS, e 59.36 mM, para o AR, representam o total de nitrogênio disponível. O meio WPM apresenta concentração iônica total bem menor, de 42.39 mM, dos quais apenas 14.59 mM correspondem ao nitrogênio. A razão amônia:nitrato para o meio MS é de 0.52 (20.61 mM de amônia: 39.40 mM de nitrato), enquanto que para o meio WPM esta razão é de 0.51 (4.94 mM de amônia: 9.64 mM de nitrato) semelhante ao meio AR (MCCOWN & GELLMER, 1987). Desta forma, o que estas três formulações apresentam em comum é a baixa quantidade de amônia em relação ao nitrato. É interessante ressaltar que apesar ter relativamente baixa concentração iônica total, o meio WPM não restringiu o crescimento das microplantas de *Phyllanthus*. Em *P. urinaria*, além destes, o meio K também apresentou resultados significativos na multiplicação de ramos. Este meio apresenta a razão amônia:nitrato 7.5 mM de amônia e 26.3 mM de nitrato, ou seja, os níveis de amônia em comparação ao nitrato foram bem menores do que no meio MS.

A influência da razão amônia:nitrato no crescimento de culturas 'in vitro' é nítida também em relação a outras espécies estudadas. Assim, SELBY & HARVEY (1990) demonstraram que a indução de ramos em gymnospermas foi inibida em meio B5 que apresenta 2.02 mM de amônia: 24.70 mM de nitrato (0.08) e concentração iônica total de 59.98 mM. Se o nitrato era utilizado como única fonte de nitrogênio, a formação de ramos era prejudicada, enquanto a utilização isolada de amônia causou necrose nos tecidos. Razões de amônia:nitrato de 0.2 e 0.5 foram as ótimas. No entanto, a formação de ramos a partir do cultivo de calos de *Solanum tuberosum* apresentou uma razão ótima de amônia/nitrato de 1:2 (LILLO, 1989). QURAIISHI ET AL. (1996) testaram três meios de cultura MS, W e WPM, suplementados com várias concentrações de BAP na micropropagação de *Cleistanthus collinus* (Euphorbiaceae), uma árvore importante comercialmente, por produzir uma madeira de qualidade para a construção civil. Os resultados obtidos demonstraram a superioridade do meio MS suplementado com 0.25 mg.l⁻¹ de BAP na multiplicação de ramos desta espécie.

Em muitos casos as culturas são sensíveis à concentração iônica total da solução. Assim, PARRO & AMO-MARCO (1996) testaram o efeito de diferentes meios de cultura na micropropagação de *Myrtus communis*, e os melhores resultados foram obtidos em meio MS/4 suplementado com 1.0 mg.l⁻¹ de BAP. JAIN & NESSLER (1996) testaram várias

formulações de meios de cultura no estabelecimento de culturas 'in vitro' de *Camptotheca acuminata*, planta medicinal chinesa, que produz compostos com ação anticâncer e anti-retroviral. Seus estudos sugeriram a utilização do meio B5 suplementado com 4 mg.l⁻¹ de BAP como o meio mais eficiente para a multiplicação dos ramos e atribuíram esta eficiência à relação entre a espécie estudada e a razão amônia:nitrato requerida e encontrada neste meio. A influência dos meios de cultura B5, MS e S no crescimento dos ramos e no enraizamento de *Acacia mangium* e *Paraserianthes falcataria* foram verificados em experimentos de micropropagação conduzidos por BON et al. (1998). Os resultados indicaram a superioridade dos meios B5 (3/4 da concentração salina total) e S (2/3 da concentração salina total) em *A. mangium* e do meio MS/2 para *P. falcataria*, no aumento do comprimento dos ramos. Todos os meios apresentaram resultados significativos nas taxas de indução e no número de raízes em *P. falcataria*, mas em níveis menos acentuados no processo de enraizamento em *A. mangium*. Estas variações indicaram que estas espécies foram significativamente influenciadas pelas diversas formulações salinas testadas, não apenas pelo efeito dos macroelementos nas respostas morfogenéticas dos explantes mas também pela concentração iônica total da solução.

Investigações sobre as mudanças químicas que ocorrem no meio de cultura, tais como precipitações, quebra das moléculas de carboidratos, quelação e retenção pelo agar, têm demonstrado que as reduções do suprimento de nutrientes para a planta cultivada 'in vitro' podem ser devidas às quantidades iniciais adicionadas, à disponibilidade no meio, à absorção pela planta e a fatores ambientais. Atualmente, muitos métodos analíticos têm favorecido o entendimento sobre a disponibilidade dos nutrientes no meio, sobre os mecanismos de absorção destes nutrientes e sobre a correlação entre a concentração dos nutrientes e as taxas de crescimento 'in vitro' (LEIFERT et al., 1995). MORARD & HENRY (1998), desenvolvendo estudos como o objetivo de otimizar a composição mineral do meio de cultura para *Solanum paludosum*, demonstraram que a seleção de uma composição mineral adequada é muitas vezes aproximada, e a suficiência da fonte de nutrientes pode ser subestimada. A formulação mais precisa do meio de cultura a ser utilizado 'in vitro' deve ser ajustada de acordo com o requerimento de cada espécie de planta, levando-se em consideração a composição mineral da planta completa. Seguindo esta estratégia, eles idealizaram e formularam um novo meio de cultura para *S. paludosum* diminuindo a concentração iônica

total, suplementando o nitrogênio na forma de nitrato e aumentando a quantidade de cálcio em relação à de potássio. Este ajuste levou à duplicação da biomassa produzida e triplicou a produção do composto secundário solamargina.

Pesquisas mais aprofundadas neste sentido poderão ser realizadas para ajustar a formulação de meios de cultura, adequando-os para a multiplicação de ramos e/ou produção de calos das diferentes espécies de *Phyllanthus* para favorecer a produção dos princípios ativos produzidos por estas espécies.

1.3. Florescimento 'in vitro' e 'ex vitro'

O florescimento 'in vitro' de *P. carolinensis* ocorreu em diferentes situações: em meio desprovido de reguladores de crescimento e em meios contendo cinetina, 2iP, IAA, IBA e NAA. Em meio contendo 2,4-D, o processo não ocorreu e foi pouco significativo ou nulo nas concentrações mais altas de NAA. Estes dados indicam que algumas das condições de cultivo 'in vitro', necessárias para a indução da floração, foram satisfatórias para esta espécie de *Phyllanthus* e não para as demais espécies estudadas. Contudo, a elucidação destes fatores depende da execução de experimentos adicionais, visando a manipulação do fotoperíodo, da temperatura e de reguladores de crescimento. Isto porque em muitas espécies a floração é controlada por fatores ambientais, como o comprimento do dia e a temperatura, os quais variam durante o ano. Há muitas evidências de que a inibição ou a indução de formação de flores é influenciada e controlada por hormônios: um ou mais estímulos de ação positiva, e um ou mais inibidores de ação negativa, substâncias estas que ainda não foram identificadas (SALISBURY & ROSS, 1994). Em alguns casos específicos de cultivo 'in vitro' de algumas espécies de plantas, há evidências da influência de reguladores de crescimento no processo. Em *Bambusa arundinaceae* (Retz) Willd. a utilização de BAP é essencial para o florescimento 'in vitro' (JOSHI & NADGAUDA, 1997). Porém, esta mesma citocinina inibiu o florescimento 'in vitro' de *Murraya paniculata* (TAHA, 1997). A utilização de espermidina ou BAP, ou a combinação de NAA e BAP, induziram a formação precoce de flores em *Dendrobium candidum*, reduzindo o período de florescimento de 3-4 anos para 3-6 meses, em uma frequência de 31.6-45.8% das culturas, sendo esta taxa aumentada para 82.8% quando os explantes foram pré-tratados com ABA em meio MS

suplementado com BAP (WANG et al., 1997). Há evidências, também, de que em certos casos os tratamentos que resultaram na indução de flores foram associados com o aumento na produção de etileno, e em outros o ácido salicílico promoveu o florescimento em combinação com outras moléculas regulatórias, tais como as giberelinas. As giberelinas parecem estar mais associadas com os processos de estímulos ao florescimento ou como controle de eventos associados com a resposta do estímulo floral (DAVIES, 1995).

Em *P. caroliniensis* o estímulo floral aparentemente é transmitido dos explantes para as novas microplantas formadas em subcultivos a partir deles, e este florescimento 'in vitro' persiste por vários ciclos regenerativos. Resultados semelhantes foram encontrados por JUMIN & NITO (1996 a), que observaram o florescimento de *Murraya paniculata* (L.) 'in vitro'. A *M. paniculata* é uma planta que apresenta uma alta tolerância e resistência aos nematóides de citros e é utilizada como importante fonte para o melhoramento genético dos citros. Além de manter o estímulo floral após vários ciclos regenerativos, por mais de um ano, estes autores verificaram também a influência da luz na floração 'in vitro', e determinaram que uma redução no florescimento ocorria quando as microplantas eram mantidas no escuro por um período de duas semanas ou mais. O florescimento foi obtido em meio de cultura suplementado com BAP; no entanto, suas investigações evidenciaram a produção de ramos, através da utilização desta citocinina em altas concentrações, e a produção de flores, somente em baixas concentrações. Estas mesmas observações foram novamente confirmadas no cultivo 'in vitro' de *Fortunella hindsii*, uma espécie também importante para o melhoramento genético de citros (JUMIN & NITO, 1996 b). Além destes casos, muitas investigações sobre o processo de florescimento foram realizadas, utilizando a influência do fotoperíodo e de alternâncias de temperatura como fatores indutores e inibidores do florescimento 'in vitro'. IVANOV et al. (1998) testaram variadas combinações de fotoperíodo e temperatura com o objetivo de inibir o florescimento precoce de girassol 'in vitro'. De acordo com os resultados obtidos, a temperatura de 20°C, o fotoperíodo de 16 horas e a modificação na composição do meio de cultura foram as condições mais favoráveis para a redução do florescimento nesta espécie. A temperatura utilizada no cultivo 'in vitro' de *Limonium sinuatum* Mill. foi um fator também determinante para a indução de florescimento desta espécie 'ex vitro'. Os resultados indicaram que temperaturas elevadas e repetidos subcultivos 'in vitro' causaram um desaparecimento do potencial de

florescimento desta espécie, que foi posteriormente restaurado através de subcultivos em baixas temperaturas (MIYAMA et al., 1998). Baixas temperaturas também foram eficientes em induzir o florescimento de *Astroemeria* sp. (PEDERSEN et al., 1996). Parece que a influência destes fatores no florescimento depende muito da espécie que está sendo estudada. HARADA & MURAI (1998) induziram a formação de flores em pêra (*Pyrus communis* L.) após um longo período de subcultivo 'in vitro', através de modificações no meio e do aumento de temperatura.

P. caroliniensis parece ser um ótimo modelo para a realização de estudos fisiológicos sobre os fatores que controlam a floração 'in vitro'. A importância da floração 'in vitro' é que este processo abre possibilidades para estudos de melhoramento genético, principalmente quando se visar cruzamento entre espécies naturalmente incompatíveis. HAÏCOUR et al. (1974), em estudos realizados sobre os padrões de diversificação e evolução de *Phyllanthus odontadenius*, sugerem que cruzamentos experimentais de *Phyllanthus*, dentro da subseção odontaderii, revelam diferentes níveis de incompatibilidade reprodutiva que poderiam ser superados através de cultura 'in vitro', o que suporta a idéia de que o desenvolvimento de métodos de floração 'in vitro' para espécies de *Phyllanthus* podem auxiliar neste tipo de estudo.

Um outro aspecto interessante ainda relacionado com a floração foi o florescimento, após 3-4 semanas de aclimação, de plantas micropropagadas de *P. caroliniensis*, *P. urinaria* e *P. fraternus*. Em *P. stipulatus* não ocorreu florescimento durante esse período, no entanto após 120 dias de cultivo 'ex vitro' as plantas floresceram.

As porcentagens finais de florescimento foram, ao final de nove semanas, de 100% e 94% para *P. caroliniensis* e *P. urinaria*, e a partir da décima primeira semana, de 33.3% para *P. fraternus*. As flores produzidas apresentaram aspecto normal e foi detectada a frutificação em *P. urinaria*, após 11 semanas, *P. stipulatus*, *P. caroliniensis* e *P. fraternus*. Entretanto, estudos mais detalhados sobre a estrutura floral necessitam ser conduzidos para comprovar se as flores produzidas são normais em todos os casos. HOSOKI & KATAHIRA (1994) obtiveram resultados semelhantes no processo de aclimação de *V. tenera*. Neste caso o florescimento das plantas ocorreu um mês após o início da aclimação e todas as plantas floresceram normalmente. A produção de flores pelas espécies de *Phyllanthus*, após a micropropagação, são indicativos de que provavelmente não ocorreram

variações genéticas limitantes à reprodução, o que é um aspecto positivo, pois em algumas espécies pode ocorrer a perda da capacidade de florescimento ou a má-formação das estruturas florais como consequência do cultivo 'in vitro'. Certas espécies produzem poucas flores ou não florescem após a micropropagação, como é o caso de certas variedades de *Gypsophila* e *Kalanchoë*. Em *Kalanchoë*, os problemas têm sido mais severos, e é sugerido que a perda da capacidade de floração é devida à reversão para a fase juvenil. Porém esta não é uma regra geral, pois estudos realizados por SANTOS et al. (1998) com *Narcissus bulbocodium* demonstraram que problemas relacionados com a perda da capacidade reprodutiva nem sempre ocorrem após o cultivo 'in vitro'. Estes autores observaram o florescimento desta espécie logo na primeira estação de crescimento após a aclimação.

O florescimento durante a aclimação de *P. stipulatus*, *P. fraternus* e *P. urinaria* indica que o fotoperíodo de 16 horas utilizado na aclimação e também nos estudos de cultivo 'in vitro' não foi o fator limitante para o florescimento 'in vitro' destas espécies. Certamente, fatores relacionados com outras condições de cultivo 'in vitro' inibiram a floração 'in vitro' destas espécies. É possível que com a transferência das plantas para as condições 'ex vitro' estes fatores inibitórios tenham sido eliminados e/ou que as condições de estresse geradas com a transferência tenham desencadeado o processo. Novamente, estas respostas de floração exibidas pelas diferentes espécies de *Phyllanthus* podem ser utilizadas como modelos potenciais de sistemas para se entenderem os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na mudança da fase vegetativa para a reprodutiva.

1.4. Aclimação

As plantas produzidas 'in vitro' apresentam uma natureza delicada pelo fato de estarem expostas a ambientes com baixa luminosidade e alta umidade relativa, o que faz com que a anatomia e a fisiologia dos tecidos sejam diferentes daquelas encontradas em ambiente natural.

Por sua natureza frágil, as microplantas sofrem alta mortalidade se transplantadas diretamente para o ambiente natural. Nelas, a camada cuticular das folhas pode ser mais fina, estruturalmente anormal e com composição química diferenciada, além de apresentar uma disfunção na regulação da abertura e fechamento dos estômatos, levando a sérios

problemas de desidratação. Durante o período de aclimação a taxa de fotossíntese é inicialmente baixa, e a sobrevivência pode depender da acumulação de carboidratos durante o cultivo 'in vitro'. Esta sobrevivência pode ser aumentada através da aclimação gradual ao meio ambiente (GEORGE, 1993). Neste trabalho, para reduzir a área foliar e manter a alta umidade das plantas no estágio inicial de crescimento, cortaram-se os caules das microplantas. Foram usadas embalagens plásticas fechadas com filme de PVC que eram abertas gradualmente, sendo que a manutenção do sistema radicular intacto permitiu que as plantas mantivessem o balanço hídrico após a remoção da condição 'in vitro'.

A aclimação com sucesso das espécies de *Phyllanthus* ocorreu após períodos diferenciados de cultivo 'in vitro'. Para as espécies de *P. caroliniensis*, *P. urinaria* e *P. fraternus*, as microplantas foram transferidas para embalagens plásticas após um período de cultivo 'in vitro' de 30 dias, apresentando comprimento médio 9 cm e 2-5 raízes. No entanto, por apresentar crescimento mais rápido, a idade estabelecida para a transferência de *P. stipulatus* foi de 15 dias, quando o comprimento médio das plantas era em torno de 7 cm e o número médio de raízes era de 6. Foram mantidas duas folhas por planta, para garantir a presença de pelo menos duas gemas axilares, a partir das quais deveriam crescer os novos ramos da planta em condições 'ex vitro'. GEORGE (1993) comenta que a sobrevivência é menor em microplantas mais jovens do que em microplantas mais desenvolvidas. No entanto, PEREZ-PARON et al. (1994) estabeleceram o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para aclimação de *Frazinus angustifolia* e não encontraram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência, quando utilizaram plantas jovens (duas semanas) ou plantas maduras (quatro semanas). Provavelmente o sucesso no processo de aclimação não dependerá somente da fase de desenvolvimento 'in vitro', mas também de outros fatores envolvidos com sua sobrevivência 'ex vitro' e principalmente da espécie de planta que se está estudando.

Outro fator determinante nos processos de estabelecimento 'ex vitro' é a condição asséptica em que as microplantas são mantidas 'in vitro' (PREECE & SUTTER, 1991). GEORGE (1993) indica como principais fatores a assepsia do operador e a esterilização dos instrumentos a serem utilizados. Os cuidados com a manutenção das condições assépticas no período inicial de transplante foram tomados através da utilização de areia esterilizada, utilização de material, pinças e bisturis esterilizados, lavagem das raízes para a

retirada do excesso de meio de cultura em água destilada e irrigação das microplantas transferidas com água destilada. Estes cuidados mínimos permitiram que as espécies de *Phyllanthus* não fossem expostas aos microorganismos no momento inicial da aclimação.

A porcentagem de sobrevivência, nestes 20 dias de permanência nas embalagens plásticas, ficou em torno de 100% para todas as espécies. Após esse período, realizou-se a transferência das plantas para os copos de plástico contendo mistura de terra e areia na proporção 1:1 não esterilizados. Neste estágio as plantas, bem como suas raízes, encontravam-se mais desenvolvidas, com uma altura média de 2 a 3 cm, e apresentavam folhas novas em sua parte aérea, variando de 2.58 (em *P. fraternus*) a 7.4 (em *P. caroliniensis*) folhas/planta, dependendo da espécie. Estes dados indicam a capacidade de crescimento diferente das espécies estudadas, também constatadas durante a fase de aclimação. Estas diferenças mantiveram-se, e após nove semanas ocorreu um acréscimo elevado nos números de folhas e ramos produzidos, chegando a apresentar uma média de 10, 6.1 e 4.8 ramos por planta nas espécies de *P. caroliniensis*, *P. urinaria* e *P. fraternus* respectivamente.

As porcentagens de sobrevivência das plantas micropropagadas das diferentes espécies de *Phyllanthus* mantiveram-se altas (86-91%) durante as nove semanas de aclimação, com exceção de *P. fraternus*, que apresentou taxa de sobrevivência de 52.5%, o que indica que o sistema de aclimação para esta espécie deve ser otimizado. Resultados semelhantes foram obtidos por HOSSAIN et al. (1994), que desenvolveram um método de aclimação em que a porcentagem de plantas sobreviventes foi de 70% como sendo um eficiente sistema de micropropagação de *F. limonia*. Neste sentido, HOSOKI & KATAHIRA (1994) também desenvolveram um protocolo para micropropagação de *Verbena tenera* e obtiveram uma porcentagem de sobrevivência de 88% das plantas após a aclimação.

Um aspecto operacional importante a ser ressaltado, com base nos resultados da aclimação das diferentes espécies de *Phyllanthus*, é que o método de aclimação desenvolvido neste trabalho é extremamente simples e dispensa estudos especiais e sistemas de nebulização, que elevam os custos dos sistemas de produção em larga escala. Todo o processo pôde ser conduzido com sucesso, em salas de crescimento com as mesmas

condições de intensidade luminosa, fotoperíodo e temperatura utilizadas para a manutenção das culturas 'in vitro'.

2. Cultura de calos

Neste trabalho testaram-se auxinas na indução de calos em *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*, e citocininas na indução de calos em *P. stipulatus* e *P. urinaria*.

Foram utilizados segmentos nodais como explantes para a iniciação de culturas de calos, pois pesquisas anteriormente realizadas por UNANDER (1991) demonstraram que estes tipos de explantes são os mais adequados para a indução de calos em espécies de *Phyllanthus*. Este mesmo autor testou outros tipos de explantes e demonstrou que a utilização de flores e cápsulas de sementes não formaram calos, e quando se utilizaram folhas o crescimento foi muito lento e limitado. Resultados semelhantes foram obtidos por MORENO (1993), que testou dois tipos de explantes na indução de calos em espécies de *P. tenellus*, *P. corcovadensis* e *P. niruri*, sendo que a maior capacidade de crescimento de calos foi obtida com segmentos de caule quando comparados com segmentos de folhas.

Apenas alguns experimentos de cultura de calos foram realizados por UNANDER (1996) com o *P. caroliniensis*; e, de acordo com os parâmetros por ele estabelecidos, esta espécie não apresentou um bom desenvolvimento, obtendo-se uma indução de formação dos calos muito baixa. Este resultado provavelmente está relacionado à espécie estudada, pois os resultados obtidos com outras espécies foram mais promissores.

Todas as auxinas testadas em *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. fraternus* induziram a formação de calos em 100% dos explantes. Entre estas, particularmente o IBA, NAA e IAA também promoveram a formação de raízes nos calos nas espécies de *P. stipulatus* e *P. fraternus*. Nas espécies de *P. caroliniensis* somente o IBA induziu a formação de raízes em pequena quantidade. Os resultados obtidos com as citocininas demonstraram que as taxas de formação de calos em *P. urinaria* foram muito baixas, com exceção do 2iP, que induziu uma taxa em torno de 90%. A taxa de indução e formação de calos em *P. stipulatus* foi em torno de 90%, com exceção da cinetina. As citocininas testadas não induziram a produção de raízes.

Em termos de crescimento, algumas das auxinas testadas promoveram aumento significativo no peso fresco dos calos dependendo da espécie. As auxinas mostraram-se eficientes em promover o crescimento dos calos em *P. fraternus*. Assim, os melhores resultados foram obtidos com IBA em *P. caroliniensis* e NAA em *P. stipulatus*. Em *P. stipulatus* as citocininas BAP e 2iP também promoveram o crescimento de calos de forma relevante. Em *P. urinaria* as citocininas já não demonstraram grande eficiência no processo, mas mesmo assim induziram calos com 188mg de peso fresco. SILVA (1995), no entanto, obteve resultados relevantes quando testou as auxinas, particularmente o IBA, que induziu calos com 447mg de peso fresco. Um aspecto importante observado em *P. caroliniensis* e *P. stipulatus* foi o incremento de peso fresco de calos produzidos por 2,4-D (1.0 mg.l^{-1}), de 718.35 mg e NAA (1.0 mg.l^{-1}), de 628mg. Estes valores foram obtidos quando os explantes encontravam-se na posição vertical em relação ao meio de cultura. Mesmo em *P. urinaria*, mas em menor escala, estas condições de cultivo foram indutoras de crescimento, talvez por proporcionarem a translocação e penetração mais adequada dos reguladores de crescimento nos tecidos do caule do que quando os explantes estão em posição horizontal. Um outro aspecto importante observado para *P. caroliniensis* foi o efeito da luz na promoção do crescimento dos calos, que normalmente ocorre melhor no escuro. Estes resultados indicam que tanto a posição do explante no meio como a exposição à luz são parâmetros que devem ser mais bem investigados principalmente nas espécies de *Phyllanthus*, que se mostravam recalcitrantes com relação à produção de calos nas condições testadas, com por exemplo *P. fraternus*, ou para otimizar a produção de calos nas demais espécies.

A eficiência das auxinas na indução e crescimento de calos foi demonstrada em algumas espécies de *Phyllanthus*. MORENO (1993) induziu a formação de calos em *P. corcovadensis*, *P. tenellus* e *P. niruri*. Em seus estudos, segmentos de caules foram inoculados em meio MS contendo sacarose (20 g/l), agar (6g/l) e auxinas como 2,4-D, IAA e IBA nas concentrações de 2, 4 e 8 mg.l^{-1} . Os resultados demonstraram que o crescimento dos calos foi maior quando IBA e 2,4-D foram utilizados. Da mesma forma KHANNA & NAG (1973) usaram o meio MS suplementado com 1 mg.l^{-1} de 2,4-D para induzir a formação de calos em *P. emblica* em condições normais de luz e temperatura de 26°C.

Para outras espécie, contudo, a utilização de auxinas associadas a citocininas tem produzido melhores resultados. Assim, UNANDER (1991) descreveu o uso de 2,4-D ou IBA (1.0 mg.l^{-1}) associado com BAP (0.5 ou 1.0 mg.l^{-1}) como sendo ótimos reguladores promotores do crescimento e indução de calos friáveis em *P. amarus*, no entanto enfatizou a não utilização do IAA como um bom indutor. Do mesmo modo, HAÏCOUR (1974) utilizou o meio MS suplementado com 0.1 mg.l^{-1} de NAA, 0.1 mg.l^{-1} de cinetina e 8% de água de coco para induzir calos em folhas, caule e raízes de *P. urinaria*. As culturas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas em temperatura de 28° C .

Em todos os experimentos de indução de calos utilizou-se o meio de cultura MS; no entanto, outras formulações de meios de cultura poderão ser testadas posteriormente, com o intuito de aumentar a produção de biomassa. UNANDER (1991) sugere a reformulação dos meios de cultura para o incremento de produção de biomassa dos calos a partir de resultados obtidos com *P. amarus* e *P. abnormis*, que demonstraram a influência da distância taxonômica entre as espécies e a necessidade de meios de cultura específicos no desenvolvimento de sistemas de cultura de calos. Em *P. amarus* e *P. abnormis* o meio de cultura utilizado promoveu uma ótima indução e crescimento dos calos, o que não ocorreu com as outras espécies estudadas, como o *P. caroliniensis*. UNANDER (1991) comparou a indução de calos em *P. amarus*, *P. abnormis* e *P. urinaria* utilizando dois meios de cultura diferentes: MS suplementado com 100 mg.l^{-1} de myo-inositol, 0.4 mg.l^{-1} de tiamina e o meio B5 suplementado com 100 mg.l^{-1} de myo-inositol, 1.0 mg.l^{-1} de ácido nicotínico, 1.0 mg.l^{-1} de piridoxina e 10 mg.l^{-1} de tiamina. Todos os meios foram suplementados com 30 g.l^{-1} de sacarose. Os melhores resultados na indução de calos foram obtidos em meio MS modificado suplementado com 1.0 mg.l^{-1} de 2,4-D e 0.5 mg.l^{-1} de BAP. Em experimentos posteriores, nos quais este mesmo autor comparou o crescimento dos calos em meio MS e B5 suplementados com 1.0 mg.l^{-1} de 2,4-D e com 1 ou 2 mg.l^{-1} de BAP, significativo aumento da biomassa dos calos foi obtida em meio MS suplementado com citocinina e auxina na taxa de 1:1. Em meios onde o IAA foi utilizado ocorreu um decréscimo no peso fresco dos calos.

O desenvolvimento de métodos para a indução e crescimento de calos em espécies de *Phyllanthus* implica no estabelecimento de uma forma eficiente e rápida de produção de calos a serem utilizados para iniciar culturas de suspensões celulares e em maiores estudos

de biossíntese de metabólitos secundários importantes farmacologicamente. Algumas pesquisas com plantas medicinais estão sendo realizadas com objetivos semelhantes. NIN et al. (1996) investigaram o potencial da cultura de calos de *Artemisia absinthium* em produzir fragrâncias sobre diferentes condições nutricionais e de cultivo, para em seguida identificarem os efeitos dos reguladores de crescimento na produção do óleo essencial de interesse. CARDOSO & OLIVEIRA (1996) iniciaram o cultivo 'in vitro' de *Hypericum brasiliense* com o objetivo de desenvolver um protocolo para a cultura de calo, que poderá ser utilizado para iniciar suspensões celulares e estudos da biossíntese da Hypericina, o maior metabólito produzido por este gênero. Pesquisas semelhantes foram realizadas por Suardi et al. (1994) com *Solanum malacoxylon*. Esta planta produz esteróides (sitosterol, diosgenina e solasodina), e o desenvolvimento de meios de cultura adequados para a produção dos calos simultaneamente à realização de análises fitoquímicas (CCD e CG) dos mesmos têm promovido grandes avanços na elucidação das vias metabólicas e biossintéticas destes compostos. WICKREMESINHE & ARTECA (1993) induziram e desenvolveram métodos de cultivo 'in vitro' para a formação de calos em diferentes espécies de *Taxus*. O objetivo principal foi avaliar os nutrientes e condições de cultivo necessárias para maximizar e manter por longos períodos a produção de Taxol® pelos calos.

Para se iniciar a formação e promover o crescimento dos calos a partir de diferentes tipos de explante geralmente adiciona-se ao meio de cultura uma ou mais auxinas. As auxinas causam a alongação celular, mas quando em contato com tecidos excisados elas podem promover a divisão celular. Pela sua estabilidade e capacidade de resistir a autoclavagem, as auxinas sintéticas são amplamente utilizadas em cultura de tecidos, sendo que as auxinas mais comumente utilizadas são o 2,4-D, NAA e o IBA. Há também muitos compostos derivados do cloro, substitutos dos ácidos fenilacéticos ou fenoxiacéticos, que são utilizados em cultura de tecidos. Em alguns casos, compostos que não são estritamente auxinas estão sendo usados como seus substitutos, como o dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anisico) ou o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiredino-2-carboxílico), ambos herbicidas quando utilizados em altas concentrações. O uso das auxinas em cultura de tecidos é uma arte, e raramente uma concentração específica pode ser usada para várias

espécies. Geralmente, a adição de uma ou mais auxinas no meio de cultura é necessária para iniciar a formação e o crescimento de calos (KRIKORIAN, 1995).

Algumas citocininas também podem ser utilizadas para a indução de calos em plantas. As citocininas sintéticas BAP e 2iP são as mais utilizadas. Quando testadas em cenoura e fumo, algumas destas citocininas são ativas, mas apenas na presença das auxinas. Nos casos em que não ocorreu suplementação exógena de auxinas, conclui-se que o sistema é sintetizador de suas próprias auxinas (KRIKORIAN, 1995). ABBAS et al. (1997) realizaram vários testes com citocininas e auxinas para induzir a formação de calos em espécies de *Corchorus*. Em ambas as espécies (*C. olitorius* e *C. capsularis*) foi necessária a utilização de citocininas para a produção de calos. O efeito das citocininas utilizadas variou com o genótipo e com o tipo de explante. A zeatina estimulou mais a formação de calos em *C. olitorius* do que o BAP. No entanto, as duas citocininas utilizadas em combinação estimularam a formação de calos em *C. capsularis*. A zeatina também estimulou a formação de calos mais do que o BAP, quando se utilizaram cotilédones como explantes, porém não foi eficiente em segmentos nodais e segmentos de raízes.

GEORGE (1993) observa a necessidade da adição de citocininas no meio de cultura simultaneamente ou posteriormente às auxinas para a indução de calos em algumas espécies, e para outras espécies somente concentrações mais altas de auxinas aplicadas isoladamente já são suficientes para a indução e crescimento dos mesmos.

Em espécies de *Phyllanthus* as auxinas juntamente com as citocininas na proporção de 1:1, ou somente auxinas adicionadas ao meio MS, demonstraram ser os reguladores de crescimento mais adequados para o estabelecimento das culturas de calos em estudos desenvolvidos por UNANDER (1996). No caso das espécies estudadas neste trabalho a formação de raízes nos calos ocorreu com as espécies de *P. stipulatus* e *P. fraternus*. O NAA foi dentre as auxinas testadas a mais eficiente, produzindo até 211.13 mg de raízes nos calos de *P. stipulatus*, seguida do IAA (0.25 e 0.5 mg.l⁻¹), que produziu em torno de 40 mg de raízes nos calos de *P. fraternus*. Estes resultados são interessantes, pois estão relacionados à capacidade dos reguladores em induzir a formação de raízes bem como à disponibilização de material para se iniciar o processo de cultura de raízes para produção de compostos secundários e também como fonte de estudos de processos de organogênese de

raízes. KIM et al. (1995) sugerem a utilização das raízes formadas nos calos para a iniciação de cultura de raízes e produção de metabólitos secundários.

SOH et al. (1998) esclarecem que há uma variedade de fatores que interferem no desenvolvimento de raízes em calos, mas que podemos distinguir pelo menos dois destes fatores: a) fatores estimulantes originados dos caules ou cotilédones, e b) fatores inibitórios originados do hipocótilo das raízes. Estes dois fatores dificilmente interferem no desenvolvimento de raízes em calos, os quais apresentam estruturas homogêneas e simples. Por esta razão a utilização de calos como material experimental pode minimizar a complexidade dos fatores correlacionados à organogênese das raízes. Estes autores avaliaram o efeito de citocininas isoladas, ou com auxinas, na formação de raízes durante a cultura de calos em *Vigna unguiculata* (L.) e observaram que a presença de cinetina (0.5-2.0 mg.l⁻¹) em meio MS com NAA promoveu o desenvolvimento de raízes nos calos desta espécie. Eles também destacam um efeito estimulante das citocininas na iniciação de primórdios radiculares em cultura de calos e de auxinas na promoção do crescimento das raízes.

Nos experimentos conduzidos neste trabalho os calos foram produzidos no escuro, e este poderia ser um fator estimulante ao desenvolvimento de raízes nos calos. Algumas pesquisas demonstram que calos e órgãos cultivados no escuro favorecem o desenvolvimento de raízes em algumas plantas com *Rumohra adiantiformis*, *Corylus avellana* e *Juglans sp.* (CHEN et al., 1985; GONZALEZ et al., 1991 e JAY-ALLEMAND., 1995).

Experimentos subseqüentes utilizando-se auxinas e citocininas simultaneamente serão necessários para o estabelecimento de métodos mais eficientes de produção de biomassa de calos em algumas espécies de *Phyllanthus*, bem como testes de composição de meio de cultura específicos.

3. Cultura de raízes

O desenvolvimento do processo de cultura de raízes 'in vitro' das espécies de *Phyllanthus* realizou-se com o objetivo de verificar a produção de seus compostos secundários através das investigações fitoquímicas e também como forma de fornecimento

de quantidades suficientes para os ensaios farmacológicos. Este processo foi estabelecido para *P. caroliniensis* e *P. urinaria*, *P. stipulatus* e *P. fratermus*, mas as curvas de crescimento foram estabelecidas apenas para *P. caroliniensis* e *P. urinaria*.

A curva de crescimento demonstrou três fases distintas de crescimento das raízes de *P. caroliniensis* e duas fases distintas de *P. urinaria* cultivadas 'in vitro'. Nos primeiros 30 dias de cultivo, *P. caroliniensis* apresentou um crescimento lento, sendo que nesse mesmo período o *P. urinaria* apresentou um crescimento rápido. Entre 30-45 dias de cultivo o crescimento das raízes de *P. caroliniensis* foi muito rápido, declinando, assim como em *P. urinaria*, a partir de 45 dias. Estas observações demonstram variações nas fases de crescimento em termos de incremento em peso fresco entre as espécies e apontam para possíveis diferenças relacionadas à produção de metabólitos secundários. As coletas do material para as análises fitoquímicas das raízes foram realizadas para todas as espécies aos 40 dias de cultivo, momento em que *P. caroliniensis* encontrava-se na fase rápida de crescimento, e *P. urinaria* na fase de declínio e senescência. Os resultados das análises fitoquímicas (CCD) confirmaram a presença de terpenos e esteróides nesse período de cultivo em todas as espécies estudadas, aparentemente em maiores quantidades em *P. fratermus* e *P. stipulatus*, porém estes resultados só poderão ser confirmados através de CG em análises posteriores.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, em relação ao tempo de crescimento e sobrevivência 'in vitro' das raízes (45 dias) foram obtidos por HOOK (1994). Esse autor iniciou o desenvolvimento e otimização da produção de cultura de raízes 'in vitro' com o objetivo de verificar a produção de compostos por *Leontopodium alpinum* e de utilizá-la como fonte de material vegetal para as investigações fitoquímicas. As culturas foram crescidas em meio MS modificado, suplementado com 30g.l⁻¹ de sacarose, e mantidas em agitador rotatório horizontal (90 rpm) sob fotoperíodo de 18h, durante 45 dias, a partir do qual ocorreu a senescência. Além disso, neste caso, a quantidade de compostos secundários (óleos essenciais e antocianinas) foi menor em cultura de raízes transformadas quando comparada com as raízes produzidas naturalmente em cultura. O autor sugeriu o cultivo no escuro como forma de aumentar a quantidade de compostos produzidos pelas raízes. Outros resultados semelhantes foram observados em sistemas de cultura de raízes com *Hyssopus officinalis* e *Datura stramonium*, onde o tempo de cultivo também ficou em

torno de seis semanas. MURAKAMI et al. (1998) otimizaram o sistema de cultura de raízes transformadas 'in vitro' de *H. officinalis* e obtiveram um incremento máximo de 8.29g.frasco⁻¹ de peso fresco, em meio de cultura WPM, no período entre 15-35 dias de cultivo (fase exponencial), mesmo período em que ocorreu a produção máxima dos compostos secundários (compostos fenólicos). Em cultivos realizados em meio de crescimento MS, o incremento máximo do peso fresco foi de apenas 2.88g.frasco⁻¹. Estes resultados foram quantitativamente maiores que os obtidos com *P. caroliniensis*, que neste mesmo período produziu peso fresco de 1.4 g.frasco⁻¹, porém foram valores obtidos em cultura de raízes transformadas e produzidas em sistemas otimizados. BAÍZA et al. (1998) estudaram a relação entre a produção de alcalóides por *D. stramonium*, o aumento de biomassa e a divisão celular em cultura de raízes transformadas e não-transformadas. As diferenças obtidas em relação ao incremento de biomassa em raízes transformadas e não-transformadas foram devidas ao desenvolvimento e crescimento de raízes laterais, e não às taxas de divisão celular, nem à presença de meristemas radiculares. Observou-se também uma relação inversa entre o índice mitótico e a produção de alcalóides. Estes resultados sugeriram que acúmulos maiores de alcalóides foram obtidos quando as culturas não estavam aumentando sua biomassa através do aumento em peso fresco ou de divisão celular, sugerindo uma relação inversa entre a acumulação de alcalóides e o crescimento, tanto para raízes transformadas quanto para não-transformadas. Em sistemas de cultura de raízes não transformadas desta espécie, os valores de incremento máximo de peso fresco obtido foram em torno de 1.5 g.frasco⁻¹, muito similares aos obtidos com *P. caroliniensis*, porém menores que os obtidos com cultura de raízes transformadas.

RIJHWANI & SHANKS (1998) obtiveram resultados semelhantes em estudos sobre a correlação entre a produção de alcalóides indólicos em cultura de raízes de *Catharanthus roseus* e o tempo de cultivo. Os resultados demonstraram que o rendimento na produção de lochnericina foi maior nas duas primeiras semanas, indicando uma forte correlação com a taxa de crescimento; porém o rendimento de serpentina foi maior no período de quatro semanas, indicando que o acúmulo deste composto é inversamente proporcional à taxa de crescimento.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que cada espécie de *Phyllanthus* apresenta particularidades em relação à dinâmica do crescimento das raízes 'in vitro' e que

investigações mais detalhadas devem ser conduzidas no futuro no sentido de verificar se existe correlação entre a fase de crescimento da cultura e as classes de metabólitos secundários produzidos. Paralelamente, estudos direcionais para a otimização do sistema poderão ser realizados, o que proporcionará informações mais detalhadas sobre as fases de crescimento e se este é devido à formação de raízes laterais e/ou ao crescimento meristemático das raízes, e a relação destes fatores com a produção dos compostos. A otimização dos meios de cultura, a utilização de diferentes reguladores de crescimento, condições de cultivo, utilização de elicitores e a possível influência destes fatores na produção dos metabólitos secundários são aspectos essenciais a serem investigados para viabilizar este sistema para a produção de compostos de interesse químico-medicinal pelas espécies de *Phyllanthus*.

A técnica de cultura de raízes em cabeleira tem sido estabelecida, nos últimos anos, como forma de aumentar a biomassa de raízes para produção de metabólitos secundários que são naturalmente produzidos (TROTIN et al., 1993; MURAKAMI et al., 1998. e BAÍZA et al., 1998). Vários métodos para aumentar a produtividade de cultura de raízes em cabeleira têm sido descritos, bem como procedimentos para otimização da produção. Neste aspecto estão incluídas a seleção de clones altamente produtores, elicitação (VAZQUEZFLOTA et al., 1994; RIJHWANI & SHANKS, 1998; LIU et al., 1999; ZABETAKIS et al., 1999), composição do meio de crescimento (STOJAKOWSKA, et al., 1995; WEATHERS et al., 1997; MA et al., 1998) e condições de cultura (LEE et al., 1998; LIU et al., 1998). Porém, nenhum procedimento padrão é conhecido como eficiente para qualquer espécie em estudo, pois a produção de compostos secundários por cultura de raízes é muito variável de espécie para espécie e, dentro da mesma espécie, de um clone para outro (WYSOKINSKA & CHMIEL, 1997).

4. Análises fitoquímicas dos calos

As análises fitoquímicas dos calos são essenciais para a identificação e incremento da produção dos compostos de interesse em espécies de *Phyllanthus*; pois permitem uma avaliação mais precisa sobre os efeitos dos reguladores de crescimento, do meio de cultura e das condições de cultivo na produção dos compostos, bem como devem permitir a seleção

de genótipos mais produtivos e a manipulação dos fatores que atuam sobre a produção dos compostos de interesse.

Estes estudos básicos iniciais são essenciais em plantas medicinais que produzem compostos específicos com efeitos farmacológicos confirmados, como é o caso do Taxol®, e também permitem a utilização desta metodologia de pesquisa para investigações de classes de compostos, como é o caso das espécies de *Phyllanthus* que ainda não apresentam um composto específico relacionado aos efeitos farmacológicos obtidos de seus extratos.

Para minimizar os efeitos dos reguladores de crescimento na indução de raízes nos calos e seus efeitos na produção dos compostos, selecionamos apenas uma das auxinas como indutora de calos (2,4-D, 1.0 mg.l⁻¹) para as espécies de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*. Esta auxina foi a única dentre as auxinas testadas que não estimulou a produção de raízes nos calos de *P. stipulatus* e *P. fraternus*. Para as espécies de *P. urinaria* o IBA (8.0 mg.l⁻¹) e o BAP (2.0 mg.l⁻¹) foram os reguladores utilizados para a indução dos calos. Esta diferenciação se deveu ao fato de que em testes anteriormente realizados por MORENO (1993) esta combinação de reguladores de crescimento foi mais eficiente.

Todos os extratos metanólicos dos calos, das diferentes espécies estudadas, demonstraram a presença de esteróides e terpenóides e a ausência de flavonóides e alcalóides nos testes fitoquímicos realizados (CCD e CG).

O rendimento obtido no extrato de calos foi mais significativo em *P. fraternus* 42.02%, quando comparado com as outras espécies que apresentaram um rendimento de 12-15%, o que indica que a quantidade de compostos produzidos nos calos de *P. fraternus* provavelmente é maior do que nos outros extratos, porém neste acréscimo não estão incluídos apenas os compostos secundários e sim de todos os compostos produzidos.

A presença de glochidonol nos extratos metanólicos de calos foi comprovada em todas as espécies de *Phyllanthus* testadas. A presença de glochidiol nos extratos de calos não foi observada, porém em extratos de raízes provavelmente ocorreu a produção deste composto. A glochidona foi detectada nos extratos de calos de *P. caroliniensis* e *P. fraternus*. Já a presença de estigmasterol foi observada em extratos de calos de todas as espécies estudadas com exceção de *P. caroliniensis*. Muitos dos compostos presentes nos extratos dos calos não foram identificados, apesar de apresentarem-se em quantidades

significativas nos extratos de todas as espécies (Anexo 1). Tal observação é importante pelo fato de que estes compostos poderão servir como objeto de estudos promissores no futuro.

Os compostos ativos como analgésicos, por via oral, não foram ainda determinados, e apenas alguns deles, presentes nas espécies estudadas, foram efetivos por via intraperitoneal. Os esteróides estigmasterol e β -sitosterol foram equipotentes aos analgésicos comerciais aspirina e paracetamol, tanto no modelo de dor induzida pelo ácido acético como no modelo da formalina (segunda fase) em camundongos (SANTOS et al., 1995). Algumas ações farmacológicas já estão sendo comprovadas e/ou associadas à presença de estigmasterol na composição fitoquímica das plantas. Este composto juntamente com outros esteróis demonstrou atividade antiinflamatória (GARCIA et al., 1999) antinociceptiva (BLOCK et al., 1998; PERES et al. 1998) hipoglicêmica (KIM et al., 1996; JAMALUDDIN et al., 1994) e inibidora do desenvolvimento de câncer de pele em ratos (KASAHARA et al., 1994). Estes esteróides, são freqüentemente encontrados em raízes (GAERTNER et al., 1999; AGUILAR & DELGADO., 1995), nas folhas e caules (TAN et al., 1999), nas flores (AHMAD & MISRA, 1997), e nas cascas de diversas plantas medicinais (DUPONT et al., 1997; ANTON et al., 1993). Porém, estudos relacionados especificamente à identificação do estigmasterol em plantas cultivadas 'in vitro' são poucos, limitando-se apenas à comprovação de sua presença na composição fitoquímica de cultura de raízes (GUO et al., 1998; KISIEL., 1995) e de cultura de células (CORIOCOSTET et al., 1993; DYAS et al., 1994 e CERDON et al., 1995) não havendo nenhum registro da otimização da produção específica deste composto 'in vitro'.

O triterpeno glochidona foi isolado recentemente da *Ipomea pes-caprae*, e demonstrou ser muito mais potente do que os esteróides e drogas-padrão (aspirina e paracetamol), inibindo as contorções induzidas pelo ácido acético e também ambas as fases de dor (neurogênica e inflamatória) do teste da formalina (KROGH et al., 1999). Até o momento, estudos relacionados a identificação de glochidona produzida 'in vitro' não foram encontrados, e os relacionados à sua atividade farmacológica são raros. Além das investigações realizadas pelo grupo de pesquisa da UFSC, este composto foi detectado em 1993 por MATSUNAGA et al. no *P. watsonii*.

Devido à similaridade da glochidona com os outros triterpenos evidenciados nas plantas do gênero *Phyllanthus*, acredita-se que estes também devam ser ativos como

analgésicos por via intraperitoneal, mas não foram ainda testados devido à quantidade limitada destas substâncias.

NIERO (1993) determinou a presença de esteróis (estigmasterol, β -sitosterol e campesterol) em extratos de parte aérea de *P. corcovadensis*. MIGUEL (1995b e 1996) confirmou a presença destes mesmos esteróis em *P. sellowianus*, além de determinar a presença de glochidona e glochidiol, entre outras substâncias. Em suas análises fitoquímicas de *P. fraternus*, este autor determinou a presença de galato de metila, hipofilantina, geranina, rutina e furosina, o que explica, em parte, a presença de pouca quantidade dos esteróis e terpenos avaliados neste trabalho para esta espécie. Estes mesmos esteróis e terpenos obtidos nos extratos de *P. corcovadensis* e *P. sellowianus* foram também detectados em nossas investigações com extratos de calos e de raízes de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fraternus*.

Os resultados obtidos neste trabalho pela análise fitoquímica dos extratos de calos e de raízes de *Phyllanthus* são relevantes, pois permitem a seleção de espécies produtoras de compostos de interesse farmacológico, como por exemplo a glochidona (produzida por apenas duas das espécies estudadas) e o stigmasterol (que foi detectado em 3 dos extratos de calos analisados e em alguns extratos de raízes).

Análises farmacológicas dos extratos dos calos foram realizadas com o objetivo de averiguar o efeito antinociceptivo à dor induzida pela formalina. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos de calos de *P. urinaria* apresentaram bons resultados na primeira e segunda fase de dor (neurogênica e inflamatória), com valores de inibição de 46.4 ± 4.6 e 57.5 ± 7.3 %, respectivamente, o que não ocorreu com as demais espécies estudadas, pois apresentaram inibição apenas na segunda fase de dor. O extrato de calos de *P. stipulatus* causou a inibição mais relevante ($64.9 \pm 6.2\%$) quando comparado com as outras espécies estudadas de *P. fraternus*, *P. caroliniensis* e *P. urinaria*, que apresentaram 44.3 ± 7.2 , 45.5 ± 3.6 e $57.5 \pm 7.3\%$ de inibição, respectivamente. Estes resultados indicam a presença de compostos responsáveis pelas ações antinociceptivas nos extratos dos calos de espécies de *Phyllanthus* produzidos 'in vitro', e apresentam resultados similares aos obtidos anteriormente por SANTOS et al. (1994) com extratos de calos de outras espécies de *Phyllanthus*. Porém, quando comparados aos resultados obtidos com extratos destas mesmas espécies cultivadas no campo, os resultados de inibição dos calos foram menores.

CALIXTO et al. (1998) demonstraram alguns resultados da ação antinociceptiva dos extratos de várias espécies de *Phyllanthus* através do teste de dor induzida pela formalina, e obtiveram resultados mais significativos que os obtidos com os extratos dos calos. Em seus estudos, as inibições máximas obtidas na primeira fase de dor variaram de 44% a 70%, e na segunda fase de 87% a 99%. Estes resultados indicam que as plantas cultivadas no campo apresentam efeitos antinociceptivos mais significativos que os calos produzidos 'in vitro'.

Em relação aos processos de extração utilizados, verificou-se que a literatura apresenta variados procedimentos, adotados por diferentes autores, para extrair os compostos, bem como para determinar as ações farmacológicas dos diversos compostos secundários produzidos em extratos de espécies de *Phyllanthus*. Nos estudos conduzidos neste trabalho, foram adotados os procedimentos de análise fitoquímica desenvolvidos por NIERO (1993) e UGAZ (1994) e os procedimentos para os testes farmacológicos descritos por Santos et al. (1994).

Outros métodos de análise têm sido utilizados por outros autores com o objetivo de identificar os compostos secundários presentes nos calos produzidos 'in vitro' das espécies do gênero *Phyllanthus*. KHANNA & NAG (1973) analisaram os extratos etéreos de cultura de calos de *P. emblica* e identificaram um tanino com ações antibacterianas e antifúngicas. HÄICOUR (1974) preparou extrato aquoso (3g de calos secos em 100 ml de água) de calos obtidos de diferentes partes da planta de *P. urinaria*. As culturas demonstraram inibição de *Bacillus subtilis*, com efeitos mais pronunciados em calos obtidos a partir de folhas como explante. Extratos aquosos de calos de *P. amarus*, *P. abnormis* e *P. urinaria* foram testados por UNANDER (1991) para a inibição da DNAP de alguns vírus, e posteriormente comparados com os extratos das plantas coletadas no campo. Os extratos de calos apresentaram uma inibição menor, por grama de extrato seco, quando comparados com os extratos das plantas coletadas no campo. Estes resultados, segundo o autor, provavelmente refletem a influência das diferentes condições de intensidade luminosa a que as plantas foram expostas em seus experimentos. ISHIMARU et al. (1992) utilizaram extratos metanólicos dos calos e de raízes transformadas para realizar as análises fitoquímicas. O ácido gálico e cinco compostos fenólicos foram identificados em cultura de raízes desta espécie. SANTOS et al. (1994) realizaram análises fitoquímicas e testaram o efeito analgésico dos extratos metanólicos dos calos produzidos 'in vitro' de *P. tenellus*, *P.*

corcovadensis e *P. niruri*. Os calos foram macerados e mergulhados em solução de 95% de metanol para a extração dos compostos e mantidos em temperatura ambiente (25°C) por 10 dias. Os compostos foram determinados através de CCD e HPLC. Os flavonóides foram determinados através do teste com o revelador cloreto férrico, e a presença de alcalóides com o reagente de dragendorff. As análises fitoquímicas revelaram a presença de compostos fenólicos e a ausência de alcalóides e flavonóides nos extratos dos calos, e resultados positivos de inibição foram obtidos nos testes farmacológicos realizados em camundongos. Os extratos produzidos em meios suplementados com 2,4-D causaram inibição nas contrações abdominais induzidas por ácido acético. As inibições máximas obtidas foram de 69, 64 e 53% pelos extratos de *P. corcovadensis*, *P. niruri* e *P. tenellus* respectivamente. Os extratos de *P. corcovadensis* e *P. tenellus* produzidos em meios de cultura suplementados com IBA e IAA apresentaram valores menores em relação à inibição máxima demonstrada pelos calos crescidos em 2,4-D. As inibições máximas, obtidas nas diferentes fases de dor (1ª e 2ª fase de dor) induzidas pela formalina (causadora do edema de pata em ratos), variaram entre 24 e 63% de inibição conforme a espécie de *Phyllanthus* avaliada. *P. tenellus* e *P. corcovadensis* apresentaram resultados mais relevantes na inibição máxima na primeira e segunda fase de dor respectivamente. Estes resultados demonstram claramente o potente efeito antinociceptivo em cultura de calos destas espécies.

Os processos de produção de calos em plantas de interesse farmacológico estão sendo realizados com várias espécies de plantas medicinais. As técnicas de micropropagação e formação de calos com espécies de *H. perforatum* L. têm sido pesquisadas com o objetivo de aprofundar as investigações sobre os compostos ativos produzidos por estas espécies (BÜTER et al., 1994). CARDOSO & OLIVEIRA (1996) iniciaram a cultura de calos em *Hypericum brasiliense*, espécie que tem mostrado propriedades similares às relatadas para a espécie, como antialérgicas, antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana. Os testes realizados demonstraram uma maior eficiência das auxinas 2,4-D e NAA na indução dos calos. WINCKREMESINHE & ARTECA (1993) testaram vários meios de cultura e reguladores de crescimento para maximizar a produção de Taxol® pelos calos de espécies de *Taxus* e os melhores resultados foram obtidos em meio B5 suplementado com 2,4-D para espécies de *T. brevifolia* e *T. baccata*, enquanto que o NAA foi mais eficiente para *T. cuspidata*. O protocolo desenvolvido permitiu a

confirmação da produção de Taxol® através de HPLC e a sua produção por mais de cinco anos em cultura. Este tipo de investigação permitirá o estabelecimento de suspensões celulares, a utilização de elicitores e a adaptação das culturas em biorreatores.

O efeito dos reguladores de crescimento na produção de compostos, especialmente auxinas, na produção de alcalóides em *C. roseus* foi estudada primeiramente em 1989 por VAN DER HEIJDEN et al. A partir daí muitas outras investigações foram realizadas para demonstrar o efeito das auxinas na inibição do acúmulo de alcalóides em cultura de células desta espécie, principalmente os efeitos relacionados à inibição de enzimas da via biossintética dos terpenóides e alcalóides indólicos (ARVY et al., 1994; CANEL et al., 1998).

Células transgênicas de *Catharanthus roseus* (L.) G. foram utilizadas para estudos sobre o efeito da presença de auxinas sintéticas, como o NAA e o 2,4-D, no meio de cultura, na acumulação de terpenóides e alcalóides indólicos. Os resultados demonstraram que a composição hormonal do meio de cultura foi um fator crucial no meio de crescimento e no meio de produção. Foi determinado que a presença de NAA durante a fase de produção reduziu os níveis de acumulação de alcalóides. A presença de 2,4-D no meio de crescimento reduziu a agregação das células e reprimiu o metabolismo secundário. Culturas crescidas em meios contendo 2,4-D demonstraram uma baixa capacidade biossintética de precursores, que resultou numa redução dos níveis de acumulação de terpenóides e alcalóides indólicos (WHITMER et al., 1998).

Muitos outros estudos foram realizados para avaliar a influência das formulações salinas dos meios de cultura sobre a produção de compostos secundários. SUARDI et al. (1994) determinaram a eficiência do meio B5 sobre a produção qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários em *Solanum malacoxylon*. Um outro exemplo são os estudos realizados com espécies de *Taxus* que possibilitaram o desenvolvimento de protocolos para induzir e manter o crescimento de calos destas espécies e permitiram avanços importantes na produção do Taxol®. Além da composição do meio de cultura, outros fatores também foram analisados, como o fotoperíodo, reguladores de crescimento, fontes de carbono e tipos de explantes utilizados para iniciar a formação de calos em espécies de *Taxus*.

5. Análises fitoquímicas das raízes

Cultura de raízes de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fraternus* produzidas em sistemas de cultivo 'in vitro' em condições similares apresentaram resultados distintos, quando analisadas em CCD, com relação aos compostos secundários presentes. Todos os extratos metanólicos das raízes das diferentes espécies estudadas demonstraram a presença de esteróides e terpenóides e a ausência de flavonóides e alcalóides nos testes fitoquímicos realizados (CCD).

É provável a presença de glochidonol nos extratos metanólicos de raízes das espécies de *P. stipulatus*, porém não foi detectada a presença de glochidiol nos extratos de raízes analisados. A glochidona provavelmente está presente nos extratos de raízes de *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. fraternus* e o estigmasterol nos extratos de raízes de *P. stipulatus*, *P. urinaria* e *P. fraternus*. De acordo com os estudos semiquantitativos (CCD), é clara a presença de esteróides e terpenos em maiores quantidades nas culturas de raízes de *P. fraternus* e *P. stipulatus* quando comparadas com *P. caroliniensis* e *P. urinaria*. Além disso, ocorre a presença de outros compostos ainda não identificados em quantidades significativas nestes extratos.

A provável presença de glochidona e estigmasterol nas raízes cultivadas 'in vitro' das espécies de *Phyllanthus* é relevante, uma vez que os dois compostos apresentaram resultados farmacológicos (efeitos antinociceptivos) muito significativos quando testados isoladamente em camundongos (SANTOS et al., 1995; KROGH et al., 1999). Este aspecto possibilita o investimento em futuros aperfeiçoamentos nos sistemas de culturas de raízes em espécies de *Phyllanthus*, tanto para otimizar a produção destes compostos quanto para investigar a produção de outros compostos como alcalóides, taninos e flavonóides, através da manipulação dos sistemas e também através da utilização das técnicas de transformação para melhorar a produção dos compostos de interesse. O grau de diferenciação e organização dos tecidos, apresentado pelos sistemas de cultura de raízes, favorecem a acumulação de alcalóides e outros compostos secundários (PARR, 1988; FLORES, 1992).

O composto estigmasterol e outros sesquiterpenos também foram isolados em cultura de raízes transformadas de *Lactuca virosa* (KISIEL et al., 1995). Além deste, vários trabalhos foram realizados com o objetivo de produção de sesquiterpenos através do

sistema de cultura 'in vitro' de raízes. ARELLANO et al. (1996) estabeleceram técnicas para a produção de sesquiterpenos de importância farmacológica por *Perezia cuernavacana* através de sistemas de cultura de raízes desta espécie. O sistema desenvolvido por este autor é uma alternativa para aumentar a produção destes metabólitos sem ter que extrair os compostos a partir de populações naturais da planta, a qual apresenta problemas agrônômicos de cultivo. WEATHERS et al. (1997) investigaram o efeito do nitrato e sais de fosfato, sacarose e idade de inóculo no crescimento e produção de sesquiterpenos em cultura de raízes de *Artemisia annua*, com o objetivo de determinar as condições de maximização de produção de biomassa radicular e produção de terpenos. Os resultados obtidos não foram eficientes, podendo haver uma correlação inversa entre a produção máxima de biomassa e a produção de terpenos. MEHMETOGLU & CURTIS (1997) realizaram investigações sobre o efeito do ácido salicílico, etanol e metil jasmonato na produção de sesquiterpenos em cultura de células e raízes de *Hyoscyamus muticus*. SINGH et al. (1998) continuaram os estudos com esta espécie utilizando fungos como elicitores e investigaram a influência do metil jasmonato na produção de sesquiterpenos em cultura de raízes não-transformadas. NAKANO et al. (1998) investigaram a produção de compostos por *Tripterygium wilfordii* var. *regelli* em cultura de raízes transformadas por *A. rhizogenes* e isolaram dois novos diterpenos e sesquiterpenos, bem como outros triterpenos já conhecidos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos de micropropagação, cultura de calos e cultura de raízes das espécies de *Phyllanthus* e nas análises fitoquímicas dos extratos produzidos 'in vitro' permitem as seguintes conclusões:

1. A multiplicação eficiente dos ramos de *P. caroliniensis* e *P. stipulatus* foi assegurada em meio MS suplementado com cinetina, e 2iP ou BAP em concentrações variando de 0.25 a 1.0 mg.l⁻¹ ou de 0.06 a 0.12 mg.l⁻¹ dependendo da espécie, uma vez que induziram o aumento significativo do número total de gemas axilares produzidas por explante. Resultados eficientes também foram obtidos com o IBA para *P. stipulatus*.
2. Todas as espécies apresentaram ótimas taxas de enraizamento em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As auxinas como o IAA e NAA induziram intensa proliferação de raízes em *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. urinaria* e poderiam ser utilizadas para a iniciação de cultura de raízes.
3. As formulações dos meios MS e AR, em concentração iônica total ou reduzida pela metade, foram eficientes na multiplicação de ramos de *P. caroliniensis*, *P. urinaria* e *P. stipulatus*.
4. O método desenvolvido para a aclimação de *P. caroliniensis*, *P. urinaria*, *P. fraternus* e *P. stipulatus* assegurou a sobrevivência de plantas de 86 a 91% das microplantas, durante as nove semanas de aclimação. No entanto, esta taxa diminuiu consideravelmente nas espécies de *P. fraternus* após o período de 9 semanas, indicando a sensibilidade desta espécie ao processo de aclimação.
5. A floração de *P. caroliniensis* 'in vitro' ocorreu em diferentes condições de cultura, e a floração 'ex vitro' foi um processo de ocorrência comum a *P. caroliniensis*, *P. urinaria*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*, indicando que estes sistemas podem ser explorados para estudos mais aprofundados sobre floração.

6. As auxinas foram eficientes em induzir a formação de calos em *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. fraternus*. As citocininas BAP e 2iP foram eficientes em induzir a formação de calos em *P. stipulatus* e apenas o 2iP foi eficiente em *P. urinaria*.

7. Os melhores resultados no incremento em peso fresco dos calos de *P. caroliniensis* foram obtidos com explantes na posição vertical em meio MS suplementado com 2,4-D 1.0 mg.l⁻¹ enquanto que para *P. stipulatus* foram com explantes na posição vertical em meio MS suplementado com NAA 1.0 mg.l⁻¹. Para *P. urinaria* os melhores resultados foram obtidos com explantes na posição vertical em meio suplementado com NAA 1.0 mg.l⁻¹. *P. fraternus* apresentou incremento de peso fresco dos calos muito baixo quando comparado com as outras espécies, o que indica a necessidade de otimização da metodologia para esta espécie.

8. As análises fitoquímicas dos extratos metanólicos dos calos de todas as espécies de *Phyllanthus* estudadas demonstraram a ausência de compostos fenólicos e alcalóides e a presença de compostos de natureza terpênica e esteróides.

9. Os rendimentos de massa seca dos extratos de calos em relação ao peso seco original de partida foram maiores em extratos de *P. fraternus* quando comparado com as outras espécies.

10. O sistema de cultivo 'in vitro' de raízes de *P. caroliniensis* demonstrou que a fase de crescimento máximo foi alcançada de 30 a 45 dias de cultivo, enquanto que no sistema desenvolvido para *P. urinaria* esta fase foi alcançada entre 15 a 30 dias de cultivo.

11. As análises fitoquímicas dos extratos dos calos demonstraram a presença de glochidonol e glochidona em *P. caroliniensis*, de glochidonol e estigmasterol em *P. stipulatus* e *P. urinaria*, e de glochidonol, glochidona e estigmasterol em *P. fraternus*, o que indica a possibilidade de otimização da produção desses compostos 'in vitro'.

12. Os rendimentos de massa seca dos extratos de raízes em relação ao peso seco original variaram de 6.08-8.93 % nas espécies de *P. urinaria*, *P. stipulatus* e *P. fraternus* e foram de 12.57% em *P. caroliniensis*.

13. As análises fitoquímicas dos extratos das raízes demonstraram a provável presença de glochidona em *P. caroliniensis*, de glochidonol, glochidona e stigmasterol em *P. stipulatus*, de estigmasterol em *P. urinaria* e de glochidona e estigmasterol em *P. fraternus*, o que indica a possibilidade de otimização da produção desses compostos 'in vitro' a partir da comprovação através da CG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.M., JONES, J.K. & CALIGARI, P.D.S. Clonal propagation by *in vitro* culture of *Corchorus* (Jute). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 47, p.231-238. 1997.
- AGUILAR, M. I. & DELGADO, G. Novel bisabole glycoside and other constituents from the roots of medicinal plant *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). **Nat. Prod. Let.** n. 7, p.155-162. 1995.
- AHMAD, A. & MISRA, L.N. Isolation of herniarin and other constituents from *Matriarca chamomila* flowers. **Inter. J. Pharmac.** n. 35, p.121-125. 1997.
- ALLEM, A.C. Notas taxonômicas sobre as tribos Phyllantheae, Dalechampeae e Manihoteae (Euphorbiaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ilheringia**, Sér. Bot. n.22, p.3-15. 1977.
- AMARAL, L.G. & ULYSSÉA, M. Considerações sobre a identificação de espécies de *Phyllanthus* (Quebra-pedra). **Insula**, n. 22, p.21-38. 1993.
- ANDERSON, W.C. Tissue culture propagation of *Rhododendrons*. **In vitro**. n.14, p.334-1978.
- ANTON, R., JIANG, Y., WENINGER, B., BECK, J.P., Rivier, L. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poiret. **J. Ethnopharmacol.** n. 38, p.153-157. 1993.
- ARELLANO, J., VAZQUEZ, F., VILLEGAS, T., HERNANDEZ, G. Establishment of transformed root cultures of *Perezia cuernavacana* producing the sesquiterpene quinone perezone. **Plant Cell Reports**. n. 15, p.455-458. 1996.
- ARVY, M.P; IMBAULT, N; NAUDASHER, F; THIERSAULT, M. & DOIREU, P. 2,4-D and alkaloid acumulation in periwinkle cell suspensions. **Biochimie**, n. 76, p.410-416. 1994.
- BACCHI, E.M. Farmacognosia de algumas espécies de *Phyllanthus* (conhecidas como Quebra-Pedra). **An. Farm. Quim.** n. 24, p.39-40. 1984.
- BAÍZA, A.M., QUIROZ, A., RUÍZ, J.A., MALDONADO- MENDOZA, I. & LOYOLA-VARGAS, V.M. Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and transformed root cultures of *Datura stramonium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 54, p.123-130. 1998.
- BERGER, K. & SCHAFFNER, W. 'In vitro' propagation of the leguminous tree *Swartzia madagascariensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n 40, p.289-291. 1995.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2 ed. Plenum Press., New York. 445 p. 1994.

- BHATTACHARYA, S. & BHATTACHARYA S. Rapid multiplication of *Jasminum officinale* L. by 'in vitro' culture of nodal explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 51, p.57-60. 1997.
- BINCKNELL, R.A. Micropropagation of *Hieracium aurantiacum*. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**. n. 37,p.197-199, 1994.
- BILA, B; GEDRIS T.E. & HERZ, W. Niruroidine, a norsecurinine-type alkaloid from *Phyllanthus niruroides*. **Phytochemistry**, v.45, n. 5, p.1441-1443. 1996.
- BLOCK, L.C., SHEIDT, C., QUINTAO, N.L.M., SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC. (Compositae). **Pharmazie**. n. 53, p.716-718. 1998.
- BON, M.C., BONAL, D., GOH, D.K. & MONTEUIS. O. Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 53, p.171-177, 1998.
- BRASSARD, N., BRISSETTE, L., LORD, D. & LALIBERTÉ, S. Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature of hybrid larch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 44, p.37-44, 1996.
- BÜTTER, K.B; BÜTTER, B. & SCHAFFNER, W. *In vitro* propagation of *Hypericum perforatum*: impact of thidiazuron and 6-benzyloaminopurine. **Abstracts of the VIII IAPTC Congress**, Firenze, Italia. p. 62. 1994.
- CALIXTO, J.B., YUNES, R.A., NETO, A.S.O., VALLE, R.M.R., RAE, G. A. Antiespasmotic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. **Braz. J. Med. Biol. Res.** n. 17, p.313-321. 1984.
- CALIXTO, J.B., RAE, G., YUNES, R.A., GIACOMOZZI, C.A. Análise farmacológica pré-clínica de extratos de *P. niruri* em músculos liso isolado vascular e não vascular. p. 320. In: **Resumos do V Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, jul 8-12, Rio de Janeiro, 1987.
- CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., PAULINO, N., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A. The Plants of Genus *Phyllanthus* as a Potential Source of New Drugs. **Ciência e Cultura: Journal of Brazilian Association for Advancement of Science**. v.49 n. 5-6, p.422: 432. 1997.
- CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. A Review of the Plants of the Genus *Phyllanthus*: Their Chemistry, Pharmacology, and Therapeutic Potential. **Med. Res. Rev.** n. 4, p.225-258. 1998.

- CANEL, C; LOPES CARDOSO, M I; WHITMER, S; VAN DER FITS, L. PASQUALI, G; VAN DER HEIJDEN, R; HOGE, J.H.C. & VERPOORTE, R. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. **Planta**. n. 205, p.414-419. 1998.
- CARDOSO, M.A. & OLIVEIRA, D.E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. n. 44, p.91-94, 1996.
- CECHINEL FILHO, V., NUNES, R.J., CALIXTO, J.B., YUNES, R.A. Inhibition of Acetylcholine-Mediated Contraction of Guinea Pig Ileum 'in vitro' Caused by Phyllanthimide Analogues: Structure-Activity Relationships. **Pharm. Sci.** v. 1, p.399-401. 1995.
- CECHINEL FILHO, V., SANTOS, A.R.S., CAMPOS, R.O.P DE., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., FERRARI, F., MESSANA, J. & CALIXTO, J.B. Chemical and Pharmacological Studies of *Phyllanthus caroliniensis* in Mice. **J. Pharm. Pharmacol** n. 48, p.1231-1236. 1996a.
- CECHINEL FILHO, V., VAZ, Z.R., NUNES, R. J., CALIXTO, J.B., YUNES, R.A. Antinociceptive Activity of Phyllanthimide. **Pharm. Sci.** v. 2, p.199-201. 1996b.
- CECHINEL FILHO, V., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., DELLE-MONACHE, F., MIGUEL, O.G. & YUNES, R. A. Triterpenes from *Phyllanthus sellowianus* roots. **Planta Med.** n. 64, p.194. 1998.
- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, n. 21, p.99-105. 1998.
- CERDON, C., RAHIER, A., TATON, M., SAUVAIRE, Y. Effect of diniconazole on sterol composition of roots and cell suspension cultures of *Fenugreek*. **Phytochemistry**. n. 39, p. 883-893. 1995.
- CHANG, C.V., LIN, M.T., LEE, S.S., LIU, K.C., HSU, F.L., LIN, J.Y. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-alpha activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera Japonica* Thunb and *Castanopsis hystrix*. **Antiviral Res.** n. 27, p.367-374, 1995.
- CHEN, S.Y., READ, P.E., HALL, J.W. Influence of light, kinetin, 2,4-D and physical treatment of *Rumohra adiantiformis* rhizome tips cultured 'in vitro'. **Am. J. Bot.** n. 72, p.921. 1985.
- CHO, D.Y. & SOH, W. Y. Effect of endogenous IAA transport on adventitious root formation in *Phaseolus vulgaris* hypocotyl cuttings. **Korean J. Bot.** n. 32, p.323-330. 1995.

- CORIOCOSTET, M. F., CHAPIUIS, L., SCALLA, R., DELBECQUE, J. P. Analysis of sterols in plants and cell cultures producing ecdysteroids. (*Chenopodium album*). **Plant Sci.** n. 91, p.23-33. 1993.
- DAVIES, P.J. Hormones and reproductive development in: **Plant Hormone: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology Plant hormones**. Kluwer Academic Publishers. p. 617-648. 1995.
- DE CAMPOS, R.O.P., SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V., VIANA, A.M., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Estudo químico e farmacológico de extratos obtidos por cultivo 'in vitro' de *Phyllanthus urinaria*. p. 98 In: **Resumos do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 17-20 setembro, Florianópolis-SC, 1996.
- DECLERCK, V. & KORBAN, S.S. Effects of source of macronutrients and plant growth regulator concentrations on shoot proliferation of *Cornus florida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 38, p.57-60. 1994.
- DOBOS, E., DÁNOS, B. & LÁSZLO-BENESIK, A. Callus induction and shoot regeneration in *Sempervivum tectorum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 36, p.141-143. 1994.
- DOSHI, J.C., VAIDYA, A.B., ANTARKAR, D.S; DEOLALIKAR, R; ANTANI, D.H. A two-stage clinical trial of *Phyllanthus amarus* in hepatitis B carriers: failure to eradicate the surface antigen. **Indian J.Gastroenterol.** n. 13, p.7-8. 1994.
- DREW, R.A., SIMPOSON, B.W. & OSBORNE, W.J. Degradation of exogenous indole-3-butyric acid and riboflavin and their influence of rooting response of papaya 'in vitro'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 26, p.29-34. 1991.
- DUPONT, M.P., LLABRES, G., DELAUDE, C., TCHISSAMBOU, L., GASTMANS, J. P. Sterolic and triterpenoidic constituents of stem bark of *Drypetes gossweileri*. **Planta Med.** n. 63, p.282-284. 1997.
- DYAS, L., THREFALL, D.R., GOAD, L.J. The sterol composition of 5 plant species grown as cell suspension cultures. **Phytochemistry**. n. 35, p.655-660. 1994.
- FERNÁNDEZ, H., BERTRAND, A.M. & SÁNCHEZ, T. R. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 44, p.261-265.. 1996.
- FETT-NETO, A.G., MELANSON, S.J., SAKATA, K & DICOEMO, F. Developing Calli of *Taxus cuspidata* by Medium composition Modification. **Biotechnology**, v. 11, p.731-734. 1993.
- FLORES, H. E. Plant roots as chemical factories. **Chemistry & Industry**. p.374-377. 1992.

- FRANKLIN, C. I. & DIXON, R. A. Initiation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures. In: **Plant Cell Culture: A practical Approach**. 2^a ed. Oxford University Press. p.1-23. 1993.
- FOO, L.Y. Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**. n. 1, p.217-224. 1995.
- FRANZ, C. Nutrient and water management for medicinal and aromatic plants. **Acta Hort.** n. 132, p.203-215. 1983.
- GAERTNER, M., MULLER, L., ROOS, J.F., CANI, G., SANTOS, A.R.S., NIERO, R., CALIXTO, J.B., YUNES, R.A., DELLE MONACHE, F., CECHINEL FILHO, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**. n. 6, p.41-44. 1999.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root callus. **Exp. Cell. Res.** n. 50, p.151-158. 1968
- GARCIA, M.D., SAENZ, M.T., GOMEZ, M.A. FERNANDEZ, M.A. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation. **Phytother. Res.** n. 13, p.78-80. 1999.
- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part1. The Technology. 2^a ed., Edington Exegetics, 574 p. 1993.
- GOH, H.K.L., RAO, A.N. & LOH, A.S. 'In vitro' plantlet formation in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) **Ann. Bot.** n. 62, p.87-93. 1988.
- GOMEZ, K.A. & GOMEZ, A. Statistical Procedures for Agricultural Research. **John Wiley & Sons**, 2^aed. Singapore. 660 p. 1984.
- GONZALEZ, A., CASARES, A., SANCHEZ, T.R. Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices. **In vitro Cell. Dev. Biol.** n. 27, p.509-591. 1991.
- GORSKI, F., CORREA, C.R., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., & CALIXTO, J.B. Potent antinociceptive activity of the hydroalcoholic extract from *Phyllanthus corcovadensis*. **J. Pharma. Pharmacol**, n. 45, p.1046-1049. 1993.
- GUO, H.Z., CHANG, Z.Z., YANG, R.J., GUO, D., ZHENG, H. Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifolia*. **Phytochemistry**. n. 49, p.1623-1625. 1998.
- HAÏCOUR, R. Comparaison chez *Phyllanthus urinaria* de activité antibactérienne des décoctions de diverses portions de la plante de cultures de tissus qui en proviennent. **C. R. Séances Acad. Sci. Paris. Série D** 278, p.3323-3325. 1974.

- HAIÇOUR, R. Premiers Éléments d'identifications biochimique des principes antibactériens d'extraits du *Phyllanthus urinaria* L. **Comptes Rendus des Séances de L'Academie des Sciences Série D** 280, p.1789-1792. 1975.
- HARADA, H. & MURAI, Y. 'In vitro' flowering on long-term subcultured pear shoots. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. n. 73, p.225-228. 1998.
- HIGASHINO, H., SUZUKI, A., TANAKA, Y. & POOTAKHAM, K. Hypoglycemic Effects of Siamese Momordica Charantia and *Phyllanthus urinaria* Extracts in Streptozotocin-induced Diabetic Rats **Folia Pharmacol.** n. 100, p.415-421. 1992.
- HOOKE, I. Secondary metabolites in hairy root cultures of *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 38, p.321-326, 1994.
- HOSSAIN, M., BISWAS, B.K., KARIM, M.R., RAHMAN, S., ISLAM, R., JOARDER, O.I. 'In vitro' organogenesis of elephant apple (*Feronia limonia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 39, p.265-268, 1994.
- HOSOKI, T. & KATAHIRA, S. Micropropagation of *Verbena tenera* by node culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 36, p.373-375, 1994.
- HOUGHTON, P.J., WOLDEMARIAM, T.Z., SHEA, S.O., THYAGARAJAN, S.P. Two securinega-type alkaloids from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**. n. 3, p.715-717. 1996.
- HUANG, Y.L., CHEN, C.C., HSU, F.L., CHEN, C.F. Two tannins from *Phyllanthus tenellus*. **J. of Nat. Prod.** n. 4, p.523-524. 1998.
- HUNZIKER, A.T. Contribución al conocimiento de las especies Argentinas de *Phyllanthus*. **Kurtziana**. Córdoba, n. 4, p.19-27. 1967.
- IVANOV, P., ENCHEVA, J & IVANOVA, I. A protocol to avoid precocious flowering of sunflower plantlets 'in vitro'. **Plant Breeding**. n. 117, p.582-584. 1998.
- ISHIMARU, K., YOSHIMATSU, K., YAMAKAWA, T., KAMADA, H., SHIMOMURA, K. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**. n. 34, p.2015-2016. 1992.
- JAFFÉ, R., WOLFF, G.A., CABRERA, A.C., CHITTY, H.C. The biogeochemistry of lipids in rivers of the Orinoco Basin. **Geochim. Cosm. Acta**. n. 21, p.4507-4522. 1995.
- JAIN, A.K. & NESSLER, C.L. Clonal propagation of *Camptotheca acuminata* through shoot bud culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 44, p.229-233. 1996.
- JAMALUDDIN, F., MOHAMED, S., LAJIS, M.N. Hypoclycemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of β -sitosterol and stigmasterol. **Food Chem.** n. 49, p.339-345. 1994.

- JAY-ALLEMAND, C., DE PONS, V., DOUMAS, P. 'In vitro' root development from walnut cotyledons: a new model to study the rhizogenesis process in woody plants. **Compte Rendue Academic des Sciences**. Paris, n. 312, p.369-375. 1995.
- JEENA, K.J., JOY, K.L. & KUTTAN, R. Effect of *Emblca officinalis*, *Phyllanthus amarus* and *Picrorrhiza kurroa* on N-nitrosodietilamine induced hepatocarcinogenesis. **Cancer Let.** n. 136, p.11-16. 1999.
- JOSHI, M. & NADGAUDA, R. S. Cytokinins and 'in vitro' induction of flowering in bamboo: *Bambusa arundinaceae* (Retz.) Willd. **Current Sci.** n. 73, p.523-526. 1997.
- JOY K.L. & KUTTAN, R. Inhibition by *Phyllanthus amarus* of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodietilamine. **J. of Clin. Biochem and Nutrit.** n. 24, p.133-139. 1998.
- JUMIN, H.B. & NITO, N. 'In vitro' flowering of orange Jessamine (*Murraya paniculata* (L.) Jack). **Birkhäuser Verlag Basel**. p.268-272, 1996a.
- JUMIN, H.B. & NITO, N. 'In vitro' flowering of *Fortunella hindsii*. **Plant Cell reports**, n. 15, p.484-488, 1996.
- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta**. n. 126, p.105-110. 1975.
- KASAHARA, Y., KUMAKI, K. KATAGIRI, S., YASUKAWA, K., YAMANOUCHI, S., TAKIDO, M., AKIHISA, T., TAMURA, T. *Carthami flos* extract and its component, stigmaterol, inhibit tumor promotion in mouse skin 2-stage carcinogenesis. **Phytothe Res.** n. 8, p.327-331. 1994.
- KHANNA, P. & NAG, T.N. Isolation, identification and screening of Phyllembin from *Emblca officinalis* Gaertn. tissue culture. **Indian J. Pharm**, n. 35, p.23-25, 1973.
- KHANNA, P. & STABA, E. J. Antimicrobials from plant tissue cultures. **Lloydia** n. 31, p.180-189. 1968.
- KISIEL, W., STOJAKOWSKA, A., MALARZ, J., KOHLMUNZER, S. Sesquiterpene lactones in *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root culture of *Lactuca virosa*. **Phytochemistry**. n. 40, p.1139-1140. 1995.
- KIERAN, P.M., MAC LOUGHLIN, P.F. & MALONE, D.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **J. Biotech.** n. 59, p.39-52. 1997.
- KIM, S.G., SOH, W.Y., CHO, D.Y. Saykosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum*. **Korean J. Plant Tissue Cult.** n. 22, p.29-33. 1995.

- KIM, C.J., LIM, J.S. & CHO, S. K. Anti-diabetic agents from medicinal plants inhibitory activity of *Schizonepeta tenuifolia* spikes on the diabetogenesis by streptozotocin in mice. **Arch. Pharm. Res.** n. 19, p.441-446. 1996.
- KOROCH, A.R., JULIANI JR. H.R., JULIANI, H.R. & TRIPPI, V.S. Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n. 48, p.213-217. 1997.
- KOVAC, J. Micropropagation of *Actinida kolomita*. **Plant. Cell, Tissue and Organ Culture.** n. 35, p.301-303. 1993.
- KRIKORIAM, A. D. Hormones in Tissue Culture and Micropropagation In: **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.** Ed. Kluwer Academic Publishers, 4^a ed. p.774-779, 1995.
- KROGH, R., KROTH, R., BERTI, C., MADEIRA, A.O., SOUZA, M.M., CECHINEL FILHO, V., DELLE-MONACHE, F., YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-capre* (L.) R. Br. **Pharmazie.** n. 54, p.1-6. 1999.
- LEE, C.D., OTT, M., THYAGARAJAN, S.P., SHAFRITZ, D.A., BURK, R.D., GUPTA, S. *Phyllanthus amarus* down-regulates hepatitis B virus mRNA transcription and replication. **Eur. J. Clin. Invest.** n. 26, p.1069-1076. 1996a.
- LEE, S.S., LIN, M.T., LIU, C.S., LIN, Y.Y., LIU, K.C.S.C. Six lignans from *P. myrtifolius*. **J. Nat. Prod.** n. 59, p.1061-1065. 1996b.
- LEE, K.T. YAMAKAWA, T., KODAMA, T., IGARASHI, Y., SHIMOMURA, K. Effects of aeration on tropane alkaloid production by transformed root of *Atropa belladonna* in flask cultures. **J. of Ferment. and Bioengin.** n. 86, p.614-616. 1998.
- LEIFERT, C., MURPHY, K.P. & LUMSDEN, P. Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences.** n. 14, p.83-109. 1995.
- LILLO, C. Effects of media components and enviromental factors on shoot formation from protoplast derived calli of *Solanum tuberosum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n.19, p.103-111. 1989.
- LIU, C.Z., WANG, Y.C., OUYANG, F., YE, H.C., LI, G.F. Technical factors of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy root culture. **Acta Bot. Sin.** n. 49, p.1821-1824. 1998.
- LIU, C.Z., WANG, Y.C., OUYANG, F., YE, H.C., LI, G.F. Production of artemisinin by *Artemisia annua* hairy root culture in a internal loop airlift bioreactor. **Acta Bot. Sin.** n. 41, p.181-183. 1999

- LIU, K.C.S.C., LIN, M.T., LEE, S.S., CHIOU, J.F., REN, S.J., LIEN, E.J. Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. **Planta Med.** n. 65, p.43-46. 1999.
- LLOYD, G. & MCCOWNS, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kaemia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int. Plant Prop. Soc. Proc.** n. 30, p.421-427. 1981.
- LOURTEG, A. & O'DONELL, C.A. Euphorbiaceae Argentinae. **Lilloa**, n. 09, p.77-173. 1943
- MA, Y.Q., BABIKER, A.G.T., SUGIMOTO, Y., INANAGA, S. Effect of medium composition on production of *Striga hermonthica* Benth germination stimulant(s) by *Menispermun dauricum* (DC.) root culture. **Planta Med.** n. 64, p.268-270. 1998.
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J.A., MCKEE, R.A. **Principles of Plant Biotechnology An Introduction to Genetic Engineering in Plants.** Black Well Scientific Publications, Oxford London., Edimburgh. 269 p. 1985.
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J. A., MCKEE, R. A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: Uma Introdução à Engenharia Genética em Plantas.** Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 344 p. 1994.
- MATSUNAGA, S., TANALA, R., TAKAOKA, Y., IN, Y., ISHIDA, T., RAHMANI, M., ISMAIL, H.B.M. 26-Nor-D-A Friedooleanane triterpenes from *Phyllanthus watsonii*. **Phytochemistry.** n. 32, p.165-170. 1993
- MCCOWN, B.H. & GELLMER, J.C. General Media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture. In: **Cell and Tissue Culture in Forestry.** Martimes Nijhoff Publishers, Dordrecht. p.4-16. 1987.
- MEHMETOGLU, U. & CURTIS, W. R. Effects of abiotic inducers on sesquiterpene synthesis in hairy root and cell suspension cultures of *Hyoscyamus muticus*. **Appl. Biochem. Biotech.** n. 67, p.71-77. 1997.
- MIGUEL, O.G., CECHINEL FILHO, V., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., FERRARI, F., MESSANA, J. & YUNES, R.A. A triterpene and Phenolic Compound from Leaves and Stems of *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Med.** n. 61, p.391. 1995.
- MIGUEL, O.G. Estudo Químico e Farmacológico das Espécies *Phyllanthus sellowianus*, *P. fraternus* e *Siphocampylus verticillatus*. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Santa Catarina. 219 p. 1996.
- MIGUEL, O.G., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., MESSANA, J., FERRARI, F., CECHINEL FILHO, V., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R. A. Chemical and Preliminary Analgesic Evaluation of Geraniin and Furosin Isolated from *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Med.** n. 62, p.146-149. 1996.

- MISHRA, S.H., QURAIISHI, A. & KOCHE, V. 'In vitro' micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 45, p.87-91, 1996.
- MIYAMA, T., INAMOTO, K., DOI, M., IMANISHI, H. Influences of temperature and subculturing 'in vitro' on subsequent flowering of *Limonium sinuatum* Mill. **J. of the Jap. Soc. for Hort. Sci.** n. 67, p.632-634. 1998.
- MONIER, C. & OCHATT, S. J. Establishing micropropagation conditions for five *Cotoneaster* genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 42, p.275-281. 1995.
- MORARD, P. & HENRY, M. Optimization of the Mineral Composition of 'in vitro' Culture Media. **J. Plant Nut.** n. 21, p.1565-1576. 1998.
- MORETO, E., CRUZ, A.B., CECHINEL FILHO, V., NIERO, R., MONTANARI, J.L., YUNES, R.A. Antibacterial activity of *Phyllanthus urinaria*. **Fitoterapia**, v. LXV, n. 5, 1994.
- MORENO, F.N. Efeito de Reguladores de Crescimento na Indução e Crescimento de Calos em Diferentes Espécies do Gênero *Phyllanthus*. **Relatório de estágio curricular para graduação em Ciências Biológicas**, UFSC. 99 p. Florianópolis, 1993.
- MORTON, J.F. Atlas of Medicinal Plants in Middle America. **Springfield**. 1 ed. p.458-462. 1981.
- MURAKAMI, Y., OMOTO, T., ASAI, I., SHIMOMURA, K., YOSHIHARA, K. & ISHIMARU, K. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 53, p.75-78. 1998.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. n. 15, p.473-497, 1962.
- NAKANO, K., YOSHIDA, S., FURUKAWA, W., TAKAISHI, Y., SHISHIDO, K. Terpenoids in transformed root culture of *Tripterygium wilfordii*. **Phytochemistry**. n. 49, p.1821-1824. 1998.
- NARA, T. K., GLEYER, J., DE CERVAL, E. L., STAMISLAS, E. Flavonoids of *Phyllanthus niruri* L., *P. urinaria*, *P. orbiculatus* L. C. Rich. **Plant. Med. Phytother.** n. 11, p.82-86. 1977.
- NIERO, R. Isolamento e identificação de compostos de *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico; correlação estrutura-atividade. **Dissertação**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 84 p.1993.
- NIN S., SCHIFF, S., BENNICI, A & MANGUERINI, R. 'In vitro' propagation of *Artemisia absinthium* L. **Adv. Hort. Sci.** n. 8:145-147. 1994

- NIN, S., MOROSI, E., SCHIFF, S. & BENNICI, A. Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 45, p.67-72. 1996.
- OLIVEIRA, E., VENTURI, S. & RANDI, A. M. Estudo Preliminar sobre o potencial de germinação de algumas espécies de *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Sem.** v 19 n.2, p.389-392. 1997.
- PARR, A. J. Secondary products from plant cell culture. In: **Biotech. in Agric.** p.1-34. 1988.
- PARRA, R. & AMO-MARCO, B. Effect of plant growth regulators and basal media on 'in vitro' shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. **Biologia Plantarum** n. 38, p.161-168. 1996.
- PEDERSEN, C., HANSEN, C.W., BRANDT, K., KRISTIANSEN, K. Alstroemeria plantlets can be induced to flowering by cold treatment during 'in vitro' culture. **Scien. Hort.** n. 66, p.217-228. 1996.
- PEREZ, M.T.L.P., DELLE MONACHE, F., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R.S., BEIRITH, A., CALIXTO, J. B., YUNES, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. **Phytoth. Res.** n. 12, p.209-211. 1998.
- PETTIT, G.R., SHAUFELEBERGER, D.E., NIEMAN, R.A., DUFRESNE, C. & SAENZ-RENAULD, A.A.S. Antineoplastic agents, 177. Isolation and Structure of Phyllanthostatin 6. **J. Nat Prod.** n. 6, p.1406-1413. 1990.
- PEREIRA, A.M.S., MORAES, M.R., DUARTE, I.B., FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythun* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 42, p.291-293. 1995.
- PEREZ-PARON, M.A., GONZALEZ-BENITO, M.E. & PEREZ, C. Micropropagation of *Frazinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 37, p.297-302. 1994.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 4, p.12-15. 1998.
- POLYA, G.M., WANG, B.H. & FOO, L.Y. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. **Phytochemistry**. n. 2, p.307-314. 1995.
- POLYA, G.M. & WANG, B.H. Inhibition of eukaryote protein kinases by plant defensive secondary metabolites. **Recent. Res. Devel. In Phytochem.** n. 1, p.77-93. 1997.
- PREECE, J.E. & SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: **Micropropagation**. Kluwer Academic Publishers.

- Netherlands. p. 71-93. 1991.
- QIAN-CUTRONE, J., HUANG, S., TRIMBLE, J., LI, H., LIM, P.F., ALAM, M., KLOHR, S.E., KADOW, K. F. Niruriside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.** n. 59, p.196-199. 1996.
- QURAIISHI, A., KOICHE, V. & MISHRA, S. K. 'In vitro' micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n. 45, p.87-91. 1996.
- RAE, G.A., CALIXTO, J.B., LEMOS, C.F., DE LIMA T.C.M., MORATO, G.S., NICOLAU, M., TAKASHA, R.N., VALLE, R.M.R., & YUNES, R.A. Perfil químico e farmacológico de quebra-pedra, *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae). pp77. In: **Resumos do VII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, set 04-06, Manaus, 1984.
- RAJAM, M.V. & CHRISTOPHER, T. 'In vitro' clonal propagation of *Capsicum* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n. 38, p.25-29.1994.
- RAJASEKARAN, P. Production of clonal plantlets of *Grevillea robusta* 'in vitro' culture via axillary bud activation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n. 39, p.277-279. 1994.
- RANDI, A.M., VENTURI, S. & OLIVEIRA, E. de. Estudo preliminar sobre o potencial de germinação de algumas espécies de *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Acta Bot. Bras** n. 11, p.1-8. 1997
- RIJHWANI, S.K & SHANKS, J.V. Effect od elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. **Biotech. Progress.** n. 14, p.442-449. 1998.
- SÁEZ, F., SÁNCHEZ, P. & PIQUERAS, A. Micropropagation of *Thymus piperella*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** n 39, p.269-272. 1994.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. Bioquímica de las Plantas e Desarrollo vegetal In: **Fisiología Vegetal.** Grupo Editorial Iberoamérica S. A. de C. V. Nebraska, México. p.209-591. 1994.
- SANCHEZ, M.C., SAN-JOSE, M.C., BALLESTER, A. & VIEITEZ. Requirements for 'in vitro' rooting of *Quercus robus* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. **Tree physiology**, n. 16, p.673-680. 1996.
- SANE, R.T., KUBER, V.V., CHALISSERY, M.S., MENON, S. Hepatoprotection by *Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus debilis* in Ccl4- induced liver dysfunction. **Curr. Sci.** n. 68, p.1243-1246. 1995.
- SANTOS, D. R. Chá de Quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e ratos. **Tese de doutorado.** Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP. 1990.

- SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V., VIANA, A.M., MORENO, F.N., CAMPOS, M.M., YUNES, R. A. & CALIXTO, J.B. Analgesic Effects of Callus Culture Extracts From Selected Species of *Phyllanthus* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** n. 46, p.755-759. 1994.
- SANTOS, A.R.S. Efeito antinociceptivo de extratos e princípios isolados de plantas do gênero *Phyllanthus* (Quebra-pedra). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 104 p. 1995.
- SANTOS, A.R.S., CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Further studies on the antinociceptive action of hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. **J. Pharm. Pharmacol.** n. 47, p.66-71. 1995.
- SANTOS, A.R.S., CAMPOS, R.O.P DE., MIGUEL, O.G., PIZZOLATTI, M.G., YUNES, R.A., CECHINEL FILHO, V., CALIXTO, J. B. Ação antinociceptiva dos extratos do *Phyllanthus amarus* e do *Phyllanthus fraternus* (Euphorbiaceae). pp 277. In: **Resumos da XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, ago, 21-24, Caxambu, MG, 1996.
- SANTOS, J., SANTOS, I. & SALEMA, R. 'In vitro' production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth. **Sci. Hort.** n. 76, p.205-217. 1998.
- SARADHI, P.P. & ISLAMIA, J.M. *Phyllanthus fraternus*- A plant with Anti-Hepatitis viral activity. **Ind. Crops and Prod.** n. 6, p.35-40. 1997.
- SATYAN, K.S., PRAKASH, A., SINGH, R.P., SRIVASTAVA, R.S. Phthalic acid bis-eter and other phytoconstituents of *Phyllanthus urinaria*. **Planta Med.** n. 61, p.293-294. 1995.
- SCHENK, R.U. & HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cultures. **Can. J. Bot.** n. 50, p.199-204. 1972.
- SCHUMUTTERER, H. & ZEBITZ, C.P.W. Effects of methanolic extracts from seeds of single neem trees of African and Asian origin on *Epilachna varvestis* and *Aedes aegypti*. In: **Proceedings of the Second International Neem Conference**. Deutsche Ges. Tech. Zus., Eschbom, West Germany. p. 38-90. 1983.
- SCRAGG A. The immobilization of plant cell. In: **Plant Cell and Tissue Culture**. John Wiley & Sons, Chichester. p 205-220. 1993a.
- SCRAGG A. Plant Cell Bioreactors. In: **Plant Cell and Tissue Culture**. John Wiley & Sons, Chichester. p. 221-239. 1993b.

- SCRAGG A. Secondary products from cultured cells and organs: II. Large scale culture. In: **Plant Cell Culture A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, 2^a ed. p.199-224. 1994.
- SELBY, C. & HARVEY, B.M.R. The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured *Sitka spruce* tissues. **Annals of botany-London**. n. 65, p.395-407. 1990.
- SHARMA, N., CHANDEL, K.P.S. & PAUL, A. 'In vitro' Propagation of *Gentiana kurroo* –Indigenous Threatened Plant of Medicinal Importance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 34, p.307-309. 1991
- SILVA, M.L.B da. Micropropagação de espécies do gênero *Phyllanthus*. **Relatório de estágio curricular para Graduação em Ciências Biológicas**, UFSC. Florianópolis, jul. 1995.
- SINGH, G., GAVRIELI, J., OAKEY, J.S., CURTIS, W.R. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. **Plant Cell Reports**. n. 17, p.391-395. 1998
- SITTIE, A.A., LEMMICH, E., OLSEN, C.E., HVIID, L., & CHRISTENSEN, S.B. Alkalamides from *Phyllanthus fraternus*. **Planta Med**. n. 64, p.192-193. 1998.
- SMITH, L.B., DOWNS, R.J. & KLEIN, R.M. Euforbiaceas. **Flora Illustrada Catarinense**. Parte I, 409 p. 1988.
- SOH, W.Y., CHOI, P.S. & CHO, D.Y. Effects of cytokinin on adventitious root formation in callus cultures of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **In vitro Cell. Dev. Biol.** n. 34, p.189-195. 1998.
- SRIVIDYA, N. & PERIWAL, S. Diuretic, hypotensive and hypoglycaemic effect of *Phyllanthus amarus*. **Indian J. Exper. Biol.** n. 33, p.861-864. 1995.
- STAFFORD A. Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In: **Plant Cell and Tissue Culture**. John Wiley & Sons, Chichester. p.124-162.1993.
- STOJAKOWSKA, A., MALARZ, J., KISIEL, W., KOHLMUNZER, S. Rairy root culture of *Lactuca virosa* L. **Acta Soc. Bot. Pol.** n. 64, p.33-39. 1995.
- SUARDI, M.L., BERNASCONI, S., PELIZZONI, F. & RACCHI, M.L. 'In vitro' cultures of *Solanum malacoxylon* Sendt.:nutricional requeriments and sterol production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 36, p.09-14, 1994.
- SUDHA, C.G. & SEENI, S. 'In vitro' propagation of *Rauwolfia micrantha*, a rare medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n 44, p.243-248. 1996.
- TAHA, R.M. 'In vitro' flowering of *Murraya paniculata* (Jack) Linn. **Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotech.** n. 5, p.68-71. 1997.

- TAN, R. X., LU, H., WOLFENDER, J.L., YU, T.T., ZHENG, W. F., YANG, L., GAFNER, S., HOSTETTMANN, K. Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. **Planta Med.** n. 65, p.64-67. 1999.
- TEMPESTA, M.S., CORLEY, D.G., BEUTLER, J.A., METRAL, C.J., YUNES, R.A., GIACOMOZZI, C.A., CALIXTO, J.B. Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **J. Nat Prod.** n. 51, p.617-618. 1988.
- THYAGARAJAN, S.P., SUBRAMANIAN, S., THIRUNALASUDARU, T., VENKASTEWARAN, P.S. & BLUMBERG, B.S. Preliminary study: The effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. **Lancet**, v. 2, p.764:766. 1988.
- UENO, H., HORIE, S., NISHI, Y., SHOGAWA, H., KAWASAKI, M., SUZUKI, S., HAYASHI, T., ARISAWA, M., SHINIZU, M., YOSHIZAKI, M., MORITA, N. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay. Geraniin, and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from 'Paraparai mi', *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.** n. 2, p.357-359. 1988.
- UGAZ, O.L. **Investigación Fitoquímica**. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Perú, 2ªed. 300p.1994.
- ULYSSEÁ, M. & AMARAL, L.G. Contribuição ao estudo do Gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) ocorrente na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Insula**, n. 26, p.1-28. 1997
- UNANDER, D.W., WEBSTER, G.L., BLUMBERG, B.S. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). I Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblia*. **J. Ethnopharmacol.** n. 30, p.233-264.1990.
- UNANDER, D.W. Callus induction in *Phyllanthus* species and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts. **Plant Cell Reports** n. 10, p.461- 466. 1991
- UNANDER, D.W., WEBSTER, G.L., BLUMBERG, B.S. Uses and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation II. The subgenus *Phyllanthus*. **J. Ethnopharmacol.** n. 34, p.97-133. 1991.
- UNANDER, D.W., BRYAN, H.H., LANCE, C.J. & MCMILLAN Jr., R.T. Cultivation of *Phyllanthus amarus* and evaluation of variables potentially affecting yield and inhibition of viral DNA polymerase. **Econ. Bot.** v. 47, p.79-88. 1993.
- UNANDER, D.W., WEBSTER, G.L., BLUMBERG, B.S. Usage and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **J. Ethnopharmacol.** n. 45, p.1-18. 1994.

- UNANDER, D.W., BRYAN, H.H., LANCE, C.J. & MCMILLAN JR., R.T. Factor affecting germination and stand establishment of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae). **Econ. Bot.** v. 49, p.49-55. 1995.
- UNANDER, D.W. XVIII- *Phyllanthus* species: In vitro culture and the production of secondary metabolites. In: **Biotechnology in agriculture and forestry**.v. 37, p.304-318. 1996.
- UNANDER, D.W. *Phyllanthus* as a Chemopreventive: A Case Study of Why It's Hard to Translate Ethnobotany to the Clinic. **Cancer Prev. Int.** v. 3, p.143-152. 1998.
- VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. & TEM HOOPEN, H. J. G. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.n. 80, p.231-280. 1989.
- VAZQUEZFLOTA, F., MORENOVALENZUELA, O., MIRANDAHAM, M.L., COELLOCOELLO, J., LOYOLAVARGAS, V. M. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures: medium optimization and elicitation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 38, p.273-279, 1994.
- VENKATESWARAN, P.S., UNANDER, D.W., BLUMBERG, B.S., HALBHERR, T., SHARAGER, D., DAHL. L., KRAUS, M., RISSINGER, C., SIMMONS, H.H. Potential antiviral agents for the treatment of Hepatitis B virus and retroviruses. **Scient. Report.** p.300-301. 1991.
- VENTURI, S. & RANDI, A.M.(a) Influência da coloração das sementes na germinação de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L. (euphorbiaceae). **Acta bot. Bras.** n. 11, p.87-94. 1997.
- VENTURI, S. & RANDI, A. M.(b) Preliminary studies on the growth of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Biotemas**. n. 10, p.61-70. 1997.
- WANG, G.Y., XU, Z.H., CHIA, T.F., CHUA, N.H. 'In vitro' flowering of *Dendrobium candidum*. **Sci. in China Ser. C-Life Sci.** n. 40, p.35-42. 1997.
- WEATHERS, P.J., HEMMANVANH, D.D., WALCERS, D.B., CHEETHAM, R.D., SMITH, T.C. Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on growth and sesquiterpene production in *Artemisia annua* hairy root cultures. **In vitro Cell. & Devel. Biol. Plant.** n. 33, p.306-312. 1997.
- WEBSTER, G.L. & BURG, D. PAST. VI. Family 97. Euphorbiaceae in Flora of Panamá. **Ann. Missouri Bot. Gard** n. 54, p.211-350. 1967/68.
- WEBSTER, G.L. A revision of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in the Continental United States. **Brittonia**. n. 22, p.44-76. 1970.

- WHITE, P.R. **The Cultivation of Animal and Plant Cells**. Ronald Press, New York. 1963.
- WHITE, P.R. **A Handbook of Plant Tissue Culture**. Jacques Cotell Press, Lancaster, Pennsylvania. 1963.
- WICKREMESINHE, E.R.M. & ARTECA, R.N. *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 35, p.181-193, 1993.
- WHITMER, S; VERPOORTE, R. & CANEL, C. Influence of auxins on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 35, p.135-141, 1998 .
- WYSOKINSKA, H. & CHMIEL, A. Transformed root cultures for biotechnonology. **Acta Biotech**. n. 17, p.131-159. 1997.
- YAO, Q.Q. & ZUO, C.X. Chemical studies on the constituents of *Phyllanthus urinaria* L. **Yao Hsueh Hsueh Pao**. n. 28, p.829:835. 1993.
- YUAN, Y.J., HU, T.T. & YANG, Y.M. Effects of auxins and cytokinins on formation of *Catharanthus roseus* G. Don multiple shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n. 37, p.193-196. 1994.
- ZABETAKIS, I., EDWARDS, R., O'HAGAN, D. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. **Phytochemistry**. n. 50, p.53-56. 1999.

ANEXO - 1

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS DOS CALOS DE ESPÉCIES DE
*Phyllanthus***

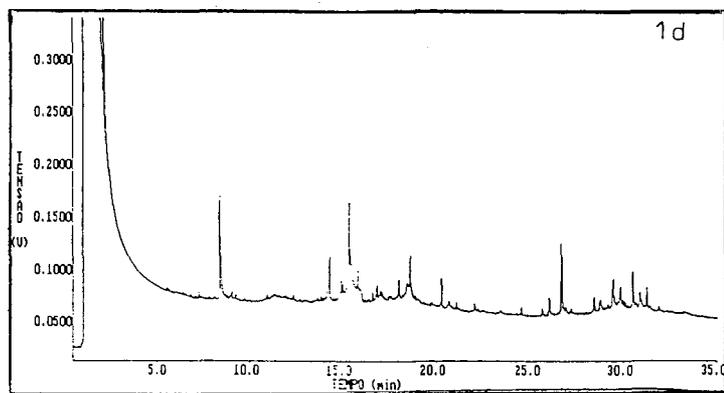
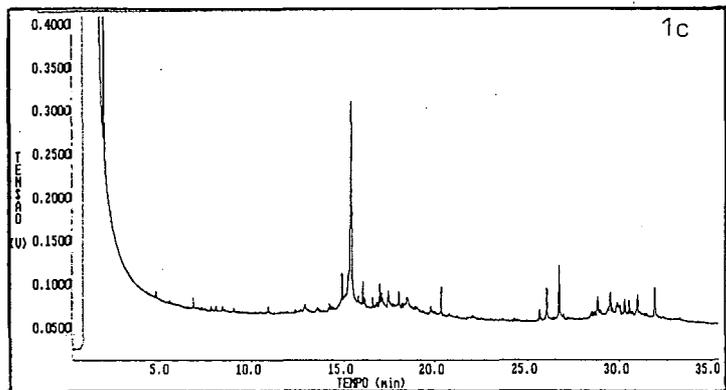
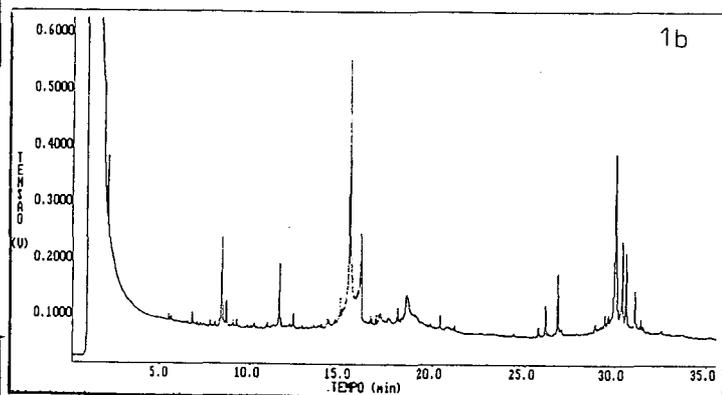
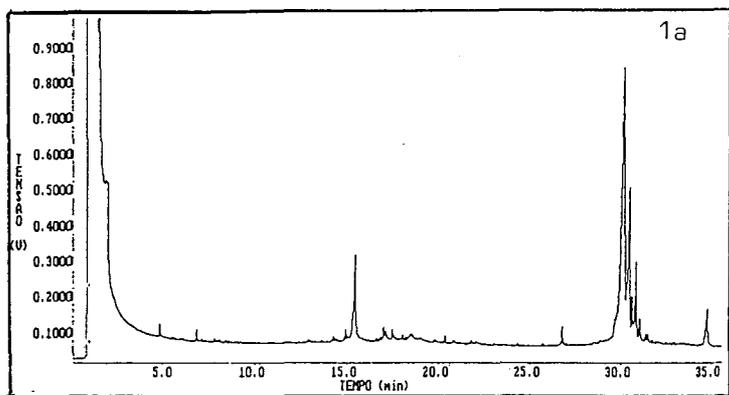
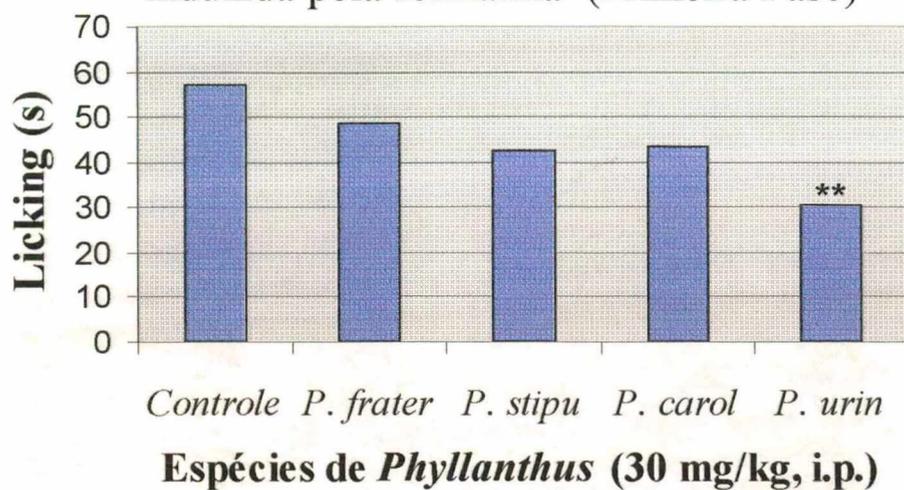


Figura 1. Perfil cromatográfico dos extratos de calos de *P. caroliniensis* (1a), *P. stipulatus* (1b), *P. urinaria* (1c) e *P. fraternus* (1d).

ANEXO - 2

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DOS EXTRATOS DE CALOS DE ESPÉCIES DE
Phyllanthus NA DOR INDUZIDA PELA FORMALINA.**

Efeito antinociceptivo dos extratos de calos de espécies de *Phyllanthus* na dor induzida pela formalina (Primeira Fase)



Efeito antinociceptivo dos extratos de calos de espécies de *Phyllanthus* na dor induzida pela formalina (Segunda Fase)

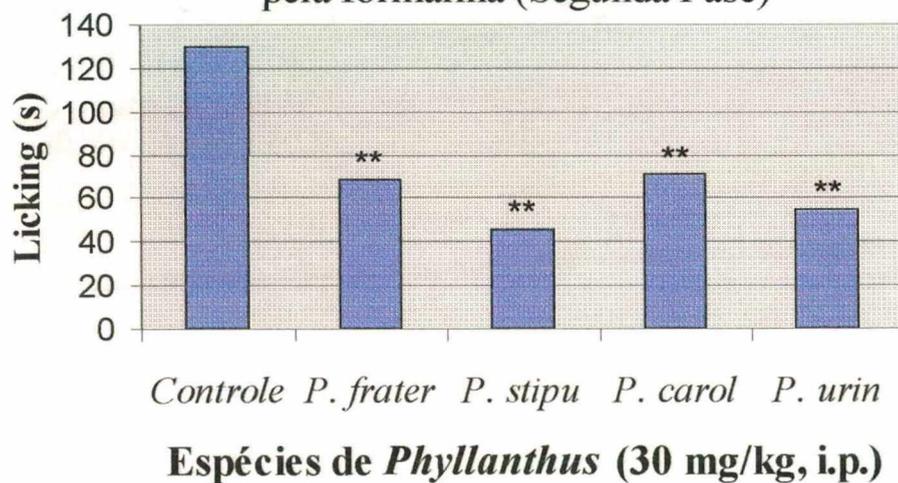


Figura 2. Efeito antinociceptivo dos extratos de calos de espécies de *Phyllanthus* na dor induzida pela formalina

ANEXO - 3

**EFEITO DOS EXTRATOS DE CALOS DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus* NA DOR
INDUZIDA PELA FORMALINA**

Tabela 1. Efeito dos extratos metanólicos (30 mg/kg, i.p.) de calos de espécies de *Phyllanthus* na dor induzida pela formalina

Primeria fase	Controle	<i>P. fraternus</i>	<i>P. stipulatus</i>	<i>P. caroliniensis</i>	<i>P. urinaria</i>
Média	57.25±4.3	48.75±6.8	42.75±10.1	43.50±9.6	30.75±05.3
Erro padrão	2.17	6.89	10.11	9.68	5.32
Inibição (%)		14.8±6.0	25.3±8.8	24.0±8.4	46.4±4.6
Segunda fase					
Média	130.25±12.2	68.50±20.2	45.75±16.2	71.00±9.4	55.25±18.9
Erro padrão	6.13	10.14	8.12	4.74	9.48
Inibição (%)		44.3±7.2	64.9±6.2	45.5±3.6	57.5±7.3