

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DA FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Xantonas, benzopiranos e floroglucinois diméricos em culturas de tecidos de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil**

Jéssica de Matos Nunes

Porto Alegre, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DA FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Xantonas, benzopiranos e floroglucinois diméricos em culturas de tecidos de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil**

Tese apresentada por **Jéssica de Matos Nunes** para a obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sandra Beatriz Rech

Porto Alegre, 2014



#### CIP - Catalogação na Publicação

de Matos Nunes, Jéssica  
Xantonas, benzopiranos e floroglucinois diméricos  
em culturas de tecidos de espécies de Hypericum  
nativas do sul do Brasil / Jéssica de Matos Nunes. --  
2014.  
228 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.  
Coorientadora: Sandra Beatriz Rech.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2014.

1. Hypericum . 2. Metabólitos secundários. 3.  
Cultivo in vitro. 4. Aclimatização. 5. Policetídio  
sintases do tipo III. I. Lino von Poser, Gilsane,  
orient. II. Rech, Sandra Beatriz, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aprovada pelos membros titulares da Banca Examinadora constituída por:

**Profa. Dra. Eliane Romanato Santarém**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**Profa. Dra. Miriam Anders Apel**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Dra. Natasha Maurmann**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro Suplente

**Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal e Farmacognosia, do Departamento de Produção e Controle de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS, e no *Institut für Pharmazeutische Biologie*, na *Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig*, em Braunschweig, Alemanha, pela modalidade doutorado sanduíche com financiamento do CNPq. A autora recebeu bolsa de estudos nacional do CNPq.





## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.  
E em apenas tudo-palavra  
Escrevendo,  
Não apenas, mas tudo estou agradecendo

Às minhas orientadoras Gilsane e Sandra  
Há década professoras da caminhada  
Com maestria e conhecimento me trouxeram  
Além de exemplo, estímulo e orientação dedicada

Ao Prof. Dr Ludger Beerhues e sua equipe, em especial à Dra. Mariam Gaid  
Pela oportunidade que me proporcionaram durante o ano em que estive fora  
Com comprometimento me possibilitaram o aprimoramento de meu trabalho  
Na Alemanha me desconstruindo, construindo o que sou agora

Aos colegas amigos do “lab”, Maikon, Henrique e Gari  
Letícia, Flávia, Fernando e Gabi  
Que no dia-a-dia, só quem vive sabe  
O companheirismo e conhecimento que a eles cabe

Àquelas que dedicaram seu precioso tempo da graduação  
Para sempre bolsistas do coração,  
Bárbara, Lizi, Bianca, Thayse  
E Luiz, que agora aprende com dedicação

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia  
Professores, porteiros, técnicos, bibliotecários  
Vigilantes, faxineiros, outros tantos e secretários  
Que cada um a sua maneira, me forneceram o necessário

Às crianças de todos os sábados  
Que muitas hoje maiores do que eu são  
Por me enfeitarem com seus sorrisos, peraltices  
Crescendo vida em meu coração

Aos amigos de perto, de longe  
De ontem e de hoje  
Que escutam e apoiam, cobram e divertem

Agregando valor às relações humanas

E, por fim, à família

Ah, nossa família...

Que de todos os próximos

Os mais próximos abriga

A meus pais Simoni e Alex

Que com amor e zelo me receberam nesta vida

Que fizeram fortes os seus (muitas vezes cansados) braços

Para dar sustento a todos os meus passos

À minha doce e perfeita vó Eva

Que dos netos e bisnetos mãe também é

Para ti, todo o meu amor

E a tua coragem aplaudo em pé

Pai, mãe, vó: para vocês palavras serão sempre só palavras

Perto do meu reconhecimento e gratidão

Ao meu irmão Alexandre, à minha irmã Pâmela

E à caçula Carol, por serem parte do que sou

Pelas parcerias, pelas brigas

E pela união que sempre prevalecerá

À família Simon, que me recebeu

E me acolheu com carinho

Sempre acompanhando de perto

E torcendo ao longo do meu caminho

Ao Guto, por dividir comigo a estrada

Me apoiando, se apoiando, lado a lado

Pelo amor e carinho que nunca faltam

Por tudo que sendo me faz ser





*E toda criatura é uma fonte de luz  
por ser, em si, uma fonte de amor.*

**Emmanuel**



## RESUMO

Metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais são, há tempos, reconhecidos como moléculas capazes de desempenhar ações farmacológicas. Entre as plantas medicinais mais utilizadas estão espécies do gênero *Hypericum*, pertencente à família Guttiferae, e que possui 494 espécies. Destas, aproximadamente 20 estão distribuídas no sul e sudeste do Brasil e apresentam o acúmulo de compostos fenólicos como flavonoides, xantonas, benzopiranos e floroglucinois. Como forma de garantia da qualidade e quantidade de plantas medicinais para consumo da indústria farmacêutica, bem como uma alternativa para preservação das espécies, o estabelecimento de protocolos de cultivo apresenta-se como uma opção vantajosa frente ao uso de plantas coletadas diretamente de seus locais de crescimento. Por este motivo, espécies nativas do sul do Brasil como *H. polyanthemum*, *H. ternum*, *H. myrianthum*, *H. carinatum* e *H. campestre* tiveram seus protocolos de cultivo *in vitro* e *ex vitro* (aclimatização) estabelecidos, verificando-se a possibilidade da produção de biomassa vegetal uniforme e de maneira otimizada, com a manutenção da síntese dos metabólitos de interesse. *H. teretiusculum*, espécie recém identificada na região central do estado, apresenta o acúmulo de metabólitos secundários e escassos relatos na literatura, focados em seus aspectos botânicos. Estes fatos levaram ao estabelecimento do protocolo de cultivo *in vitro* e aclimatização da espécie. As plântulas apresentaram crescimento satisfatório quando cultivadas *in vitro* em meio MΔ apenas ou suplementado com ácido indol butírico. Após 18 semanas de aclimatização, verificou-se o aumento da biomassa e o acúmulo dos derivados do floroglucinol uliginosina B e isohyperbrasilol B, verificados em traços na planta *in natura*, bem como hiperbrasilol B e japonicina A, não detectados nos extratos das plantas coletadas de seu habitat natural. Este resultado evidencia a relevância do cultivo *in vitro* como forma de otimização da produção de moléculas bioativas. Entre as espécies nativas estudadas, *H. polyanthemum* destaca-se por ser a única, até o momento, produtora dos três benzopiranos, HP1, HP2 e HP3. Além deles, a planta também produz o derivado do floroglucinol uliginosina B. A presença de HP1, com atividades analgésica e antidepressiva bem como de uliginosina B, que se classifica como novo protótipo para moléculas antidepressivas, levou ao desenvolvimento de um depósito de patente para o extrato *n*-hexano da espécie e requer estudos para a investigação da otimização em sua biossíntese. Neste sentido, a influência da imposição de estresse abiótico (ácido salicílico e dano mecânico, sozinhos ou combinados, fertilização e seca, sozinhos ou combinados) em plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* foi investigada na décima oitava semana de aclimatização. Embora HP2 não tenha apresentado aumento em

nenhum dos tratamentos aplicados, o aumento de 40 e 6 vezes na produção de uliginosina B nas folhas e flores, respectivamente, destaca-se entre os resultados obtidos, bem como aumento significativo na síntese de HP1 nas folhas e flores e HP3 nas folhas após a aplicação de seca e seca com fertilização, respectivamente. Os resultados sugerem que a biossíntese dos principais metabólitos de *H. polyanthemum* pode ser consideravelmente incrementada com a exploração do recurso da imposição de estresse hídrico no mesmo. O estabelecimento do cultivo *in vitro* de raízes adventícias de *H. polyanthemum* foi realizado como alternativa de produção rápida e “limpa” dos metabólitos secundários de interesse. No entanto, embora apresentando crescimento satisfatório em meio líquido, a síntese de benzopiranos e floroglucinois não foi verificada, mas a produção de diversas xantonas. Interessante é ressaltar que apenas traços de uma xantona é relatado para plantas *in natura* da espécie, não sendo detectada em plântulas cultivadas *in vitro*. Com o objetivo de compreender a produção e regulação na síntese destes compostos, realizou-se a investigação de enzimas poliacetídeo sintases (PKS) do tipo III nos tecidos da espécie, com o objetivo principal da obtenção de uma isobutirofenona sintase, envolvida com a biossíntese de floroglucinois e benzopiranos. Dos *screenings* realizados com primers de expressão de algumas PKS do tipo III foi possível isolar uma benzofenona sintase (BPS) das culturas de células em suspensão e um fragmento 3'-terminal de uma ORF específica para PKS do tipo III, sem apresentar enzimas funcionalmente relacionadas à BPSs. Estes achados concordam com o perfil fitoquímico das culturas de células em suspensão, que apresentam no mínimo duas xantonas como componentes majoritários, e das plântulas *in vitro*, que apresentam majoritariamente benzopiranos e derivados do floroglucinol em seus extratos, sem detecção de estruturas relacionadas à xantonas. Considerados em seu conjunto, os resultados do presente trabalho contribuem para a preservação e manutenção da qualidade do material vegetal das espécies de *Hypericum* com potencial uso na terapêutica, bem como contribui para o entendimento da biossíntese dos principais metabólitos de *H. polyanthemum* que demonstram variar de acordo com o tecido vegetal.

**Palavras-chave:** *Hypericum polyanthemum*, *Hypericum teretiusculum*, benzopiranos, derivados do floroglucinol, xantonas, raízes adventícias, células em suspensão, enzimas poliacetídeo sintases do tipo III



## ABSTRACT

**Xanones, benzopyrans and dimeric phloroglucinols in tissue cultures of *Hypericum* species native from South of Brazil.** Plant secondary metabolites are long ago known to be able to perform pharmacological effects. *Hypericum* genus possesses 494 species distributed around the world and approximately 20 grow in south Brazil and accumulate phenolic compounds such as flavonoids, xanones, benzopyrans and phloroglucinol derivatives. Aiming plant quantity and quality for pharmaceutical industry purposes, as well as to avoid natural resource exploitation, *in vitro* and *ex vitro* (acclimatization) protocols were established for *H. polyanthemum*, *H. ternum*, *H. myrianthum*, *H. carinatum* e *H. campestre*, affording uniform and increased vegetal biomass. *H. teretiusculum* is a species recently found in the state center, demonstrating secondary metabolite accumulation and only few information in literature, most of them directed to botanical aspects. These data leaded to the establishment of *in vitro* and *ex vitro* propagation protocols for the species. Plants were successfully micropropagated in M $\Delta$  medium with or without IBA supplementation. After 18 weeks of field growth, vegetal biomass increase and phloroglucinol derivatives accumulation was verified, with uliginosin B and isohyperbrasilol B, just found as traces in *in natura* plants as well as hyperbrasilol B and japonicin A, not detected in plants harvested directly from the wild. These results attest the relevance of cultivation protocols establishment aiming to optimize bioactive molecules obtainment. Among the native studied species, *H. polyanthemum* is highlighted for HP1, HP2 and HP3 benzopyrans productions, described just for the species until now. Besides, the phloroglucinol uliginosin B is also produced. The presence of HP1, with antinociceptive and antidepressant activities and uliginosin B, classified as a novel prototype for antidepressant-like molecules, a patent was deposited for *n*-hexanic extract of the species, claiming for investigations focusing on biosynthesis increment. Guided for this objective, abiotic stresses (SA application and mechanical damage, alone or combined, mild fertilization and drought, alone or combined) was imposed to acclimatized plants of *H. polyanthemum* on eighteenth

week of field growth. Although HP2 was not increased with any of the applied treatments, a 40-fold and 6-fold increase on uliginosin B production in leaves and reproductive parts, respectively are highlighted among the obtained results, as well as significant increase in HP1 in leaves and HP3 in reproductive parts after drought and drought + fertilization treatment, respectively. The data suggest that main *H. polyanthemum* metabolites might be strongly induced by drought stress modulation. The establishment of *in vitro* adventitious root cultures of *H. polyanthemum* was described as alternative for rapid and “clean” secondary metabolites obtainment. Nevertheless, even demonstrating ability for stable *in vitro* growth, benzopyrans and phloroglucinol derivatives were not detected in this tissue, but a wide array of xanthenes was detected instead. It is interesting to point out that only traces of xanthone is related for *in natura* plants and such class of compounds was not detected in *in vitro* plants. Aiming to understand biosynthesis of these compound, type III polyketide synthases (type III PKS) were investigated in *H. polyanthemum* tissue, focusing mainly on BUS discovery, involved in benzopyrans and phloroglucinol biosynthesis. After screening cell suspension cultures cDNA, a benzophenone synthase (BPS) enzyme was isolated and biochemically characterized, while *in vitro* plants afforded a 3'-end fragment of a type III PKS specific ORF and neither other enzymes related with xanthone biosynthesis. These data are in accordance with phytochemical profile displayed by cells suspensions, presenting at least two xanthenes as majoritarian compounds in the extracts, and plants, which just accumulate benzopyrans and uliginosin B. Considered compiled data, the present work direct medicinal plant studies into increment of valuable secondary metabolites.

**Key-word:** *Hypericum polyanthemum*, *Hypericum teretiusculum*, benzopyran, phloroglucinol derivatives, xanthenes, adventitious roots, cell suspension cultures, type III polyketide synthase





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plântula de <i>H. teretiusculum</i> cultivada <i>in vitro</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 2.</b> Massa fresca e massa seca de plântula de <i>H. teretiusculum</i> cultivado <i>in vitro</i> . .....	<b>56</b>
<b>Figura 3.</b> Quantificação de compostos fenólicos totais em plântulas de <i>H. teretiusculum</i> micropropagadas <i>in vitro</i> . .....	<b>56</b>
<b>Figura 4.</b> Massa fresca das diferentes partes de <i>H. teretiusculum</i> aclimatizado. .....	<b>59</b>
<b>Figura 5.</b> Derivados do floroglucinol identificados em plantas aclimatizadas de <i>H. teretiusculum</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 6.</b> Ilustração da evolução da indução de raízes adventícias de <i>H. polyanthemum</i> . .....	<b>106</b>
<b>Figura 7.</b> Influência da concentração inicial das raízes no crescimento das mesmas, em meio líquido. ....	<b>109</b>
<b>Figura 8.</b> Acúmulo de biomassa das raízes adventícias em função do tempo de cultivo. ....	<b>114</b>
<b>Figura 9.</b> Comparação do conteúdo de floroglucinois em raízes adventícias e folhas de <i>H. polyanthemum in natura</i> .....	<b>115</b>
<b>Figure 10.</b> Basic mechanism of decarboxylative Claisen condensation. ....	<b>123</b>
<b>Figure 11.</b> Chemical diversity of type III PKSs explained by variation in starter molecule. ....	<b>125</b>
<b>Figure 12.</b> Proposed mechanism of the enzyme reactions of type III polyketide synthases .....	<b>126</b>
<b>Figure 13.</b> CHS and STS mechanism of action .....	<b>127</b>
<b>Figure 14.</b> Xanthone biosynthesis as further step of BPS catalysis. ....	<b>129</b>

<b>Figure 15.</b> PPS and BPs reaction mechanism.....	<b>130</b>
<b>Figure 16.</b> BIS reaction mechanism .....	<b>131</b>
<b>Figure 17.</b> OKS reaction mechanism.....	<b>132</b>
<b>Figure 18.</b> BUS reaction mechanism.....	<b>133</b>
<b>Figure 19.</b> Smart II 5'RACE protocol outline. ....	<b>145</b>
<b>Figure 20.</b> Schematic presentation of TATA box protocol for aiming 5'RACE.	<b>148</b>
<b>Figure 21.</b> Outline of cloning procedure. ....	<b>149</b>
<b>Figure 22.</b> pGEM-T and pTZ57R/T vectors maps.. ....	<b>150</b>
<b>Figure 23.</b> pRSETB vector map. ....	<b>151</b>
<b>Figure 24.</b> Benzopyrans chromatogram and UV spectra.....	<b>157</b>
<b>Figure 25.</b> Xanthones chromatogram from <i>H. polyanthemum</i> cell suspension cultures.....	<b>158</b>
<b>Figure 26.</b> 1,3,7-trihydroxyxanthone and 1,3,5,6-trihydroxyxanthone chromatogram and UV spectra.....	<b>159</b>
<b>Figure 27.</b> Chromatograms of isolated "peak 1" and "peak 2" from <i>H. polyanthemum</i> cell suspension cultures.....	<b>160</b>
<b>Figure 28.</b> Purified peaks from <i>H. polyanthemum</i> cells in an acetonitrile-water gradient elution system.....	<b>160</b>
<b>Figure 29.</b> LC-MS/MS spectrum of "peak 1" and "peak 2" from <i>H. polyanthemum</i> cells extract. ....	<b>162</b>
<b>Figure 30.</b> Postulated structures for 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthones from <i>H. polyanthemum</i> cells .....	<b>164</b>
<b>Figure 31.</b> Postulated structures for 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthones from <i>H. polyanthemum</i> cells n.....	<b>167</b>

<b>Figure 32.</b> Acetone extract from root cultures of <i>Hypericum polyanthemum</i> ..	<b>170</b>
<b>Figure 33.</b> Acetone extract from <i>in vitro</i> <i>H. polyanthemum</i> plants .....	<b>170</b>
<b>Figure 34.</b> Gel photo of 18S amplification and type III PKS screening with overexpression primers in <i>H. polyanthemum</i> cells cDNA.....	<b>171</b>
<b>Figure 35.</b> Gel photo of 18S amplification and type III PKS screening with overexpression primers in <i>H. polyanthemum</i> plants .....	<b>172</b>
<b>Figure 36.</b> Upstream nucleotide sequence of <i>H. polyanthemum</i> BPS cDNA...	<b>173</b>
<b>Figure 37.</b> HpoBPS SDS-PAGE. ....	<b>174</b>
<b>Figure 38.</b> Amino acid sequence of HpoBPS. ....	<b>175</b>
<b>Figure 39.</b> Postulated catalytic mechanism for the HpoBPS. ....	<b>176</b>
<b>Figure 40.</b> Percent identity among amino acid sequences of <i>H. polyanthemum</i> benzophenone synthase (HpoBPS), <i>H. perforatum</i> isobutyrophenone synthase (HpBUS), <i>H. androsaemum</i> benzophenone synthase (HaBPS) and <i>H. androsaemum</i> chalcone synthase (HaCHS).....	<b>177</b>
<b>Figure 41.</b> BUS screening in <i>in vitro</i> plants of <i>H. polyanthemum</i> .....	<b>178</b>
<b>Figure 42.</b> Amino acid sequence of HpoPKS2 3'-end fragment. ....	<b>179</b>
<b>Figure 43.</b> Upstream nucleotide sequence of HpoPKS2 3'-end fragment.....	<b>180</b>
<b>Figure 44.</b> Percent identity among amino acid sequences of <i>H. androsaemum</i> benzophenone synthase (HaBPS), <i>H. sampsonii</i> benzophenone synthase (HsBPS), the terminal 157 amino acids from PKS2 fragment from <i>H. polyanthemum</i> plants (HpoPKS2) and <i>Swertia chirata</i> benzophenone synthase (ScPKS2). ....	<b>181</b>
<b>Figure 45.</b> Screening of xanthone related enzymes in <i>in vitro</i> <i>H. polyanthemum</i> plant cDNA. ....	<b>182</b>
<b>Figure 46.</b> Semiquantitative expression analysis of HpoPKS2 in <i>in vitro</i> <i>H. polyanthemum</i> plants.....	<b>183</b>

<b>Figure 47.</b> Dependence of HpoBPS activity on pH.....	<b>185</b>
<b>Figure 48.</b> Dependence of HpoBPS activity on protein concentration. ....	<b>186</b>
<b>Figure 49.</b> Dependence of HpoBPS activity on incubation time.....	<b>186</b>
<b>Figure 50.</b> Substrate specificity of HpoBPS.....	<b>187</b>
<b>Figure 51.</b> Dependence of HpoBPS1 activity on benzoyl-CoA (A), isobutyryl-CoA (B) and malonyl-CoA (c) concentrations via Michaelis-Menten plots. ....	<b>189</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação entre atividades biológicas e produtos (extratos ou compostos isolados) verificada para espécies de <i>Hypericum</i> nativas do sul do Brasil.....	<b>32</b>
<b>Tabela 2.</b> Massa fresca, massa seca e teor de uliginosina B em plântulas de <i>H. teretiusculum</i> micropropagadas .....	<b>53</b>
<b>Table 3.</b> Gradient elution method from xanthenes analysis.....	<b>136</b>
<b>Table 4.</b> Gradient elution method from xanthenes analysis.....	<b>138</b>
<b>Table 5.</b> Type III PKSs overexpression primers for <i>Hypericum</i> species. ....	<b>140</b>
<b>Table 6.</b> Primers used in different amplifications. ....	<b>140</b>
<b>Table 7.</b> Standard procedure for reverse transcription reaction. ....	<b>142</b>
<b>Table 8.</b> Reaction procedure for standard PCR.....	<b>143</b>
<b>Table 9.</b> Touch down PCR standard program. ....	<b>143</b>
<b>Table 10.</b> General procedure for poli-C tailing 5'cDNA .....	<b>146</b>
<b>Table 11.</b> Standard reaction for TATA box amplification.....	<b>146</b>
<b>Table 12.</b> PCR program for TATA box amplifications. ....	<b>147</b>
<b>Table 13.</b> Restriction digestion procedure for <i>NheI</i> and <i>KpnI</i> . ....	<b>150</b>
<b>Table 14.</b> Ligation procedure of purified DNA into p-GEM-T Easy and pTZ57R/T vectors. ....	<b>150</b>
<b>Table 15.</b> Buffers used in plasmid isolation.....	<b>153</b>
<b>Table 16.</b> Buffers used in His <sub>6</sub> -tagged protein purification.. ....	<b>154</b>
<b>Table 17.</b> Formulae of SDS-PAGE gel and solutions used in protein electrophoresis. ....	<b>155</b>
<b>Table 18.</b> UV pattern of different xanthenes trioxygenated at C1, C3 and C7.	<b>165</b>

<b>Table 19.</b> UV patterns of various xanthenes tetraoxygenated at C1, C3, C5 and C6.....	<b>168</b>
<b>Table 20.</b> GSP designed for HpPKS2 5'RACE.....	<b>180</b>
<b>Table 21.</b> Kinetic parameters of HpoBPS1.....	<b>189</b>

## SUMÁRIO

1. OBJETIVOS GERAIS .....	33
2. Capítulo 1 .....	37
ESTABELECIMENTO DA MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Hypericum teretiusculum</i> A. ST. HIL.....	37
3.1. INTRODUÇÃO .....	39
3.2. OBJETIVO .....	41
3.3. REVISÃO .....	41
3.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.5.1 Estabelecimento do cultivo de <i>Hypericum teretiusculum</i> A. St.- Hil	47
3.5.2 Avaliação da influência da concentração de sais no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Hypericum teretiusculum</i> .....	49
3.5.3 Aclimatização de <i>Hypericum teretiusculum</i> micropropagado <i>in</i> <i>vitro</i>	49
3.5.4 Obtenção dos extratos vegetais.....	50
3.5.5 Quantificação de compostos fenólicos totais .....	50
3.5.6 Quantificação de derivados do floroglucinol por CLAE.....	51
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.5.1 Micropropagação de <i>in vitro</i> de <i>Hypericum teretiusculum</i> .....	51
3.5.2 Avaliação da influência da concentração do meio de cultura no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Hypericum teretiusculum</i> .....	54
3.5.3 Aclimatização de <i>H. teretiusculum</i> micropropagado <i>in vitro</i> ...	58
3.6. CONCLUSÕES .....	62
4. Capítulo 2 .....	65
Indução por estresse de importantes metabólitos secundários em plantas aclimatizadas de <i>Hypericum polyanthemum</i> .....	65

4.1.	INTRODUÇÃO.....	68
4.2.	PRINCIPAIS RESULTADOS (substitui artigo publicado).....	71
4.3.	DISCUSSÃO GERAL .....	91
5	Capítulo 3.....	95
	ESTABELECIMENTO DE CULTURAS DE ADVENTÍCIAS DE <i>Hypericum polyanthemum</i> .....	95
6	Chapter 4.....	119
	TYPE III POLYKETIDE SYNTHASES IN <i>Hypericum polyanthemum</i> .....	119
6.1	OBJETIVES.....	122
6.2	REVISION.....	122
6.3	MATERIALS AND METHODS.....	134
6.1	Tissue cultures and phytochemical analysis .....	134
6.4.1.1	<i>In vitro</i> <i>Hypericum polyanthemum</i> plants .....	134
6.4.1.2	Establishment of callus and cell suspension cultures.....	134
6.4.1.3	Establishment of root cultures.....	135
6.4.1.4	Metabolite extraction .....	135
6.5	RESULTS AND DISCUSSION.....	156
6.6	CONCLUSION .....	189
	ANEXO 1 .....	215
	Introduction .....	217
	Materials and methods.....	218





## INTRODUÇÃO GERAL

O emprego de plantas como ferramenta para preservação, manutenção e reparo da saúde é prática estabelecida entre os homens e sua aplicação estende-se desde o seu consumo na forma *in natura*, como o caso das frutas, até a forma de produtos isolados, quando metabólitos vegetais são purificados a partir de uma matriz vegetal (STANZIANI, 2008). Este último caso é de especial interesse para a indústria farmacêutica que tem encontrado, na utilização de produtos naturais como matéria-prima, interessante apelo terapêutico e comercial (CANTER et al., 2005; PASSALACQUA et al., 2007).

Entre as principais plantas tradicionalmente empregadas com fins terapêuticos encontram-se as espécies do gênero *Hypericum*, há séculos utilizadas com diferentes finalidades como o tratamento de pequenas queimaduras externas, inflamações de pele e nevralgias (GREESON et al., 2001). Embora com diferentes aplicabilidades, é a ação antidepressiva de preparações a base de *H. perforatum*, espécie nativa da Europa, Ásia e África, a responsável pela importância terapêutica do gênero (KASPER, 2001; MELZER et al., 2010).

Dos compostos produzidos por *H. perforatum*, a atividade antidepressiva foi inicialmente atribuída às naftodiantronas hipericina e *pseudo*-hipericina (BUTTERWECK et al., 1998). Estudos posteriores apontaram o papel de xantonas como inibidores da enzima monoamina oxidase (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995; HOSTETTMAN et al., 1995) e, subsequentemente, chegou-se à hipótese de que a hiperforina, um derivado do floroglucinol, também estaria entre as principais substâncias responsáveis pela atividade antidepressiva de *H. perforatum* (CHATTERJEE et al., 1998). Com a continuidade das investigações, destacou-se ainda o possível envolvimento de flavonóides nesta atividade (BUTTERWECK et al., 1998; 2000). Outras espécies do gênero também têm sido avaliadas quanto ao potencial antidepressivo, demonstrando tal atividade no teste do nado forçado, modelo animal de depressão (SÁNCHEZ-MATEO et al., 2002; WANG et al., 2010).

Com o objetivo de encontrar, em espécies de ocorrência natural no Brasil, propriedades semelhantes às de plantas do mesmo gênero já utilizadas na terapêutica, algumas das 22 espécies de *Hypericum* distribuídas entre as regiões sul e sudeste (ROBSON, 1981; 1990) vem sendo estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, verificando-se importantes relações entre atividades biológicas e a produção de determinados metabólitos secundários, sintetizadas na tabela abaixo (Tabela 1 Relação entre atividades biológicas e produtos (extratos ou compostos isolados) verificada para espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil.).

**Tabela 1** Relação entre atividades biológicas e produtos (extratos ou compostos isolados) verificada para espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil.

Espécie	Atividade	Produto	Referência
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. connatum</i> <i>H. polyanthemum</i>	Antiviral	Extrato metanólico	SCHMITT et al., 2001
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. myrianthum</i> <i>H. polyanthemum</i>	IMAO <sup>(1)</sup> A	Fração lipofílica	GNERRE et al., 2001
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. polyanthemum</i>	Antinociceptiva	Extrato <i>n</i> -hexânico	VIANA et al., 2003
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. connatum</i> <i>H. myrianthum</i>	Antiprolifetariva	Frações lipofílicas	FERRAZ et al., 2005a
<i>H. polyanthemum</i> <i>H. caprifoliatum</i> <i>H. carinatum</i> <i>H. connatum</i> <i>H. myrianthum</i> <i>H. polyanthemum</i> <i>H. ternum</i>	Antitumoral	Benzopiranos HP1, HP2 e HP3	FERRAZ et al., 2005b
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. myrianthum</i> <i>H. polyanthemum</i> <i>H. ternum</i>	Antimicrobiana	Extratos metanólicos	DALL'AGNOL et al., 2003
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. myrianthum</i> <i>H. polyanthemum</i>	Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i>	Fração lipofílica, HP2, HP3, uliginosina B, hiperbrasilol B e japonicina A	DALL'AGNOL et al., 2005
<i>H. ternum</i>	Antifúngica	Frações lipofílicas	FENNER et al., 2005
<i>H. caprifoliatum</i>	IMAO <sup>(1)</sup>	Extrato <i>c</i> -hexano bruto e purificado	VIANA et al., 2005
<i>H. caprifoliatum</i>	Antinociceptiva Antidepressiva	Extrato <i>n</i> -hexano e metanólico Fração lipofílica	VIANA et al., 2006
<i>H. connatum</i>	Ati-herpes vírus simplex	Hiperbrasilol B, amentoflavona e luteoferol	FRITZ et al., 2007
<i>H. caprifoliatum</i>	Antiespasmódica gastrointestinal	Extrato <i>c</i> -hexano	VIANA et al., 2007
<i>H. ternum</i>	Antioxidante	Compostos fenólicos	BERNARDI et al., 2008
<i>H. polyanthemum</i> <i>H. caprifoliatum</i> <i>H. carinatum</i> <i>H. myrianthum</i> <i>H. polyanthemum</i>	Acaricida	Extrato <i>n</i> -hexano	RIBEIRO et al., 2007
<i>H. caprifoliatum</i> <i>H. carinatum</i> <i>H. myrianthum</i> <i>H. polyanthemum</i>	Antioxidante	Extrato metanólico	BERNARDI et al., 2008a
<i>H. caprifoliatum</i>	Antidepressiva	Fração lipofílica	DAUDT et al., 2000;



			VIANA et al., 2008
<i>H. polyanthemum</i>	Antiproliferativa	Benzopieranos HP1, HP2 e HP3	GRIVICICH et al., 2008
<i>H. polyanthemum</i>	Analgésica	HP1	HAAS et al., 2010
<i>H. polyanthemum</i>	Analgésica	Uliginosina B	STOLZ et al., 2012
<i>H. polyanthemum</i>	Antidepressiva	Uliginosina B	STEIN et al., 2012
<i>H. polyanthemum</i>	Anti-tricomoniase	HP1, HP2, HP3 e uliginosina B	CARGNIN et al., 2013
<i>H. caprifoliatum</i>			
<i>H. carinatum</i>			
<i>H. linoides</i>	Antifúngico	Extrato lipofílico	BARROS et al. 2013a
<i>H. myrianthum</i>			
<i>H. polyanthemum</i>			
<i>H. carinatum</i>			
<i>H. linoides</i>	Antiquimiotático	Extrato lipofílico	BARROS et al. 2013a
<i>H. myrianthum</i>			

<sup>(1)</sup>Atividade inibidora da enzima monoamina oxidase

A demanda crescente por material vegetal requer o fornecimento dos mesmos com qualidade e em quantidade, o que pode ser alcançado por meio de técnicas de cultivo. Algumas das espécies nativas do sul do Brasil possuem protocolos de cultivo *in vitro* e *ex vitro* (aclimatização) estabelecidos (BERNARDI, 2007; BERNARDI et al., 2007; BERNARDI et al. 2008; PINHATTI et al., 2010), demonstrando utilidade desta técnica na preservação planta e otimização da quantidade de metabólitos secundários obtidos. Soma-se, a estes fatores, a utilidade das técnicas de cultivo como forma de viabilizar o fornecimento de material vegetal para o estudo destes mesmos metabólitos, quer seja quanto às suas atividades biológicas, quer seja quanto à sua biossíntese.

## 1. OBJETIVOS GERAIS

Considerando a importância dos metabólitos secundários das espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, em especial *H. polyanthemum*, que destaca-se pela produção de floroglucinois e benzopiranos, bem como *H. teretiusculum*, sem relatos na literatura e produtora de derivados do floroglucinol, o presente trabalho apresenta como objetivos gerais:

- O estabelecimento de protocolo de cultivo *in vitro* e aclimatização para *H. teretiusculum* A. St.-Hil;
- Avaliar a resposta de plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum*, quanto a produção de benzopiranos e uliginosina B, frente à diferentes mecanismos de elicitação abiótica;
- Estabelecer protocolo de cultivo *in vitro* de raízes adventícias de *H. polyanthemum* e avaliar a influência das condições de cultivo no desenvolvimento destes tecidos;
- Investigar a presença de enzimas poliketídeo sintases do tipo III, envolvidas com a produção de metabólitos secundários em *H. polyanthemum*, com vistas ao entendimento da biossíntese de benzopiranos, floroglucinois e xantonas.





**2. Capítulo 1**

**ESTABELECIMENTO DA MICROPROPAGAÇÃO E  
ACLIATIZAÇÃO DE *Hypericum teretiusculum* A. ST. HIL.**

---



### 3.1. INTRODUÇÃO

A matéria-prima vegetal utilizada pela indústria constitui-se de plantas coletadas *in natura* ou cultivadas seguindo protocolos especificamente desenvolvidos (LUBBE e VERPOORTE, 2011). Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens, sendo de maior proveito para a indústria farmacêutica o uso de plantas obtidas através da segunda opção.

O cultivo de plantas possibilita o exercício do controle de qualidade de maneira facilitada ao longo de todas as etapas do processo, o que inclui a coleta, identificação do material vegetal e avaliação da qualidade do mesmo em termos de composição química (CANTER et al., 2005) e contaminantes químicos e biológicos (SARASAN et al., 2011). Além disso, a variação inter-coletas também é reduzida quando se utiliza plantas cultivadas (SARASAN et al., 2011).

Entre as técnicas disponíveis para este fim, o uso de sistemas de micropropagação *in vitro* possibilita a obtenção de plantas, a partir de uma planta mãe, que determinará o genótipo e o fenótipo das plantas filhas em um espaço de tempo e de área reduzidos (LUCCHESINI e MENSUALI-SODI, 2010). Desta forma, o desenvolvimento de protocolos de micropropagação é um dos primeiros passos para a seleção e multiplicação de plantas com alta produção de metabólitos secundários (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ROUT e DAS, 2000).

Entre as vantagens decorrentes do estabelecimento de uma linhagem vegetal de interesse está a possibilidade de solucionar dificuldades inerentes ao cultivo de determinada espécie, como a reduzida produção de sementes (SARASAN et al., 2006) e os baixos índices de germinação (SINGH et al., 2009). Além disso, a variação das condições climáticas em resposta a mudança das estações do ano deixam de afetar o desenvolvimento das plantas, contribuindo para o suprimento de material vegetal de uma maneira mais estável (SCHIPPMANN et al., 2006).

Complementarmente à micropropagação, a posterior aclimatização é uma excelente alternativa para promover a produção de plantas medicinais em larga

escala (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; FLORES et al., 2004). A aclimatização consiste em reintroduzir plantas cultivadas *in vitro* para suas condições naturais de crescimento e apresenta a readaptação às condições de crescimento *ex vitro* como um fator determinante para o seu sucesso (FLORES et al., 2004, LUCCHESINI e MENSUAL-SOLDI, 2010).

Entre as espécies de *Hypericum* estudadas por nosso grupo de pesquisa, *H. polyanthemum* (BERNARDI et al., 2007), *H. ternum*, *H. carinatum* e *H. myrianthum* (BERNARDI, 2007) possuem protocolos de cultivo *in vitro* e *ex vitro* estabelecido. *H. polyanthemum* (BERNARDI et al., 2008) e *H. ternum* (PINHATTI et al., 2010) tiveram seu desenvolvimento ontogênico estudado durante a aclimatização, apresentando desenvolvimento satisfatório durante o cultivo a campo e a manutenção da produção dos metabólitos secundários estudados.

A projeção do gênero *Hypericum* em nível mundial deve-se a *H. perforatum*, planta utilizada como matéria prima para a produção de fitoterápicos com ação antidepressiva. A atividade observada para os extratos apolares desta planta deve-se, principalmente, à presença de hiperforina, uma naftodiantrona, e hipericina, um derivado do floroglucinol. Uliginosina B, também um derivado do floroglucinol, é produzido por diversas espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil e apresenta atividades analgésica (STOLZ et al., 2012) e antidepressiva (STEIN et al., 2012).

Considerando a presença de uliginosina B e de outras moléculas bioativas nas espécies de *Hypericum* nativas e o cultivo de plantas medicinais como alternativa para garantir a preservação das espécies medicinais e a qualidade dos produtos delas obtidos, torna-se interessante o estabelecimento de protocolos de cultivo para as espécies de *Hypericum* nativas.



### 3.2. OBJETIVO

Proporcionar a produção de biomassa vegetal com capacidade biossintética de compostos bioativos, bem como promover sua preservação, através do estabelecimento da micropropagação e aclimatização de *H. teretiusculum* a partir de plantas coletadas *in natura*.

### 3.3. REVISÃO

A preservação de plantas ameaçadas de extinção ou que possuem distribuição restrita pode seguir a duas estratégias: preservação *in situ* e *ex situ*. A preservação *in situ* caracteriza-se pela manutenção e continuação do desenvolvimento das plantas em seu habitat natural. Por outro lado, a preservação *ex situ* compreende técnicas que podem ser usadas de maneira complementar aos métodos *in situ*, muitas vezes representando a única alternativa possível para proteção da espécie (SARASAN et al., 2006; KAPAI et al., 2010). Enquanto a execução das estratégias de cultivo *in situ* representa a continuidade de uma população em seu espaço natural, mantendo as características do bioma (SCHIPPMANN et al., 2006), a conservação *ex situ* garante maior grau de segurança na proteção do germoplasma (SARASAN et al., 2006; KAPAI et al., 2010).

Lucchesini e Mensuali-Sodi (2010) sintetizaram a descrição das etapas para o desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* segundo Debergh e Maene, que compreende 5 passos, diferentemente dos três descritos por Murashige e Skoog (1974). Estes estágios englobam os passos que compreendem da coleta da planta *in natura* à obtenção da aclimatização, e caracterizam-se por:

Estágio 0 - separação das plantas coletadas em melhores condições; Estágio 1 - início do cultivo asséptico

Estágio 2 - indução, desenvolvimento e multiplicação dos brotos

Estágio 3a - crescimento (alongamento) dos brotos

Estágio 3b - enraizamento

Estágio 4 - aclimatização

O estágio 0 é descrito como a etapa em que, visualmente, são selecionadas as plantas coletadas em melhores condições e com menos indícios de contaminação, visando selecionar a planta mãe, que será a base para a micropropagação *in vitro*. O impacto do estágio 0 não é, aparentemente, apenas limitado às condições sanitárias do explante. Ele também irá afetar o índice de sobrevivência das plântulas ao longo das sucessivas subculturas no processo de cultivo. Esta multiplicação *in vitro* pode ocorrer a partir do cultivo de meristemas, brotos, pecíolos, raízes e outros, sendo, para isto, fundamental a garantia de condições assépticas.

O estágio 1 é a etapa em que iniciam-se os processos para a desinfestação dos explantes obtidos a partir da planta coletada, visto que seu crescimento ocorre em contato com diversos microrganismos e poluentes. Além destas partículas presentes no ar e, por vezes, visíveis nas estruturas da planta, contaminantes como fungos e bactérias endógenas podem fazer-se presentes por anos ao longo das sucessivas subculturas, mesmo após realizados os processos de assepsia (SARASAN et al., 2006). Os métodos convencionais de esterilização incluem hipoclorito de sódio (em concentrações que variam de 5 a 15%), álcool etílico (teores de 50 a 95°GL) e, menos utilizado atualmente, cloridrato de mercúrio (de 0,01 a 0,1%).

Para o caso das contaminações endógenas, algumas alternativas para solucionar o problema incluem a imersão da planta por um período prolongado em baixas concentrações da solução de dicloroisocianurato de sódio, bem como a adição de 1 g/L de hipoclorito de cálcio no meio utilizado na primeira subcultura (SARASAN et al., 2006). A ausência de contaminação durante a micropropagação, além de garantir melhores condições de desenvolvimento ao explante, possibilita a identificação de espécies que apresentam tendência a desenvolver contaminação mesmo sob os cuidados de assepsia durante as subculturas.

Além da contaminação, outros fatores devem ser considerados na escolha do explante, tais como o estágio ontogênico da planta e do órgão que será utilizado, seu tamanho e localização e a estação em que a planta será coletada. As características do explante são fundamentais para o sucesso da continuação do cultivo estabelecido.

Outro aspecto essencial para a técnica de micropropagação é a escolha do meio de cultura adequado para cada espécie. Entre as formulações elaboradas, o meio MS, formulado por Murashige e Skoog (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é utilizado para um grande número de espécies. Este meio é composto por carboidratos, vitaminas, macronutrientes e micronutrientes necessários para o desenvolvimento da planta. Além do meio MS, outras formulações apresentando diferente composição de sais inorgânicos, aminoácidos e vitaminas são utilizadas, como o meio Gamborg (B5), White, McCown, Quoirin e Lepoivre e Schenk e Hildebrandt (ROUT e DAS 2000; LUCCHESINI e MENSUALI-SODI, 2010).

A formação dos novos brotos, após a primeira transferência para o meio *in vitro*, caracteriza o estágio 2 do estabelecimento da micropropagação e resulta de um balanço finamente controlado entre a concentração de hormônios vegetais endógenos ao explante e os fornecidos pelo meio de cultivo *in vitro*. O balanço dos hormônios capazes de induzir o desenvolvimento de brotos depende de cada espécie e deve ser investigado.

O estágio 3 de cultivo compreende o alongamento dos brotos formados (estágio 3a) e o enraizamento (estágio 3b) do explante, sendo alcançado com o uso de auxinas em concentrações que variam com o tipo do regulador de crescimento e a espécie do vegetal utilizados.

O enraizamento *in vitro* é um processo fisiologicamente mais custoso para a plântula se comparado ao crescimento de brotos. A excisão que originará um novo broto significa uma simples separação de parte da planta do local em que até o momento fornecia-lhe a água e os minerais obtidos a partir das raízes. Esta necessidade nutritiva passará a ser, então, suprida diretamente pelo meio de cultura no qual o broto será . Por outro lado, a regeneração de um novo sistema radicular

requer uma profunda modificação fisiológica no organismo, visto que parte importante do seu tecido foi retirado (meristemas radiculares). Por esta razão, o esforço metabólico será maior para o desenvolvimento de novas raízes, tornando-se fundamental o fornecimento de reguladores de crescimento vegetal (LUCCHESINI e MENSUALI-SODI, 2010).

Uma vez enraizadas e com taxas satisfatórias de sobrevivência e desenvolvimento completo ao longo das sucessivas subculturas, as plantas podem ser cultivadas em um passo alternativo ao cultivo *in vitro*: a aclimatização. A reintrodução de uma planta cultivada *in vitro* à condições *ex vitro* de crescimento caracteriza a aclimatização (ROUT e DAS, 2000, NETO et al., 2004) e pode proporcionar significativo incremento na biomassa vegetal e síntese de metabólitos secundários (COUCEIRO et al., 2006; BERNARDI et al., 2008; NUNES et al., 2009a; NUNES et al., 2009b; PINHATTI et al., 2010). Além disso, as plantas aclimatizadas são provenientes de um cultivo *in vitro* no qual as condições de crescimento das plântulas foram otimizadas visando o aumento da produção dos compostos de interesse. Em alguns casos, as plantas aclimatizadas podem também sofrer modificações em suas rotas metabólicas, resultando em alteração na composição química de seus extratos quando comparados às plantas *in natura*. Este é o caso de *Cleome rosea*, cujas plantas aclimatizadas não apresentaram citotoxicidade ao DNA plasmidial quando comparadas com as plantas coletadas *in natura* e com as plântulas micropropagadas (SIMÕES et al., 2006).

A micropropagação e aclimatização têm sido utilizadas para a obtenção de metabólitos secundários de diferentes espécies medicinais (SARASAN et al., 2006; LUBBE e VERPOORTE, 2011). Para o gênero *Hypericum*, a maior parte dos trabalhos abordando técnica de cultivo descrevem protocolos desenvolvidos para *H. perforatum*. Brutovská e colaboradores (1998) estabeleceram o cultivo *in vitro* de *H. perforatum* a partir de sementes e posteriormente aclimatizaram as plântulas micropropagadas, demonstrando que estas foram capazes de reproduzirem-se sexuadamente, mantendo padrão de diploidia estável e elevado, característica relacionada com maior produção de hiperforina pela planta.

Variações nas estratégias do cultivo objetivando a otimização no cultivo também são investigadas. Em estudo realizado por Couceiro e colaboradores (2006), utilizando sistema de cultivo *in vitro* fotoautotrófico (sem presença de açúcar no meio de cultura), as plântulas apresentaram desenvolvimento completo em um tempo até seis vezes menor do que o observado para sistemas fotomixotróficos (com a presença de açúcares no meio de cultura). Somado a este resultado, após a aclimatização, as plantas cultivadas sob condições fotoautotróficas não desenvolveram-se de forma satisfatória, diferentemente das demais, que apresentaram anormalidades anatômicas e desordens fisiológicas. A aclimatização de *H. perforatum* também foi obtida com sucesso em sistema hidropônico mantido em casa de vegetação (MURCH et al., 2002). Recentemente, estudo de avaliação da micropropagação de *H. perforatum* entre diferentes sistemas de cultivo demonstrou que a indução e multiplicação de brotos em meio líquido com imersão parcial do explante foi comparável com os explantes crescidos em meio semissólido (SAVIO et al., 2012).

Outras espécies do gênero, como *H. hirsutum* e *H. maculatum* também tiveram protocolo de desenvolvimento *in vitro* estabelecido com o uso de diferentes reguladores de crescimento, demonstrando que maiores comprimentos de brotos são alcançados quando cultivados em meio com a adição de diferentes concentrações de 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimetilalilaminopurina, 6-benzilaminopurina e cinetina. Neste mesmo estudo, as culturas *in vitro* foram elicitadas com ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS), demonstrando inibição no acúmulo de biomassa pelos explantes, enquanto da adição AJ, e aumento na produção de hipericina, *pseudo*-hipericina e hiperforina quando AJ e AS foram utilizados (COSTE et al., 2011).

*Hypericum foliosum*, espécie nativa dos Açores (Portugal), que apresenta baixo índice de germinação de suas sementes e tempo limitado para armazenamento das mesmas, teve seu cultivo *in vitro* eficientemente estabelecido, eliminando as dificuldades para sua multiplicação (MOURA, 2008). Em estudo realizado com espécie nativa dos Balcãs, *H. rumeliacum* teve a micropropagação *in vitro* estabelecida, demonstrando produção de compostos fenólicos totais

comparáveis aos da planta *in natura* durante o estágio de floração (DANOVA et al., 2010).

A primeira espécie brasileira micropropagada foi *H. brasiliense*, planta que se desenvolveu *in vitro* a partir de segmentos nodais crescidos de sementes de diferentes frutos da planta coletada *in natura*, tendo o enraizamento ocorrido em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento (CARDOSO e DE OLIVEIRA, 1996). A partir das plantas cultivadas, seguiram-se os estudos fitoquímicos e biológicos revelando a presença de xantonas com atividade antifúngica e IMAO (ROCHA et al., 1994), derivados do floroglucinol com atividade antimicrobiana (ROCHA et al., 1995; ROCHA et al., 1996), além da atividade analgésica para o extrato hidroalcoólico, provavelmente pela ação de flavonóides como a quercetina (MENDES et al., 2002), presentes também nas espécies nativas do sul brasileiro (DALL'AGNOL et al., 2003; BERNARDI et al., 2008, NUNES et al., 2010).

As espécies de *Hypericum* estudadas por nosso grupo de pesquisa, *H. polyanthemum* (BERNARDI et al., 2007), *H. ternum*, *H. carinatum* e *H. myrianthum*, apresentam protocolo de cultivo *in vitro* estabelecido (BERNARDI et al., 2007). Após esta etapa, o desenvolvimento do protocolo de aclimatização foi também obtido com sucesso para *H. polyanthemum*, demonstrando que o período de maior produção de biomassa ocorre em 18 semanas de cultivo a campo, correspondendo ao período com a maior produção de compostos fenólicos pelas partes vegetativas e reprodutivas das plantas (BERNARDI et al., 2008). Ainda para esta espécie, verificou-se que a aclimatização após diferentes tempos de cultivo *in vitro* proporcionou seu desenvolvimento em campo aberto por dois anos consecutivos, obtendo-se maior biomassa das plantas completas, assim como maior produção do benzopirano HP3 pelas flores, a partir de plantas aclimatizadas após micropropagação por um período de 12 semanas (NUNES et al., 2009a).

Experimentos posteriores demonstraram que a aplicação de modelo experimental de fertilização com diferentes concentrações de solução nutritiva foi capaz de promover o aumento da produção de biomassa e de metabólitos

secundários bioativos em plantas aclimatizadas (NUNES et al., 2009b), e o estresse biótico induzido pelo fungo *Nomuraea rileyi* resultou em aumento de biomassa, assim como dos benzopiranos e uliginosina B nas partes reprodutivas da planta (MEIRELLES et al., 2012). A avaliação da elicitação de *H. polyanthemum* por diferentes fatores ambientais resultou em um artigo científico, apresentado no Capítulo 2 deste trabalho.

*Hypericum ternum*, após aclimatização, teve a produção de metabólitos secundários quantificada no período vegetativo, reprodutivo e de frutificação, demonstrando que ácido clorogênico, hiperosídeo, quercitrina, guaijaverina, isoquercitrina e uliginosina B acumulam-se em maior quantidade durante o estágio de floração (PINHATTI et al., 2010).

Recentemente, a espécie *Hypericum teretiusculum* começou a ser investigada por nosso grupo de pesquisa. Esta espécie é popularmente conhecida como arruda-do-campo e orelha-de-gato, apresentando-se restritamente distribuída ao longo dos estados do sul do país (SLUSARSKI et al., 2007). Os estudos descritos para esta espécie restringem-se à sua caracterização botânica, não havendo relatos de sua composição química, tampouco de cultivo. Em análises preliminares, *H. teretiusculum* mostrou-se produtor de uliginosina B bem como de compostos fenólicos, tornando-se, portanto, interessante a continuidade dos estudos com a planta.

### **3.4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.5.1 Estabelecimento do cultivo de *Hypericum teretiusculum* A. St.-Hil**

Para o estabelecimento do protocolo de cultivo *in vitro* de *H. teretiusculum*, plantas *in natura* foram coletadas na cidade de Quevedos, no Rio Grande do Sul (ICN S. Bordignon e RB Macedo, 248), em dezembro de 2010, e passaram por um processo de lavagem e assepsia conforme descrito para outras espécies de *Hypericum* (BERNARDI, 2007).

Segmentos apicais das plantas recém-coletadas foram submetidos à lavagem em água corrente e, posteriormente, enxaguados com água destilada para retirada de partículas grosseiras superficialmente aderidas. Após a lavagem, realizou-se a descontaminação do material vegetal pela imersão dos segmentos apicais, por 1 minuto, em solução de etanol 70 °GL e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por 10 minutos.

Em capela de fluxo laminar vertical, os segmentos foram enxaguados quatro vezes em água destilada estéril, o excesso de água eliminado com papel filtro e a extremidade dos mesmos, medindo aproximadamente 5 mm, foram implantadas verticalmente em diferentes formulações do meio semissólido MΔ (MAURMANN et al., 2008) que consiste em uma versão modificada do meio de Murashige e Skoog (MURASHIGE E SKOOG, 1962), adicionado de 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar, pH ajustado em 5,8 e esterilizado por autoclavagem à 121 °C durante 20 minutos.

Inicialmente, o meio MΔ foi suplementado com diferentes concentrações de auxinas, variando de 0,2 a 2 mg/L (ácido indolacético, ácido indolbutírico, ácido naftaleno-acético e ácido 2,4-diclorofenóxiacético), isoladas ou combinadas com 0,2 mg/L de 6-benzilaminopurina. O meio MΔ é uma modificação do meio MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962) contendo 75% da concentração original dos macro-nutrientes:  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 75% da concentração original dos micro-nutrientes:  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 150% da concentração original dos micro-nutrientes: KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , e 150% da concentração original de meso-inositol.

Na primeira subcultura, quando os explantes apicais foram excisados da planta *in natura*, todos os procedimentos de corte foram realizados com a planta imersa em água para evitar que o rompimento do tecido vegetal, ocasionado pelo corte do bisturi, prejudicasse a integridade do tecido e, conseqüentemente, a aquisição de nutrientes e adaptação do explante ao meio de cultivo. As culturas



foram mantidas sob condições controladas em sala climatizada a  $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

Após as primeiras semanas de crescimento *in vitro*, os meios MΔ suplementados com ácido indolbutírico nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/L destacaram-se na promoção de plântulas completas, sendo selecionados para a continuidade do estudo. O meio MΔ sem a adição de reguladores de crescimento também foi utilizado para a manutenção das culturas. Após três ciclos de cultivo de seis semanas cada, os parâmetros de massa fresca, massa seca e teor de uliginosina B no extrato *n*-hexano foram avaliados nas plântulas cultivadas nestes três meios.

### **3.5.2 Avaliação da influência da concentração de sais no desenvolvimento *in vitro* de *Hypericum teretiusculum***

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de sais do meio MS no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *H. teretiusculum*, plântulas cultivadas em meio MΔ foram transferidas para o meio MS na concentração completa de seus sais (100%), denominado MS, com a metade da concentração de seus sais (50%), denominando MS 50 e em um quarto da concentração de seus sais (25%), denominado MS 25. Após três ciclos de subculturas de seis semanas cada, avaliou-se os parâmetros de crescimento nos diferentes meios quanto à produção de massa fresca, massa seca, comprimento e número de brotos e raízes, bem como o teor de compostos fenólicos totais.

### **3.5.3 Aclimatização de *Hypericum teretiusculum* micropropagado *in vitro***

Objetivando o aumento de biomassa produtora de metabólitos secundários, plântulas de *H. teretiusculum* micropropagadas por seis semanas em meio MΔ sem adição de reguladores de crescimento ou suplementado com 0,5 mg/L de AIB foram cultivadas em campo aberto. Primeiramente, as plântulas passaram por um período de adaptação *ex vitro*, no qual foram transferidas para garrafas *PET*

contendo substrato de vermiculita:terra (2:1), cobertas por filme PVC e mantidas sob as mesmas condições controladas descritas no item 4.1, por 30 dias. Após este período, as plantas foram transferidas para vasos contendo terra de jardim (substrato para plantas pronto para uso constituído por terra vermelha, terra preta e rocha calcária moída) e levadas para a Faculdade de Agronomia – UFRGS, onde foram cultivadas em campo aberto por 18 semanas. Após este período, as plantas foram coletadas e analisadas quanto à produção de massa fresca das partes vegetativas (ramos e folhas) e reprodutivas (botões fechados, botões abertos, flores abertas, flores senescentes e frutos), imediatamente após a coleta.

#### **3.5.4 Obtenção dos extratos vegetais**

Os extratos analisados foram obtidos a partir de material vegetal liofilizado e moído, pelo método de extração assistida por ultrassom, em cinco ciclos de 20 minutos de sonicação cada, utilizando-se 5 mL de solvente em cada ciclo. Os compostos fenólicos totais foram quantificados no extrato bruto metanólico de 100 mg planta e, os derivados do floroglucinol, no extrato *n*-hexânico de 50 mg de planta.

O volume total de cada um dos extratos obtidos foi filtrado em funil de Buchner com placa porosa de filtro sinterizado G5 para clarificação e eliminação do material vegetal suspenso e, subsequentemente, seco em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a temperatura máxima de 30 °C.

#### **3.5.5 Quantificação de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos totais presente nas amostras vegetais foi quantificado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu modificado (IVANOVA et al., 2005). Soluções metanólicas dos extratos a uma concentração de 10 mg/mL foram previamente oxidadas com 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N e, após 5 minutos, a reação foi neutralizada com solução de carbonato de sódio 75 g/L, em quantidade suficiente para completar um volume

total final de 10 mL. Após 1 hora de reação em frascos âmbar e ao total abrigo da luz, as amostras adquirem uma coloração azul proporcional à quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra. A intensidade da coloração azul foi medida em espectrofotômetro (Bioespectro SO 220) em comprimento de onda de 765 nm e quantificadas através de uma curva padrão de quercetina (Merck®). Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina (miligramas de quercetina por grama de massa seca de planta - mgQ/gMS).

### **3.5.6 Quantificação de derivados do floroglucinol por CLAE**

Os extratos *n*-hexânicos contendo os derivados do floroglucinol foram ressuspensos em metanol, filtrados por membrana de acetato celulose (22 µm) e submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com metodologia previamente validada (CCANA-CCAPATINTA, 2014). Para tanto, utilizou-se um equipamento Shimadzu com coluna Waters Nova Pack C18 (4 µm, 3,9 x 150 mm) acoplada a pré-coluna Waters Nova Pack C18 60A (3.9 x 20 mm). A eluição ocorreu com fluxo de 1 mL/min com fases móvel A (acetonitrila:metanol, 80:20 + 0,1% HCOOH) e B (água + 0,1% HCOOH) em sistema de gradiente linear, sendo: de 75% a 100% de B em 10 min, manutenção de 100% de B por 10 min e reequilíbrio com 75% de B por 5 min. Os derivados do floroglucinol foram quantificados através de uma curva de calibração na faixa de 1 a 500 µg/mL de compostos purificados, exceto japonicina A, que foi expressa em massa de uliginosina A. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 350 nm com uma lâmpada UV de deutério, e os limites de detecção e quantificação foram 0,68 e 2,05 µg/mL, respectivamente.

## **3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.4.1 Micropropagação de *in vitro* de *Hypericum teretiusculum***

A regeneração *in vitro* de plântulas completas de *H. teretiusculum* a partir de ápices caulinares das plantas coletadas *in natura* ocorreu no meio de cultura

MΔ suplementado com AIB nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/L. Calos foram observados nos explantes cultivados em meio MΔ adicionado simultaneamente de BAP na concentração de 0,04 mg/L e ANA na concentração de 0,4 mg/L. Após transferidas para o meio MΔ sem a adição dos hormônios, as plântulas de *H. teretiusculum* continuaram desenvolvendo-se completamente, apresentando alongamento de brotos e raízes, conforme mostra a Figura 1 Plântula de *H. teretiusculum* cultivada por 4 semanas, sob condições controladas de temperatura e luminosidade, em meio MΔ sem a adição de reguladores de crescimento..



**Figura 1** Plântula de *H. teretiusculum* cultivada por 4 semanas, sob condições controladas de temperatura e luminosidade, em meio MΔ sem a adição de reguladores de crescimento.

Quando avaliadas quanto ao acúmulo de biomassa vegetal, as plântulas micropropagadas em meio MΔ suplementado com 0,5 mg/L de AIB apresentaram maior acúmulo de massa fresca e massa seca quando comparadas com as plântulas micropropagadas no meio MΔ com a adição de 0,1 mg/L de AIB ou sem a adição de reguladores de crescimento. Além disso, o valor observado para a produção de uliginosina B pelas plântulas micropropagadas foi consideravelmente maior do que o verificado para a planta coletada *in natura*, conforme indicado na Tabela 2 Massa fresca, massa seca e teor de uliginosina B em plântulas de *H. teretiusculum* micropropagadas em diferentes

meios de cultivo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  DP. Diferentes letras indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA seguida de Tuckey).

**Tabela 2** Massa fresca, massa seca e teor de uliginosina B em plântulas de *H. teretiusculum* micropropagadas em diferentes meios de cultivo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  DP. Diferentes letras indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA seguida de Tuckey).

	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)	Uliginosina B* (mg/gMS)
MΔ	79,85 $\pm$ 25,9 <sup>c</sup>	16,3 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>	0,041
MΔ + 0,1 mg/L de AIB	125,4 $\pm$ 20,4 <sup>b</sup>	29,8 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>	0,046
MΔ+ 0,5 mg/L de AIB	155,3 $\pm$ 28,77 <sup>a</sup>	30,9 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	0,041
Planta <i>in natura</i>	na	na	0,0012

\*Valor de apenas uma quantificação por CLAE. na: Não analisado

O estabelecimento de um protocolo de cultivo *in vitro* compreende, entre as suas etapas, o passo em que os brotos surgirão e se alongarão, seguido da indução e crescimento de raízes (LUCCHESINI e MENSUALI-SODI, 2010). Em *H. teretiusculum*, plântulas completas foram obtidas no mesmo meio de cultura, eliminando uma etapa do protocolo de cultivo *in vitro*, diminuindo o tempo e os custos envolvidos no processo.

Para outras espécies de *Hypericum* nativas, a indução de plântulas completas em um mesmo meio de cultivo também foi observada. *H. polyanthemum* apresentou resposta organogênica após estabelecimento do cultivo *in vitro* em meio MΔ suplementado com 0,04 mg/L de BAP, mantendo o desenvolvimento de brotos e raízes quando transferidas para o mesmo meio sem a adição dos reguladores de crescimento (BERNARDI et al., 2007). O mesmo comportamento foi observado para *H. carinatum* e *H. myrianthum* (BERNARDI, 2007). *H. ternum* apresentou a indução de novos brotos mesmo quando diretamente subculturado em meio MΔ sem a adição de reguladores de crescimento (BERNARDI, 2007). Para *H. brasiliense*, outra espécie nativa do sul do Brasil, foi relatado o desenvolvimento de plântulas completas no meio de

cultivo MS, simplificando o protocolo de micropropagação desenvolvido (CARDOSO e DE OLIVEIRA, 1996).

Desde o início da micropropagação de *H. teretiusculum* não foram verificados problemas decorrentes da vitrificação, que é uma disfunção fisiológica observada em tecidos cultivados *in vitro* apenas algum tempo após o seu estabelecimento (DEBERGH et al., 1992). Este fenômeno caracteriza-se como uma disfunção fisiológica anormal em órgãos e tecidos vegetais *in vitro*, na qual os tecidos tornam-se translúcidos, túrgidos, com diminuição na quantidade de clorofila, tornando-se quebradiços e com aparência cristalina. Quanto ao desenvolvimento, os explantes podem passar a crescer de forma rápida e anormal, apresentando diminuição dos espaços entrenós, folhas grossas e encurvadas, perda de cutícula, excesso de produção de etileno e senescência (YASEEN et al., 2013).

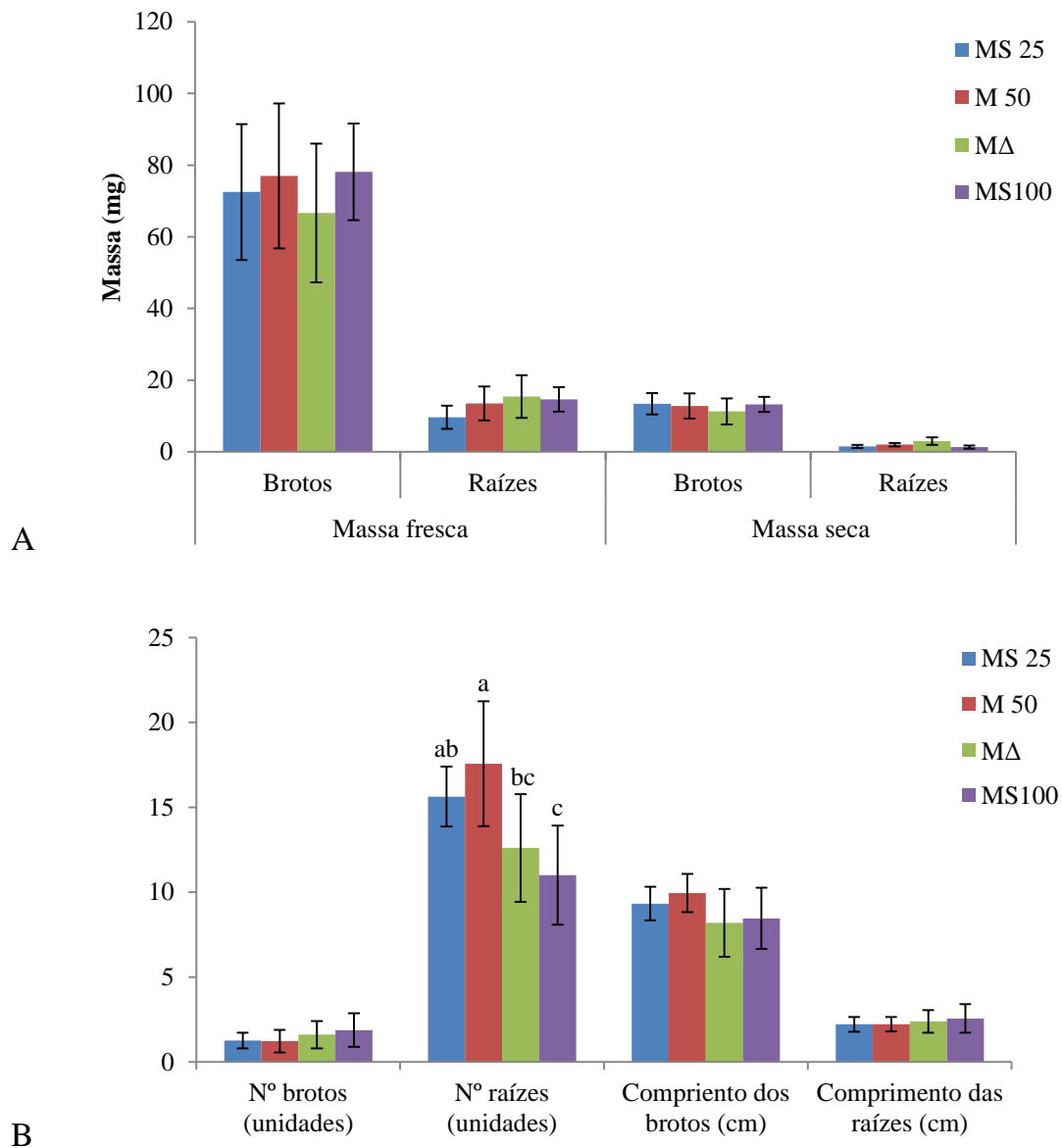
Após quatro anos do seu estabelecimento, o protocolo de cultivo *in vitro* desenvolvido para *H. teretiusculum* mostra-se como uma fonte viável para a manutenção da espécie e como alternativa à produção de biomassa capaz de sintetizar substâncias bioativas de interesse. As etapas posteriormente executadas, como o cultivo da planta em diferentes meios de cultura e a aclimatização em campo aberto possibilitam a otimização nas condições deste cultivo, com consequente aumento na produção de biomassa vegetal.

### **3.5.2 Avaliação da influência da concentração do meio de cultura no desenvolvimento *in vitro* de *Hypericum teretiusculum***

Plântulas cultivadas *in vitro* devem ser providas de nutrientes minerais provenientes do meio de cultivo que possibilitem seu desenvolvimento e sobrevivência, sendo cada espécie dependente de uma condição ótima na composição de minerais que, por sua vez, depende do tipo de explante cultivado, estágio de desenvolvimento e método de cultivo. Para avaliar o desenvolvimento de *H. teretiusculum* em diferentes meios de cultivo, plântulas micropropagadas em

meio MΔ foram transferidas para formulações do meio MS com diferentes concentrações de seus sais: MS 25 (25% da concentração de sais), MS 50 (50% da concentração dos sais) e MS (100% da concentração dos sais do meio MS).

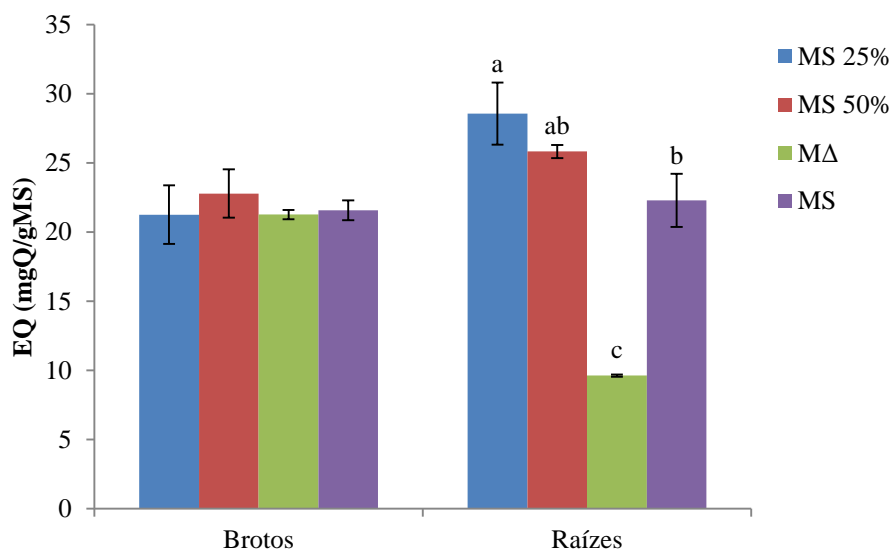
Após 3 ciclos de 6 semanas de cultivo cada, as plântulas micropropagadas em meio MS 25, MS 50, MΔ e MS foram avaliadas quanto aos parâmetros de massa fresca e massa seca de brotos e raízes, comprimento e número de brotos e raízes, conforme indicado na Figura 2.



**Figura 2** Acúmulo de (A) massa fresca e massa seca obtido por brotos e raízes e (B) número e comprimento de brotos e raízes em plântulas de *H. teretiusculum* cultivado *in vitro* por 6 semanas em diferentes meios de cultivo (MS 25%, MS 50%, MΔ e MS). Os valores estão expressos como média ± DP. Diferentes letras indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA seguida de Tuckey).

Os parâmetros avaliados não diferiram para as plântulas cultivadas nos meios de cultura com diferente concentração de sais, exceto quanto ao número de raízes, que foi maior para as plântulas cultivada no meio MS 50 ( $17,5 \pm 3,58$ ), seguido pelos meios MS 25 ( $15,6 \pm 1,77$ ) e MΔ ( $12,6 \pm 3,17$ ), com menor valor verificado para o meio MS ( $11,0 \pm 2,91$ ).

A quantificação de compostos fenólicos totais dos brotos e raízes das plântulas micropropagadas nos meios semissólido MS 25, MS 50, MΔ e MS demonstrou que não houve diferença significativa na produção desta classe de substância pelos brotos, conforme indicado na Figura 3, enquanto nas raízes a produção de compostos fenólicos totais foi inversamente proporcional à concentrações de sais no meio, com exceção das raízes cultivadas em meio MΔ, que apresentaram menor produção destes metabólitos.



**Figura 3** Quantificação de compostos fenólicos totais em brotos e raízes de plântulas de *H. teretiusculum* micropropagadas *in vitro*, por 6 semanas, em diferentes meios de cultivo (MS 25, MS 50, MΔ e MS). Os valores estão expressos como média ± DP. Diferentes letras indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA seguida de Tukey).



Para a implementação de um protocolo de multiplicação *in vitro*, a composição do meio de cultivo é fator muito importante sobre a resposta da iniciação e manutenção das culturas. O conteúdo total de minerais no meio de cultivo influencia o potencial hídrico do mesmo, o que pode resultar em alterações na capacidade da planta em captar água e minerais disponíveis para o seu crescimento. Em estudos realizados com espécies do gênero *Hypericum* foi demonstrado que o meio MS na metade da concentração de seus sais foi adequado para a regeneração de plântulas completas de *H. perforatum* (PASQUA et al., 2003). Para outros gêneros, também foi verificado que menores concentrações de sais do meio MS foram adequadas para o enraizamento de brotos *in vitro* a partir de plantas coletadas *in natura* (THIYAGARAJAN e VENKATACHALAM, 2012).

Além do crescimento radicular, a síntese de substâncias em *H. teretiusculum* também apresentou variações de acordo com o meio no qual as plântulas foram cultivadas. A diminuição verificada para a produção de compostos fenólicos totais das raízes das plântulas desenvolvidas em meio MΔ pode ser explicada por uma particularidade desta formulação, que consiste na utilização de mesoinositol na concentração de 150 mg/L (150% do originalmente utilizado na formulação MS). O mesoinositol é um açúcar capaz de conjugar-se com auxinas em um complexo enzimático auxina-inositol, que é inativo como regulador de crescimento. Durante o cultivo, este complexo é desfeito, liberando a auxina que pode voltar a exercer a sua função reguladora de crescimento (COHEN e BANDURSKI, 1982). Desta maneira, o mesoinositol pode contribuir para a diminuição do acúmulo de metabólitos secundários, uma vez que apresenta efeitos na homeostasia de auxinas (DORNENBURG e KNORR, 1995; CHAN et al., 2005; BAQUE et al., 2010).

Considerando os parâmetros de crescimento referentes ao número e tamanho de brotos e raízes, verificou-se a ausência de diferença significativa para a resposta frente aos diferentes meios de cultivo testados. As plantas

desenvolveram-se igualmente quando crescidas em diferentes concentrações de sais do meio MS, que se mostraram adequadas para a manutenção da espécie.

### **3.5.3 Aclimatização de *H. teretiusculum* micropropagado *in vitro***

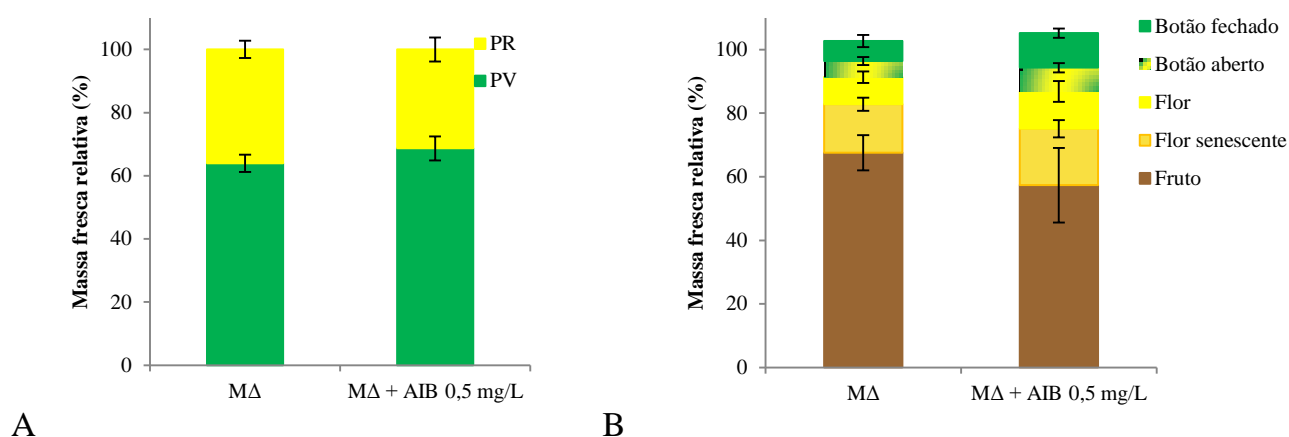
A regeneração *in vitro* de *H. teretiusculum* foi estabelecida e a micropropagação da espécie constitui-se em uma forma de garantir sua preservação e a viabilização da otimização da produção de metabólitos secundários. Com o objetivo de proporcionar aumento significativo da biomassa vegetal obtida *in vitro* e avaliar a produção de compostos bioativos, as plântulas micropropagadas foram aclimatizadas.

Por apresentarem maior acúmulo de massa fresca, plântulas micropropagadas em meio MΔ com a adição de 0,5 mg/L de AIB, bem como em meio MΔ apenas, foram transferidas para garrafas *PET* contendo substrato com mistura de vermiculita:terra (2:1, v:v) para adaptação às condições *ex vitro*, e posteriormente foram levadas para a Faculdade de Agronomia – UFRGS, onde foram cultivadas em campo aberto por um período de 18 semanas.

Após este período, as plantas foram coletadas e tiveram suas partes vegetativas e reprodutivas avaliadas quanto ao acúmulo de massa fresca. As partes vegetativas compreendem folhas e ramos e as partes reprodutivas compreendem cinco estágios de desenvolvimento floral: botão fechado (completamente verde, abrigando o botão floral em seu interior), botão aberto (com as sépalas parcialmente abertas, evidenciando a extremidade amarela do botão floral), flor (completamente aberta, de coloração amarela), flor senescente (de coloração amarela escura, é o estágio em que a flor encontra-se fechada, após seu desabrochar) e fruto.

Embora as plântulas micropropagadas em meio MΔ suplementado com 0,5 mg/L de AIB apresentassem praticamente o dobro da massa fresca verificada para as plântulas provenientes do cultivo em meio MΔ, não foi verificada diferença no desempenho final destas populações quanto ao acúmulo de massa fresca após o

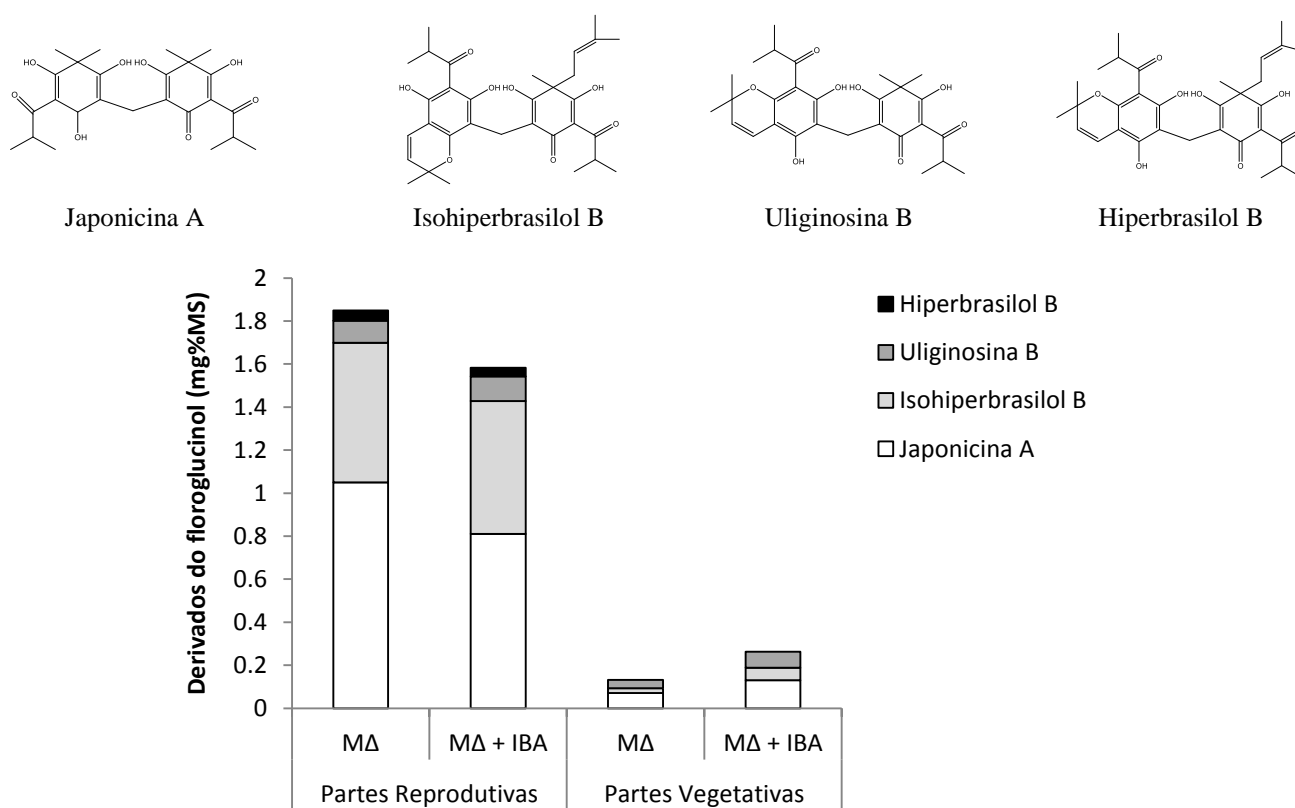
período de aclimatização em campo aberto. O peso fresco das partes reprodutivas e vegetativas somaram  $12,4 \pm 2,23$  mg e  $24,9 \pm 3,5$  mg, respectivamente, para as plantas aclimatizadas provenientes de plântulas micropropagadas em meio MΔ e a  $12,3 \pm 2,56$  mg e  $26,7 \pm 3,6$  mg, respectivamente, para as plantas aclimatizadas provenientes do cultivo *in vitro* em meio MΔ adicionado de 0,5 mg/L de AIB. A Figura 4 indica a proporção, em massa fresca, das partes reprodutivas e vegetativas em relação à massa fresca total da planta aclimatizada após 18 semanas de cultivo (Figura 4A) e de cada estágio ontogênico floral, em relação à massa fresca total das partes reprodutivas (Figura 4B).



**Figura 4** Avaliação da massa fresca de *H. teretiusculum* aclimatizado por 18 semanas: (A) proporção de partes reprodutivas (PR) e partes vegetativas (PV) frente à massa fresca total das plantas aclimatizadas e (B) proporção dos diferentes estágios ontogênicos florais (botão fechado, botão aberto, flor, flor senescente e fruto) frente à massa fresca total das partes reprodutivas das plantas. As barras representam a média  $\pm$  DP.

Para *H. teretiusculum*, a relação entre partes vegetativas e reprodutivas, bem como entre os diferentes estágios ontogênicos florais, não diferiu para as plantas aclimatizadas em campo aberto após 18 semanas de cultivo. Estes valores são comparáveis aos verificados para a massa fresca de plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* por um período de 18 semanas, quando aproximadamente 65% da massa fresca total das plantas corresponderam a ramos e folhas, caracterizando as partes vegetativas. Proporção bastante semelhante também pode ser verificada entre os diferentes estágios ontogênicos das flores de *H. teretiusculum* e *H. polyanthemum* (BERNARDI et al., 2008).

Além de possibilitar o incremento da biomassa vegetal, o processo de aclimatização proporcionou revelantes resultados frente à síntese de floroglucinois. Entre os metabólitos produzidos pelas plantas aclimatizadas foi verificada a presença de quatro derivados do floroglucinol. Japonicina A, uliginosina B, hiperbrasilot B e isohiperbrasilot B foram identificados nas flores destas plantas, enquanto hiperbrasilot B não foi detectado nas partes vegetativas. Japonicina A foi o composto majoritário entre as substâncias por hora descritas nas partes reprodutivas ( $1,04 \pm 0,12$  e  $0,81 \pm 0,08$  mg% massa seca) e vegetativas ( $0,07 \pm 0,01$  e  $0,13 \pm 0,06$  mg% massa seca) em plantas aclimatizadas cultivadas em meio MΔ e MΔ + 0,5 mg/L, respectivamente, não diferindo estatisticamente (Figura 5). O acúmulo verificado de compostos fenólicos totais foi  $27,96 \text{ g} \pm 3,53 \text{ EQ}$  e  $25,98 \pm 2,8 \text{ EQ}$  nas flores das plantas aclimatizadas cultivadas em meio semissólido com e sem a adição de IBA, respectivamente, e  $49,74 \text{ g} \pm 4,03 \text{ EQ}$  e  $42,57 \text{ g} \pm 3,75 \text{ EQ}$  nas partes vegetativas de plantas micropropagadas *in vitro* com e sem a adição da auxina, respectivamente.



**Figura 5** Derivados do floroglucinol identificados em plantas de *H. teretiusculum* aclimatizadas por 18 semanas após cultivo *in vitro* em meio MΔ e em meio MΔ suplementado com 0,5 mg/L IBA. A análise

estatística não identificou diferenças entre as medias após teste t entre plantas provenientes dos tratamentos com e sem auxina.

O acúmulo de compostos fitoquímicos é um processo finamente ajustado de acordo com a idade, órgão e condições de crescimento da planta (HOSNI et al., 2011; NCUBE et al., 2012). Os derivados do floroglucinol em *H. teretiusculum* estão presentes nas partes reprodutivas e vegetativas das plantas após 18 semanas de aclimatização, com maior concentração verificada nas partes reprodutivas. *H. ternum*, outra espécie nativa do sul do Brasil foi avaliada em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo a presença de uliginosina B quantificada nas folhas após 15 semanas de cultivo (após florescimento) a campo, mas não após este período (PINHATTI et al., 2010). Diversos protocolos de cultivo tem sido desenvolvidos para plantas medicinais, demonstrando que, além dos fatores externos, as características genéticas da planta também são determinantes para o sucesso da multiplicação (SARASAN et al., 2006), justificando os estudos direcionados para cada espécie.

É importante ressaltar que, dos quatro floroglucinois identificados nas plantas aclimatizadas de *H. teretiusculum*, apenas uliginosina B e traços de hiperbrasilol B foram verificados nas plantas *in natura* da espécie, atestando a importância dos resultados alcançados com o estabelecimento do cultivo *in vitro* e aclimatização da espécie. No entanto, resultados semelhantes são descritos para *H. brasiliense*, planta na qual isouliginosina B foi detectada nas raízes, mas não em brotos da planta coletada *in natura* durante seu estágio de floração (DE ABREU et al., 2004), enquanto folhas de plantas coletadas em outra localidade apresentaram a produção do metabólito (ROCHA et al. 1995). Tais alterações podem ser causadas por diversos fatores, de processos endógenos às características ambientais do local de crescimento do vegetal.

### 3.6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de protocolos de cultivo para plantas medicinais é amplamente descrito e baseia-se no fato de constituir-se em uma forma de preservação das espécies, de controle de parâmetros que afetam a qualidade da matéria-prima obtida e, conseqüentemente, de otimização da produção de metabólitos secundários. Guiado pelas atividades farmacológicas descritas para *H. perforatum*, planta com uso consolidado como matéria-prima de fitoterápicos com atividade antidepressiva, nosso grupo de pesquisa estuda espécies de *Hypericum* nativas, que vem demonstrando atividades semelhantes para seus extratos e substâncias isoladas. Concomitante à prospecção fitoquímica e aos estudos farmacológicos, surge a demanda para o desenvolvimento de protocolos de cultivos destas espécies, sendo, até o momento, descrita a aclimatização de *H. polyanthemum*, *H. ternum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. campestre*.

*Hypericum terestiusculum*, planta arbustiva nativa do sul do Brasil, foi coletada e teve seu cultivo *in vitro* estabelecido, sendo micropropagada sob condições assépticas e mostrando-se capaz de multiplicar-se em meio de cultivo sem a adição de reguladores de crescimento.

A aclimatização da espécie foi conduzida com sucesso, possibilitando crescimento pleno da planta e perfil de biomassa estreitamente similar ao observado para plantas de *H. polyanthemum* aclimatizadas pelo mesmo período. Soma-se a este fato, ainda, a produção de quatro derivados do floroglucinol pela planta aclimatizada, dois dos quais não verificados na planta *in natura*. Desta maneira, o protocolo de cultivo *in vitro* com posterior aclimatização, presentemente descrito para *H. teretiusculum*, mostra-se como uma eficiente maneira de preservação da espécie e otimização da produção de matéria-prima vegetal capaz de produzir substâncias naturais de interesse farmacêutico, entre elas destacando-se a uliginosina B.

Os resultados descritos neste capítulo resultaram em um artigo submetido à revista **Acta Physiologiae Plantarum**, que encontra-se no ANEXO 1.





## 4. Capítulo 2

**Indução por estresse de importantes metabólitos secundários em plantas  
aclimatizadas de *Hypericum polyanthemum***

---



Os dados apresentados neste capítulo resultaram em um artigo científico PUBLICADO na revista **South African Journal of Botany** (doi: 10.1016/j.sajb.2014.06.014) e intitula-se “**Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants**”. O mesmo é parte integrante deste trabalho e constitui o item “4.2 Materiais e Métodos” deste capítulo.

## 4.1. INTRODUÇÃO

O aumento do uso de plantas medicinais e de seus derivados direciona estudos para os seus extratos, frações e substâncias isoladas, o que requer contínuo fornecimento de matéria-prima vegetal de qualidade. Entretanto, as substâncias provenientes do metabolismo secundário vegetal são produzidas em baixas quantidades por plantas cultivadas *in natura*, além de estarem sujeitas à variações em seus teores devido à influência de fatores externos resultantes de seu cultivo, como temperatura (COUÇEIRO et al., 2006), época da coleta (ÇIRAK et al., 2006; COUÇEIRO et al., 2006; MOGHADDAM et al., 2013), estágio de desenvolvimento da planta (ÇIRAK et al., 2008; HOSNI et al., 2011), local de coleta (ÇIRAK et al., 2006), irrigação (PINHATTI et al., 2010; SELMAR e KLEINWÄCHTER, 2013), solo (SELMAR e KLEINWÄCHTER, 2013), ação de microorganismos (ÇIRAK et al., 2014), entre outros.

Com o objetivo de controlar os fatores que afetam o desenvolvimento de plantas medicinais, bem como de reduzir o extrativismo predatório, protocolos de cultivo *in vitro* e *ex vitro* (aclimatização de plântulas micropropagadas *in vitro*) têm sido estabelecidos para diferentes espécies com potencial aplicação na terapêutica. Este é o caso de espécies fornecedoras de produtos naturais com atestadas atividades biológicas, como *Hypericum perforatum* (CONCEIÇÃO et al., 2006; COUCEIRO et al., 2006) e *Ginkgo biloba* (RADOMIR e TUDOR, 2011).

Uma vez que um dos principais papéis dos metabólitos secundários em uma planta é protegê-la do ataque de insetos, herbívoros e patógenos, bem como possibilitar sua sobrevivência frente a outros tipos de estresse biótico e abiótico, estratégias para a otimização da obtenção destes compostos, baseadas no princípio de elicitação, são válidas (ZHAO et al., 2005). De uma forma geral, “elicitador”, para plantas, refere-se a estruturas químicas de várias fontes capazes de desencadear respostas fisiológicas, morfológicas e o acúmulo de fitoalexinas, muitas delas com

atividades farmacológicas e, por este motivo, investigadas (VLOT et al., 2008), como na espécie *Valeriana glechomifolia*, que recentemente apresentou resultados positivos quanto ao acúmulo de biomassa e produção de valepotreatos em plântulas cultivadas em meio líquido após elicitação com ácido salicílico e ultrassom (RUSSOWSKI et al. 2013).

A elicitação em plantas pode ser obtida por dois tipos de agentes elicitores: bióticos e abióticos. Algumas espécies de *Hypericum* tem sido alvo de estudos com elicitores abióticos, que incluem substâncias como o ácido salicílico e o ácido jasmônico (WALKER et al., 2002), estresse hídrico (ABREU e MAZZAFERA, 2005; ZOBAYED e KOZAY, 2007) e depleção de nutrientes (BRISKIN et al., 2001), além de investigações com elicitores bióticos, através do co-cultivo de plântulas *in vitro* (KIRAKOSYAN et al., 2000, ÇIRAK et al., 2014), plantas aclimatizadas (FRANKLIN et al., 2006; MEIRELLES et al., 2012) e cultura de células (CONCEIÇÃO et al., 2006; FRANKLIN et al., 2009) com agentes elicitores como fungos e bactérias. Fatores ambientais como indução de seca (ZOBAYED et al., 2007; FAHEEM et al., 2011; SELMAR e KLEINWÄCHTER, 2013) e adubação (BRISKIN et al., 2001; NUNES et al., 2009b; ZHU et al., 2009), assim como a influência no desenvolvimento de plantas aclimatizadas através da indução de dano mecânico e agentes químicos (HOUSTI et al., 2002), como ácido salicílico (PASTÍROVÁ et al., 2004; LOAKE e GRANT, 2007), tem sido estudada, demonstrando resultados interessantes quanto à indução do metabolismo secundário de classes de compostos específicas.

*Hypericum polyanthemum* é uma espécie nativa do sul do Brasil, estudada por nosso grupo de pesquisa e que se mostra produtora do derivado do floroglucinol uliginosina B, substância que tem sido amplamente estudada por suas atividades analgésica (STOLZ et al., 2012) e antidepressiva (STEIN et al., 2012). Além disso, entre os benzopiranos, substâncias até o momento apenas relatados para esta espécie, (FERRAZ et al., 2001), HP1 destaca-se pela sua atividade analgésica mediada pelo sistema opióide (HAAS et al., 2010).

Protocolos de micropropagação *in vitro* já foram estabelecidos para *H. polyanthemum* (BERNARDI et al., 2007), assim como a aclimatização das plântulas micropropagadas em campo aberto (BERNARDI et al., 2008). Seguindo a continuidade dos estudos, plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* foram acompanhadas por um período de dois anos em campo aberto (NUNES et al., 2009b) e, em estudo posterior, fertilizadas durante a aclimatização por 18 semanas (NUNES et al., 2009a). Em ambos os casos as plantas mantiveram a capacidade biossintética dos metabólitos analisados, sendo a fertilização capaz de promover o aumento de biomassa produtora dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 e do derivado do floroglucinol, uliginosina B.

Considerando a importância de *H. polyanthemum* como fonte produtora de compostos derivados do floroglucinol e os estudos referentes ao cultivo da espécie desenvolvidos, este capítulo tem por objetivo abordar a influência da elicitação de plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum*, em resposta à indução de diferentes tipos de estresses abióticos na produção de uliginosina B e dos três benzopiranos (HP1, HP2 e HP3) por ela produzidos.

## **4.2. PRINCIPAIS RESULTADOS (em substituição ao artigo publicado)**

O presente estudo foi realizado com plantas de *Hypericum polyanthemum* aclimatizadas por 18 semanas. As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: (1) aplicação de ácido salicílico de forma contínua, durante as 18 semanas de aclimatização; (2) imposição de restrição hídrica a partir da 17ª semana de cultivo; (3 e 4) a aplicação destes tratamentos juntamente com solução MS 50% como fertilizante; (5) imposição de dano mecânico pela perfuração das folhas com agulha fina e estéril 1, 2 e 7 dias anteriores à coleta; (6) aplicação de solução de ácido salicílico 1, 2 e 7 dias anteriores à coleta; e (7) submissão das plantas aos tratamentos 5 e 6, simultaneamente. O acúmulo de biomassa nas partes reprodutivas e folhas, bem como a biossíntese do derivado do floroglucinol uliginosina B, os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 e o teor de compostos fenólicos totais foram avaliados.

Como resultados, verificou-se que, considerando a biomassa vegetal, os tratamentos de restrição hídrica deste associado com fertilização resultaram em um aumento no acúmulo de massa das partes reprodutivas e vegetativas das plantas. Os tratamentos de dano mecânico, aplicação de ácido salicílico ou destes combinados não alteraram a produção de biomassa.

Quanto à biossíntese de metabólitos secundários, destaca-se a submissão das plantas à restrição hídrica, com aumentos de 40 e 7,5 vezes de uliginosina nas folhas e partes reprodutivas, respectivamente. O aumento na produção de compostos fenólicos totais e HP1 também foi obtido com este tratamento em ambas as partes das folhas. O benzopirano HP2 não teve o seu acúmulo aumentado com nenhum dos tratamentos impostos às plantas e HP3 foi quantificado em quantidades superiores às plantas controles nas folhas após tratamento de restrição hídrica associada à fertilização e dano mecânico após 1 dia de aplicação bem como nas partes vegetativas após a imposição da seca e 7 dias após imposição de dano mecânico.

Com este estudo, verificou-se que a utilização de estresses abióticos durante o período de aclimatização das plantas é capaz de promover o aumento na produção de biomassa vegetal e acúmulo de metabólitos secundários, sendo o tratamento de seca para *H. polyanthemum* uma maneira viável para o aumento massivo na produção de uliginosina B e HP1, principais metabólitos da espécie.



### 4.3. DISCUSSÃO GERAL

A elicitação de plantas consiste na ativação do metabolismo secundário vegetal frente a uma agressão e ocorre de diferentes maneiras, dependendo da natureza do estímulo. Uma das principais formas de indução metabólica é a ativação dos mecanismos de Resistência Sistêmica Adquirida, conhecida pela sigla RSA ou SAR, do termo em inglês. Este fenômeno consiste em disparar mecanismos de defesa, por exemplo, contra patógenos que afetam o tecido localmente e pode ser uma ameaça para a planta. O sinal iniciado no local da agressão se espalha através do floema, ativando o sistema imunológico da planta (VLOT et al., 2008). A principal via de atuação do ácido salicílico na defesa vegetal é a partir da indução da resistência sistêmica adquirida, tanto em nível local (da agressão ou estímulo), quanto em nível sistêmico (LOAKE e GRANT, 2007).

Os tratamentos apresentados no manuscrito foram capazes de influenciar o acúmulo de biomassa e produção de uliginosina B, HP1 e HP3 nas plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum*, com destaque para o tratamento de seca sobre a produção do derivado do floroglucinol em questão.

Entender o que ocorre com o metabolismo de uma planta submetida a estresse não é trivial, uma vez que sua resposta fisiológica a este estímulo sempre estará ligada a diversos fatores ambientais. Para o caso de estresse induzido por seca, assim como por outros meios, o alcance do incremento na produção dos metabólitos de interesse vai depender do grau de estímulo ou dano que o elicitor apresentar sobre o metabolismo vegetal.

O efeito da falta do suprimento de água em plantas medicinais tem sido estudado devido ao impacto que esta causa sobre o metabolismo secundário vegetal. Os resultados destes estudos demonstram que a deficiência de água durante o período vegetativo da planta, ou seja, anterior à floração, pode resultar em estresse hídrico, reduzindo o rendimento das plantas por 3 principais mecanismos: (1) diminuição da absorção da incidência luminosa e nível fotossintético, devido à redução da área foliar resultante do murchar da planta; (2) diminuição da

eficiência com que a radiação absorvida fotossinteticamente induz a produção de biomassa, o que pode ser detectado pela diminuição da taxa de troca de CO<sub>2</sub> ao nível da superfície folhar; e (3) à diminuição do rendimento de grãos (ou órgão da planta utilizado para a obtenção de metabólitos secundários), mesmo sem a redução significativa no acúmulo de biomassa, caso o estresse ocorra em um período crítico para o desenvolvimento da planta (FARAHANI et al., 2009). Da maneira e intensidade com que a planta responde a estas alterações fisiológicas depende o balanço positivo nas concentrações das substâncias de interesse após a elicitación.

Sobre este aspecto, é importante ressaltar que a concentração de metabólitos secundários normalmente aumenta em plantas submetidas a estresse hídrico, o que pode ocorrer por dois fatores: (1) diminuição da produção de biomassa, sem alteração na eficiência biossintética e (2) aumento real na produção destes metabólitos (NUNES et al., 2009a; SELMAR e KLEINWÄCHTER, 2013). Desta maneira, a avaliação do balanço de biomassa e concentração de metabólitos na mesma é fundamental para avaliara a eficiência de uma estratégia de elicitación desenvolvida.

Para as plantas de *H. polyanthemum* submetidas a estresse hídrico, o teor de uliginosina B aumentou aproximadamente 40 vezes quando comparado ao quantificado nas partes vegetativas das plantas controle e aproximadamente 6 vezes quando analisado nas partes reprodutivas. Aumento significativo também foi verificado para o acúmulo de HP1 e HP3 nas folhas após submetidas às mesmas condições de seca. Considerando que não houve diferença no aumento da biomassa de partes vegetativas ou partes reprodutivas destas plantas quando comparadas com o controle, o aumento na produção de uliginosina B resulta de um ganho real no rendimento metabólico das plantas submetidas à seca. Desta forma, o protocolo de elicitación desenvolvido para plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* mostrou-se adequado como alternativa à otimização da produção de uliginosina B pela espécie, em particular quando as plantas são submetidas a estresse hídrico.





**5 Capítulo 3**

**ESTABELECIMENTO DE CULTURAS DE ADVENTÍCIAS DE**  
*Hypericum polyanthemum*

---



## 5.1. INTRODUÇÃO

A obtenção de substâncias biologicamente ativas provenientes de fontes vegetais é um desafio abarcado pela biotecnologia vegetal. Além da micropropagação *in vitro* de plântulas e da possibilidade de sua posterior aclimatização, uma alternativa interessante para a obtenção de biomassa capaz de produzir moléculas de interesse é o cultivo de raízes (VERPOORTE et al., 2002; LUBBE e VERPOORTE, 2011; BAQUE et al., 2012a).

O cultivo de raízes adventícias é uma técnica que possibilita rápido acúmulo de biomassa, produção estável de metabólitos secundários e produção dos mesmos em concentrações semelhantes aos verificados nas plantas *in natura* (ZOBAYED et al., 2004; ÇIRAK, et al., 2007; CUI et al., 2010a). Protocolos para a indução e cultivo de raízes adventícias de *Hypericum perforatum* foram estabelecidos, possibilitando o aumento de biomassa e da produção de hiperforina, hipericina e flavonóides, que variaram em resposta à concentração de reguladores de crescimentos no meio de cultura e outros parâmetros empregados durante o cultivo (ZOBAYED et al., 2004; CUI et al., 2010b).

Somado-se às possibilidades de fontes de metabólitos secundários, o cultivo *in vitro* de células vegetais proporciona o acúmulo de biomassa produtora das substâncias de interesse e possibilita um meio apropriado para o estudo dos fatores que podem implicar na composição qualitativa e quantitativa de um extrato vegetal, tais como moléculas precursoras e enzimas presentes nas culturas. Considerando este aspecto, o estudo enzimático em culturas celulares de *H. polyanthemum* torna-se interessante, especialmente se direcionado à síntese de benzopiranos e derivados do floroglucinol.

As espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil apresentam, em sua constituição fitoquímica, substâncias interessantes do ponto de vista farmacológico, como alguns derivados do floroglucinol e outros compostos fenólicos (VON POSER et al., 2006). Entre estes compostos, o derivado dimérico do floroglucinol, uliginosina B, destaca-se pela sua ação analgésica (STOLZ et al.,

2012) e antidepressiva, sendo sugerida como um novo protótipo de fármaco para esta classe (STEIN et al., 2012) . No entanto, para estas espécies de *Hypericum* nativas, ainda não foram descritos estudos relacionados ao estabelecimento do cultivo de células ou raízes.

## **5.2. OBJETIVO**

Considerando a importância das espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil como fonte de metabólitos bioativos bem como o estabelecimento do cultivo *in vitro* de culturas de raízes como ferramenta para a otimização da obtenção destes compostos, este capítulo tem por objetivo descrever o estabelecimento do cultivo *in vitro* de raízes adventícias de *H. polyanthemum* e avaliar cinética de crescimento, a influência da concentração inicial (inóculo da cultura) e variações na concentração de sacarose sobre o acúmulo de biomassa e produção de substâncias bioativas.

## **5.3. REVISÃO**

As raízes dos vegetais são consideradas uma potencial fonte de moléculas bioativas – que compreendem diferentes classes de metabólitos e proteínas – sendo, muitas vezes, o único tecido capaz de sintetizar determinados grupos de metabólitos secundários na planta. Os atuais avanços da biotecnologia vegetal fornecem diversas oportunidades para o cultivo de células, tecidos e órgãos para a produção de metabólitos secundários como alternativa ao cultivo da planta inteira. Entretanto, do ponto de vista comercial, a produção em larga escala de produtos naturais por culturas de células vegetais ainda é pequena, apresentando-se como uma prática difícil devido à baixa produtividade e instabilidade das culturas (SIVAKUMAR, 2006). Além disso, em alguns casos os compostos de interesse não são sintetizados por estas células indiferenciadas (RAO e RAVISHANKAR, 2002; VERPOORTE et al., 2002).



Entre as opções de cultivo estabelecidas, o cultivo de raízes adventícias é um meio eficiente para obtenção de metabólitos secundários, devido ao seu rápido crescimento, com consequente acúmulo de biomassa produtora de compostos de interesse (CHOI et al., 2000; KIM et al., 2004). As raízes adventícias também podem servir como fonte contínua destas substâncias (VERPOORTE et al., 2002). Desta forma, eficiência e altas concentrações de metabólitos secundários podem ser alcançados com a otimização de protocolos de cultivo *in vitro* para este tipo de cultura (WU et al., 2006).

Considerando o gênero *Hypericum*, culturas de raízes adventícias em suspensão foram estabelecidas com sucesso para *H. perforatum* por meio do cultivo de explantes folhares em meio MS suplementado com ácido indol-butírico, verificando-se que alterações na composição do meio de cultura, como a concentração de sacarose (CUI et al., 2010b) e a relação entre as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  (CUI et al., 2010c) são capazes de influenciar o acúmulo de biomassa e a produção de compostos fenólicos pelas culturas. *Echinacea angustifolia* (WU et al., 2006), *Panax ginseng* C.A. Meyer (JEONG et al., 2009a), *Morinda citrifolia* L. (BAQUE et al., 2012b) e *Castilleja tenuiflora* Benth (GÓMEZ-AGUIRRE et al., 2012), são exemplos de outras plantas medicinais cujo cultivo em suspensão de raízes adventícias foi estabelecido, obtendo-se acúmulo de biomassa e produção de metabólitos secundários.

O estabelecimento do cultivo de raízes adventícias em suspensão proporciona rápido crescimento do tecido, permite a seleção de linhagens específicas e a conservação de espécies. Uma técnica complementar a esta prática é o cultivo de raízes adventícias em biorreatores, que permite significativa otimização na produção de biomassa e metabólitos secundários (CHOI et al., 2000; YU et al., 2001; KIM et al., 2004; LEE et al., 2006, LUBBEE e VERPOORTE, 2011, BAQUE et al., 2012a), além de apresentar relativa facilidade de transição para uma estratégia de cultivo em larga escala (*scale up*) (PAEK et al., 2005, BAQUE et al., 2012a). Os biorreatores, de maneira geral, podem ser descritos como um ambiente estéril preenchido por meio de cultura líquido ou meio de

culura líquido sob circulação de ar, sendo projetados para proporcionarem, da maneira mais eficiente possível, o controle de parâmetros de cultivo como agitação, aeração, temperatura, oxigênio dissolvido no meio, pH, entre outros (PEAK et al., 2005; KOLEWE, 2008). A incremento no acúmulo de biomassa em raízes adventícias, através do cultivo em biorreatores, foi descrito para *Hypericum perforatum* (CUI et al., 2010a), *Eleutherococcus koreanum* (LEE e PAEK, 2012) e *Panax ginseng* (LANGHANSOVA et al., 2012), evidenciando a importância do desenvolvimento de protocolos de cultivo específicos para cada espécie, com o estudo das condições ótimas de cultivo para cada caso.

Entre os fatores que influenciam o metabolismo celular, determinando respostas específicas frente a condições estabelecidas, destaca-se a condutividade elétrica do meio, que está diretamente associada ao pH do mesmo. A condutividade elétrica decresce ao longo do tempo de cultivo, refletindo o acúmulo de biomassa e corroborando relatos que demonstram que esta grandeza está intimamente ligada à utilização de nutrientes do meio pelas células, possibilitando com que sua medição seja utilizada para a estimativa indireta de biomassa (RYU et al., 1990; GEORGIEV et al., 2009).

Em estudo realizado com raízes adventícias de *H. perforatum* cultivadas *in vitro* por sete semanas, foi possível estabelecer uma correlação linear entre a condutividade elétrica do meio e a biomassa acumulada pelas culturas, com um excelente índice de correlação ( $R^2 = 0,930$ ) calculado (CUI et al., 2011), o que demonstra que esta grandeza traduz-se em um indicativo do estado fisiológico das células vegetais, permitindo o monitoramento do crescimento das mesmas ao longo do cultivo. Em processos biotecnológicos, as células funcionam como “fábricas” que convertem substrato em produtos, fazendo com que sua concentração no meio possua um impacto determinante no rendimento da obtenção destas substâncias. Desta maneira, o monitoramento do crescimento celular durante o cultivo é essencial, principalmente em processos em larga escala (VERPOORTE et al., 2002; GEORGIEV et al., 2009).

É importante ressaltar, ainda, que a presença de determinada substância no meio de cultivo não implica em sua disponibilidade para o consumo celular. Quando um nutriente é adicionado ao meio, as raízes adventícias o absorvem seletivamente, de acordo com a solubilidade deste composto, convertendo-o em biomassa (LEE e SHULER, 2000). Esta observação é particularmente importante para nutrientes voláteis como o oxigênio. O oxigênio é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória destas culturas e por isso desempenha importante papel no metabolismo energético das células. Além disso, o fornecimento das condições para que ele esteja disponível ao tecido em quantidade adequada à demanda metabólica faz com que protocolos de cultivo específicos sejam desenvolvidos para cada tipo celular. Dióxido de carbono e etileno são outros dois gases que também requerem atenção quanto à sua incorporação ao meio de forma a estarem disponíveis de maneira satisfatória ao consumo celular (PEYNE et al., 1991; JEONG et al., 2006; THAN et al., 2006).

Dessa forma, o cultivo de raízes adventícias é uma fonte de material biológico para produção comercial estável de metabólitos secundários importantes. Comparado com a cultura de células, as raízes adventícias apresentam alta estabilidade em seu ambiente de crescimento e sintetizam elevadas quantidades de metabólitos secundários, que são liberados para o espaço intercelular do tecido, facilitando sua extração (SIVAKUMAR, 2006). Em artigo de revisão, Baque e colaboradores (2012a) realizaram um estudo sobre diferentes plantas medicinais que possuem cultivo de raízes adventícias estabelecido e que se mostram eficientes na produção dos metabólitos secundários de interesse para cada uma. No total, foram identificadas 18 espécies, que fornecem mais de 20 classes de compostos relacionados com atividades biológicas tais como antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e antibiótica.

No sul do Brasil, as espécies de *Hypericum* são capazes de sintetizar diferentes classes de compostos fenólicos que apresentam atividades biológicas, sendo, por isso, de extremo interesse a obtenção que uma forma de viável para o

cultivo de matéria-prima vegetal de forma estável e em quantidade, capaz de produzi-los.

## **5.4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.4.1. Indução do cultivo *in vitro* de raízes adventícias de *H. polyanthemum***

O cultivo *in vitro* de raízes adventícias foi obtido a partir de plântulas micropropagadas de *H. polyanthemum* (BERNARDI et al., 2007) cultivadas em meio semissólido MΔ (MAURMANN et al., 2008), sem adição de reguladores de crescimento, acrescido de 6 g/L de ágar e 30 g/L de sacarose, e pH ajustado para 5,8. Explantes foliares destas plântulas foram transferidos para meio MΔ semissólido, suplementado com diferentes concentrações (0,5, 1 e 2 mg/L) dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina (CIN). Os explantes foram cultivados ao abrigo da luz, em sala climatizada a  $25 \pm 1$  °C. Após aproximadamente 14 dias, pequenos segmentos de raízes foram observados emergindo da superfície foliar dos explantes cultivados nos meios suplementados com AIB. Estes segmentos foram excisados (1 a 2 cm) e subcultivados no mesmo meio a cada duas semanas.

Após tornarem-se numerosos, os segmentos de raízes foram transferidos para meio líquido (sem adição de ágar), de mesma formulação, e mantidos em agitador rotatório (100 rpm) sob as mesmas condições controladas de cultivo. As raízes em meio líquido foram subcultivadas a cada duas semanas e a análise de crescimento demonstrou que o meio suplementado com 2 mg/L de AIB foi o mais adequado para promoção do aumento de biomassa, sendo, por isso, selecionado para a continuidade dos estudos.

#### **5.4.2. Avaliação da influência do inóculo sobre o crescimento das culturas de raízes adventícias**

A influência da concentração inicial dos tecidos de raízes inoculados em meio líquido foi avaliado após seis ciclos de cultivo de duas semanas cada. Os seguintes inóculos foram avaliados: 2, 4, 6, 8, 10, 40, 80, 120 140 e 200 gramas de raízes por litro de meio (g/L), em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MΔ suplementado com 2 mg/L de AIB, 30 g/L de sacarose e pH ajustado para 5,8.

Após duas semanas de crescimento, a massa fresca foi avaliada e o teor de benzopiranos (HP1, HP2 e HP3) e derivados do floroglucinol (uliginosina B e isouliginosina B) quantificado por CLAE e expressos em mg/gMS (miligrama por grama de massa seca).

#### **5.4.3. Avaliação da cinética de crescimento das culturas de raízes adventícias**

A cinética de crescimento das raízes foi avaliada a partir do acompanhamento da produção de biomassa ao longo de 10 semanas de cultivo, produzidos por um inóculo inicial de 1g de raízes em 50 mL de meio líquido, ou seja, em uma concentração de 20 g/L .

As raízes subculturadas foram mantidas sob as mesmas condições controladas descritas no item 4.1, em agitador rotatório (100 rpm), ao abrigo da luz e em temperatura de  $25 \pm 1$  °C.

#### **5.4.4. Avaliação da influência da concentração de sacarose no meio líquido sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em raízes adventícias de *H. polyanthemum***

O efeito da variação da concentração de sacarose no meio foi avaliado a partir do cultivo de inóculos de 20 g/L em meio líquido MΔ, suplementado com 2 mg/L de AIB e adicionado de 1, 2, 3, 4 ou 5 g/L de sacarose.

As raízes foram cultivadas por 4 semanas sob condições controladas (item 4.1), a massa seca registradas e o teor dos benzopiranos e derivados do floroglucinol quantificados por CLAE.

#### **5.4.5. Quantificações por CLAE**

Os teores dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3, bem como dos derivados do floroglucinol uliginosina B e isouliginosina B foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os benzopiranos foram quantificados sob eluição isocrática de mistura de acetonitrila:água (60:40, v:v), com fluxo de 1 mL/min e detecção por ultravioleta em comprimento de onda de 270 nm. A concentração das substâncias nas amostras foi calculada a partir de curvas padrão construídas com substâncias isoladas do extrato *n*-hexânico das partes aéreas de *H. polyanthemum*, conforme metodologia previamente validada (BERNARDI, 2007). A quantificação dos derivados do floroglucinol ocorreu sob eluição isocrática de mistura de acetonitrila:água (95:5, v:v) adicionada de 0,05% de ácido trifluoroacético, com fluxo de 1 mL/min e detecção por ultravioleta em comprimento de onda de 220 nm. O teor das substâncias foi quantificado por uma curva padrão de uliginosina B, também isolada do extrato *n*-hexânico das partes aéreas de *H. polyanthemum* conforme metodologia previamente descrita (NUNES et al., 2009) e expressos em mg de uliginosina B por grama de massa seca de raiz (mg/gMS).

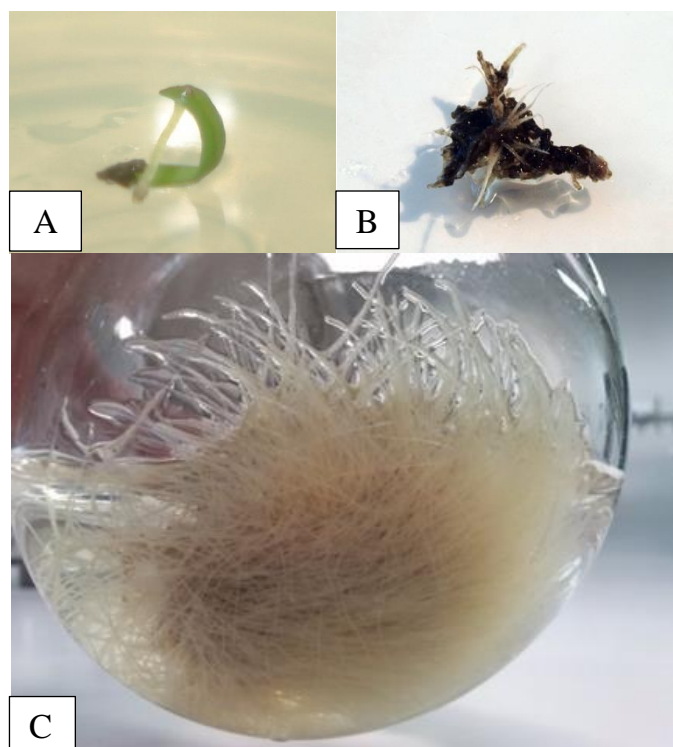
Ambos os métodos utilizaram coluna cromatográfica Waters Nova-Pack C<sub>18</sub> acoplada à pré-coluna Waters Nova-Pack C<sub>18</sub> 60A. As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento com sistema quaternário de bombas Waters 600, detector com comprimento de onda duplo Waters 2487 e injetor automático Waters 717, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Teresa Dalla Costa (PPGCF – UFRGS).

## 5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Estabelecimento do cultivo *in vitro* de raízes adventícias de *H. polyanthemum*

Explantes foliares de plântulas de *H. polyanthemum* micropropagadas foram subculturadas em meio MΔ semissólido suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA, AIA, AIB, 2,4-D e CIN. A sequência ilustrada na Figura 6 mostra os segmentos radiculares formados após aproximadamente 14 dias de cultivo, emergindo das folhas cultivadas em meio MΔ suplementado com AIA e AIB. No entanto, apenas as raízes formadas a partir de explantes foliares cultivados em meio suplementado com AIB foram persistentes em seu desenvolvimento, crescendo em número e comprimento ao longo das sucessivas subculturas, sendo, por isso, selecionados para a transferência para o meio líquido e continuidade dos experimentos.

Após tornarem-se numerosos em meio semissólido, os segmentos radiculares foram excisados e transferidos para o mesmo meio líquido contendo AIB nas concentrações anteriormente utilizadas (0,5, 1 e 2 mg/L). As raízes cultivadas em meio líquido apresentaram rápido crescimento entre os intervalos de 2 semanas, sendo as culturas do meio suplementado com AIB na concentração de 2 mg/L as que demonstraram crescimento mais estável ao longo das subculturas, sendo, por isso, escolhidas para a continuidade dos estudos.



**Figura 6** Indução do crescimento *in vitro* de raízes adventícias de *H. polyanthemum*: (A) segmento folhar inicial emergindo de explante folhar cultivado em meio semissólido MΔ suplementado com 2 mg/L de AIB, (B) numerosos segmentos radiculares desenvolvidos em meio semissólido, em etapa anterior à sua transferência para meio líquido e (C) raízes adventícias cultivadas por 4 semanas em meio líquido.

Em estudo realizado com *Periploca sepium*, planta medicinal produtora de periplocina, composto com pronunciada ação cardioativa, Zhang e colaboradores (2011) demonstraram que as folhas da planta apresentaram-se como o melhor explante para a indução de raízes adventícias, comparativamente a ramos e raízes. Da mesma forma, um protocolo para o cultivo de raízes adventícias de *Morinda citrifolia* foi eficientemente estabelecido a partir de explantes folhares de plântulas micropropagadas por 2 semanas (BAQUE et al., 2010). Para o gênero *Hypericum*, folhas de *H. perforatum* foram adequadas para a indução e manutenção de raízes adventícias cultivadas em biorreator e na forma de suspensão em frascos sob agitação (CUI et al., 2010a; CUI et al., 2010b), assim como observado para a indução de raízes em *H. polyanthemum*.

Os meios de cultura são formulações com diferentes componentes, incluindo sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas e, por vezes, reguladores de crescimento (CALDAS et al., 1998). Entre estas substâncias, os reguladores de



crescimento desempenham um papel fundamental no crescimento da planta e na regulação de processos metabólicos em nível celular (KIM et al., 2004; LEE et al., 2006; CUI et al., 2010a; LANGHANSOVA et al., 2012). Para as culturas de raízes adventícias de *H. polyanthemum*, a presença de auxinas exógenas mostrou-se benéfica para a diferenciação celular do tecido, em especial a presença de AIB em diferentes concentrações. Ácido indolbutírico possibilitou rápido crescimento e estabilidade no desenvolvimento das raízes ao longo das sucessivas subculturas.

Em trabalho realizado com *Echinacea angustifolia*, AIB na concentração de 2 mg/L demonstrou a melhor resposta na indução de raízes adventícias para a espécie investigada (WU et al., 2006). De maneira semelhante, quando cultivado em meio líquido (meio MS sem  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) acrescido de 25  $\mu\text{M}$  de AIB, *Panax ginseng* C.A. Meyer apresentou a melhor taxa de indução de raízes adventícias a partir de cultura de calos, assim como maior acúmulo de biomassa e produção de ginsenosídeos (JEONG et al., 2009a). Entretanto, o mesmo não foi observado para *Castilleja tenuiflora* Benth., em que as raízes adventícias obtidas em meio semissólido B5 suplementado com 10  $\mu\text{M}$  de ANA, quando transferidas para meio suplementado com AIB, não apresentaram desenvolvimento satisfatório, demonstrando sinais de oxidação e crescimento limitado (GÓMEZ-AGUIRRE et al., 2012).

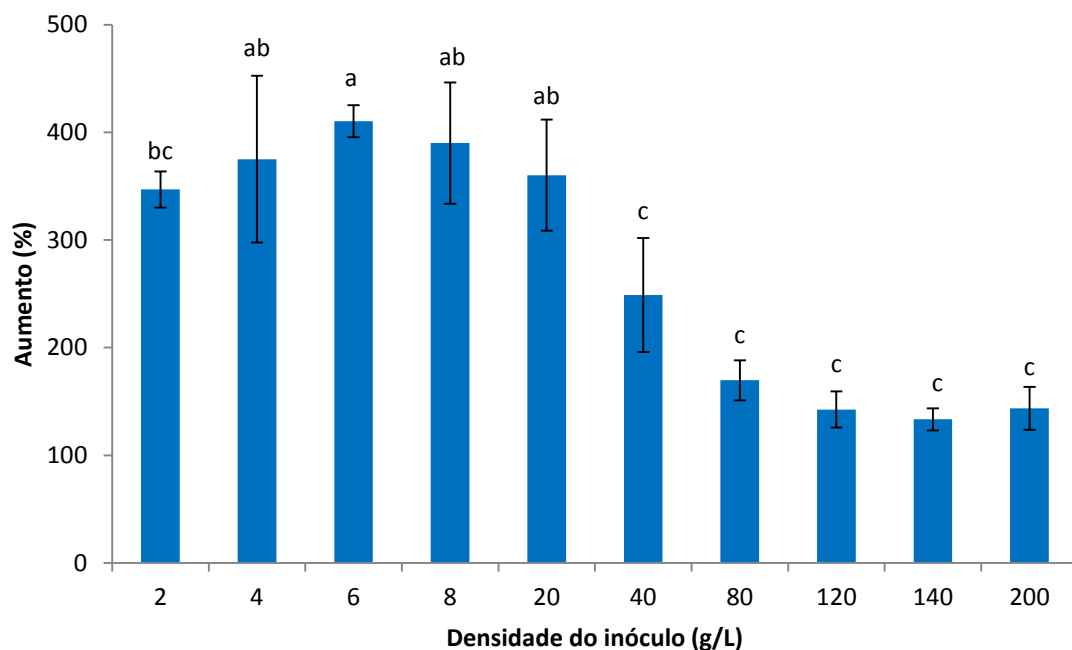
É interessante ressaltar, ainda, que as concentrações de AIB utilizadas para o cultivo das raízes adventícias de *H. polyanthemum* (0,1 a 2 mg/L) representam entre 2 e 40% da concentração verificada como sendo a mais adequada para o acúmulo de biomassa e produção de metabólitos ativos em *P. ginseng* (JEONG et al., 2009a), que equivale a aproximadamente 5 mg/L. Considerando a resposta metabólica de diferentes culturas vegetais estabelecidas *in vitro*, é frequente o relato do efeito prejudicial do aumento da concentração de auxinas no meio de cultivo frente à produção de metabólitos secundários, mesmo quando influenciando positivamente o incremento de biomassa (DORNENBURG e KNORR, 1995; CHAN et al., 2005; BAQUE et al., 2010). Estas diferenças qualitativas e quantitativas apresentadas no cultivo vegetal evidenciam as

particularidades fisiológicas e metabólicas entre diferentes espécies, corroborando a importância do desenvolvimento de protocolos de cultivos adequados quando se deseja otimizar a obtenção de produtos naturais com potencial emprego farmacológico (CANTER et al., 2005; LUBBE e VERPOORTRE, 2011; SARASAN et al., 2011, BAQUE et al., 2012a).

### **5.5.2 Avaliação da influência do inóculo no crescimento das culturas de raízes adventícias**

A densidade do inóculo em uma cultura *in vitro* contribui para o sucesso de seu desenvolvimento, uma vez que é capaz de modular seu metabolismo (LEE et al., 2006). Para avaliar a influência da concentração inicial de raízes no aumento de biomassa e produção de metabólitos secundários, as raízes adventícias de *H. polyanthemum* foram subculturadas com 2, 4, 6, 8, 20, 40, 80, 120, 140 e 200 g/L, sendo avaliadas após 6 ciclos de subculturas de 2 semanas cada.

A avaliação do acúmulo de biomassa demonstrou que a maior massa final de raízes foi verificada para os maiores inóculos. No entanto, o maior aumento de massa, relativamente à massa inicial, ocorreu nos inóculos de menores densidades, atingindo até 390% da biomassa inicial quando 8 g/L de raiz foram inoculados no meio líquido, conforme demonstra a Figura 7. A partir dos inóculos de 20 g/L, o aumento de massa fresca foi inversamente proporcional ao aumento do valor do inóculo, sendo indiferente para os inóculos de densidades maiores do que 80 g/L, quando atinge um mínimo de aproximadamente 130% de crescimento, verificado para uma concentração inicial de 200 g/L de raízes.



**Figura 7** Aumento de massa fresca (%) de raízes adventícias de *H. polyanthemum* cultivadas por 2 semanas em meio líquido MΔ suplementado com 2 mg/L de AIB em relação à concentração inicial (inóculo) de raízes (g/L). Os valores estão expressos como média ± DP. Diferentes letras indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA seguida de Tuckey).

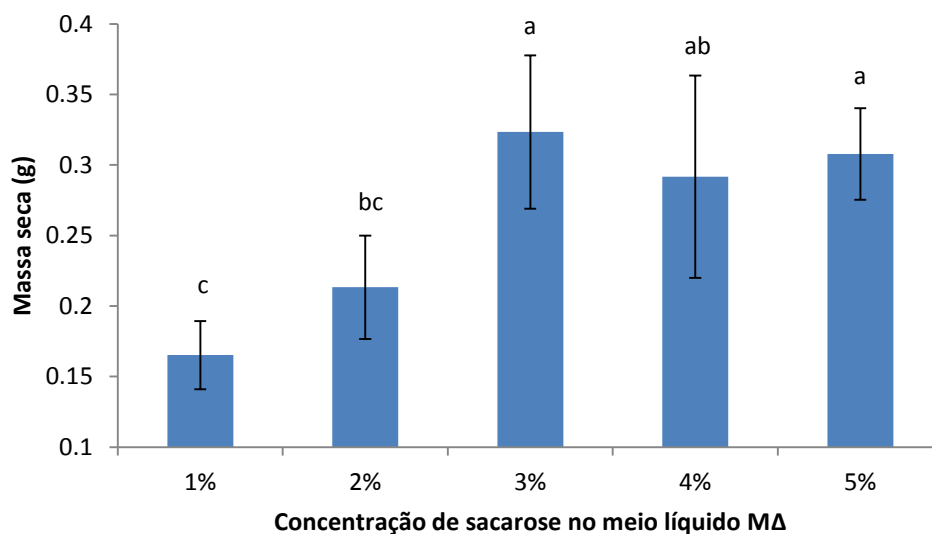
Os resultados encontrados referentes ao aumento de biomassa estão de acordo com estudos que demonstram que maiores concentrações de inóculo podem contribuir para maior acúmulo de biomassa final, no entanto, não contribuem para a taxa de crescimento (CUI et al., 2011; LEE et al., 2011). Esta mesma condição de elevados inóculos iniciais é relatada, ainda, como desfavorável para o aumento da produção de compostos fenólicos e flavonoides de *Echinacea angustifolia* (WU et al., 2006) e para escopolamina e alcaloides tropânicos, produzidos por raízes adventícias de *Scoplia parviflora* (MIN et al., 2007), que tiveram sua biossíntese otimizada em inóculos de menores densidades.

Esta limitação no desenvolvimento fisiológico e metabólico do tecido pode apresentar relação com a depleção de nutrientes do meio ao longo do tempo de cultivo, como açúcares (WU et al., 2006; LEE et al., 2006; MIN et al., 2007; CUI et al., 2010b; BAQUE, 2012b; ZHANG et al., 2012) e sais (CUI et al., 2010a; ZHANG et al., 2011). O consumo e consequente diminuição da concentração destes nutrientes pelos tecidos alteram alguns parâmetros físico-químicos do meio,

tais como pH, viscosidade, potencial osmótico e condutividade elétrica, que também influenciam o metabolismo das culturas *in vitro*.

### 5.5.3 Avaliação da influência da concentração de sacarose no meio líquido sobre o crescimento de raízes de *H. polyanthemum*

Para avaliar a influência da concentração de sacarose no crescimento e produção de metabólitos secundários em raízes adventícias de *H. polyanthemum*, 1 g de raiz foi cultivado por 4 semanas em meio líquido MΔ, suplementado com 2 mg/L de AIB e com as seguintes concentrações de sacarose: 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. O acúmulo de massa seca demonstra que as raízes cultivadas em meio com 3% e 5% de sacarose apresentaram maior crescimento (Figura 8).



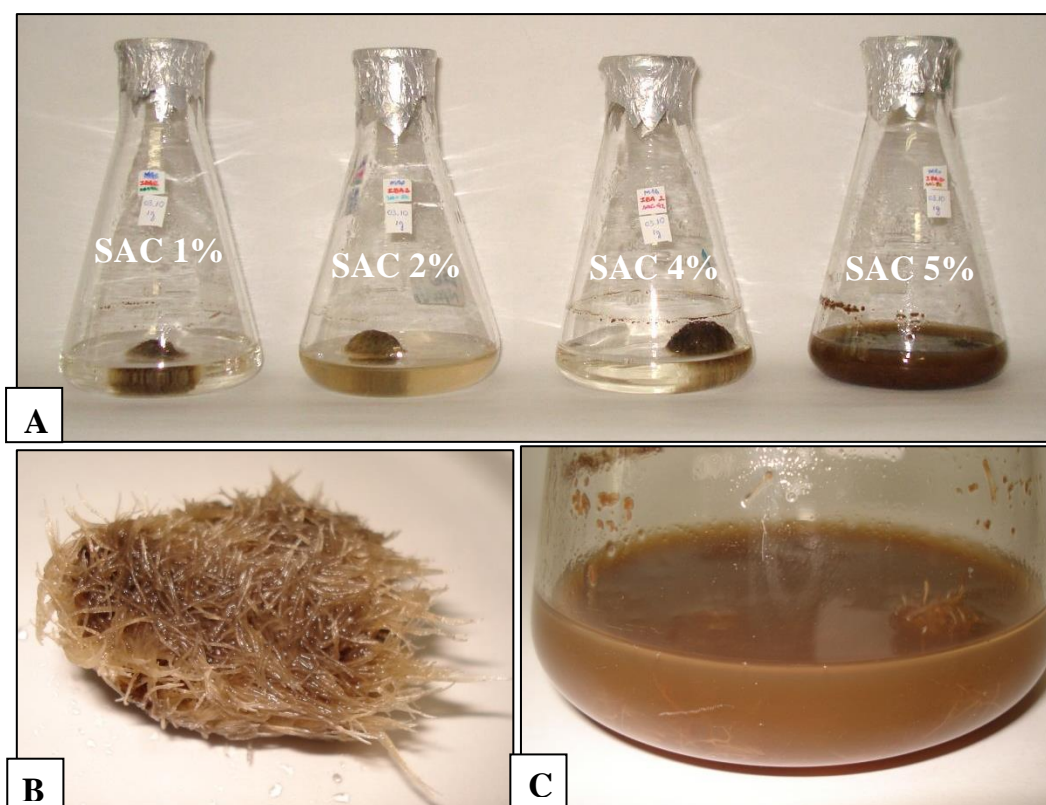
**Figura 8:** Acúmulo de massa seca (g) resultante da concentração de sacarose (%) no meio líquido de cultivo o MΔ suplementado com 2 mg/L de AIB. Os valores estão expressos como média  $\pm$  DP. Diferentes letras indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$  (ANOVA seguida de Tukey).

A sacarose é considerada uma importante fonte de carbono e energia para células vegetais, sendo a sua concentração inicial capaz de afetar o crescimento e a produção de metabólitos secundários em culturas *in vitro* (CUI et al., 2010b; BAQUE et al., 2012b, ZHANG et al., 2012). Quanto às raízes, a importância dos

açúcares deve-se ao fato destas moléculas estarem envolvidas na regulação e expressão de um número significativo de genes vegetais, controlando o crescimento do tecido, servindo de substrato para a respiração celular e, conseqüentemente, desempenhando papel importante na rota biossintética de diversos compostos que controlam o desenvolvimento vegetal (ROLLAND et al. 2006).

Estudos demonstram que a disponibilidade de sacarose no meio de cultivo é fundamental para o acúmulo de biomassa pela cultura de tecidos, o que está de acordo com o perfil crescente visualizado para a massa seca das raízes cultivadas em meio líquido com 1%, 2% e 3% de sacarose, similar ao verificado em trabalho de Zhang e colaboradores (2012), com o máximo de acúmulo da biomassa vegetal mantendo-se até a utilização de 5% de sacarose no meio. Quantidades excessivas de sacarose, no entanto, podem aumentar a viscosidade e pressão osmótica do meio, dificultando a captação de nutrientes e limitando o crescimento do tecido (LEE et al., 2006; CUI et al., 2010b, BAQUE et al., 2012b). Este fenômeno não ocorreu com as concentrações investigadas para o cultivo das raízes adventícias de *H. polyanthemum*, com elevado acúmulo de massa seca verificado, inclusive, para as raízes cultivadas em meio líquido contendo 5% de sacarose. Referente a este resultado, torna-se importante descrever a aparência das culturas quando cultivadas sob diferentes concentrações de sacarose.

Na Figura 11 estão mostrados os frascos nos quais foram cultivadas as raízes de *H. polyanthemum* nas diferentes concentrações do açúcar. É possível perceber que para as concentrações de 1%, 2% e 4%, após 4 semanas de cultivo o meio de cultura encontra-se claro e límpido, com as raízes emaranhadas em uma massa compacta com formato esférico (Figura 11B). Já para o cultivo em 5% de sacarose, após 4 semanas o meio apresenta-se escuro e com aspecto leitoso, apresentando as raízes soltas, sem a formação de uma massa compacta (Figura 9C). Embora a figura não permita visualizar, as raízes apresentaram-se claras após a remoção do meio de cultura.



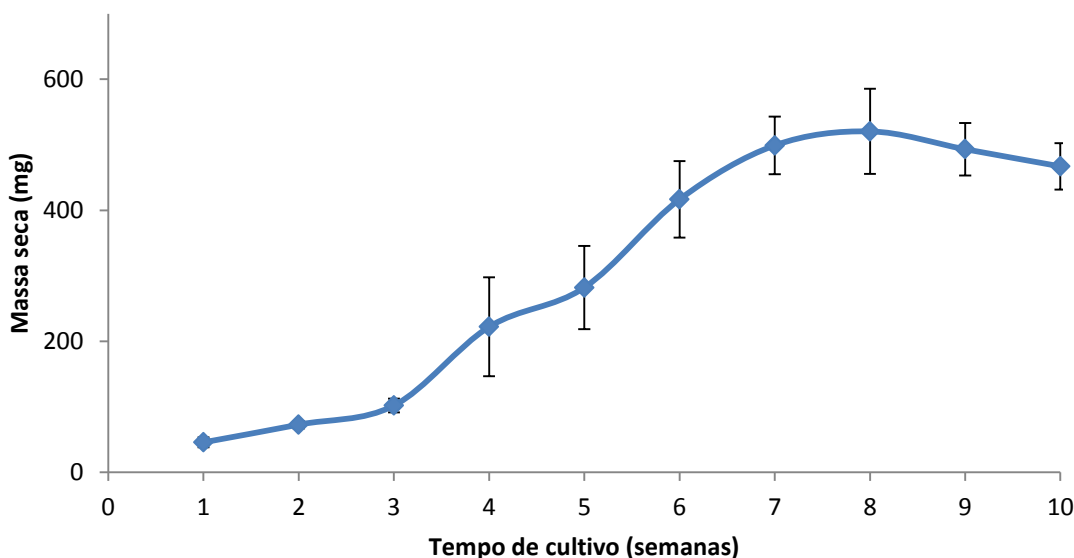
**Figura 9:** Aspecto visual (A) dos meios de cultura das raízes adventícias de *H. polyanthemum* cultivadas por 4 semanas em meio líquido MΔ adicionado de 1% (SAC 1%), 2% (SAC 2%), 4% (SAC 4%) e 5% (SAC 5%) de sacarose. (B) Raízes adventícias de *H. polyanthemum* cultivadas por 4 semanas em meio com 4% de sacarose, apresentando na forma de um emaranhado de raízes e (C) aspecto escuro do meio contendo 5% de sacarose após 4 semanas de cultivo – as raízes deste meio apresentaram-se soltas, diferentemente das cultivadas nos meios com as menores concentrações de sacarose.

Min e colaboradores (2007) relatam que as raízes adventícias de *Scoplia parviflora*, após 5 semanas de cultivo, apresentam-se de forma bastante semelhante à observada para *H. polyanthemum*. O padrão de crescimento destas raízes foi observado como dividindo a esfera do aglomerado radicular em região externa e interna, representando tecido jovem e senescente, respectivamente. As regiões com tecido jovem e crescimento ativo de raízes apresentaram-se com coloração amarela clara, tal como verificado para *H. polyanthemum*. Com esta organização, o interior da massa tecidual possui acesso restrito aos nutrientes e oxigênio do meio, apresentando, por isso, diferente rendimento na produção dos compostos analisados.

#### 5.5.4 Avaliação da cinética de crescimento das raízes adventícias de *H. polyanthemum*

Para determinar o estágio de desenvolvimento em que ocorre o maior acúmulo de biomassa pelas culturas e avaliar a produção de compostos bioativos, raízes adventícias de *H. polyanthemum* foram cultivadas *in vitro* e avaliadas semanalmente por um período de 10 semanas. Por demonstrar produção de derivados do floroglucinol, bem como por combinar uma taxa de crescimento satisfatória e considerável acúmulo de biomassa, o inóculo de 20 g/L foi selecionado para a condução do estudo. Desta maneira, 1g de raízes adventícias foi inoculado em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura e avaliado semanalmente quanto aos parâmetros de massa seca e produção dos benzopiranos e dos derivados do floroglucinol.

Como mostrado na Figura 10, o período de maior acúmulo de biomassa ocorre em 8 semanas de cultivo. As raízes adventícias apresentaram uma fase lag entre 0 e 3 semanas, uma fase de crescimento exponencial entre 3 e 7 semanas e uma fase estacionária entre 7 e 9 semanas, decrescendo em seguida. *Valeriana glechomifolia* Meyer, espécie nativa do sul do Brasil que produz valepotriatos, substâncias envolvidas com a atividade sedativa que caracteriza o uso farmacológico de outras plantas do gênero, teve o cultivo de raízes adventícias estabelecido. Para *V. glechomifolia*, o maior acúmulo de biomassa também ocorreu entre 7 e 8 semanas de cultivo, estágio em que se verificou a maior produção de valepotriatos (MAURMANN et al., 2006). *Echinacea purpurea* apresentou período estacionário atingido após 7 semanas de cultivo (JEONG et al., 2009b).



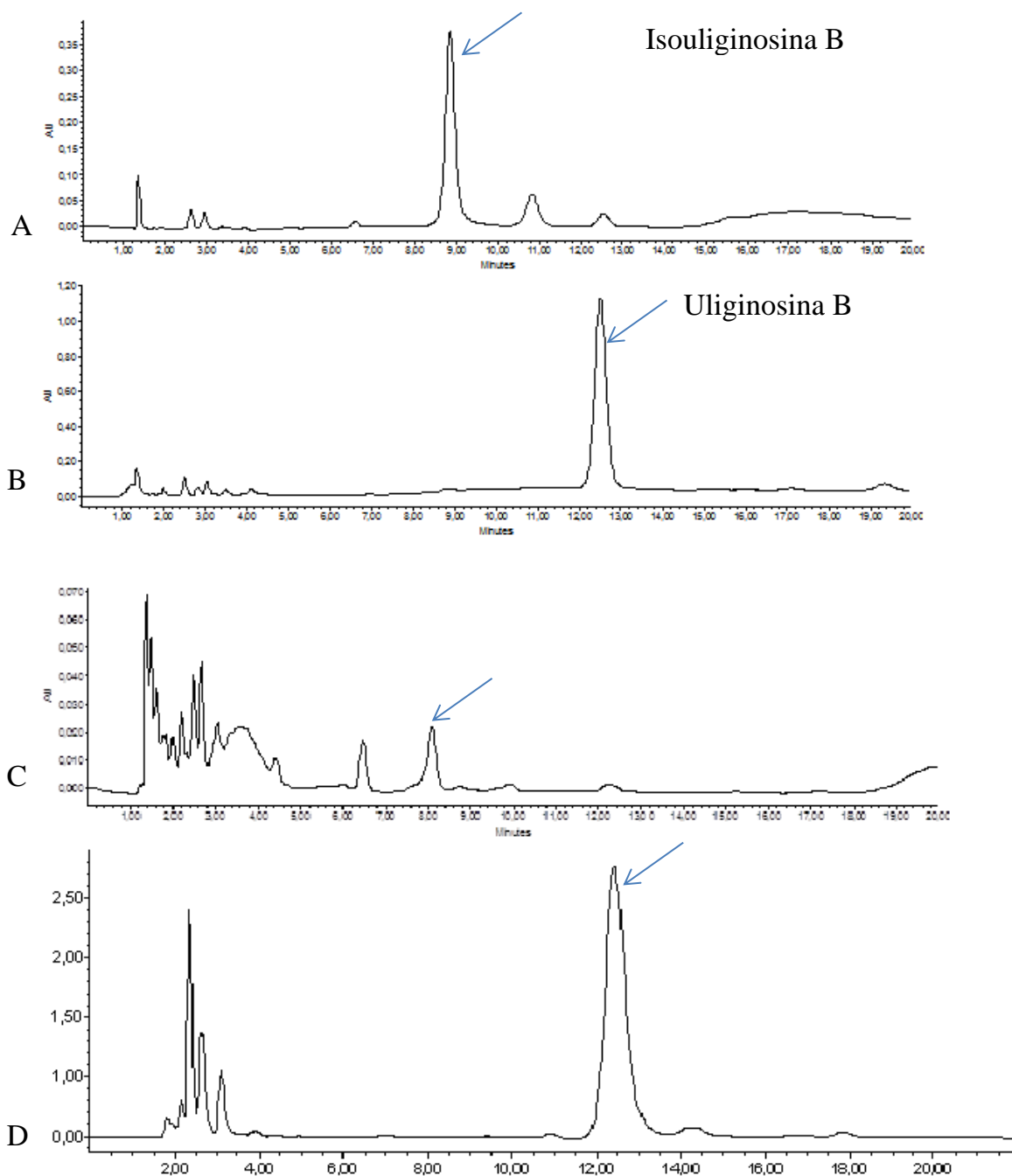
**Figura 10** Acúmulo de biomassa em raízes adventícias de *H. polyanthemum* ao longo de 10 semanas de cultivo, em meio líquido MΔ, suplementado com 2 mg/L de AIB.

### 5.5.5 Produção de metabólitos secundários nas raízes adventícias de *H. polyanthemum*

Em análise por CLAE dos extratos obtidos das raízes adventícias, não foi verificada a presença dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3, presentes nas partes aéreas de plantas *in natura* (FERRAZ et al., 2001), plântulas micropropagadas (BERNARDI et al., 2007) e plantas aclimatizadas (BERNARDI et al., 2008, NUNES *et al.*, 2009b). Quanto aos derivados do floroglucinol, as primeiras avaliações, realizadas com as culturas de raízes ainda recentes, revelaram a presença de uliginosina B bem como de seu isômero, isouliginosina B. É interessante ressaltar que, até o momento, não há relato da presença do isômero isouliginosina B em material vegetal de *H. polyanthemum*. Conforme os cromatogramas representados na Figura 11, é possível verificar a presença de isouliginosina B e uliginosina B (Figura 11A) no extrato *n*-hexano das culturas de raízes (Figura 11C), enquanto verifica-se apenas a presença de uliginosina B no extrato das folhas da planta *in natura* (Figura 11D). Estas mesmas culturas, no entanto, quando analisadas aproximadamente 3 anos após o seu estabelecimento, não mais apresentaram o acúmulo destes derivados do floroglucinol, passando a



apresentar um perfil fitoquímico predominantemente formado de xantonas tetraoxigenadas.. Este fato é de extrema relevância no momento em que claramente diferencia a expressão gênica nas raízes e demais tecidos citados da planta, o que se reflete em seu perfil metabólico.



**Figura 11** Esquema representativo do perfil cromatográfico de (A) isouiginosina B, (B) uliginosina B, (C) extrato *n*-hexano de 20 g/L raízes adventícias de *H. polyanthemum* cultivadas por 4 semanas e (D) extrato *n*-hexano das folhas de *H. polyanthemum in natura*. Condições cromatográficas - CLAE: eluição isocrática ACN:H<sub>2</sub>O 95:5 (v:v) + 0,01% ATF, fluxo de 1 ml/min em coluna C<sub>18</sub> e detecção em  $\lambda = 220$  m.

## 5.6. CONCLUSÃO

A obtenção de moléculas inovadoras, com atividades farmacológicas relevantes e potencial aplicabilidade pela indústria farmacêutica, é um constante desafio quando sua origem provém de uma fonte vegetal. Quantidade e pureza são dois fatores limitantes que se seguem à observação de uma atividade biológica promissora para um produto natural. Neste sentido, esforços tem sido empregados no desenvolvimento de protocolos de cultivo eficientes, reprodutivos e seguros para plantas medicinais e seus derivados.

Neste sentido, o cultivo de células e tecidos, em especial de raízes adventícias, apresenta-se como uma vantajosa maneira para a busca do entendimento e manipulação de rotas biossintéticas, visto que se constitui em uma fonte de crescimento celular rápido e estável.

No presente capítulo, foi descrito o estabelecimento e estudos iniciais para a otimização de parâmetros para o cultivo de raízes adventícias de *H. polyanthemum*, espécie nativa do sul do Brasil que produz, como um de seus principais metabólitos, uliginosina B, derivado do floroglucinol com destacadas atividades analgésica e antidepressiva. As culturas obtidas em meio MΔ suplementado com 2 mg/L de AIB mostraram-se a mais adequada para a manutenção das subculturas, apresentando considerável acúmulo de biomassa em um intervalo de 2 semanas.

Os parâmetros estudados permitem concluir que, a partir do inóculo selecionado, o maior acúmulo de biomassa ocorre com 8 semanas de cultivo *in vitro*, sendo o meio MΔ acrescido de 3 a 5% de sacarose, as formulações que resultaram em maior crescimento das raízes. No entanto, a síntese de benzopiranos e floroglucinois não manteve-se nestes tecidos, que apresentaram perfil fitoquímico bastante diferenciado quando comparados aos verificado nas plantas da espécie. Esta modificação evidencia diferenciação na expressão gênica dos dois sistemas.

O Capítulo 4 foi realizado durante doutorado sanduíche, no *Institut für Pharmazeutische Biologie* na *Technische Universität Braunschweig*, em Braunschweig, na Alemanha. O trabalho foi orientado pelo Prof. Dr. Ludger Beerhues e supervisionado pela Dr. Mariam Gaid, no período de fevereiro de 2013 a janeiro de 2014.



**6 Chapter 4**

**TYPE III POLYKETIDE SYNTHASES IN *Hypericum polyanthemum***



## INTRODUCTION

Plant secondary metabolites are since long known to bring benefits for human health and are used as raw material for pharmaceutical industry (CANTER et al., 2005; PASSALACQUA et al., 2007; STANZIANI, 2008). Chalcones, stilbenes, phloroglucinols, resorcinol, benzophenones, biphenyls and pyrones comprise a wide array of biologic activities (ABE, 2008).

Among the traditionally used medicinal plants, species from *Hypericum* genus are employed for various therapeutic applications, such as treatment of wounds, skin inflammation, minor external burns and nerve pain. However, the most explored application is the antidepressant activity of *Hypericum perforatum*, attributed to the presence of acylphloroglucinol derivatives, reflecting the therapeutic relevance of the genus. Xanthones, benzophenones, flavonoids and naphthodianthrones are secondary metabolites also often reported for *Hypericum* species, and are catalysed for type III PKSs enzymes (FLORES-SANCHES and VERPOORTE, 2009, STEWARD JR et al., 2013).

The referred bioactive compounds are polyketide related structures and are included in a large class of structurally diverse natural products (CHAN et al., 2009). While structurally diverse, all polyketides are assembled by successive condensations between a thioesterified malonate derivative and an acyl thioester. For instance, flavonoids are known to be formed from naringenin chalcone, produced from chalcone synthases (CHS), and xanthones arise from benzophenone synthase reaction, affording phlorbenzophenone (2,4,6-trihydroxybenzophenone) that will further undergoes regioselective oxidative phenolic coupling by xanthone synthases thus forming xanthone molecules (PETERS et al., 1998). However, one of the most instigating biosynthetic pathway is the one affording molecules with phloroglucinol moiety.

The biosynthesis of such compounds is likely to involve isobutyrophenone synthase activity, forming the acylphloroglucinol scaffold. Nevertheless, the central step of this biosynthesis is still unresolved at the gene level and a cDNA

encoding this enzyme with a high preference for isobutyryl-CoA has not been cloned yet.

*Hypericum polyanthemum*, native to south of Brazil, is rich in phloroglucinol, benzopyran derivatives and produces traces of 6-deoxyjacareubin xanthone (HAAS et al., 2010). Xanthones were not detected in *in vitro* plants whereas cell cultures produced xanthones but lack benzopyrans. This differential accumulation of compounds must be related to differential expression of the respective enzymes and it provides a great chance of cloning cDNAs encoding PKSs involved in xanthone and benzopyran biosyntheses in *H. polyanthemum*. While some progress in revealing xanthone formation was made in the past years (BEERHUES and LIU, 2009), benzopyran and phloroglucinol biosynthesis is not well understood. So far, no polyketide synthase exhibiting clear preference for isobutyryl-CoA has been detected at the molecular level. Considering its phytochemical profile, with massive predominance of BUS-like derived products, *H. polyanthemum* offers an instigation chance to isolate, for the first time, an isobutyrophenone synthase cDNA involved in acylphloroglucinol formation.

## **6.1 OBJETIVES**

Considering the importance of polyketide derived compounds and the differentiated phytochemical profile in *H. polyanthemum* tissues, the objective of this work was to investigate the biosynthesis of type III PKSs derived product, with emphasis in BUS characterization.

## **6.2 REVISION**

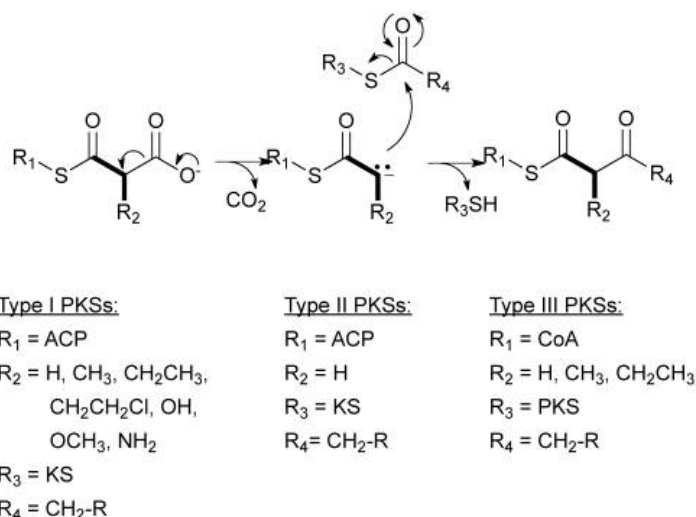
### **Polyketide synthases (PKSs)**

Polyketide synthases (PKSs) are the enzymes responsible for the synthesis of polyketide derived products. They evolved from fatty acid synthase enzymes (involved in primary metabolism) by gene duplication event followed by refunctionalization of the gene duplicates (AUSTIN and NOEL, 2003). Presenting



different modules, being at least acyltransferase (AT), acyl carrier protein (ACP) and  $\beta$ -keto acyl synthase ( $\beta$ -KS) activities, supplementary subunits such as ketoreductases, cyclases or aromatases define the folding pattern of the polyketo intermediate and further post-PKS modifications, such as oxidations, reductions or glycosylations are added to the polyketide (FLORES-SANCHEZ and VERPOORTE, 2009).

PKSs can act catalysing successive rounds of condensations between a thioesterified malonate derivative and an acyl thioester (Figure 12). They can operate as iterative or non-iterative manner, that is, with more than one or just one round of elongation catalysed in the ketosynthase domain. PKSs are categorized into three classes: types I, II and III.



**Figure 12** Basic mechanism of decarboxylative Claisen condensations for extender unit incorporation. ACP = Acyl carrier protein; KS = ketosynthase, PKS = polyketide synthase. Figure is identical copy from CHAN et al., 2009.

**Type I** describes multifunctional proteins that contain a different active site for each enzyme-catalysed reaction. This class is sub-grouped as iterative or modular and are usually present in fungal or bacterial systems (MOORE and HOPKE, 2001).

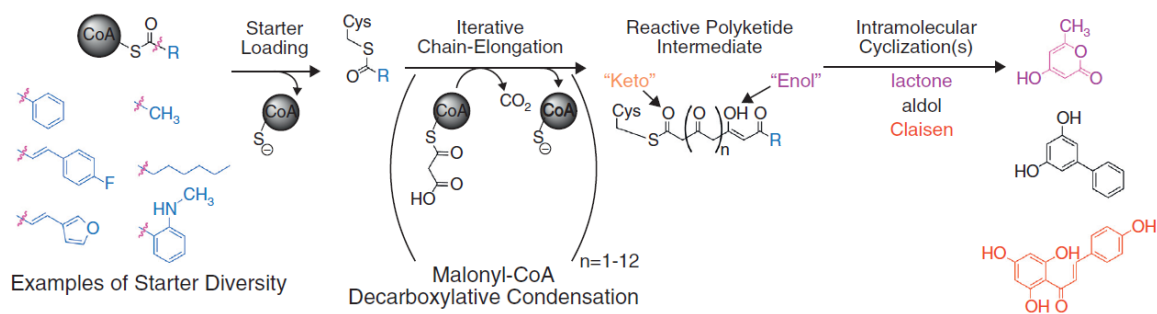
**Type II** is a system of individual enzymes that carry a single set of iteratively activities. The only known groups of organisms that employ type II

PKS systems for polyketide biosynthesis are soilborne and marine Gram-positive actinomycetes (FLORES-SANCHEZ and VERPOORTE, 2009).

**Type III** is present in bacteria, plants and fungi. This class is the predominant supplier of the most important plant biosynthesized natural compounds (AUSTIN and NOEL, 2003). The enzymes catalyse a sequential decarboxylative condensation of malonyl-CoA units to an aromatic or aliphatic CoA-thioester starter unit to form a linear polyketide chain that is further cyclized and aromatized in the same active site (AUSTIN and NOEL, 2003; SHI *et al.*, 2008; FLORES- SANCHEZ and VERPOORTE, 2009). They utilize a variety of different starter substrates ranging from aliphatic-CoA to aromatic-CoA substrates, from small (acetyl-CoA) to bulky (*p*-coumaroyl-CoA) substrates or from polar (malonyl-CoA) to nonpolar (isovaleroyl- CoA) substrates giving the plants an extraordinary functional diversification.

### **Type III PKS: prolific source of secondary metabolites**

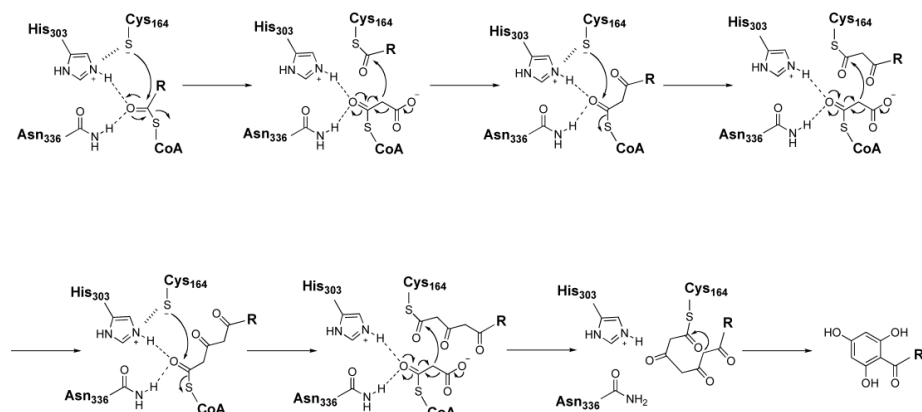
Type III polyketides are one of the most important families of natural products that exhibit a wide variety of bioactivities. Type III PKSs are simple homodimeric enzymes of 40–45 kilodalton (kDa) that conform the steric conditions to determinane acyl group binding, chain elongation, and tautomerization of reactive polyketide intermediates (STEWART JR et al, 2013). Through catalyses, a wide diversity of natural products are formed by varying the starter substrate (aliphatic or aromatic units), the number of acetyl additions (1–7), and the mechanism of ring formation used to cyclize linear polyketide intermediates (Claisen condensation, aldol condensation, or heterocyclic lactone formation) (Figure 13; AUSTIN and NOEL, 2003; FLORES-SANCHEZ and VERPOORTE, 2009).



**Figure 13** Chemical diversity is generated at multiple stages of the type III PKS reaction cycle. The biosynthetic potential of type III PKSs arises from the preferred starter molecule, variable numbers of chain-elongation steps, and alternative cyclization schemes of linear intermediates.

The mechanism of action proposed for these enzymes was based on crystallization studies with recombinant CHS from alfalfa plants (*Mendicago sativa*), which possess the highly conserved cysteine<sup>164</sup>-histidine<sup>303</sup>-asparagine<sup>336</sup> catalytic triad (numbered according to *Mendicago sativa*), characterizing its active center and present in all type III PKSs (Figure 14; FERRER et al., 1999). Contributing for catalytic efficiency, a number of relatively inert amino acids defines the shape and volume of the active site cavity, varying substantially between the functionally divergent members of the super family (LIU et al., 2007).

Roughly explained, reaction is initiated by a starter molecule loading at the active site Cys<sup>164</sup>, which is followed by iterative decarboxylative condensations of malonyl-CoA and the final cyclization of the enzyme-bound intermediate. Most importantly, the enzyme uses a single catalytic Cys<sup>164</sup>, and each chain elongation step involves cleavage of the once formed C–S thioester bond and the subsequent formation of a new C–C bond by the insertion of an additional C2 building block to produce a CoA-linked polyketide intermediate. The remarkable functional diversity of the CHS super family enzymes thus derives from the differences in the selection of the starter molecules, the number of the malonyl-CoA condensations, and the mechanisms of cyclization reactions.



**Figure 14** Proposed Mechanism of the Enzyme Reactions of Type III Polyketide Synthases ABE 2008

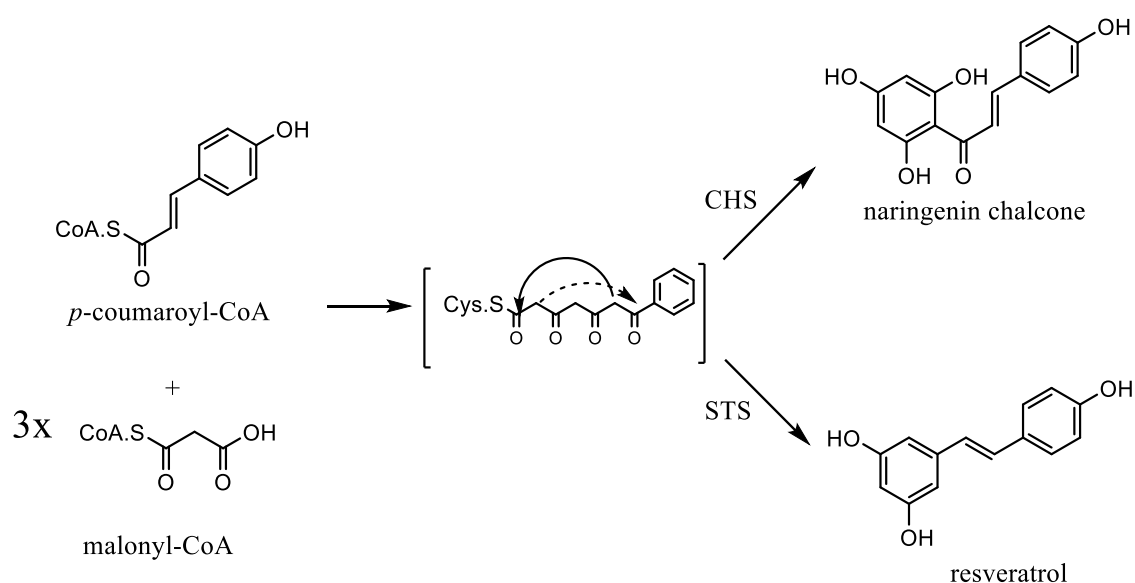
A growing number of type III PKSs have been cloned and characterised, such as chalcone synthase, benzophenone synthase, stilbene synthase and biphenyl synthase. According to its function and structure similarity, type III PKSs can be divided in four groups: CHS-family, including chalcone synthases (CHS), benzophenone synthases (BPS), isobutyrophenone synthases (BUS) and phlorisovalerophenone synthases (VPS); STS-type, containing stilbene synthases (STS), biphenyl synthases (BIS), bibenzyl synthases (BBS) and stilbenecarboxylate synthase (STCS); CTAS-type, comprising 2-pyrone synthase (2-PS), *p*-coumaroyltriacytic acid synthase (CTAS) and *C*-methylchalcone synthase (PstrCHSS2); miscellaneous group, counting oktaketide synthases (OKS), pentaketide synthases (PCS), hexaketide synthases (HKS) and aloesone synthases (ALS). The most studied enzymes pertain to CHS/STS-superfamily (FLORES-SANCHEZ and VERPOORTE, 2009).

### **Chalcone synthases (CHS) and stilbene synthases (STS)**

CHS and STS enzymes share 75%–90% amino acid sequence identity for their about 400 residues, and both enzyme families catalyze the same iterative condensation of three acetyl units (derived from the decarboxylation of malonyl-CoA) to a CoA-tethered phenylpropanoid starter molecule (derived from phenylalanine), most typically *p*-coumaroyl-CoA. However, STS enzymes cyclize the resulting tetraketide intermediate product via an intramolecular C2→C7 aldol

condensation, rather than the intramolecular C6→C1 Claisen condensation (Figure 15) (AUSTIN et al., 2004).

CHS catalyses sequential condensation of one *p*-coumaroyl-CoA molecule and three malonyl-CoA molecules formatting naringenin chalcone. After initial capture of the *p*-coumaroyl moiety, each subsequent condensation step begins with decarboxylation of malonyl-CoA at the CHS active site. The formed naringenin chalcone undergoes to flavonoids formation (FERRER et al., 1999).

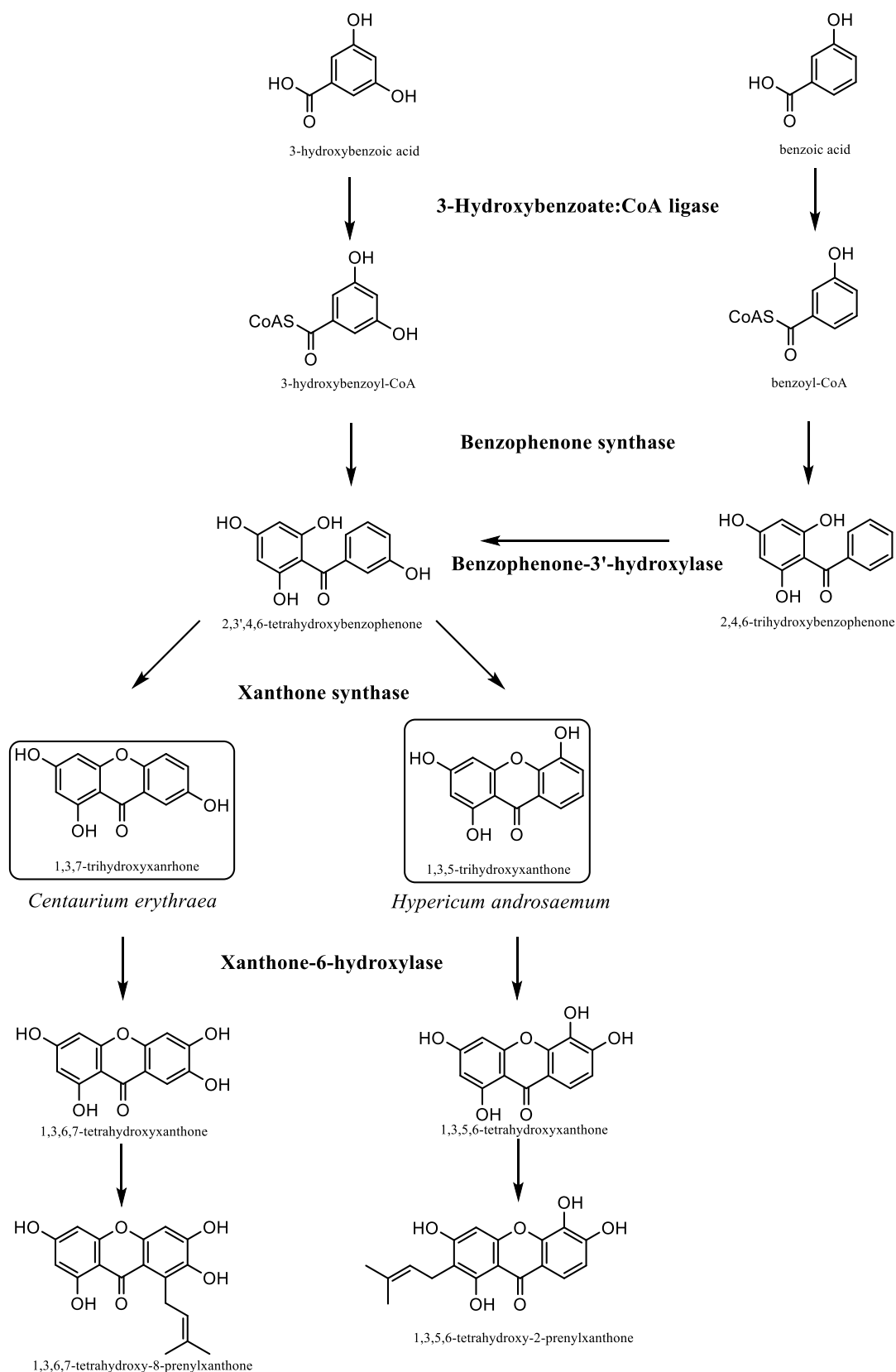


**Figure 15** CHS and STS reaction condensation of one molecule of *p*-coumaroyl and three molecules of malonyl-CoA. Alternative intramolecular cyclization patterns lead to different natural product scaffolds, and plane arrow depicts CHS C6→C1 Claisen condensation leading to hydroxylated chalcones, whereas dashed arrow shows the C2→C7 aldol condensation leading to the STS-synthesized resveratrol.

### Benzophenone synthase (BPS)

BPS catalyses the iterative condensation of benzoyl-CoA or 3-hydroxybenzoyl-CoA (itself formed through 3-hydroxybenzoate:CoA ligase) with three acetyl units from the decarboxylation of malonyl-CoA to form a linear tetraketide (LIU et al., 2003, 2007). The polyketide is formed and undergoes an intramolecular C6→C1 Claisen condensation to form 2, 4, 6-trihydroxybenzophenone (phlorbenzophenone) or 2, 3', 4, 6-tetrahydroxybenzophenone. Hereafter, the C13 skeleton intermediate 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone undergoes regioselective cyclisation by oxidative

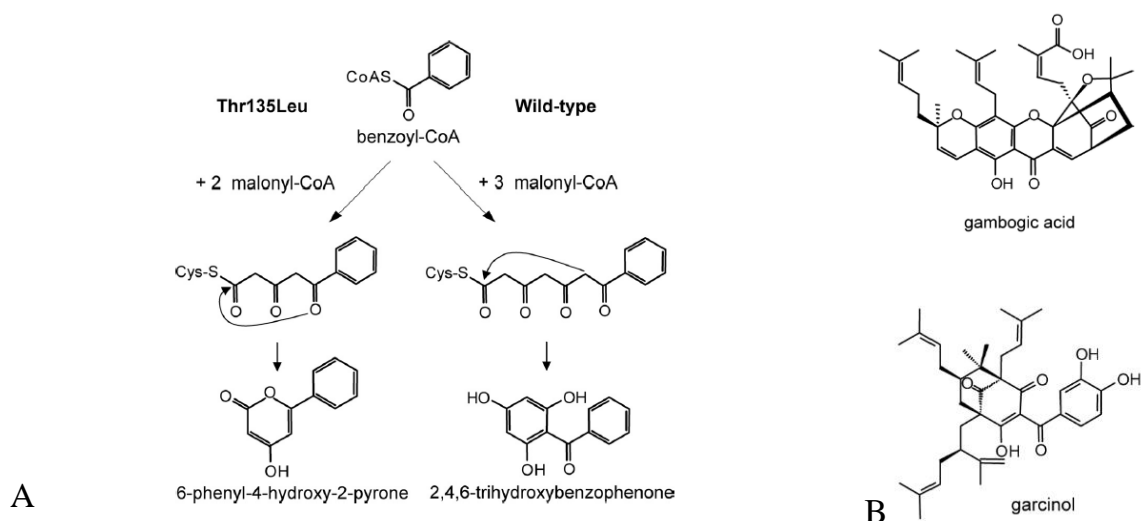
phenol coupling reaction to give rise to 1,3,5-trihydroxyxanthone via the para-position to the 3-hydroxy group in cell culture of *Centaurium erythraea*, whereas the same reaction occurs via the ortho-position, resulting in 1,3,7-trihydroxyxanthone in cell cultures of *Hypericum androsaemum* (SCHMIDT AND BEERHUES et al., 1998; PETERS et al., 1998). Xanthonenes, important class of secondary metabolites, are formed from benzophenone precursor and suffer several post-PKS reaction, such as prenylation, to give rise a broad variety of structures (Figure 16).



**Figure 16** Xanthone biosynthesis as further step of BPS catalysis. BPS reaction use either benzoyl-CoA or 3-hydroxybenzoyl-CoA affording 2, 3', 4, 6- tetrahydroxybenzophenone or 2, 4, 6- trihydroxybenzophenone, respectively. Further steps involving xanthone synthases will lead to xanthone skeleton formation by cyclisation oxidative phenol coupling orientation, and prenylation and other skeleton adornments, affording a diverse array of products.

## Phenylpyrone Synthase (PPS)

PPS functionally enzyme was obtained by point mutation of BPS, where threonine<sup>135</sup> was changed by a leucine residue (Thr<sup>135</sup>Leu). However, PPS was not yet detected as naturally occurring type III PKS. The reaction is characterized by the condensation of benzoyl-CoA with two malonyl-CoA giving an intermediate triketide, which cyclizes into phenylpyrone via intramolecular C-5 keto-enol oxygen→C-1 lactonization (Figure 17A; KLUNDT et al., 2009). This clear difference in both substrate and product specificity was rationalized by homology modelling and might be due to the opening of a new pocket that accommodates the phenyl moiety of the triketide intermediate but limits polyketide elongation to two reactions, resulting in phenylpyrone formation. This reaction is suggested to be related with the biosynthesis of caged polycyclic compounds, such as anti-tumoral and anti-inflammatory molecules (Figure 17B). Bicyclic bridge results from the stepwise prenylation of the benzophenone nucleus (BPS product) and concomitant intramolecular cyclization reactions of the attached C5 and C10 isoprenoid units (BEERHUES AND LIU, 2009).

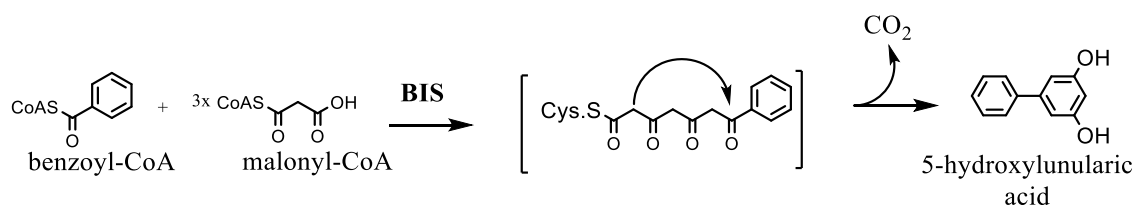


**Figure 17** (A) PPS Thr<sup>135</sup>Leu mutant, decarboxilatively condensating two units of malonyl-CoA and wild-type BPS condensating three molecules of malonyl-CoA with benzoyl-CoA to afford 2,4,6-trihydroxybenzophenone. PPS functionality might be related to the synthesis of (B) caged xanthenes such as garcinol and gambogic acid.



### Biphenyl synthase (BIS)

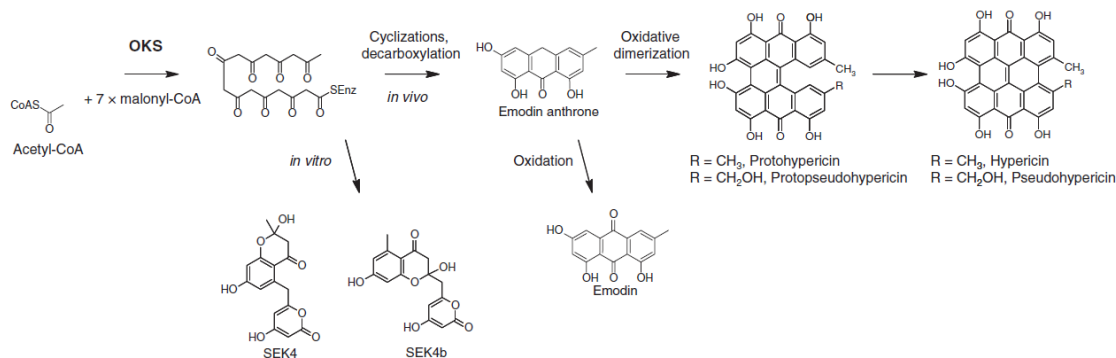
Similarly to BPS, BIS catalyses decarboxylative condensation of three molecules of malonyl-CoA with one of benzoyl-CoA to form the same linear tetraketide intermediate. However, intramolecular cyclization occurs as C2→C7 aldol condensation with decarboxylative elimination of the terminal carboxyl group, giving 3,5-dihydroxybiphenyl (Figure 18; LIU et al., 2007). BIS is the key enzyme of biphenyl metabolism, phytoalexins present in Maloideae family, which includes a number of economically important fruit trees, such as apple (*Malus domestica*), pear (*Pyrus communis*), and quince (*Cydonia oblonga*) (BEERHUES and LIU, 2012).



**Figure 18** BIS reaction showing aldol cyclazation (C2→C7) of linear tetraketide intermediate bonded in a cysteine residue to form biphenyl 5-hydroxylunularic acid as final product.

### Oktaketide synthase (OKS)

OKS was studied in *H. perforatum* plants and was related to anthraquinone biosynthesis, such as hypericin and pseudohypericin. Its catalyses is currently poorly understood but it is suggested that OKS condensates acetyl-CoA with seven malonyl-CoA resulting in tri- to oktaketide products to form an oktaketide chain, including oktaketides SEK4 and SEK4b as shunt products. Subsequently, this oktaketide chain undergoes cyclizations and decarboxylation to form emodin anthrone, precursor of the hypericin (Figure 19; KARPINNEN et al., 2008).

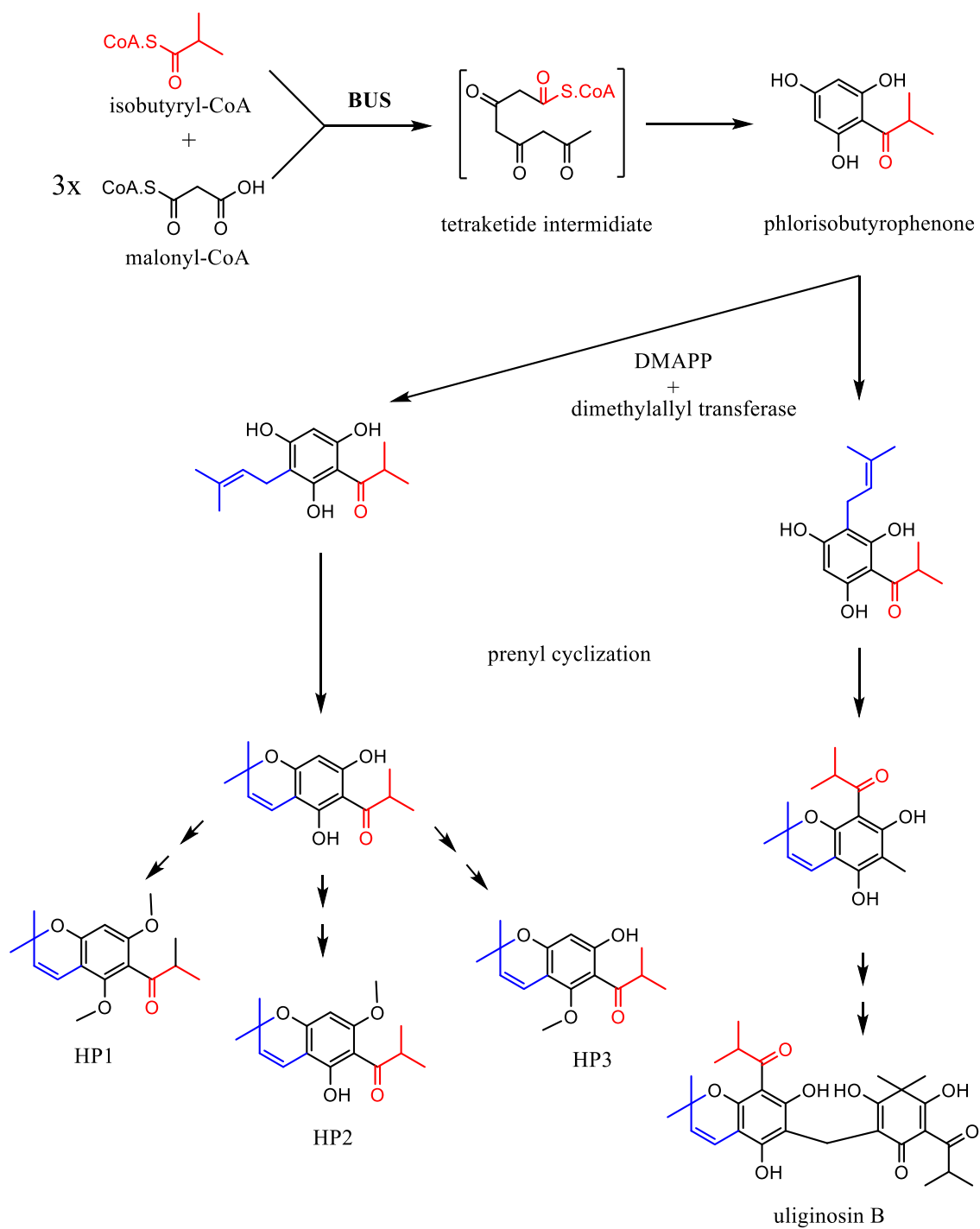


**Figure 19** Putative reaction of OKS involved in the biosynthesis of hypericins in *H. perforatum*. *In vivo*, it is suggested that OKS condensates one acetyl-CoA with seven malonyl-CoA to form an octaketide chain that subsequently undergoes cyclizations and decarboxylation to form emodin anthrone. It is possible that *in vitro* OKS affords shunt products SEK4 and SEK4b in the absence of some additional, yet unidentified factors (KARPPINEN et al., 2008).

### Isobutyrophenone (BUS) and biosynthesized products in *H. polyanthemum*

BUS catalyses the condensation of isobutyryl-CoA with three molecules of malonyl-CoA to give a linear tetraketide intermediate which is cyclized by intramolecular Claisen condensation to yield phlorisobutyrophenone (KLINGAUF et al., 2005). Phlorisobutyrophenone is the precursor of hyperforin, the major biologically active constituent of *H. perforatum* (KLINGAUF et al., 2005; BEERHUES, 2006). Further steps will lead to aromatic prenyltransferases are integral membrane proteins and their catalytic cavities include a typical prenyl diphosphate binding site.

Benzopyrans and phloroglucinol derivatives, as uliginosin B, present in *H. polyanthemum* extracts is likely to involve phlorisobutyrophenone formation, prenylation, pyran ring formation, and C- and O-methylations with additional steps leading to the formation of the dimeric structure, and afford an interesting system for BUS investigations (Figure 20).



**Figure 20** BUS reaction by condensating isobutyryl-CoA with three molecules of malonyl-CoA, giving phlorisobutyrophenone, and prenylation followed by prenyl cyclization, proposed as further steps leading to benzopyrans and uliginosin B formation.

## 6.3 MATERIALS AND METHODS

### 6.1 Tissue cultures and phytochemical analysis

Plant tissues used in the present work were previously established or were initiated along with these studies. Cells, roots and plants used during the sandwich PhD work accomplished in Germany were properly carried abroad under authorization of the *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* (IBAMA, authorization number 12BR009762/DF).

#### 6.4.1.1 *In vitro* *Hypericum polyanthemum* plants

*In vitro* cultures of *H. polyanthemum* plants were established (BERNARDI et al., 2007) in MΔ medium (MAURMANN et al., 2008). Plants were cultured under controlled growth conditions ( $25 \pm 2$  °C, light intensity of  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and photoperiod of 16 hours) and subdivided by apical tip excision every 8 weeks. Plants used for type III PKS studies were cultivated under the same environmental conditions but in MS full medium formulation, at the host laboratory *Technische Universität Braunschweig*, Germany.

#### 6.4.1.2 Establishment of callus and cell suspension cultures

Callus cultures of *H. polyanthemum* were established from leaf explants of *in vitro* plants. Leaf explants were transferred to semisolid Murashige and Skoog medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962) modified according to Maurmann and co-workers (2008), supplemented with different auxin and cytokinin concentrations (IBA, NAA, 2,4-D, and kinetin). After approximately 14 days, the first calli sprouted out and were then subcultured to the same medium every 2 weeks. When callus growth was stable they were able to grow on ½MS semisolid medium. Cultures were maintained in darkness at the temperature of  $25 \pm 2$  °C.

### **6.4.1.3 Establishment of root cultures**

Root cultures were established from the same micropropagated plant material for callus initiation, as described in Chapter 3. *In vitro* plants of *H. polyanthemum* were cultivated on semisolid MΔ medium (MAURMANN et al., 2008) without growth regulators. Leaf explants were excised from plants and placed horizontally on medium surface supplemented with different concentrations of NAA, IAA, IBA, 2,4-D and kinetin. Leaves were cultured in dark for approximately 14 days, when the first root segments sprouted out in cultures from medium supplemented with IBA. These segments were transferred for the same fresh medium every 2 weeks.

After numerous root segments formation, cultures were transferred for the liquid medium and cultivated under light protection in a rotatory shaker (100 rpm) with the same conditions mentioned above. Roots were subdivided each 2 weeks intervals to fresh liquid ½ MS medium supplemented with 1 mg/L IBA, since it was efficient on root promotion.

### **6.4.1.4 Metabolite extraction**

Benzopyrans, phloroglucinol derivative uliginosin B and xanthones were analyzed in *H. polyanthemum* cultures.

#### **6.4.1.4.1 Benzopyrans and phloroglucinol extraction**

The three benzopyrans and the phloroglucinol derivative uliginosin B were extracted by ultrasound-assisted extraction (20 minutes sonication, 5 times) with *n*-hexane. Solvent was evaporated under reduced pressure until dryness, residue was resuspended in methanol, filtered through an acetate cellulose membrane (0.22 μm) and analyzed by HPLC.

#### 6.4.1.4.2 Xanthenes extraction

To isolate the xanthenes, *in vitro* grown cells, roots and plants of *H. polyanthemum* (1 g fresh weight) were homogenized for 10 minutes in a mortar with 5 mL acetone. The extract was separated by centrifugation at 4000 rpm for 20 minutes and the acetone evaporated in a rotatory vacuum evaporator till dryness. The residue was dissolved in 1 mL methanol, vortexed carefully and filtered through an acetate cellulose membrane (0.22  $\mu\text{m}$ ) and analyzed by HPLC.

#### 6.4.1.5 HPLC analysis

Benzopyrans were analyzed in a Waters C<sub>18</sub> column (4 $\mu\text{m}$  x 3.9  $\mu\text{m}$  x 150 mm) using a Shimadzu liquid chromatography equipment under isocratic conditions (acetonitrile:water, 60:40, v:v), flow rate of 1 mL/min and detection at 270 nm. Extracts aiming phloroglucinol derivative uliginosin B analysis were separated along with the same column under isocratic conditions (acetonitrile:water, 95:5, v:v + 0.01% TFA), flow rate of 1 mL/min and detection at 220 nm.

Xanthenes were analyzed by Phenomenex<sup>TM</sup> (Torrance, USA) C<sub>18</sub> column (5 $\mu\text{m}$  x 3.9  $\mu\text{m}$  x 150 mm) using an Agilent HPLC system, equipped with a dual absorbance detector and gradient elution described in Table 3. The flow rate was 0.5 mL/min and detection at 254 nm. Chromatograms were analyzed with Agilent ChemStation software. Analysis of xanthenes was done by comparing the UV spectra of the individual peaks with authentic reference xanthenes.

**Table 3** Gradient elution method from xanthenes analysis. Solvent ratio is expressed as percentage of volume and changes were linearly processed.

Run time	Water	Acetonitril
0 min	60	40
6 min	40	60
12 min	35	65
15 min	0	100
20 min	60	40

#### **6.4.1.6 LC-MS analysis**

Isolated xanthones from *H. polyanthemum* cells were analyzed by LC-MS on a QTRAP 3200 system (Applied Biosystems/MDS Sciex). Samples were directly introduced into an ESI source (Turbo V; Applied Biosystems/MDS Sciex) using a Hamilton syringe pump and a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was operated in the positive mode with a source voltage and declustering potential of 5.5 kV and 76 V, respectively. Nitrogen gas was used for nebulization and all parameters were optimized according to standard methods already established in the host laboratory (GAID et al., 2012).

#### **6.4.2 Biochemical methods**

##### **6.4.2.1 Preparation of cell-free extracts and protein measurement**

Protein extraction and incubation was carried out as described previously (SCHMIDT and BEERHUES, 1997; KLINGAUF et al., 2005; BOUBAKIR et al., 2005). Cultured cells (3 g) were ground with 10% (w:w) polyclar AT and homogenized in 3 mL of 0.1M HEPES buffer (pH 8) containing 10 mM DTT freshly added. Samples were centrifuged (10000 rpm, 5 min, 4°C) and the supernatant (ca. 2.5 mL) was desalted through a PD10 column using 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5. All steps were performed at 0-4°C. Total protein concentration was determined by binding of proteins to Coomassie brilliant Blue G 250 (BRADFORD, 1976). In the photometric assay, the binding ability causes a shift in the absorbance from 465 nm to an intense band at 595 nm. In the assay, 10 µL sample was mixed with 90 µL buffer and 900 µL Bradford-dye solution. The assay was performed in a cuvette of one cm width at 595 nm in an UV/VIS spectrophotometer. Protein concentrations were calculated through a calibration curve.

### 6.4.2.2 Biochemical characterization of HpoBPS

For biochemical characterization of HpoBPS enzyme, pure recombinant protein was used. All incubations were performed in triplicate and average values were calculated.

#### 6.4.2.2.1 Enzymatic assays

The preferred starter substrates for the polyketide synthase reactions are isobutyryl-CoA and benzoyl-CoA if isobutyrophenone synthase or benzophenone synthase activities are present, respectively. The extender substrate is malonyl-CoA for both enzymes. Enzymatic products were analyzed by LC-DAD with 20  $\mu$ L injection, 0.5 mL/min flow rate and gradient elution as follows in Table 4:

**Table 4** Gradient elution method from xanthenes analysis. Solvent ratio is expressed as percentage of volume and changes were linearly processed.

<b>Run time</b>	<b>Water</b>	<b>Acetonitril</b>
0 min	30	70
5 min	30	70
17 min	60	40
25 min	60	40
27 min	70	30
30 min	100	0
35 min	30	70

#### 6.4.2.2.2 Determination of optimum pH

For examination of the optimum pH, 0.1 M potassium phosphate buffer ranging from pH 5.5 to 7.5 and 0.1 M Tris-HCl buffer ranging from pH 8 to 10 were used in incubation assays.

#### 6.4.2.2.3 Linearity with protein amount and incubation time

The amount of enzymatically formed 2,4,6-trihydroxybenzophenone (nmol) was determined as a function of the protein amount in the standard assay (1 -50  $\mu$ g protein) and the incubation time (from 0 till 40 min).



#### **6.4.2.2.4 Study of substrate specificity**

HpoBPS assays were performed using benzoyl-CoA, isobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA, butyryl-CoA, hexanoyl-CoA, octanoyl-CoA, 2-hydroxybenzoyl-CoA and 4-hydroxybenzoyl-CoA as starter substrates and malonyl-CoA as extender substrate. All starter substrates were used at a final concentration of 8  $\mu$ M. Protein amount was 4  $\mu$ g per 250  $\mu$ L assay.

#### **6.4.2.2.5 Determination of kinetic parameters**

At optimum pH, temperature, and incubation time, the kinetic properties of HpoBPS were determined using different concentrations of substrates. Appropriate enzyme concentration (4  $\mu$ g) was chosen so that the reaction velocity was linear during the assay period. The  $K_m$  values for the HpoBPS substrates were calculated from Michaelis-Menten plots using Hyper 32, a hyperbolic regression programme for the analysis of enzyme kinetic data (<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/software.html>).

### **6.4.3 Molecular biology methods**

#### **6.4.3.1 Design of gene specific primers**

A primer usually requires a minimum of 18-25 nucleotides complementary to the sequence of interest and a GC content of approximately 45-55%. If the introduction of a restriction site is required, it should be flanked by 3-10 “spacer” nucleotides at the 5' end of the primer to allow an efficient digestion close to the end of the cDNA as in case of overexpression primers.

The first screening of type III PKS sequences in *H. polyanthemum* tissues was performed with PKS overexpression primers previously designed for other

*Hypericum* species as listed in Table 5. HpBUS was designed by Belhadj (2013) and resulted in a PKS with both BUS and BPS activities. HpaBPS (TOCCI, 2013) and HaBPS (LIU et al., 2003) are BPS from *H. perforatum* var *angustifolium* and *H. androsaemum*, respectively.

**Table 5** Type III PKSs overexpression primers for *Hypericum* species.

	Sequence	Reference
Forward	5'-ATGGCTAGCATGGCGCCTGCTATGGAATACTC-3'	HpBUS
Reverse	5'-ACAGGTACCCTAGTGCAGGATGGGGACAC-3'	(BELHADJ, 2013)
Forward	5'-GCATGCTAGCATGGCCCCAGCAATGGAATA-3'	HpaBPS
Reverse	5'-AGGGGTAGGAGGTCCTCCATGGTACG-3'	(TOCCI, 2013)
Forward	5'-ATGCCGCGCATGGAGTACTCAAC-3'	HaBPS
Reverse	5'-GGGCTAGGTCCTGGAGAATTGGGACTCTGG-3'	(LIU et al., 2003)

Following investigations required gene-specific primers (GSP) and their design was executed by or straightly supervised during execution by Dr. Mariam Gaid.

Degenerate and universal primers were also used with different purposes through the variety of accomplished amplifications (Table 6).

**Table 6** Primers used in different amplifications.

Purpose	Primer	Sequence
Reverse transcription	SMART II	5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
	5'-CDS	5'-(T)25 N-1N-3'
	3'-CDS	5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T)30 N-1N-3'
5' or 3'RACE	RACE-long	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT-3'
	RACE-short	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
Terminal transferase PCR	AAP <sup>1</sup>	5'-GGC CAC GCG TCG AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3'
	AUAP <sup>2</sup>	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGTAC-3'
5'end /promoter region amplification	TATA <sup>3</sup>	5'-GAT TCT AGA (CT) (CT)5 CTA TA(AT) A(AT)A (GC) (AC)-3'
Universal primers for sequence	M13	5'-TGTAACGACGCGCCAG-3'
	SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
Degenerate primers	ScPKSdpF1 <sup>4</sup>	5'-TA(CT)(CA)A(ATGC)CA(AG)GG(ATGC)TG(CT)TT (CT) GC-3'
cDNA quality control	Forward-18S <sup>4</sup>	5'-TGATGGTATCTACTACTCGG-3'
	Reverse-18S <sup>4</sup>	5'-AATATACGCTATTGGAGCTGG-3'

<sup>1</sup>Abridged Anchor Primer;

<sup>2</sup>Abridged Universal Amplification Primer;

<sup>3</sup>GUO et al., 2011;

<sup>4</sup>Designed by Dr. Mariam Gaid at *Intitut für Pharmazeutische Biologie*

#### **6.4.3.2 Isolation of total RNA and genomic DNA**

Isolation and purification of total RNA were performed using the RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) and GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Fermentas) whereas genomic DNA was extracted and purified through a DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen).

Cell and root cultures and *in vitro* plants of *H. polyanthemum* (100 mg) were harvested, ground with liquid nitrogen and stored at -80 °C or readily used for RNA and genomic DNA extraction. Using silica-gel membrane technology procedure to isolate nucleic acids from biological samples, a chaotropic agent together with a silica based nucleic acid binding solid phase were used. Guanidine hydrochloride at pH 3 to 5 or guanidine thiocyanate at higher pH, combined with other salts, is used as the chaotropic agent. After binding of the DNA to the solid surface, the solid phase is washed with the chaotropic agent to remove any biological contamination followed by treatment with 70% ethanol to remove the chaotrope. The DNA is eluted using water or 10 mM Tris-HCl at pH 8, readily used or stored at -20°C. Purified RNA was used either directly for reverse transcription or stored at -80°C. Genomic DNA can be stored with relatively high stability at -20°C.

#### **6.4.3.3 Quantification of RNA and DNA concentration**

The concentration of nucleic acids was spectrophotometric determined by measuring the absorbance value of the RNA samples at wavelength of 260 nm. One unit absorbance value at 260 nm ( $\epsilon_{260}$ ) corresponds to 40 ng/ $\mu$ L of single stranded RNA or 50 ng/ $\mu$ L of double-stranded DNA (SAMBROOK et al., 2001).

The calculation was as follows:

Concentration (DNA or RNA in ng/ $\mu$ L) =  $\epsilon_{260}$  x Absorbance x dilution factor. Purity is determined by calculating the ratio of absorbance at 260 nm and at 280 nm. Pure samples having an  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.8-2.0 ensure the appropriate

quality. Contaminations with proteins or phenolics would reduce this value due to their absorbance at 280 nm.

#### 6.4.3.4 Reverse Transcription

Reverse transcription reaction is used to synthesize the first cDNA strand from total RNA, an oligo dT primed single strand DNA complementary to the respective mRNA. The reaction is catalysed by a RNA-dependent DNA polymerase and after reverse transcription, RNA template is degraded by incubation with RNaseH at 37 °C for 20 min.

RNaseH is an endoribonuclease that specifically hydrolyzes the 5'-phosphodiester bonds of RNA, which is hybridized to DNA. The reverse transcription reaction product can be directly used or stored at -20°C.

cDNA for overexpression studies was obtained from freshly ground cells and *in vitro* plants (with liquid nitrogen) by traditional reverse transcription with 5' and 3'CDS primers using a reverse transcriptase enzyme, H Minus Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuL V RT).

The components described in Table 7 were orderly added for cDNA synthesis:

**Table 7:** Standard procedure for reverse transcription reaction.

3'-RACE-cDNA		5'-RACE-cDNA	
Poly(A)-RNA 1 µg	4-10 µL	Poly(A)-RNA 1 µg	4-10 µL
3'-CDS Primer 10 pmol	1 µL	5'-CDS Primer 10 pmol	1 µL
Nuclease free water up to	12.5 µL	Nuclease free water up to	12.5 µL
Tubes were incubated in thermocycler at 70 °C for 5 minutes and the following components were added to both tubes at 37 °C after brief cooling in ice			
5x Buffer		4 µL	
Reverse transcriptase		1 µL	
10 mM dNTP Mix		2 µL	
RNase inhibitor (40 U/µl)		0.5 µL	
Nuclease free water add up to		20 µL	
The reaction mixture was incubated at 42 °C for 90 min, followed by heat inactivation of the enzyme at 70 °C for 15 min.			

### 6.4.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR is carried out by using two oligonucleotide primers that flank the DNA fragment to be amplified. These primers hybridize the opposite strands of the target sequence and are oriented so that DNA synthesis proceeds by the polymerase across the region between the primers. This segment is doubled in every cycle of the PCR resulting in an exponential accumulation of the specific fragment. Standard PCR is described in Table 8 Reaction procedure for standard PCR.:

**Table 8** Reaction procedure for standard PCR.

Component	Volume
DNA (1 µg)	1 µL
Forward primer (10 pmol )	1 µL
Reverse primer (10 pmol )	1 µL
10x reaction buffer with 20 mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
DNA polymerase (5U/µL)	0.1 µL
Nuclease free water up to	25 µL

### 6.4.3.6 Touchdown PCR

Touchdown PCR was used when increase in specificity was required. This technique allows to select a broad range of annealing temperatures, which begins from 5 to 10 °C higher than melting temperature ( $T_m$ ) of the universal primer, then decreasing 0.5 °C per cycle until it reaches 5 °C below the  $T_m$  of the GSP.

Touchdown PCR programme described in Table 9 Touch down PCR standard program.:

**Table 9** Touch down PCR standard program.

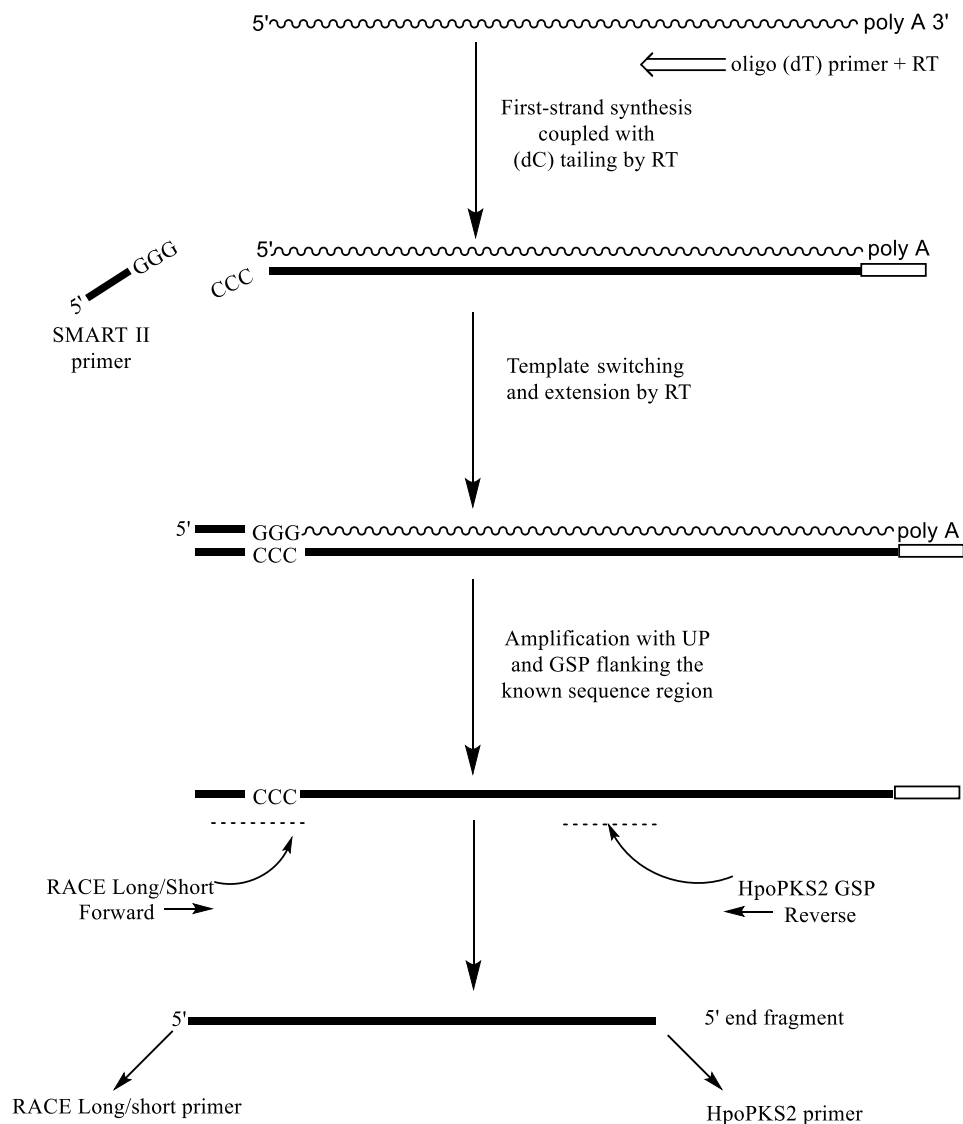
Step	Temp [°C]	Time [s]	Cycles
1	94	180	
2	70	Pause	
3	94	45	
4	$T_m+5^{\circ}\text{C}$	45	$T_m$ decrease 0.5 degree each cycle
5	72	60	10x from step 3
6	94	45	
7	$T_m$	45	
8	72	120	30x from step 6
9	72	600	

### 6.4.3.7 5' RACE

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) is a polymerase chain reaction-based technique developed to obtain the full length cDNA by extending a cDNA fragment toward its 5'- or 3'-ends. Messenger RNA, cDNA and gDNA from *in vitro* *H. polyanthemum* plantlets were used as template for HpoPKS2 5'-end isolation. Based on sequence information from 3'-end and middle fragments of target sequence, reverse primers have been designed to amplify the missing 5'-end along with universal primers, hence assembling the full-length sequence. Three protocols with different strategies were used for 5' RACE procedures

#### 6.4.3.7.1 SMART II protocol

Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript (SMART) provides a mechanism for generating full-length cDNAs in reverse transcription reactions (ZHU et al., 2001). This is possible by the joint action of a modified oligo (dT) primer (SMART II-primer) and a variant of M-MuL V RT enzyme (PowerScript™ Reverse Transcriptase) that, upon reaching the end of an RNA template, exhibits terminal transferase activity adding 3–5 residues (predominantly dC) to the 3' end of the first-strand cDNA. The SMART II-primer contains a terminal stretch of G residues that anneal to the dC-rich cDNA tail and serves as an extended template for RT. Hence the enzyme switches templates from the mRNA molecule to the SMART II generating a complete cDNA copy of the original RNA with the additional SMART sequence at the end. Further steps amplify the new cDNA into its 5'-end using gene specific primers of the previous known 3'-end fragment and a SMART II complementary overhanged poly-C primer (Figure 21).



**Figure 21** 5'RACE following Smart II protocol with special reverse transcriptase (RT) aiming full length assembly. After tagged 5' end with Smart II primer, universal primers (UV) might be used against gene specific primer (GSP) flanking known region to amplify the unknown 5' end.

#### 6.4.3.7.2 Poli-C tailed cDNA using terminal transferase

The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT), a template-independent DNA polymerase, catalyses the repetitive addition of deoxyribonucleotides to the 3'-OH of single-stranded and double-stranded DNA. The TdT requires an oligonucleotide of at least three nucleotides to serve as a primer. 5' cDNA obtained from *in vitro* plants were used as template. Poli-C tailing reaction occurred as shown in Table 10:

**Table 10** General procedure for poli-C tailing 5'cDNA

<b>Step</b>	<b>Procedure</b>	
1 <sup>st</sup>	5x tailing buffer	5 µL
2 <sup>nd</sup>	5' cDNA	10 µL
3 <sup>rd</sup>	2mM dCTP	25 µL
4 <sup>th</sup>	Water	up to 24 µL
5 <sup>th</sup>	Incubate for 2 minutes at 94 °C	
6 <sup>th</sup>	Briefly chill in ice	
7 <sup>th</sup>	TdT enzyme (20 U/µL)	1 µL
8 <sup>th</sup>	Incubate 10 minutes at 37 for TdT °C catalysis	
9 <sup>th</sup>	Incubate 10 minutes at 65 °C for enzyme inactivation	

#### 6.4.3.7.3 TATA box protocol

The TATA-box is a conserved region in the promoter of most plant genes. The TATA box protocol (GUO et al., 2011) allows the amplification of the unknown 5'-end of a full length sequence using forward degenerated primers designed according to the TATA box nucleotide frequency matrices (SHAHMURADOV et al., 2003) and three reverse gene-specific primers of the gene of interest designed to perform nested PCR. A sequence of reactions is performed initially with 1 µL of genomic DNA. Second round reaction use 1 µL of first round PCR product as the template, while 25 dilutions of second round PCR product served as template of third round PCR. Three different reverse gene-specific primers (GSP) complementary to a known coding region and with higher annealing temperature ( $T_a$ ) than degenerate primers (TD) were used. Amplifications strategy occurred as shown in Table 11

**Table 11** Standard reaction for TATA box amplification.

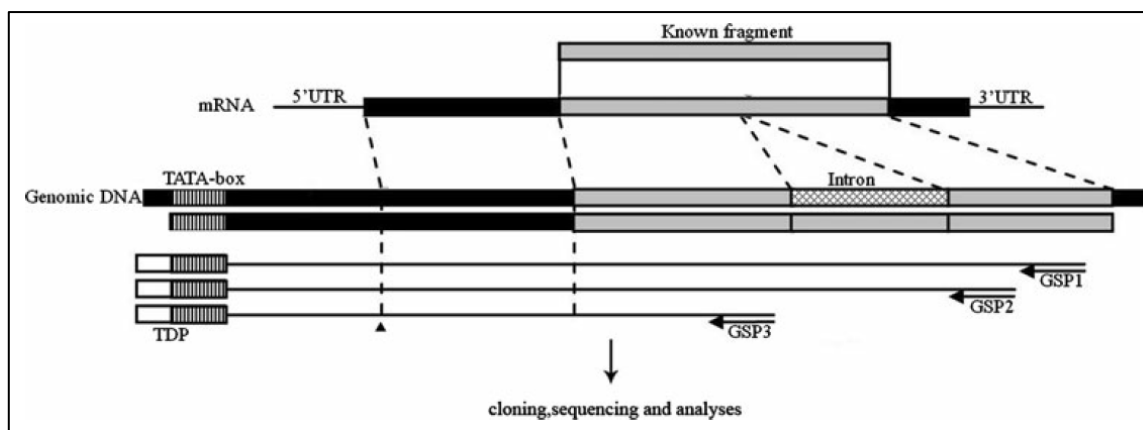
<b>Component</b>	<b>Volume</b>
DNA (1 µg)	5 µL
TD primer (50 pmol )	1 µL
Reverse primer GSP (10 pmol )	1 µL
10x reaction buffer with 20mM MgCl <sub>2</sub>	2.5 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Polymerase (5 U/µL)	0.25 µL
Nuclease free water	up to 25 µL



**Table 12** PCR program for TATA box amplifications.

Step	1 <sup>st</sup> reaction			2 <sup>nd</sup> and 3 <sup>rd</sup> reactions		
	Temp (°C)	Time (s)	Cycles	Temp (°C)	Time (s)	Cycles
1	98	180		98	180	
2	70	120		70	120	
3	95	30		95	30	
4	48-47	30		61	30	
5	72	150	5x from step 3	72	150	3x from step 3
6	95	30		95	30	
7	30	40		56	30	
8	72	150		72	150	3x from step 6
9	95	30		95	30	
10	58	30		59	30	
11	72	150	4x from step 9	52	150	3x from step 9
12	95	30		95	30	
13	56	30		56	30	
14	72	150	9x from step 12	72	150	15x from step 12
15	72	300		72	300	
16	8	pause		8	pause	

Since genomic DNA is used as template for amplification, 5' UTR and introns must be also obtained. Three amplifications are performed with different GSP to increase the specificity of the final fragment (Figure 22 Schematic presentation of the amplification of the 5'-end from genomic DNA using TATA box degenerated primers (TDP). The known fragment of the gene of interest is shown in gray. The black triangle represents the translation start site. The three rounds of amplifications are performed with TATA box degenerated primer as the forward and GSP1, GSP2 and GSP3 as reverse primer, respectively. Figure is identical copy from GUO et al., 2011.).



**Figure 22** Schematic presentation of the amplification of the 5'-end from genomic DNA using TATA box degenerated primers (TDP). The known fragment of the gene of interest is shown in gray. The black triangle represents the translation start site. The three rounds of amplifications are performed with TATA box degenerated primer as the forward and GSP1, GSP2 and GSP3 as reverse primer, respectively. Figure is identical copy from GUO et al., 2011.

#### 6.4.3.8 Agarose gel electrophoresis

Agarose gels were prepared at concentrations from 0.8 to 2% agarose in electrophoresis buffer according to the expected band size. Either ethidium bromide or ready solution of Midori Green were added to enable visualization of bands under UV light.

#### 6.4.3.9 Purification of DNA from agarose gels

The purification of fragments after gel electrophoresis was performed using the Innu PREP DOUBLE Pure Kit (Analytic Jena Biosolution) to obtain clean DNA fragment. DNA was adsorbed to silica gel membrane in the presence of high concentration of chaotropic salts. Contaminants were washed out and the DNA was eluted with a low ionic strength elution buffer or water.

#### 6.4.3.10 Cloning of PCR products

After amplification, purified bands were ligated with vectors for sequencing and overexpression as outlined in Figure 23.

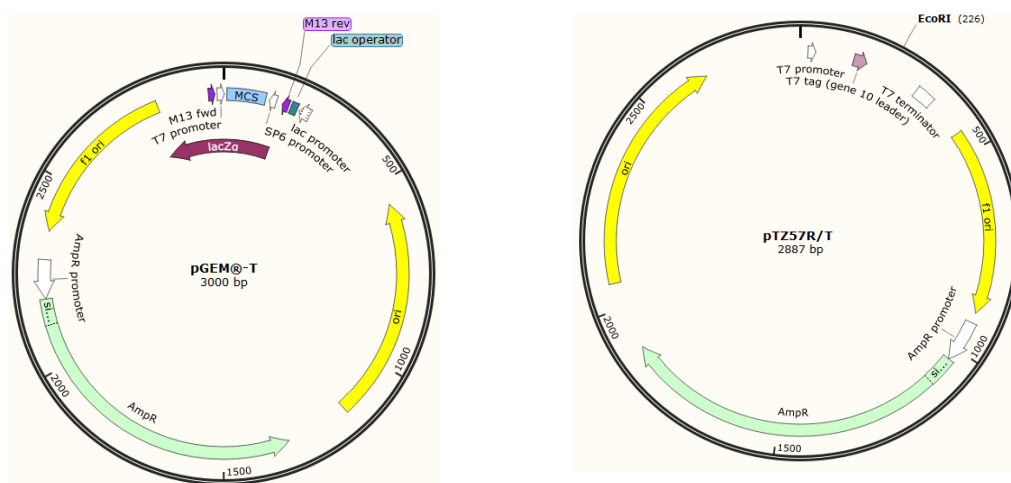


**Table 13** Restriction digestion procedure for *NheI* and *KpnI*.

<i>NheI</i> restriction digestion		<i>KpnI</i> restriction digestion	
Component	Volume	Component	Volume
5'cDNA	8.5 $\mu$ L	5'cDNA	8.5 $\mu$ L
10X Tango buffer	1 $\mu$ L	10X <i>KpnI</i> buffer	1 $\mu$ L
<i>NheI</i> (10U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L	<i>KpnI</i> (10U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L

### 6.4.3.10.2 Ligation into T-vector

During 5'RACE trials, pGEM-T vector (Promega<sup>TM</sup>) and pTZ57R/T vector (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) were used (Figure 24). These vectors allow direct cloning of *Taq*-polymerase amplified PCR products. They are around 3 Kb linearized plasmid, prepared by cutting the vector with *EcoRI* restriction enzyme and adding a 3' terminal thymidine to both ends. *Taq*-polymerase is a non-proofreading DNA polymerase, which adds a single "A" overhang to each 3'-end of the PCR product. The resulting PCR product can be directly ligated into a linear vector with a 3' terminal "T" at both ends. Ligation occurred as described in (Table 14).



**Figure 24** pGEM-T and pTZ57R/T vectors maps. T7 and SP6 promoters are present in the former and T7 promoter, in the latter.

**Table 14** Ligation procedure of purified DNA into p-GEM-T Easy and pTZ57R/T vectors.

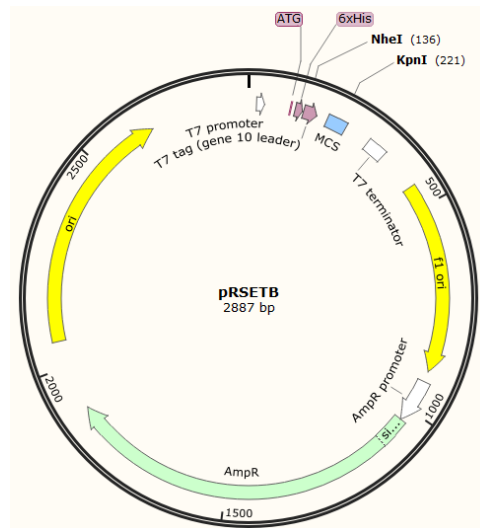
Component	Volume
Insert (poli-A DNA)	7.8 $\mu$ L
Vector	1 $\mu$ L

10X T4 DNA ligase buffer	1 $\mu$ L
T4 DNA ligase (2U)	0.2 $\mu$ L
Incubate overnight at 4°C	

#### 6.4.3.10.3 Ligation into pRSETB vector

pRESTB expression vector was designed for His-tag protein expression in *E.coli*.

DNA insert was positioned in frame and downstream of the 6xHis coding region. This sequence includes ATG initiation codon and permits the use of affinity chromatography for protein purification afterwards.



**Figure 25** pRSETB vector indicating T7 promoter, His<sub>6</sub>-tag region and restriction sites used for foreign DNA ligation.

#### 6.4.3.10.4 Transformation into DH5 $\alpha$ *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$  is a strain of *Escherichia coli* with lacZ $\Delta$ M15 mutation, being unable to hydrolyse lactose into glucose and galactose. Transformation was made by incubating 5  $\mu$ L of foreign plasmid and 50  $\mu$ L of competent cells at 4 °C for 20 minutes followed by a quickly heat shock at 42°C for 45 seconds, thereby forcing DNA into the cells by followed 5 minutes incubation at 4°C.

In order to maximize transformation efficiency, cells were cultivated in 250  $\mu$ L SOC medium under continuous shaking at 37°C for 1h and finally plated on LB-agar medium containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin.

#### **6.4.3.10.5 Transformation into BL 21 (DE3) pLysS**

pRSETB plasmid carrying DNA for heterologous protein expression was transformed into the expression host *E. coli* BL21 cells following the same procedure employed for DH5 $\alpha$  (4.4.9.5), excepting that the heat shock time was for 25 seconds and SOC medium was added as 700  $\mu$ L volume for growing bacterial culture. SOC medium containing BL21 cells was incubated under 150 rpm shaking during 1 hour at 37°C, being 60  $\mu$ L of bacterial suspension plated afterwards. LB-agar medium contained 100  $\mu$ g/mL ampicillin and 60  $\mu$ g/mL chloramphenicol. Ampicillin resistance is acquired from the expression vector and chloramphenicol resistance is acquired from the host cells. An aliquot of bacterial cultures containing plasmids with target insert were stored at -80°C in autoclaved solution of glycerol:LB-medium (20:80, v:v) aiming the permanent supply of *E. coli* BL21 containing the desired gene to start protein expression.

#### **6.4.3.10.6 Selecting putative positive mutant**

Both putative positive plasmids with pGEM-T Easy and pTZ57R/T vectors were selected by differentiating white colonies, which contain a DNA fragment in the cloning site of the plasmid, from the blue colonies, which contain the original plasmid without interruption of lacZ $\alpha$  gene. This difference is possible because lacZ gene present in vector encodes  $\beta$ -galactosidase enzyme that cleaves the artificial chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) added to LB plates, if has no insert embedded in the coding region, becoming a blue colony. Introduction of a cloned DNA fragment into the multiple cloning site of the vector disrupts the fragment of  $\beta$ -galactosidase and prevents formation of active  $\beta$ -galactosidase enzyme resulting in white colonies.

pRSETB vector contains the ampicillin resistance gene (AmpR) that permits the growth of bacteria harbouring the target construct on LB plates with ampicillin. All colonies obtained from pRSETB transformation into DH5 $\alpha$  should be positive mutants.

#### 6.4.3.10.7 Plasmid isolation

Circular plasmids were isolated from *E. coli*-DH5 $\alpha$  by the alkaline lysis method developed by Birnboim and Doly (1979). Each single colony from grown LB plate was grown (overnight, under 150 rpm shaking and 37 °C) into 5 mL liquid LB medium containing ampicillin. Total overnight cultures were harvested by centrifugation (5000 rpm for 5 min) and the bacterial pellet was resuspended into 300  $\mu$ L of ice-cold buffer 1 containing RNase A (Table 15). For alkaline lysis with SDS, 300  $\mu$ L of buffer 2 was added to the bacterial suspension followed by gentle mixing and incubation at room temperature for 5 minutes. To precipitate protein and large fragments of genomic DNA, 300  $\mu$ L of ice-cold buffer 3 was added, followed by gentle mixing, incubation on ice for 20 minutes and centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes. The clear supernatant was extracted with chloroform, the plasmid DNA was precipitated from the aqueous phase by centrifugation with 2-propanol for 30 min at 13,000 rpm and the pellets were washed with 70% ethanol. The plasmid DNA was finally dried at 37 °C and redissolved in 50  $\mu$ L distilled water. The purified plasmid DNA was submitted to restriction analysis and transformed.

**Table 15** Buffers used in plasmid isolation.

<b>Buffer</b>	<b>Component</b>	<b>Comment</b>
1	50mM Tris-HCl 10mM EDTA	pH = 8
2	200mM NaOH 1%SDS	Store at room temperature
3	2.55 M potassium acetate	pH = 5.5

#### 6.4.3.11 Sequencing

Plasmids were sent for sequencing at GATC, Germany, or Microsynth, Switzerland, as per their instructions.

#### **6.4.3.12 Heterologous expression of recombinant protein in *E. coli***

One colony containing plasmid with heterologous protein was harvested and inoculated in 10 mL of LB medium containing 100 µg/mL ampicillin and 60 µg/mL chloramphenicol and incubated overnight (200 rpm and 37°C). Four mL of the overnight culture was transferred to 100 mL LB medium and incubated at the same growing conditions. When culture OD<sub>600</sub> was in the 0.6-0.8 range, 50 µL of 1 mM IPTG was added and the incubation temperature reduced to 25°C during another overnight period. Cells were harvested by centrifugation, pellets were readily used or kept at -20°C.

#### **6.4.3.13 Extraction and purification of expressed proteins from *E. coli* cells**

In order to determine its biochemical activity, heterologously expressed proteins were extracted from *E. coli* cells. All procedure was performed under 4 °C. Each culture flask (containing 100 mL of LB medium) was centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes, pellets were resuspended in 6 mL of lysis buffer (Table 16) and mechanical disruption of the cell membrane was made by sonication on ice for 5 min at 40% pulses using a Branson Sonifier B15 (Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Germany). After centrifugation at 10,000 g for 10 minutes, the supernatant was separated and 400 µL nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) slurry was added into lysate. An aliquot of the supernatant had been taken as expressed protein control and stored at -20°C until SDS PAGE.

Ni-NTA-lysate mixture was gently mixed for 1 hour at 4°C and Ni-NTA was removed by filtration in a column previously eluted with washing buffer (Table 16). Proteins were collected from column through elution buffer (Table 16) rinsing and kept at 4 °C until enzymatic assays.

**Table 16** Buffers used in His<sub>6</sub>-tagged protein purification. All buffers were adjusted to pH = 8.



	Lysis buffer	Washing buffer	Elution buffer
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.4 g	3.4 g	3.4 g
NaCl	0.9 g	0.04 g	8.8 g
Imidazole	(20 mM) 0.7 g	(50 mM) 1.7 g	(250 mM) 8.5 g
dH <sub>2</sub> O	up to 500 mL	up to 500 mL	up to 500 mL

#### 6.4.3.14 SDS-PAGE

SDS-PAGE was used to confirm the successful expression of cloned cDNA in heterologous expression. Proteins were loaded with SDS and become equally negatively charged. In addition, a thiol reagent disrupts their subunits. While migrating towards the anode, they are separated according to their molecular mass (LAEMMLI, 1970). The concentration of acrylamide and bisacrylamide in the separating gel was 12%, which allowed the highest resolution of proteins between 10 and 200 kDa. Protein samples were mixed with protein loading buffer (Table 17 Table 16) in a 1:1 ratio and denatured at 95°C for 5 min. To estimate the molecular mass of the separated protein, a prestained 10-170 kDa protein marker was loaded in parallel with the samples. The running conditions were 25 mA in the stacking gel, 35 mA in the separating gel and 200 V supplied by a Standard Power Pack P25 (Biometra). To check for successful protein expression, the gel was incubated overnight at room temperature in Coomassie blue staining solution followed by destaining solution until clear bands appeared.

**Table 17** Formulae of SDS-PAGE gel and solutions used in protein electrophoresis.

	Stacking gel (5%)	Separating gel (12%)
dH <sub>2</sub> O	3.4 mL	dH <sub>2</sub> O 3.3 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.63 mL	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 ml
30% Acrylamide/Bis.	0.83 mL	30% Acrylamide/Bis. 4 mL
10% (w/v) SDS	50 µL	10% (w/v) SDS 10 µL
10% (w/v) APS	50 µL	10% (w/v) APS 10 µL
TEMED	5 µL	TEMED 4 µL
Protein loading buffer	dH <sub>2</sub> O	2.7 mL
	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1 mL
	Glycerin	2 mL
	10% (w/v) SDS	3.3 mL
	β-mercaptoethanol	0.5 mL
	0.5% (w/v) Bromophenol blue	0.5 mL
10x Electrophoretic buffer	Tris-HCl	15 g
	Glycin	72 g

	Na-SDS	5 g
	dH <sub>2</sub> O	up to 500 mL
Staining solution	Coomassie-blue R 250	25 mL
	Methanol	100 mL
	Acetic acid	20 mL
	Water	up to 200 mL
Coomassie-blue stock solution*	Coomassie-blue R 250	0.5 g
	Water	up to 50 mL
Destaining solution	Methanol	30 mL
	Acetic acid	20 mL
	dH <sub>2</sub> O	200 mL

\*Coomassie-blue stock solution must be filtered before using.

#### 6.4.3.15 Computer-assisted sequence analysis

DNA sequences were analyzed using the EditSeq, MegAlign, SeqMan, and MapDraw options from the DNASTAR software. BLAST (Basic local alignment tool) is a set of similarity search programs designed to explore all of the available sequence databases regardless of whether the query is protein or DNA. BLAST analyses were performed in the following databases:

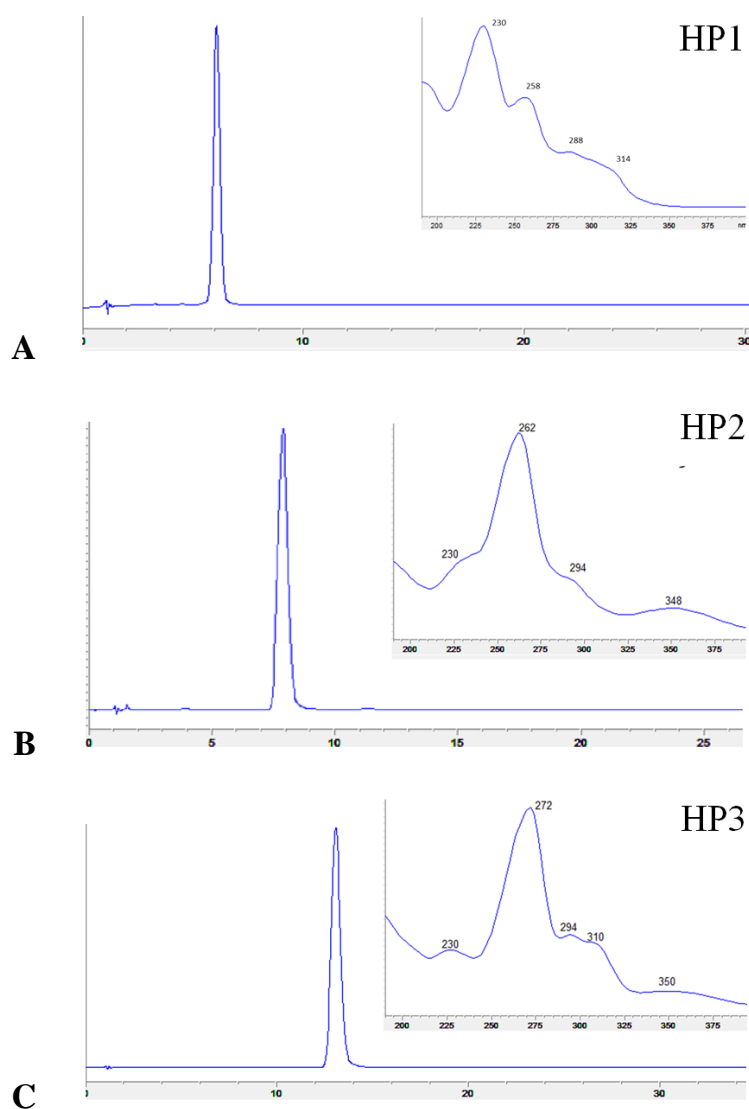
- **NCBI** - [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- **Medicinal Plant Genomic Resources** - [http://medicinalplantgenomics.msu.edu/mpgr\\_external\\_blast.shtml](http://medicinalplantgenomics.msu.edu/mpgr_external_blast.shtml)
- **Gatersleben** - <http://webblast.ipk-gatersleben.de/hypericum/>
- **PhytoMetaSyn** - <http://www.phytometasyn.ca/>

## 6.5 RESULTS AND DISCUSSION

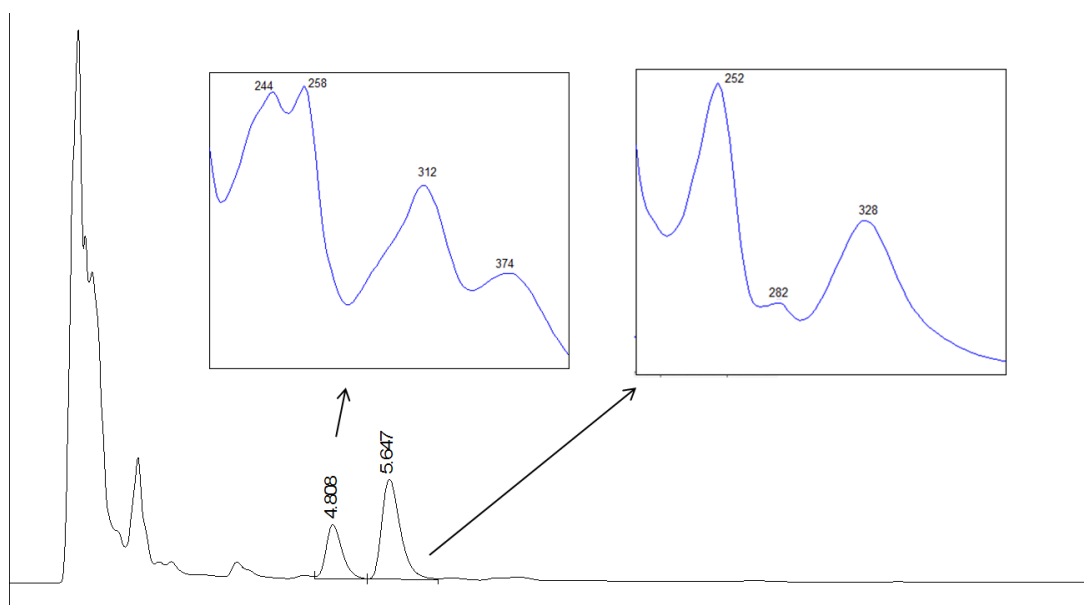
### 6.5.1 Phytochemical analysis

#### 6.5.1.1 Cell cultures of *H. polyanthemum*

Acetone extract of *H. polyanthemum* cell suspension cultures was analysed by HPLC. First analysis was performed using the benzopyran elution system and the observed peaks were compared to standard compounds (Figure 26). No benzopyran-related peaks were identified (Figure 27).

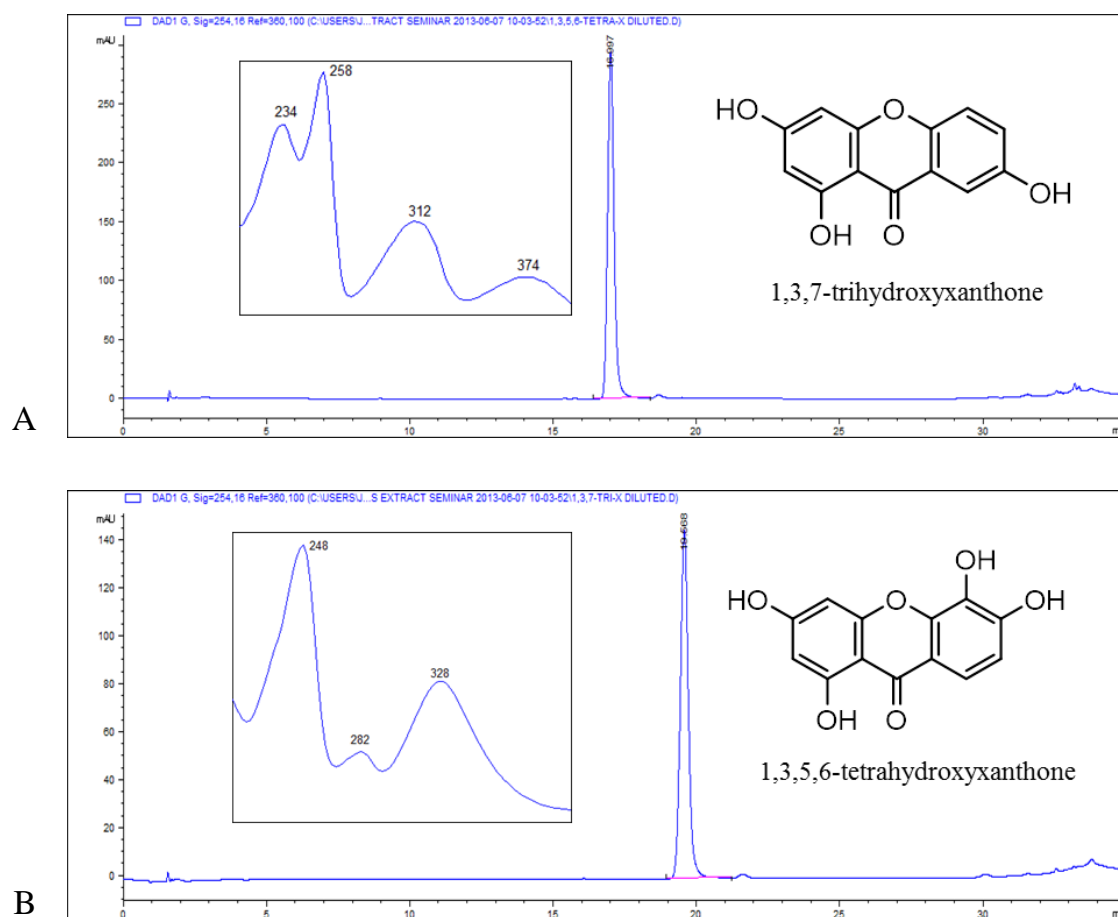


**Figure 26** HPLC analysis showing retention times ( $r_t$ ) and UV spectra of the three benzopyran standard compounds. (A) HP1 ( $r_t = 6$  min), (B) HP2 ( $r_t = 7.9$  min), and (C) HP3 ( $r_t = 13$  min).



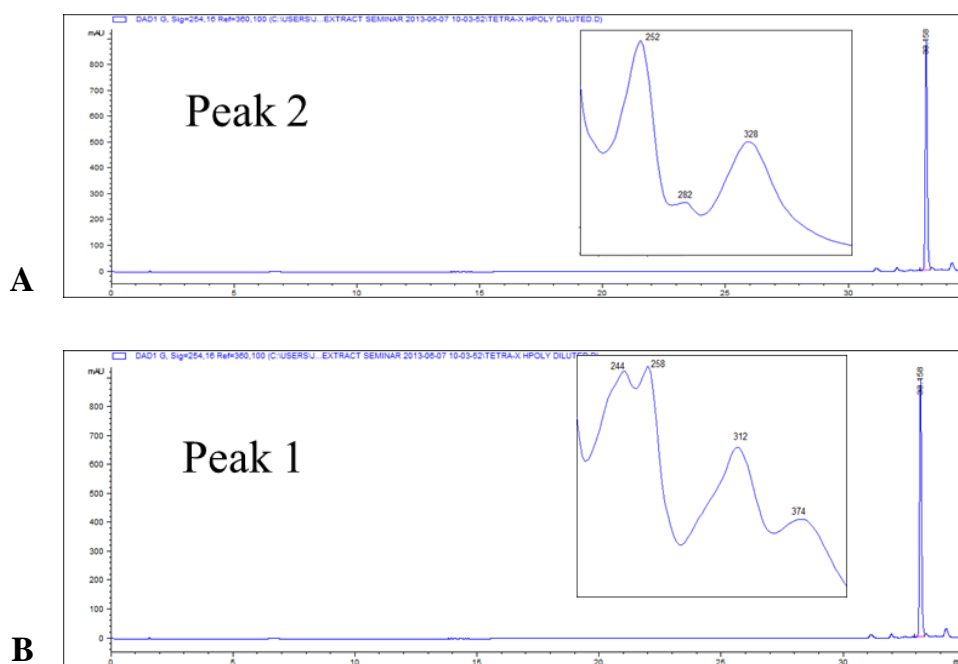
**Figure 27** HPLC analysis of acetone extract from *H. polyanthemum* cells demonstrating the absence of benzopyrans and the presence of two unknown peaks, named “peak 1” ( $r_t = 4.8$  min) and “peak 2” ( $r_t = 5.64$  min).

The UV spectral patterns of the acetone extract peaks agreed with the xanthone UV profile. The UV spectra of the two major peaks matched those exhibited by 1,3,7-trioxygenated and 1,3,5,6-tetraoxygenated xanthones. Both molecules were synthesized by Islam El-Awaad in his PhD work in the same host laboratory and were kindly provided by him for comparison. These standard molecules are better separated in a different chromatographic system and appear in the center of the chromatogram when the elution gradient corresponds to approximately 60% MeOH (Figure 28).



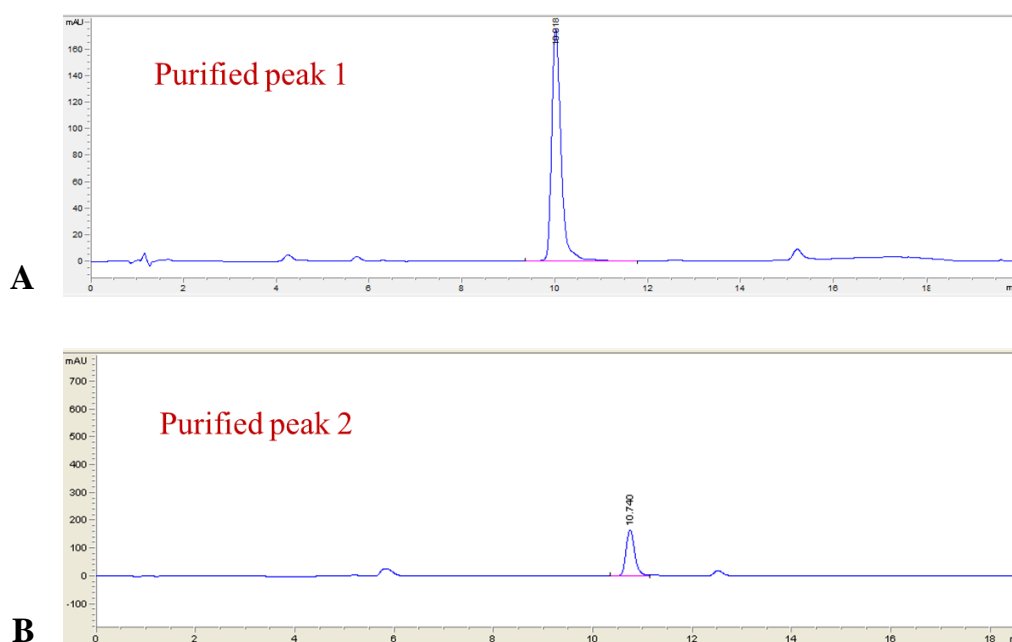
**Figure 28** HPLC profiles and UV spectra of (A) 1,3,7-trihydroxyxanthone ( $t_r = 17$  min) and (B) 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone ( $t_r = 19.5$  min).

In order to elucidate the structure of the two major compounds present in the acetone extract from *H. polyanthemum* cells, peaks 1 and 2 were isolated by slight modification in HPLC equipment operating in analytic mode. When analysed in the xanthone HPLC method, *H. polyanthemum* xanthenes appear in the washing phase, i.e. at the end of the chromatogram which corresponds to elution with 100% MeOH (Figure 29). This chromatographic behaviour indicates that *H. polyanthemum* xanthenes are more lipophilic than tri- and tetrahydroxy substituted compounds, thus attempting for lipophilic moieties possibly attached to the molecule, such as aliphatic or cyclized prenyl groups



**Figure 29** Chromatograms of peak 2 ( $r_t = 33.15$  min) and peak 1 ( $r_t = 33.31$  min) related to *H. polyanthemum* xanthenes eluted in MeOH gradient. The lipophilic molecules appear in the washing phase when MeOH content corresponds to 100%.

An elution gradient with acetonitrile and water (6.4.1.5) was chosen to allow proper separation of xanthenes in the extract. Using this system, peaks 1 and 2 from *H. polyanthemum* cells were isolated (Figure 30) and further analysis with cells, roots and plant extracts were performed.



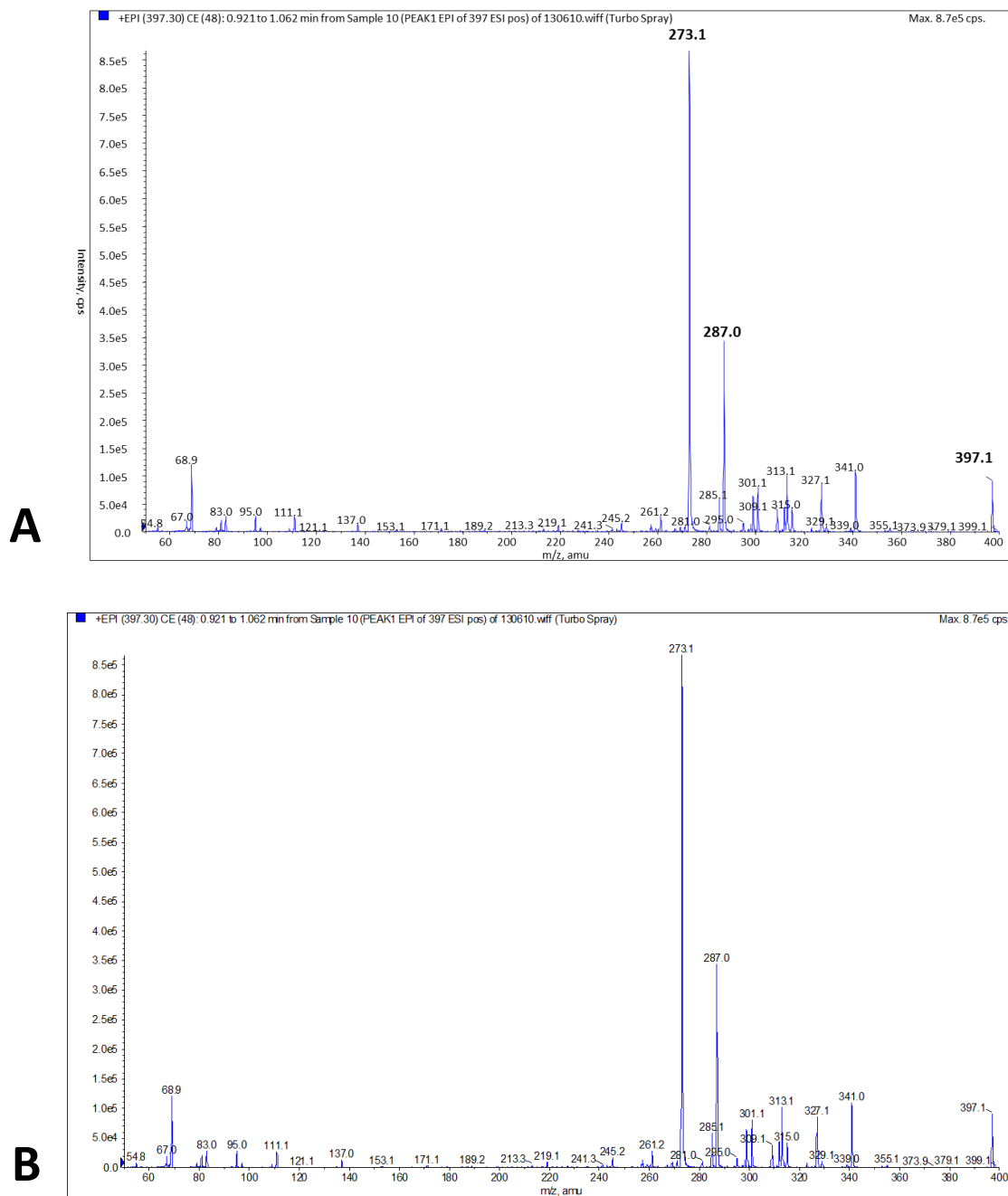
**Figure 30** Purified peaks (A) 1 ( $r_t = 10$  min) and (B) 2 ( $r_t = 10.74$  min) from *H. polyanthemum* cells in

an acetonitrile-water gradient elution system.

A rapid and reliable identification of natural compounds in medicinal plants might be an arduous work despite advances in analytical techniques. Nevertheless, it is noteworthy that accelerated increase in knowledge related to plant metabolic pathway engineering studies has been also obtained for secondary metabolites (ZOTCHEV, 2008). Using this background, a lot of unknown chemical components from the herbal medicines might be predicted based on the chemical structure of known components and then be monitored and characterized by modern analytical techniques especially liquid chromatography–mass spectrometry (ZOU et al., 2008).

Xanthone biosynthesis arises from the type III PKSs pathway and has been studied at enzyme and gene levels, leading to identification of several enzymes including benzophenone and xanthone synthases. In the *Hypericum* genus, the intermediate 1,3,7-trihydroxyxanthone is regioselectively hydroxylated at C-6 by 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase (SCHMIDT et al., 2000). In less extent, the same occurs with intermediate 1,3,5-trihydroxyxanthone. Further steps subject the main skeleton to substitution through *C*- or *O*-methylations.

Purified compounds from *H. polyanthemum* cells were submitted to UV spectroscopy and high resolution LC-MS/MS analysis. Peak 1 showed UV absorption maxima at 244, 258, 312 and 374 nm (Figure 29B). The fragmentation pattern obtained by LC-MS/MS (Figure 31A) revealed a pseudo molecular ion peak  $[M + H]^+$  at  $m/z$  397.1, consistent with the molecular formula of  $C_{23}H_{24}O_6$ , and the major fragment ions  $[M + H]^+$  341, 327.1, 313.1, 301.1, 287, 273.1.

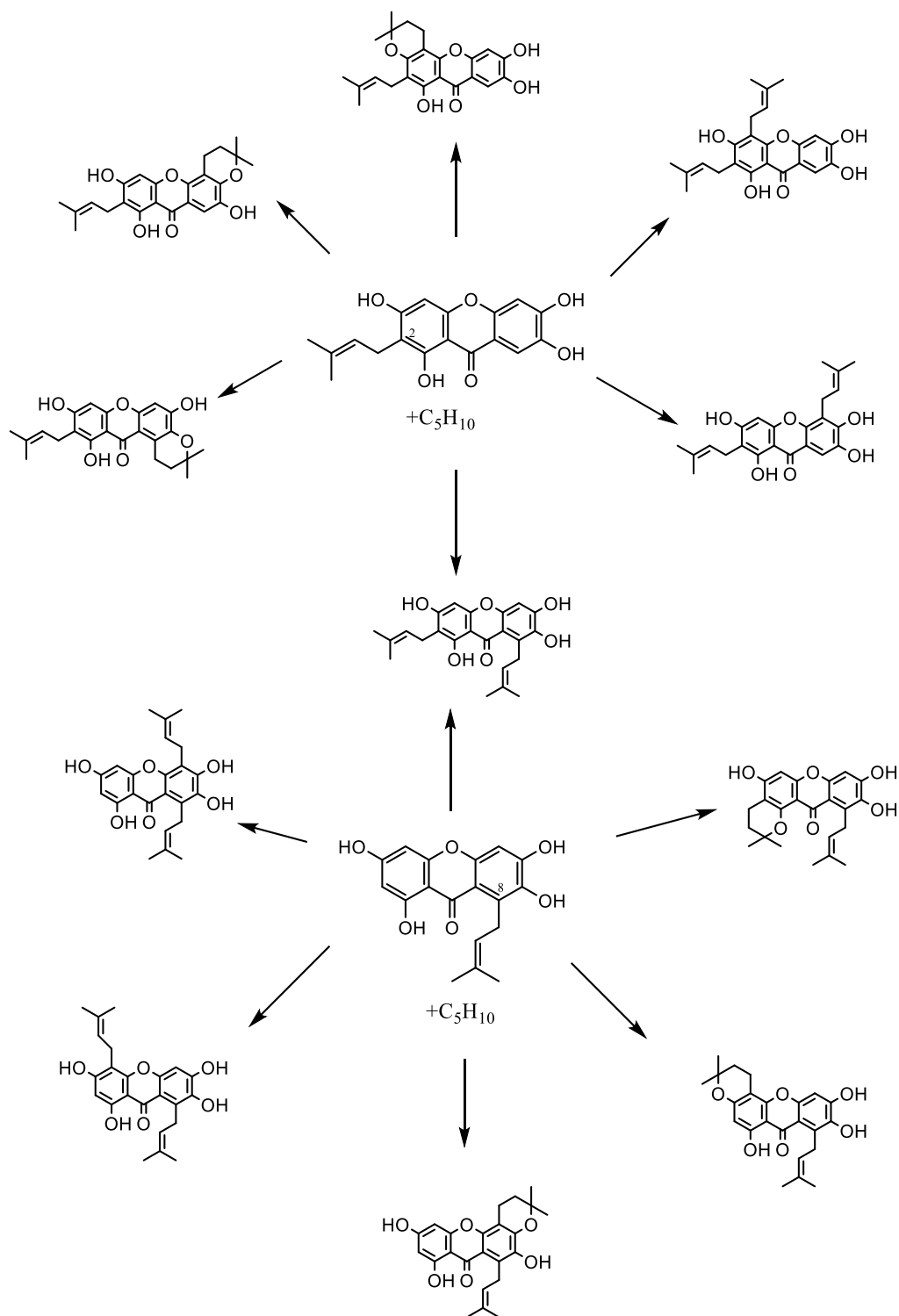


**Figure 31** LC-MS/MS spectrum of (A) peak one (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone) and (B) peak 2 (1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone) from *H. polyanthemum* cells extract.

Based on compiled data for peak 1, that were (1) the same UV maxima as 1,3,7-trihydroxyxanthone, (2) the polarity of non-oxygenated substituents in the molecule, (3) the molecular mass of 396.46 and (4) the oxygenation pattern known to follow type III PKSs in *Hypericum* genus, it is possible to suggest some structural features for *H. polyanthemum* “peak 1” xanthone. One extra hydroxylation at C-6 and two aliphatic or cyclized  $-C_5H_{10}$  groups were considered



to be present in the molecule. Low molecular mass xanthenes present in *Hypericum* species are often substituted by prenyl or cyclized groups, such as pyrans and pyrens. Single prenylations are usually observed at C-2 and C-8 (SCHIMDT and BEERHUES, 1997; ABD EL-MAWLA, 2005; CROCKETT et al., 2009; EBERHARDT, 2009; ZARENA and ZANCAR, 2009, FRANKLIN et al., 2009). Even though UV and mass spectroscopy data are not enough for molecular structure elucidation, compiled evidences about 1,3,6,7-tetraoxygenated xanthone from *H. polyanthemum* cells were collected and postulated structures are presented (Figure 32). The suggested structures are modifications from C-2 and C-8 prenylated xanthenes.

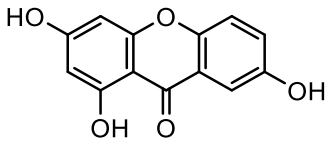
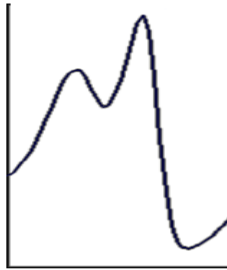
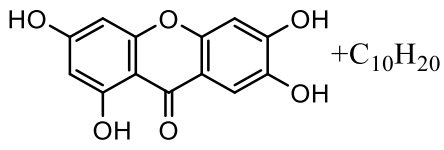
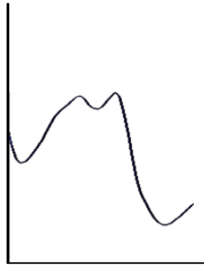
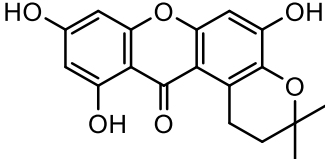
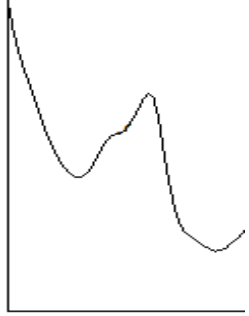
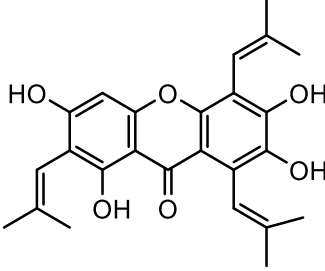
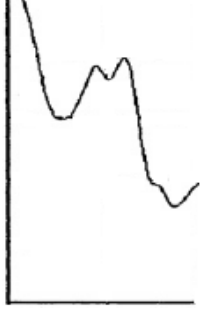


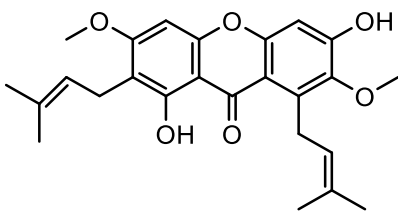
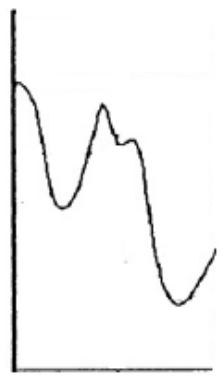
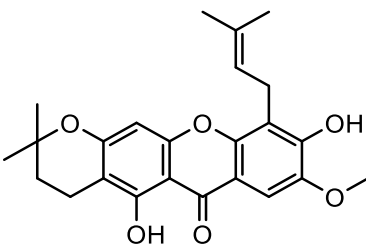
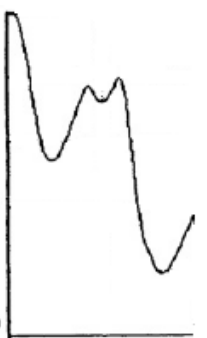
**Figure 32** Possible structural formulae for substituted 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthenes from cultured *H. polyanthemum* cells based on prenylations at C2 and C8 of xanthone skeleton.

It is well known that the UV spectrum of a molecule is determined by the relevant energy absorption of the main chromophore substituents. Number and position of a certain group might not influence the UV spectrum of a compound. This is observed between 1,3,6,7-tetraoxygenated xanthenes of *H. polyanthemum*

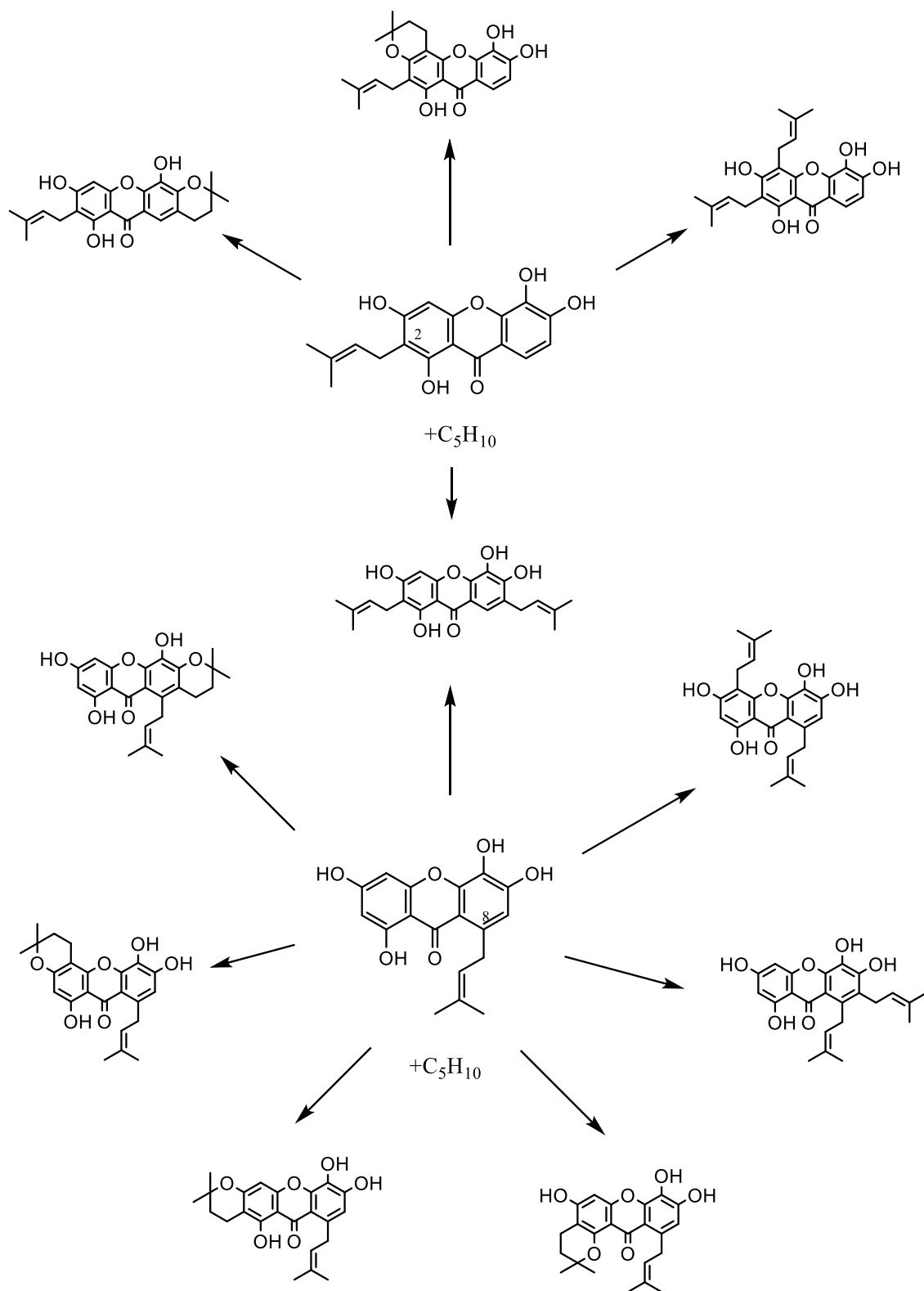
and the precursor 1,3,7-trihydroxyxanthone. In this case, what determines the same maximum absorption in the range between 200 and 300 nm is likely to be the 1,3,7-oxygenation pattern rather than substitutions by hydroxy, methoxy, aliphatic or cyclized groups. Similar behaviour also occurs among different 1,3,7-trioxygenated xanthenes in which  $\lambda_{\max}$  at 245 and 260 nm are observed in such range (Table 18).

**Table 18** UV pattern of different xanthenes trioxygenated at C1, C3 and C7.

Oxygenated xanthenes	UV – $\lambda_{\max}$ (200 to 300 nm)	Data source
 <p>1,3,7-trihydroxyxanthone</p>		Synthesized by Islam El-Awaad
 <p>1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone + substitutions</p>		<i>H. polyanthemum</i> xanthone from cell cultures (present study)
 <p>Hyperxanthone E</p>		<i>H. calycinum</i> Gaid et al., 2012
		<i>Garcinia mangostana</i> Zarena and Sankar, 2009

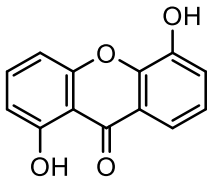
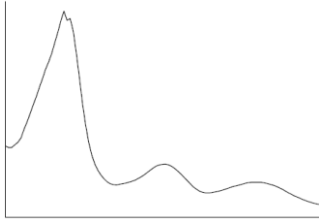
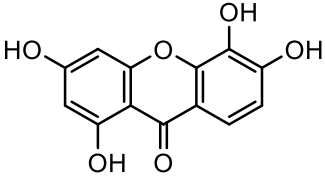
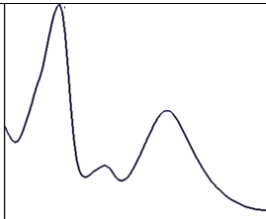
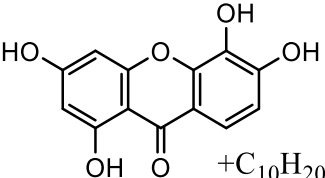
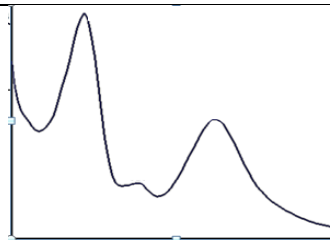
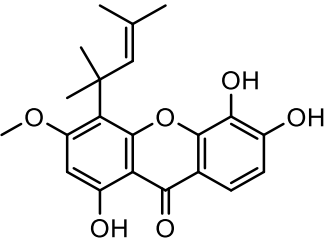
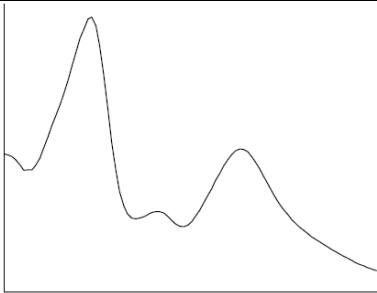
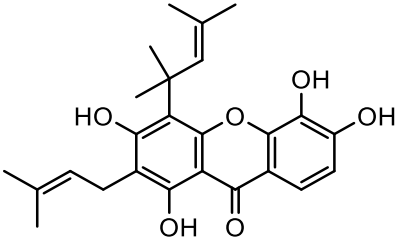
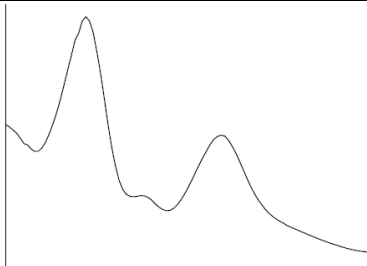
Garcinone E	
 <p><math>\beta</math>-Mangostin</p>	
 <p>3-Isomangostin</p>	

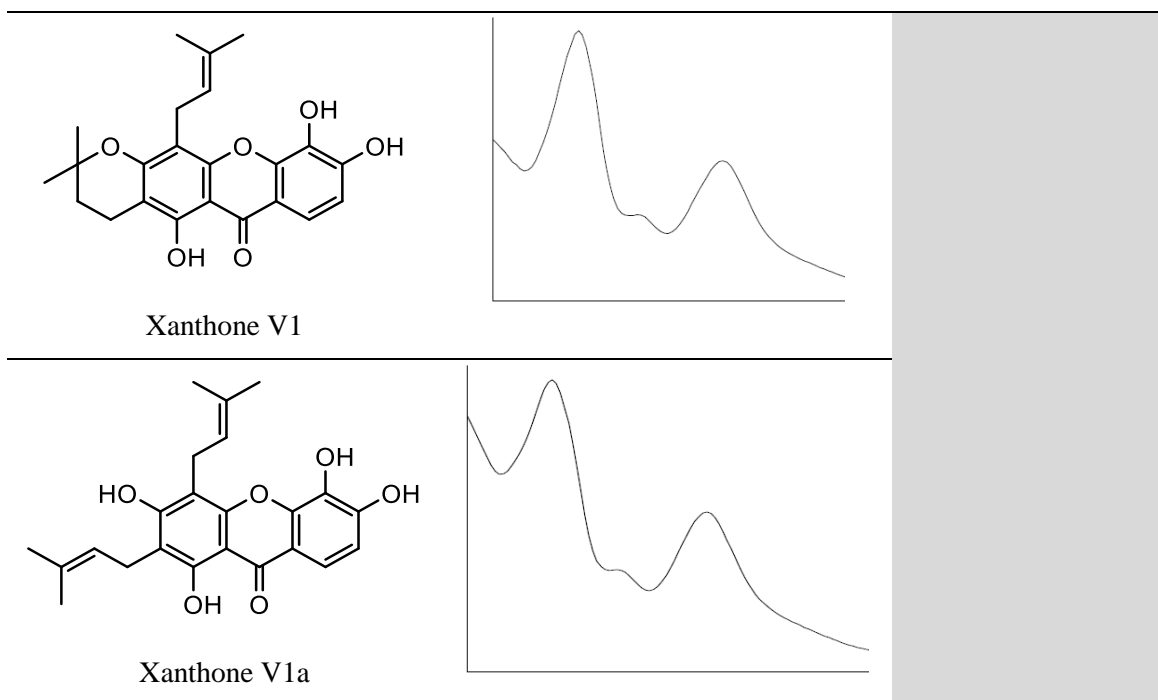
Similar inference is reasoned for “peak 2”. As observed in Figure 29B, the same pseudo molecular ion peak  $[M + H]^+$  at  $m/z$  397.1 and fragmentation pattern were observed, suggesting that both molecules are structurally closely related and structure possibilities were built (Figure 33). Nevertheless, considering the xanthone corresponding to peak 2, 1,3,5,6-tetraoxygenation pattern is strongly supported by the UV spectrum, since alterations in non-oxygenated substitutions do not affect spectra while the lack of an oxygen (supplied by hydroxyl or methoxy groups) strongly affects the resultant UV shape (Table 19).



**Figure 33** Possible structural formulae for substituted 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone from cultured *H. polyanthemum* cells based on prenylations at C2 and C8 of the xanthone skeleton.

**Table 19** UV patterns of various xanthenes tetraoxygenated at C1, C3, C5 and C6

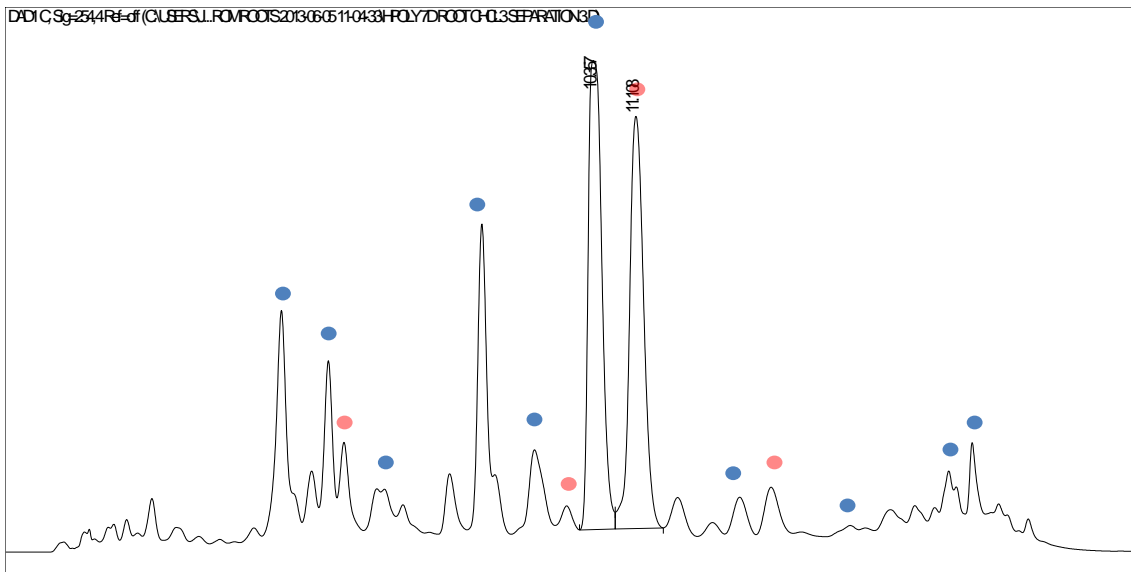
Oxygenated xanthenes	UV – $\lambda_{\max}$ (200 to 400 nm)	Data source
 <p>1,5-dihydroxyxanthone</p>		Eberhardt, 2009
 <p>1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone</p>		Synthesized by Islam El-Awaad
 <p>1,3,5,6-tetraoxyxanthone + substitutions</p>		<i>H. polyanthemum</i> xanthone from cell cultures
 <p>Isocudraniaxanthon B</p>		Eberhardt, 2009
 <p>Gerontoxanthon I</p>		



Phytochemical data associated with biosynthetic knowledge allowed to indicate the presence of two oxygenated xanthenes in *H. polyanthemum* cell extracts. Nevertheless,  $^1\text{H}$ NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR analyses are required for complete structure elucidation.

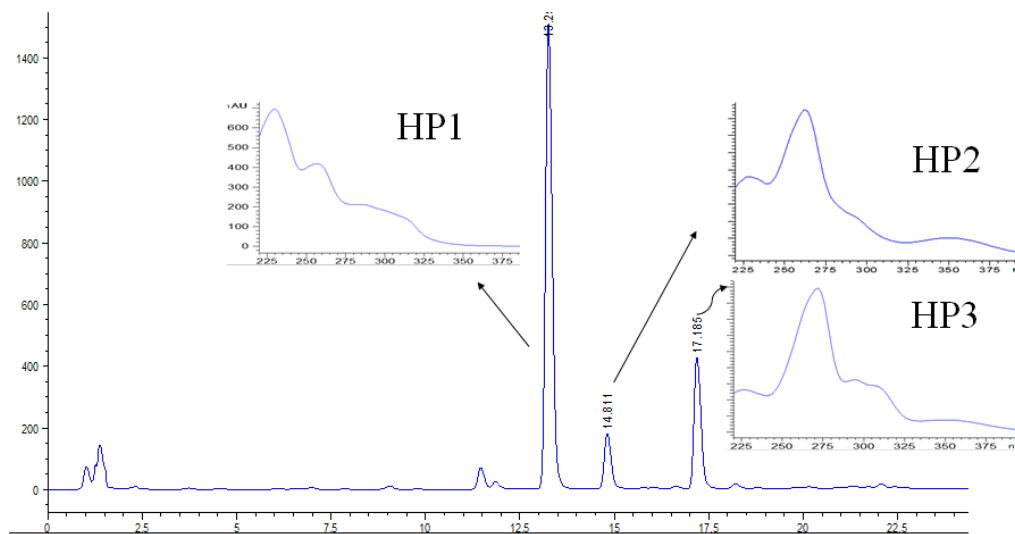
#### 6.5.1.2 Root cultures and *in vitro* plants of *H. polyanthemum*

Roots and plants *in vitro* cultures of *H. polyanthemum* were investigated regarding their phytochemical profiles. Two majoritarian peaks presented the same UV spectra of 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone ( $r_t = 10.35$  min) and 1,3,7-trihydroxyxanthone ( $r_t = 10.35$  min). Furthermore, several peaks showing the same UV pattern like these two structures were also observed, revealing that *in vitro* roots are a prolific source of xanthenes (Figure 34).



**Figure 34** Analysis of an acetone extract from root cultures of *Hypericum polyanthemum* containing (•) 1,3,6,7 and (◦) 1,3,5,6-tetraoxygenated xanthenes.

*In vitro* plants did not show peaks corresponding to xanthenes related structures, but the three benzopyrans, as observed in *in natura* plants (Figure 35).



**Figure 35** Acetone extract from *in vitro* *H. polyanthemum* cultured plants analysed in xanthone elution system.



## 6.5.2 Molecular analysis

### 6.5.2.1 Screening for benzoate-specific type III PKSs in cultured cells, adventitious roots and *in vitro* plants

Total RNA was extracted from 100 mg of plant material as described in 6.4.3.2 and used for reverse transcription. cDNA quality was controlled by 18S amplification (Figure 36A). Forward and reverse primers for three *Hypericum* benzoate-specific type III PKSs were used for screening of possible bands in *H. polyanthemum* cDNA. Using primers designed by Belhadj (2013, Table 5) a PCR product of 1.2 Kb was observed (standard PCR, 55°C). Aiming heterologous expression, the same primer pair was used to proofread the target sequence using reverse transcribed RNA extracted from cell suspension cultures and high-fidelity DNA polymerase (Figure 36B).

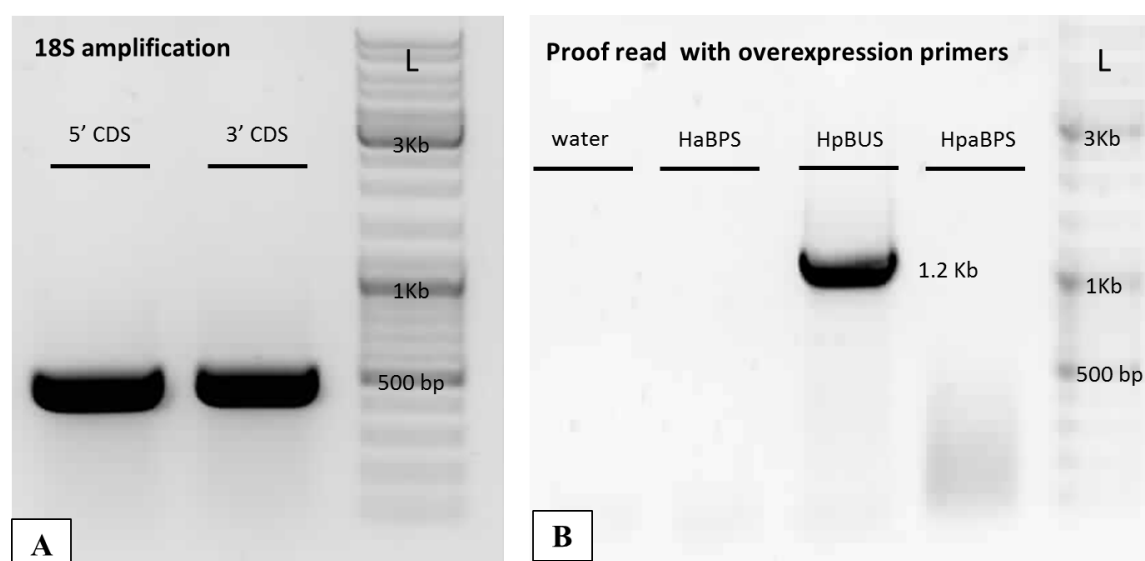
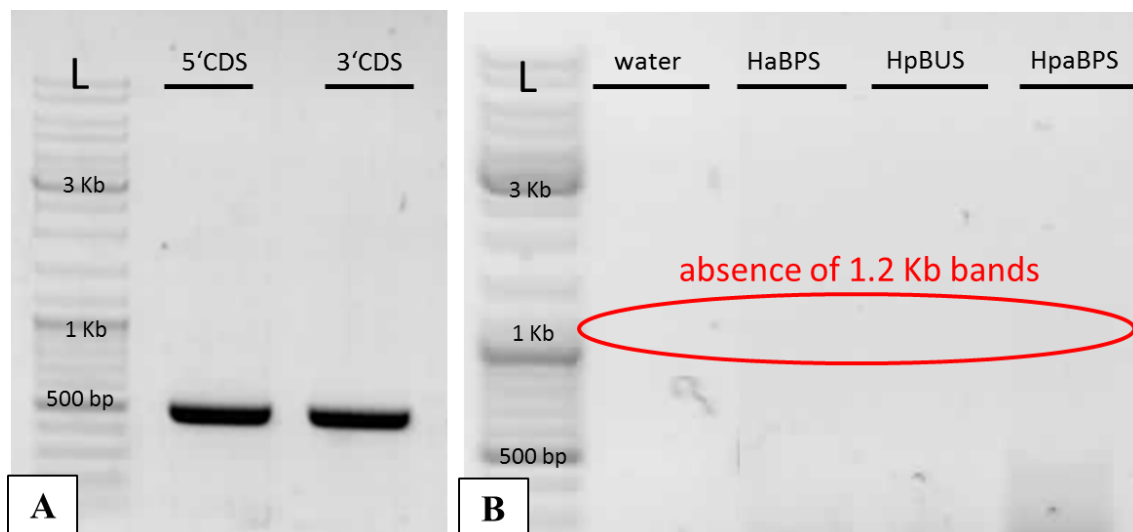


Figure 36 (A) 18S amplification showing intense bands of 500 bp, attesting a high quality of transcribed cDNA from *H. polyanthemum* cells. (B) Proofread amplification with water as control and overexpression primers of *H. androsaemum* BPS (HaBPS), *H. perforatum* BUS (HpBUS) and *H. perforatum* var *angustifolium* BPS (HpaBPS). The only fragment obtained is verified at 1.2 Kb size. L = 10 Kb ladder mark.

RNA from root cultures displayed a band of 1.2 Kb when the same overexpression primers (Belhadj, 2013) were used. On the other hand, 5'cDNA extracted from *in vitro* plants did not afford any band when amplified in the same conditions (Figure 37). Interestingly, two out of three primers used amplify ORFs

encoding classical benzophenone synthase (BPS) which is involved in xanthone biosynthesis, and one encodes isobutyrophenone synthase (BUS) able to prefer isobutyryl-CoA (100%) over benzoyl-CoA (~80%) (BELHADJ, 2013), indicating its involvement in hypeforin biosynthesis. Xanthenes were not detected in *H. polyanthemum in vitro* plants, just benzopyrans and phloroglucinol derivatives, which are likely to arise from BUS reactions.



**Figure 37** (A) 18S amplification showing intense bands of 500 bp, attesting a high quality of transcribed cDNA from *H. polyanthemum in vitro* plants. (B) Proofread amplification with water as control and overexpression primers of *H. androsaemum* BPS (HaBPS), *H. perforatum* BUS (HpBUS) and *H. perforatum* var *angustifolium* BPS (HpaBPS). No bands were obtained. L = 10 Kb ladder mark.

### 6.5.2.2 Sequencing

The 1.2 Kb fragment obtained from proofread amplification of cDNA from cultured *H. polyanthemum* cells using HpBUS overexpression primers was ligated with the pRSETB vector and sent for sequencing. The assessed fragment was correctly inserted in the plasmid with no frame shifts and corresponded to an ORF of 1188 bp, encoding a protein of 395 amino acids (Figure 38).

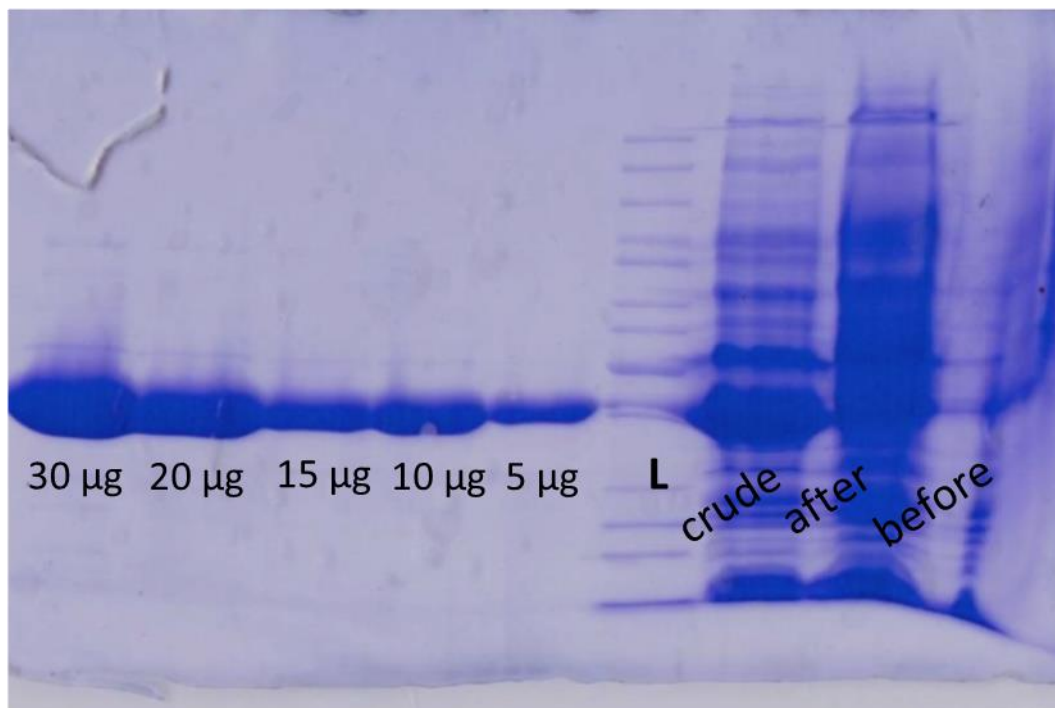
**ATGGCGCCTGCTATGGAATACTC**AAACCAGAACGCCCATGTTCAAGGA  
 CAGAGGACGGCTTCCGTCCTCGCCATTGCCACCACCAACCCCGAACAC  
 TTCATCCTCCAGGAAGACTACCCTGACTTCTACTTCAACAACACTAACA  
 GCCAGCACATGACCGACCTCAAGGAGAAGTTCAAGCGTATTTGCGTCA  
 AGTCCCATATCAGGAAGAGGCACTTTTACCTGACAGAGGAGATCCTGA  
 AGAATAACCCAGGCATCGCCACCTACGGTGCTGGCTCCCTCGACGCC  
 GCCAGAGGATCCTTGAGACTGAGGTCCCCAAGCTTGGTGAGCAGGCTG  
 CCCTCAAGGCCATCGCGGAATGGGGCCAGCCCATCTCCAAGATCACCC  
 ACGTTGTCTTCGCCACGACCTCCGGGTTTATGATGCCCGGCGCCGACTA  
 CGCCATCACCCGTCTTCTCGGCCTCAACCGCACCGTCAGGCGCGTGATG  
 CTCTATAACCAAGGCTGCTTCGCCGGGGGCACGGCCCTTCCCGTCGCCA  
 AGGACCTCGCTGAAAACAACCACCAGGCACGCGTTCTCGTCGTGTGTG  
 CGGAGAACACCGCCATGACCTTCCATGCGCCCAACGAGTCCCACCTTG  
 ACGTGATCGTGGGCCAGGCTATGTTTTCGGACGGAGCATCCGCTCTGAT  
 CATTGGGGCCGAATCGGACCACTCCGCTGGGGAGAGGGCAGTGTTTGA  
 GATCCTGTGCGCGAGCCAGACCATCGTGGCGGGTTCAGACGGGGCGAT  
 AACGGCCCACTTCTACGAGATGGGGATGAGCTACTTCTCAAGGAGGA  
 CGTCATCCCGCTCTTCCGTAACAACATCGCTGCGGTCATGGAGGAGGC  
 CTTCGCCCCGCTGGGGGTCTCCGACTGGAACCTCCCTTTTCTATTCCATC  
 CACCCCGGTGGCCGCGGGATCATCGACGGCGTCGCCGAAAACCTCGGA  
 ATCAAGGACGAGAACCTTGTGGCCACTAGGCACGTCCTGGGCGAGTAC  
 GGAAACATGGGATCGGCCTGTGTGATTTTCATCCTGGATGAGCTGAGG  
 AGGAGCTCCAAGGTCAACGGGAAGCCACAACCGGCGACGGAAAGCA  
 GTTCGGATGCCTGATCGGCCTAGGTCCGGGGCTCACCGTGGAGGCCGT  
 CGTCCTCAAGAG**GTGTCCCCATCCTGCACTAG**

**Figure 38** Upstream nucleotide sequence of *H. polyanthemum* BPS cDNA isolated from cell cultures. Gray shades correspond to HpBUS-forward and HpBUS-reverse overexpression primers included in *H. polyanthemum* benzophenone synthase ORF, respectively. Underlined ATG and TAG correspond to start and stop codons, respectively.

### 6.5.2.3 Heterologous expression of HpoBPS in *E. coli* BL21

The constructed plasmid was successfully overexpressed in *E. coli* strain BL21 and the resultant protein was extracted and purified. The efficiency of overexpression was examined by SDS PAGE demonstrating that the bacterial system was strongly inducible by IPTG and that affinity purification occurred properly since high protein amounts (> 15 µg) resulted in a single band of the correct size (Figure 39). The yield of pure protein determined by the Bradford method was around 15 mg/L of bacterial culture. For every assay, proteins were

newly purified from bacterial pellets stored less than 6 weeks at -20 °C. Storage of pure protein with or without glycerin results in appreciable loss of activity.



**Figure 39** Purification of *H. polyanthemum* BPS monitored by SDS-PAGE. Bands were visualized by staining with Coomassie blue. L = ladder for size mark; crude = crude bacterial extract; after/before = after/before IPTG induction of expression.

The expressed protein migrated until the mark of ~43 kDa, which is in accordance with the 40-45 kDa homodimer configuration of type III PKSs. Analysis of the amino acid sequence deduced from the ORF for the expressed protein revealed the presence of the characteristic amino acids shaping the geometry of the active site defined for type III PKS enzymes, consisting of an initiation pocket with Met<sup>217</sup>, Iso<sup>258</sup>, Ala<sup>260</sup>, Tyr<sup>269</sup>, an elongation pocket comprising Thr<sup>165</sup>, Ser<sup>166</sup>, Thr<sup>197</sup>, Met<sup>199</sup>, Thr<sup>200</sup>, Ser<sup>219</sup>, Glu<sup>342</sup> and the absolutely conserved catalytic triad in all known PKSs formed by Cys<sup>167</sup>, His<sup>307</sup> Asp<sup>340</sup> (Figure 40).

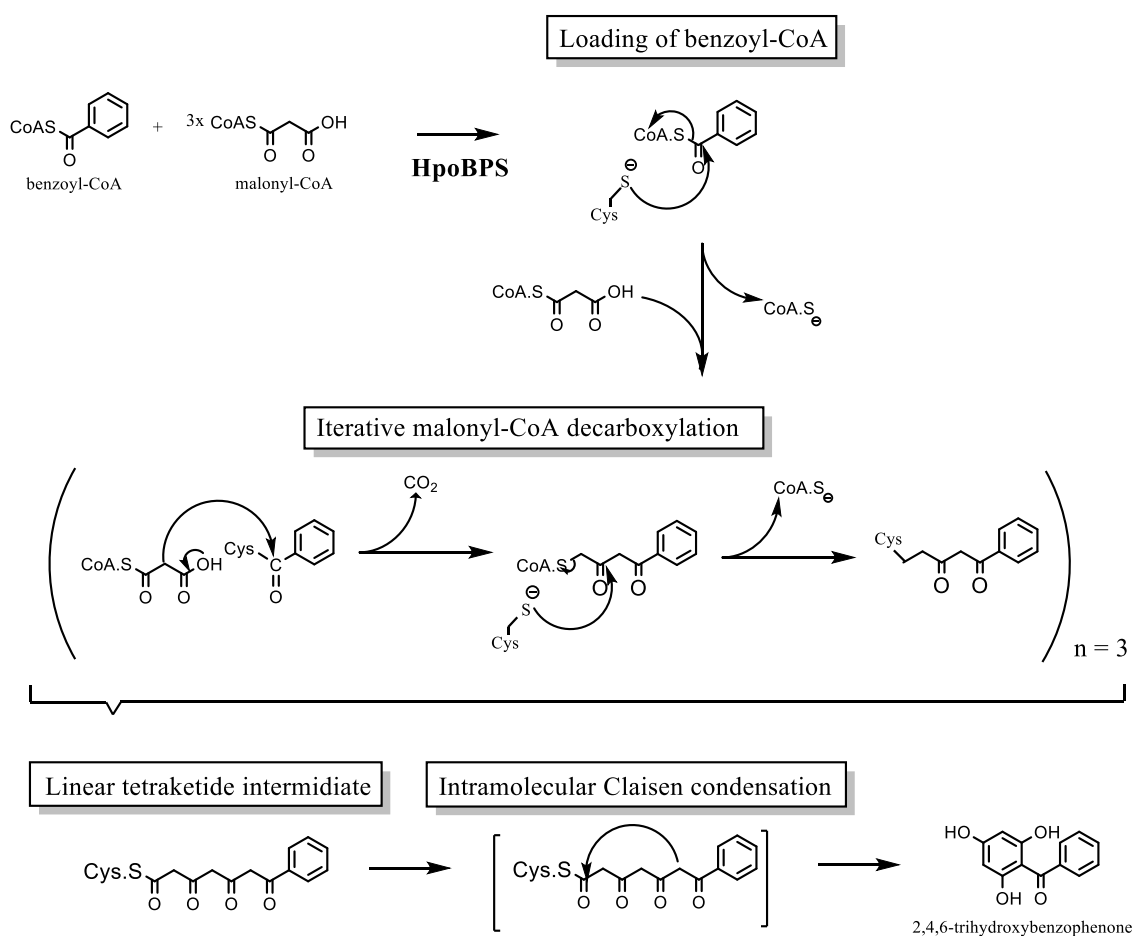
MAPAMEYSTQNAHVQGQRTASVLAIAATTNPEHFILQEDYPDFYFNNTNSQ HMTDLKEKFKRICVKSHIRKRHFYLTTEEILKNNPGIATYGAGSLDARQRILE TEVPKLGEQAALKAIAEWGQPISKITHVVFATTSGFMMPGADYAITRLLGL NRTVRRVMLYNQGCFFAGGTALPVAKDLAENNHQARVLVCAENTAMTF HAPNESHLDVIVGQAMFSDGASALIIGAESDHSAGERAVFEILSASQTIVAG SDGAITAHFYEMGMSYFLKEDVIPLFRNNIAAVMEEAFAPLGVSDWNSLF YSIHPGGRGIIDGVAENLGIKDENLVATRHLVGEYGNMGSACVIFILDELRL RSSKVNGKPTTGDGKQFGCLIGLGPGLTVEAVVLKSVPIH		
Initiation pocket	Elongation pocket	Catalytic triad
A = Alanine	I = Isoleucine	R = Arginine
C = Cysteine	K = Lysine	S = Serine
D = Aspartic acid	L = Leucine	T = Threonine
E = Glutamic acid	M = Methionine	V = Valine
F = Phenylalanine	N = Asparagine	W = Tryptophan
G = Glycine	P = Proline	Y = Tyrosine
H = Histidine	Q = Glutamine	

**Figure 40** Amino acid sequence of HpoBPS indicating its active site composed of initiation pocket, elongation pocket and catalytic triad according to the colors of the pink, yellow and blue shades, respectively.

Once these features are present in the soluble enzyme it is possible to expect that the basic principle of the reaction mechanism will take place by using a CoA-tethered substrate to carry out thioester exchange reactions, polyketide chain-elongation and select a cyclization path in a single active site (STEWART et al., 2013). Each dimer encapsulates a large internal cavity which lies at the end of a CoA binding tunnel. Following proposed catalytic mechanism for different type III PKSs such as CHS, STS, BPS, OKS and ACS (FERRER et al., 1999; JEZ et al., 2000; FLORES-SANCHES AND VEERPOORTE, 2009; KLUNDT et al., 2009), it is possible to postulate how the reaction proceeds in the active site of HpoBPS.

The reaction initiates with binding of benzoyl-CoA by loading its acyl group onto an active site cysteine (Figure 41). The Cys<sup>167</sup> is the nucleophile that initiates the reaction and attacks the thioester carbonyl of the starter resulting in transfer of the starter moiety to the cysteine side chain. Asn<sup>336</sup> orients the thioester carbonyl of malonyl-CoA near His<sup>307</sup>, with Phe<sup>218</sup> providing a nonpolar environment for the terminal carboxylate that facilitates decarboxylation. The reaction continues with three successive iterative rounds of decarboxylative

condensation of two-carbon units derived from malonyl-CoA. Phe<sup>218</sup> and Phe<sup>270</sup> perform as gatekeepers intermediating the recapture of the elongated starter-acetyl-diketide-CoA by Cys<sup>167</sup> and the subsequent release of CoA, which set the stage for additional rounds of elongation resulting in the formation of a final linear polyketide intermediate. This linear intermediate is then intramolecularly folded by C6→C1 Claisen condensation to form 2,4,6-trihydroxybenzophenone as final product.



**Figure 41** Postulated catalytic mechanism for the HpoBPS condensation of benzoyl-CoA with three molecules of malonyl-CoA: the stepwise assembly of an extended polyketide intermediate occurs with starter unit benzoyl-CoA loaded onto the active site Cys<sup>167</sup>, which is extended by three carbons derived from the decarboxylative condensation with malonyl-CoA. The linear intermediate polyketide undergoes intramolecular C6→C1 Claisen condensation to form 2,4,6-trihydroxybenzophenone as final product. Further steps involving the xanthone synthase enzyme catalyzing regioselective oxidative phenol coupling lead to xanthone formation.

Finally, the preference for benzoyl-CoA as substrate (was verified with overexpressed protein and the amino acid sequence comparison with other type III PKSs (Figure 42) is in accordance with the classification of the isolated full length clone from *H. polyanthemum* cell cultures as a benzophenone synthase enzyme.

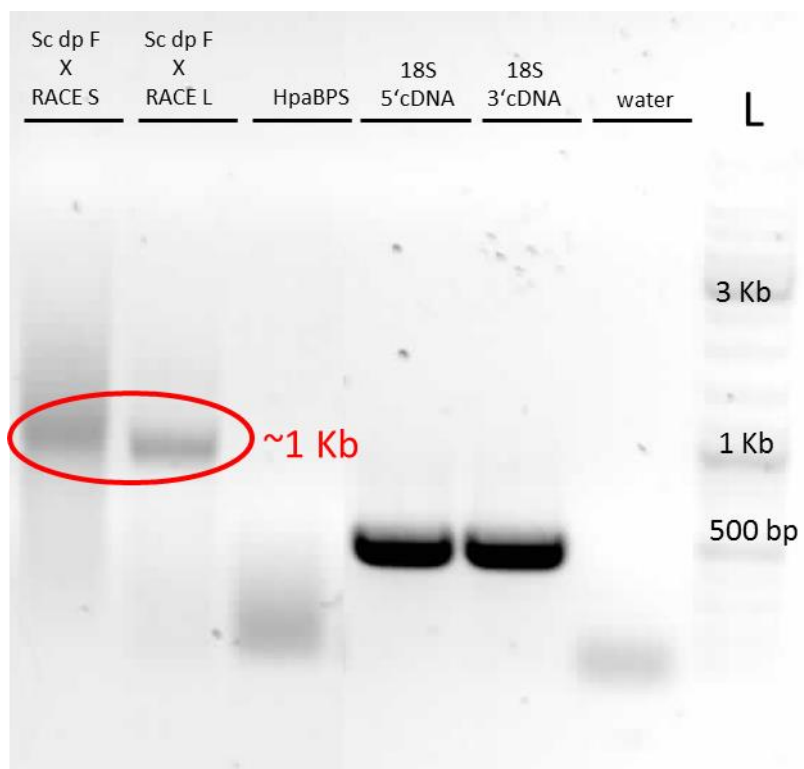
Percent Identity						
	1	2	3	4		
1		57	57.5	70.1	1	HpoBPS
2	64.3		90.7	63.9	2	HpBUS
3	63.4	10.0		63.7	3	HaBPS
4	38.4	49.4	49.7		4	HaCHS
	1	2	3	4		

**Figure 42** Percent identity among aminoacid sequences of *H. polyanthemum* benzophenone synthase (HpoBPS), *H. perforatum* isobutyrophenone synthase (HpBUS), *H. androsaemum* benzophenone synthase (HaBPS) and *H. androsaemum* chalcone synthase (HaCHS).

#### 6.5.2.4 BUS investigation in *H. polyanthemum* *in vitro* plants

*In vitro* plants of *H. polyanthemum* are rich in phloroglucinol and benzopyran derivatives. The biosynthesis of such compounds is likely to involve isobutyrophenone synthase activity (BUS). Despite not presenting any PCR product even when screened with overexpression primers of other benzoate-specific type III PKSs, the differential accumulation profile verified in *in vitro* plants indicates an investable chance to isolate, for the first time, BUS cDNA involved in acylphloroglucinol formation.

For this purpose, further explorations were realized with cDNA isolated from *in vitro* plants. A new series of amplifications were performed through a different strategy which allows a broad array of possibilities of transcript amplifications. Distinct forward overexpression primers from *H. perforatum* BUS, *H. androsaemum* BPSs, *H. perforatum* subsp. *angustifolium* BPS and a degenerate primer from *Swertia chirata* (Sc dp F; AGARWAL, 2013) were used against reverse RACE long/ RACE short nested primers. In these trials, one interesting band of approximately 1Kb size was found with Sc dp F and RACE long/RACE short amplification (Figure 43).



**Figure 43** PCR products of amplification using *in vitro* plants cDNA and degenerate primers of *Swertia chirata* against reverse RACE short (Sc dp S x RACE S) and RACE long (Sc dp F x RACE L) as well as forward overexpression primers of *H. perforatum* BUS (HpBUS), *H. androsaemum* BPS (HaBPS) and *H. perforatum* var *angustifolium* (HpaBPS) against RACE short. The quality of employed cDNA was attested by two intense 500 bp bands after 5'cDNA and 3'cDNA 18S amplification. Purity of PCR conditions was assigned by the absence of bands when water was used as control template. L = 10 Kb ladder mark.

This band was extracted from the gel, ligated into the T-vector and sequenced, affording a sequence of around 875 bp. After cleaning the raw sequence obtained from the sequencing company adopting VecScreen database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>), a 3' end fragment corresponding to 707 bp of a putative ORF and 115 bp of 3' end untranslated region (3'UTR) were found to be cloned (Figure 44).

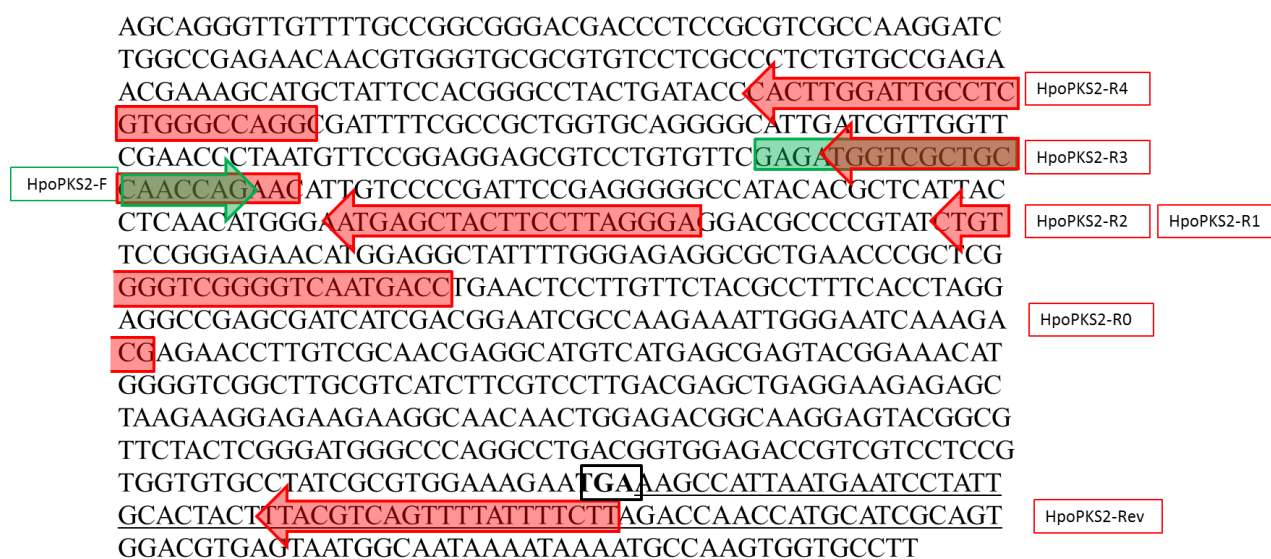
BLAST analysis of the deduced amino acid sequence endorse the ORF hypothesis since the presence of the three residues Cys<sup>164</sup>, His<sup>307</sup> and Asp<sup>340</sup> (numbered as in *Medicago sativa*, FERRER et al., 1999) known to compose the very conserved PKSs catalytic triad was accused. The compiled informations demonstrated that the cloned 3' end still missed around 490 bp and encodes a specific sequence, being named *H. polyanthemum* PKS2 (HpoPKS2).



QQGC F A G G T T L R V A K D L A E N N V G A R V L A L C A E N E S M L F H G P T D T H L D C L V G Q A I F A A G A G A L I V G S N P N V P E E R P V F E M V A A N Q N I V P D S E G A I H A H Y L N M G M S Y F L R E D A P Y L F R E N M E M V A A N Q N I V P D S E G A I H A H Y L N M G M S Y F L R E D A P Y L F R E N M E A I L G E A L N P L G V G V N D L N S L F Y A F H L G G R A I I D G I A K K L G I K D E N L V A T R H V M S E Y G N M G S A C V I F V L D E L R K R A K K E K K A T T G D G K E Y G V L L G M G P G L T V E T V V L R G V P I A W K E		
Initiation pocket	Elongation pocket	Catalytic triad
A = Alanine	I = Isoleucine	R = Arginine
C = Cysteine	K = Lysine	S = Serine
D = Aspartic acid	L = Leucine	T = Threonine
E = Glutamic acid	M = Methionine	V = Valine
F = Phenylalanine	N = Asparagine	W = Tryptophan
G = Glycine	P = Proline	Y = Tyrosine
H = Histidine	Q = Glutamine	

**Figure 44** Amino acid sequence of HpoPKS2 indicating its active sites composed of initiation pocket, elongation pocket and catalytic triad according to the colors of the pink, yellow and blue shades, respectively.

Once HpoPKS2 was sequenced, it was used as template for design of forward and reverse gene specific primers (GSP) in order to perform 5'RACE protocols and obtain the full length sequence. One forward primer used against any other reverse GSP to confirm the presence of the HpoPKS2 fragment in amplified products from 5'RACE and five reverse primers (HpBPS-4, HpBPS-3, HpoPKS2-R2, HpoPKS2-R1, HpoPKS2-R0 and HpoPKS2-Rev) were designed (Figure 45). The properties of each primer and the expected band size of the fragment are listed in Table 20.



**Figure 45** Upstream nucleotide sequence of HpoPKS2 isolated from *H. polyanthemum* *in vitro* plants. The green arrow delimitates the position of the designed forward GSP HpoPKS2-F. Red arrows indicate the position of designed reverse GSP HpoPKS2-R4, HpoPKS2-R3, HpoPKS2-R2, HpoPKS2-R1, HpoPKS2-R0 and HpoPKS2-Rev. The framed bold TGA corresponds to the putative stop codon and the underlined stretch coincides with complete 3'UTR, right after followed by the poly(A) tail from vector ligation (not shown).

**Table 20** GSP designed for HpPKS2 5'RACE.

Primer	Original sequence (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Expected band size with 5' racing
HpoPKS2-F	ATCATATCATTCACCGTCTTCC	58.2	-
HpoPKS2-R4	CCACTTGGATTGCCTCGTGGGCCA	67.8	~650bp
Hpo-PKS2-R3	CGAGATGGTCGCTGCCAACCAGAA	66.1	~750bp
Hpo-PKS2-R2	GGATTGAGCTCCTTCCTTAGGGA	62.4	~900bp
Hpo-PKS2-R1	CCCGTTTGGGGTTCGGGGTCAA	65.7	~1000bp
Hpo-PKS2-R0	GATCATCGACGGAATCGCCAA	59.8	~1066 <sup>1</sup> bp
Hpo-Rev	GCACTACTTTACGTCCGTT	54.5	Full lenght <sup>2</sup>

<sup>1</sup>With F = 237 bp; <sup>2</sup>Together with HpoPKS2-F= 520 bp

Comparisons among HpoPKS2 and other PKSs sequences after BLAST of the sequence in NCBI, Medicinal Plant Genomic Resources, Gatersleben and Phytometacyn databases resulted in a maximum of around 70% identity with main hits appearing as BPSs and CHSs. Alignment with BPSs previously isolated in the host laboratory showed that HpoPKS2 (Figure 46, number 3) shares a maximum of 60% identity with the other two *Hypericum* BPSs, which is low enough to predict that HpoPKS2 is not a benzophenone synthase. Therefore, it was worthy to start 5'RACE to obtain the full length sequence for HpoPKS2 aiming a BUS full length.

Percent Identity						
	1	2	3	4		
1		98.5	58.2	57.3	1	HaBPS
2	1.5		58.2	57	2	HsBPS
3	60.4	60.4		44.2	3	HpoPKS2 (3'end 157aa)
4	62.3	62.8	97		4	ScPKS2
	1	2	3	4		

Figure 46 Percent identity among amino acid sequences of *H. androsaemum* benzophenone synthase (HaBPS), *H. sampsonii* benzophenone synthase (HsBPS), the terminal 157 amino acids from PKS2 fragment from *H. polyanthemum* plants (HpoPKS2) and *Swertia chirata* benzophenone synthase (ScPKS2).

### 6.5.2.5 Semi-quantitative PCR of HpoPKS2, HpoBS and 1,3,7-XS

Additional study was carried out to aid hypothesis that HpoPKS2 is a BUS. Transcripts were semi-quantitatively monitored in *in vitro* plants from the first to the seventh week of cultivation. Overexpression primers of HpoBPS (the same used for HpPKS amplification (BELHADJ, 2013; Table 5 this study), a primer pair corresponding to a very conserved middle fragment region of around 560 bp in 1,3,7-trihydroxyxanthone synthase (1,3,7-TXS; El-Awaad unpublished results) and HpoPKS2-F against HpoPKS2-Rev, expecting to amplify 514 bp from HpoPKS2 sequence, were used. Semi-quantification was achieved by using the same amount of initial RNA for all the sample reactions, followed by normalization of the band intensity after visualization under UV light by 18S expression from the same pool of cDNA. ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) software was used to quantify the intensity of the PCR product bands.

The attempt demonstrated that neither HpoBPS nor 1,3,7-TXS amplifications resulted in bands after performed PCR. Both these enzymes are expected to cooperate in xanthone biosynthesis since BPS enzymes are known to supply 2,4,6-trihydroxybenzophenone substrate to the downstream 1,3,7-TXS enzyme. *H. polyanthemum in vitro* plants did not constitutively produce such class of compounds, demonstrating that the absence of bands correlates the phytochemical and biochemical profiles in plant tissues. cDNA samples from cell suspension cultures and adventitious roots were submitted to the same

amplification conditions using 1,3,7-TXS primer pair and they showed the correspondent 560 bp fragment. This achievement is expected since expression of a BPS (HpoBPS) was already proved in the *in vitro* system for cells (Figure 47).

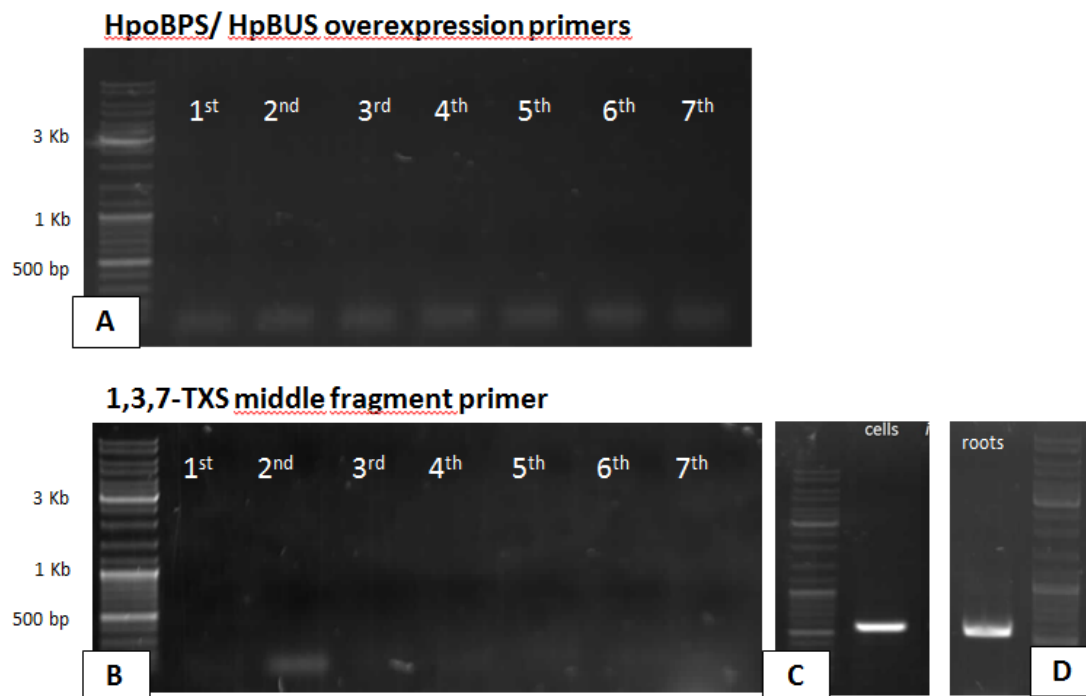
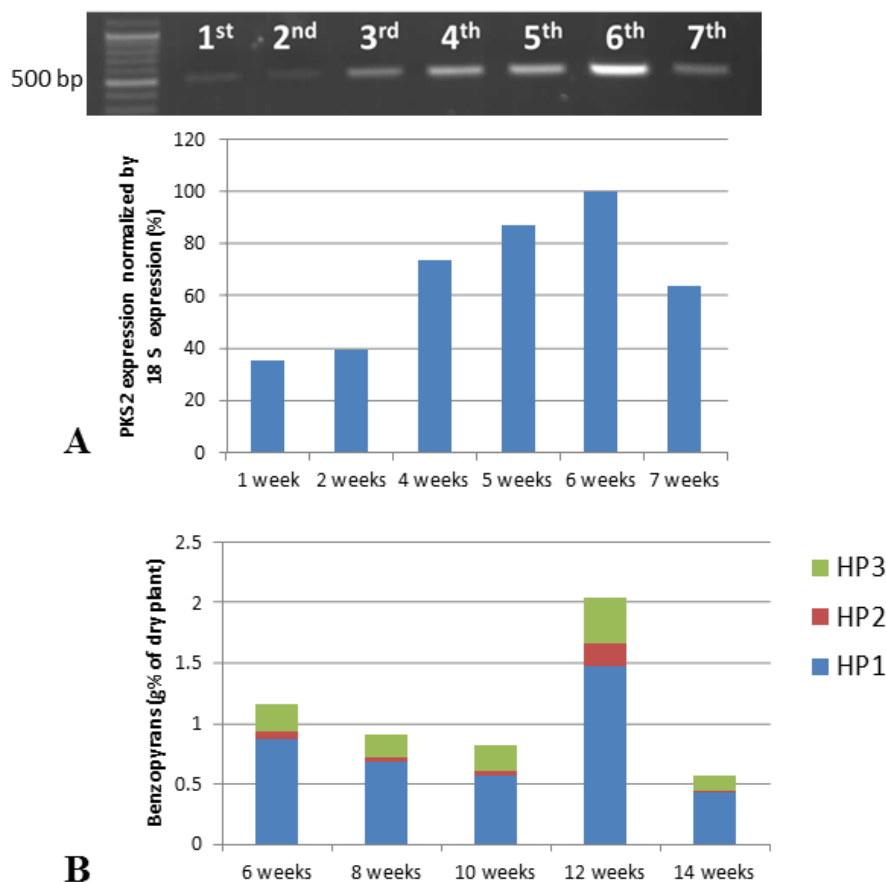


Figure 47 Screening of plant cDNA with (A) HpoBPS/HpBUS overexpression primers and (B) 1,3,7-TXS middle fragment primers, demonstrating that it is not possible to detect any band for xanthone-related enzymes in plants, a system which does not accumulate this class of compound. Positive PCR amplification was performed with (C) cell culture cDNA, where previously expression of HpoBPS and accumulation of xanthenes was proved. (D) Use of adventitious roots cDNA.

Regarding the specific HpoPKS2 514 bp fragment (obtained with HpoPKS2-F against HpoPKS2-Rev primers), clear amplification bands were detected during the whole analyzed period. An increase in expression with maximum at sixth week was observed. When comparing with benzopyrans quantification in *in vitro* plants (BERNARDI, 2007) it is possible to observe that a decrease in benzopyrans amount starts after sixth week of cultivation, at the same time that HpoPKS2 is found to lower its expression (Figure 48A). On the other hand, the complete array of possible BUS-derived secondary metabolites should be considered, such as phloroglucinol derivatives. It may explain the discrepant maximum amount of the three benzopyrans occurring in twelfth week (Figure 48B).



**Figure 48** Semi-quantitative expression analysis of HpoPKS2 by 18S expression normalization (top) and benzopyrans production (bottom) in *in vitro* *H. polyanthemum* plants from first to seventh week of growth.

### 6.5.2.6 5'RACE for HpoPKS2

After isolating 3' end of a new ORF, 5'RACE took place through numerous trials of protocols with different strategies. TATA box amplifications, 5'C-tailing of cDNA with TdT, Smart II reverse transcription and several amplifications with different combinations of overexpression and degenerate primers for type III PKSs were carried out. An HpoBPS isomer sequence, 5 non-specific sequences and 2 unread plasmids were obtained as a result of these attempts. Due to the arduous task that 5'end isolation characterizes and the limited time in the host laboratory, a full-length sequence of the putative BUS from *H. polyanthemum* was not achieved, but the *in vitro* plants of this species still constitute a great opportunity for isolating a cDNA encoding isobutyrophenone synthase.

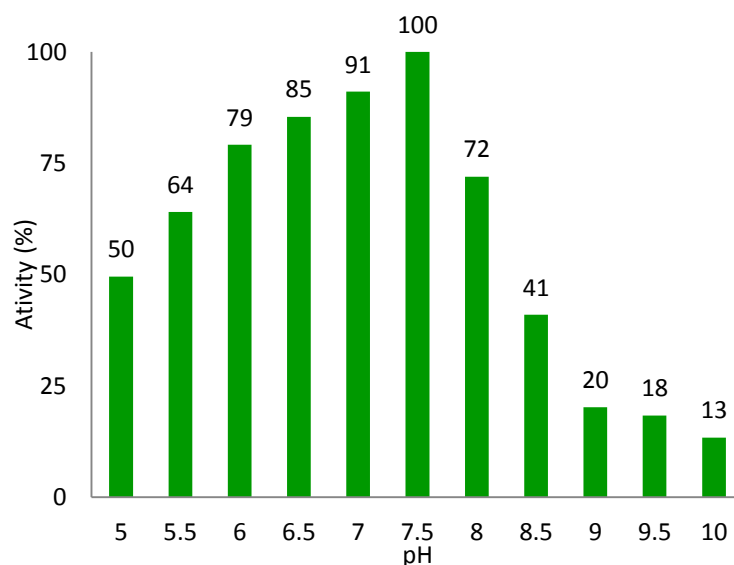
### **6.5.3 Biochemical characterization of HpoBPS**

The enzymatic assays with the extender substrate malonyl-CoA and different activated CoA-esters as starter substrates revealed that benzoyl-CoA is the starter molecule of preference, leading to the formation of 2,4,6-trihydroxybenzophenone. This behavior, supported by the presence of the catalytic triad present in all known PKSs until now (amino acids cysteine<sup>164</sup>, histidine<sup>303</sup> and asparagine<sup>336</sup>) is in accordance to a BPS activity for this enzyme. Reaction time, reaction pH and protein amount are enzymatic assay parameters that are currently being optimized in order to determine kinetic parameters of the enzyme.

#### **6.5.2.1 pH optimum**

The pH of a reaction plays an important role on the enzyme performance. Structure and activity of enzymes can be altered according to the pH of a reaction solution due to the change in the state of ionization of acidic or basic amino acids, and might lead to enzyme inactivation. Besides, changes in pH may also affect the shape or charge properties of the substrate, so that the substrate either cannot bind to the active site or cannot undergo catalysis.

Aiming to find the best pH for HpoBPS1, the same enzymatic reaction was performed in a range from pH 5 to 10. The optimum pH was 7.5 although there was a relatively broad pH optimum. All subsequent tests were performed at pH 7.5 in 0.1 M potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) buffer (Figure 49).

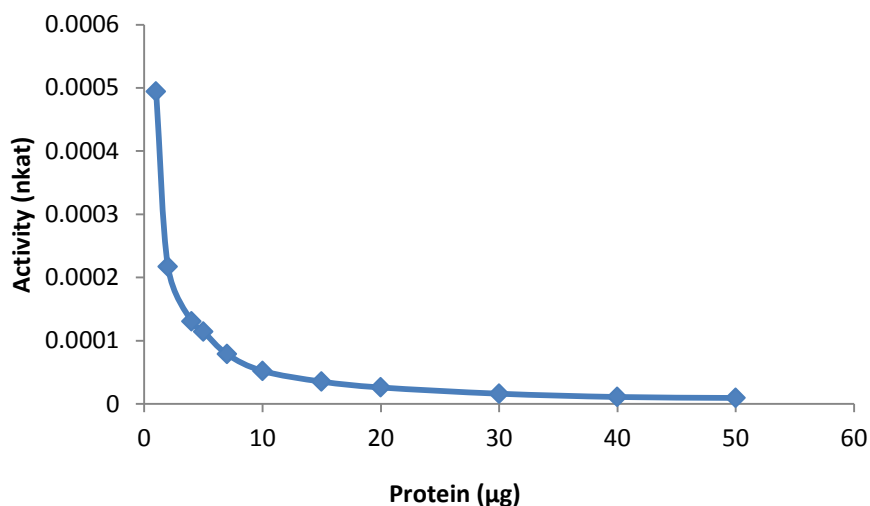


**Figure 49** Dependence of HpoBPS activity on pH.

### 6.5.2.2 Linearity with protein concentration

Investigating the effect of protein concentration on the reaction rate is important to avoid limitation in the reaction rate due to enzyme amounts too low or too high. Any change in the amount of product formed over a specified period of time will be dependent on the level of enzyme present.

The amount of enzymatically formed 2,4,6-trihydroxybenzophenone (nmol) was determined as a function of the protein amount in the standard assay. Usually what is expected between enzyme concentration and product formation is a direct and linear ratio until the saturation point from where on increasing protein concentration will not result in increasing of product formation. Nevertheless, for HpoBPS it is appositively observed. Increasing amounts of protein concentration result in diminished amounts of product formation. It can be due to the fact that some inhibiting compound is present with the enzyme (Figure 50).

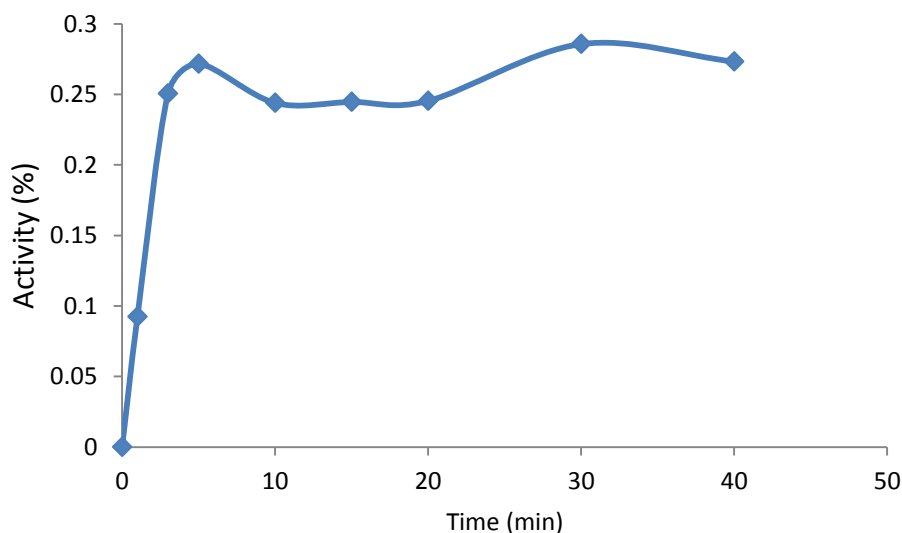


**Figure 50** Dependence of HpoBPS activity on protein concentration.

### 6.5.2.3 Linearity with incubation time

The product formation rate of an enzyme-catalysed reaction is dependent on the time, being increasingly high in the beginning and reaching a plateau afterwards. Later, enzyme instability and substrate depletion may occur.

Enzymatically formed 2,4,6-trihydroxybenzophenone (nmol) was determined as a function of incubation time in the standard assay. Product formation was linear with incubation time up to 5 minutes (Figure 51).



**Figure 51** Dependence of HpoBPS activity on incubation time.



#### 6.5.2.4 Study of substrate specificity

At the pH and temperature optima (7.5 and 37°C, respectively), spectrophotometric assays were performed using a series of substrates at a final concentration of 3.2 ng/μL. The incubation time was 5 min, and 4 μg of protein per assay was used. The preferred substrate for HpoBPS was benzoyl-CoA followed by isobutyryl-CoA (78% relative activity). No activity was detected with 2-hydroxybenzoyl-CoA, 4-hydroxybenzoyl-CoA or octanoyl-CoA (Figure 52).

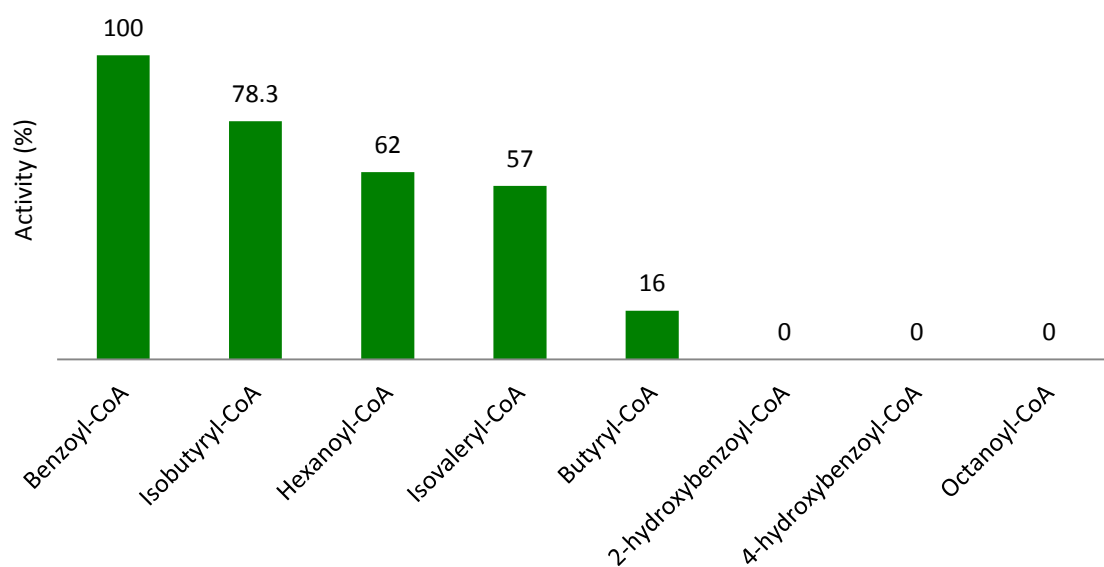
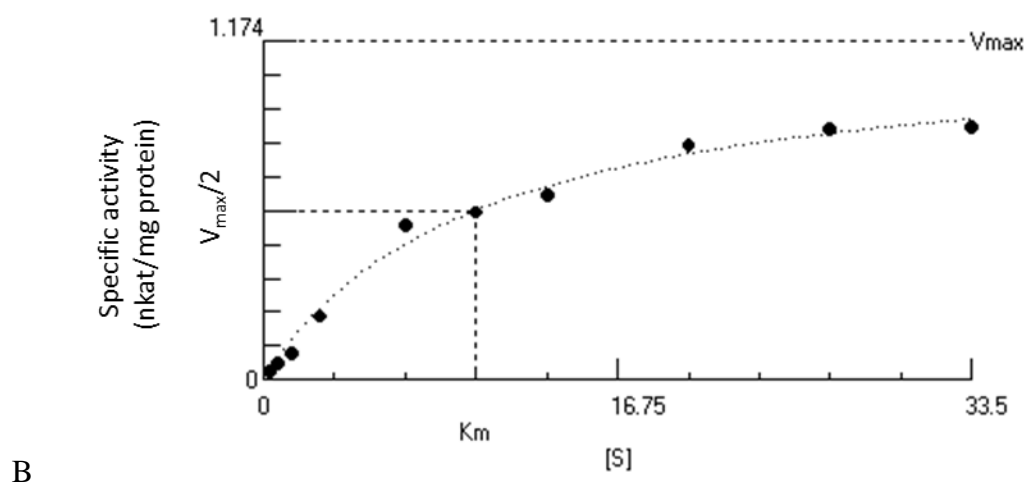
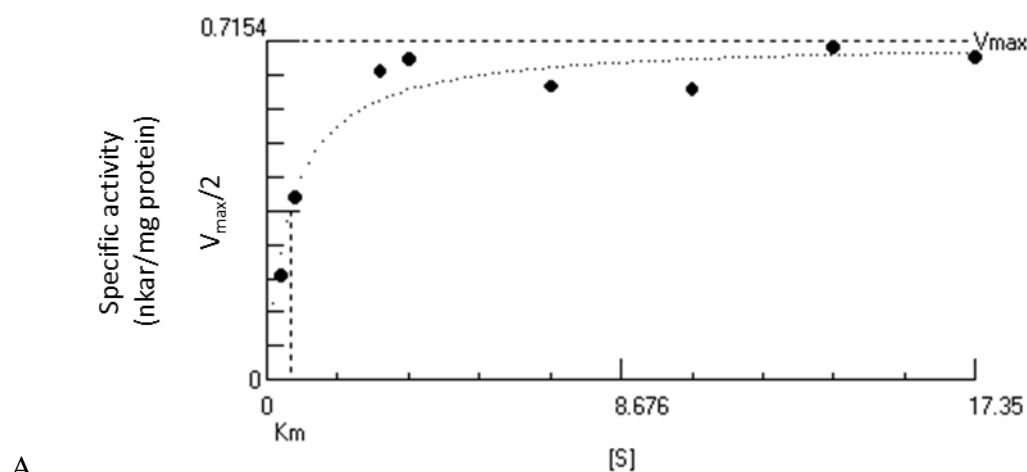


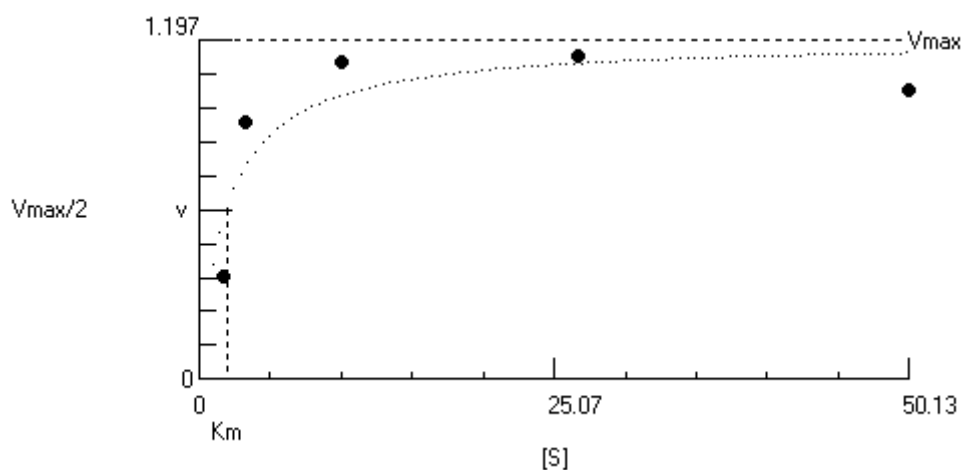
Figure 52 Substrate specificity of HpoBPS.

#### 6.5.2.5 Determination of kinetic parameters

At optimum pH 7.5, temperature 37°C and 4 μg/assay of purified protein, the kinetic properties of HpoBPS were determined. The increase in reaction rate with increasing concentrations of substrates (benzoyl-CoA or isobutyryl-CoA and malonyl-CoA) obeyed Michealis-Menten kinetics (Figure 53). The Michaelis constant ( $K_m$ ) allows measuring the affinity of an enzyme for its substrate. A low  $K_m$  indicates that the enzyme requires only a small level of substrate to become saturated. Hence, the maximum velocity is reached at relatively low substrate concentrations.

The  $K_{cat}$  value (the turnover number) is the number of substrate molecules that each active site converts to produce product molecules per unit time, in which the enzyme is working at maximum efficiency. It is a measure of  $V_{max}$ /enzyme concentration. The ratio  $K_{cat}/K_m$  defines a measure of the catalytic efficiency of an enzyme-substrate pair. The  $K_m$  values of HpoBPS, as determined from Michaelis-Menten were  $0.58 \mu\text{M}$  for benzoyl-CoA,  $10 \mu\text{M}$  for isobutyryl-CoA and  $1.71 \mu\text{M}$  for malonyl-CoA (Figure 53). The kinetic parameters are summarized in Table 21.





C

**Figure 53** Dependence of HpoBPS1 activity on benzoyl-CoA (A), isobutyryl-CoA (B) and malonyl-CoA (c) concentrations via Michaelis-Menten plots.

**Table 21** Kinetic parameters of HpoBPS1.

	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\max}$ [nkat/mg]	$K_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
Benzoyl-CoA	0.58	0.71	0.062	105276
Isobutyryl-CoA	10	1.17	0.100	10062
Malonyl-CoA	1.71	1.07	0.092	53813

It is important to point out that  $K_m$  for benzoyl-CoA is almost 20-fold lower than the same parameter calculated for isobutyryl-CoA, clearly indicating a benzophenone synthase function for the enzyme. Furthermore, the  $K_m$  of HpoBPS1 was also lower than the values observed for BPSs from *H. androsaemum* ( $K_m = 5.7 \mu\text{M}$ ; LIU et al., 2003), *H. perforatum*, with ( $K_m = 15.8 \mu\text{M}$ ; TOCCI, 2013) and *H. sampsonii*, with ( $K_m = 15.8 \mu\text{M}$ ; ABDELAZIZ, 2014).

## 6.6 CONCLUSION

Due to phytochemical and biological studies of medicinal plants and *in vitro* systems, cell and tissue cultures are recognized as promising alternatives to entire plants in the production of secondary metabolites. In order to study biosynthesis of main compounds produced by *H. polyanthemum in vitro* plants, cell suspensions and adventitious root cultures were established as an alternative for rapid and stable tissue production with biosynthetic capacity. Preliminary phytochemical

analysis indicated the presence of low quantities of benzopyrans and phloroglucinol derivatives, leading to the first investigations of enzymatic profiles in this species.

After RNA extraction from cell cultures and amplification of cDNA, a band of 1.2 Kb was obtained as PCR product when a BUS (but also with some BPS activity) primer pair was used. Nevertheless, further phytochemical investigations with the same population of cell suspension cultures revealed that benzopyrans and phloroglucinol derivatives were not produced, but a broad array of xanthenes was synthesized instead. This observation was in agreement with the verified BPS functionality detected for the isolated transcript after overexpression in *E. coli*. The initially detected benzopyrans and phloroglucinols might be residuals produced by the enzymatic machinery before complete adaptation into callus and cell suspension cultures.

BPS enzymes catalyse formation of benzophenone derivatives that are known to be precursors for xanthone biosynthesis. This result was an important achievement regarding the *H. polyanthemum* species. Interestingly, cell and root cultures were found to display a very distinct phytochemical profile compared to plants and thus an altered gene expression profile as well. However, the objective of bringing to light an enzyme demonstrating high preference for isobutyryl-CoA was still remaining. For this purpose, *in vitro* plants of *H. polyanthemum* were investigated as an encouraging system to isolate an isobutyrophenone synthase cDNA involved in acylphloroglucinol formation.

After new attempts directed to *in vitro* plant material, a second sequence was obtained and named HpoPKS2, encoding around 60% of the terminal portion of a type III PKS ORF. The performed 5'RACE trials did not supply the 5'end and hence no full-length sequence. After analysis of the partial deduced amino acid sequence, the identity with several *Hypericum* PKSs was found to distinguish it from BPSs and CHSs (<70% identity). This data together with the presence of the conserved catalytic triad, the time-dependent expression behaviour in plants and the absence of HpoPKS2 gene expression in cell and root cultures, which do not

produce isobutyryl-CoA derived products, allow to deduce that HpoPK2 is probably an isobutyrophenone synthase. To date, a cDNA encoding this PKS function has not yet been published, stimulating future research into this enzyme and biosynthetic pathway.

## 7. DISCUSSÃO GERAL

O estabelecimento do cultivo *in vitro* de *H. teretiusculum*, a otimização do processo de aclimatização de *H. polyanthemum* através da imposição de estresse abiótico, o estabelecimento do cultivo *in vitro* de raízes adventícias e o estudo de enzimas poliketídicas sintases do tipo III, envolvidas na biossíntese dos principais metabólitos secundários da mesma espécie, foram investigados e descritos no presente trabalho. Considerados em seu conjunto, os dados compilados somam-se aos estudos objetivando a otimização no uso dos recursos medicinais de origem vegetal e contribuem para a preservação e conhecimento das espécies de *Hypericum* da flora nativa do sul do Brasil.

Ao ser cultivado *in vitro* e aclimatizado em campo aberto, *H. teretiusculum* demonstrou não só a manutenção da biossíntese de metabólitos secundários como apresentou acúmulos quantificáveis de substâncias derivadas do floroglucinol, não detectados na planta *in natura*. A possibilidade de cultivo da espécie sob condições controladas, visando o aumento da produção dos metabólitos de interesse por ela produzidos, é de extrema importância visto que proporciona elevada quantidade na produção de biomassa vegetal e evita a exploração da espécie em seus locais naturais de crescimento.

Sob este mesmo aspecto, a combinação de diferentes estresses abióticos em plantas de *H. polyanthemum* basearam-se em protocolo de cultivo previamente estabelecido, e foram aplicados na décima oitava semana de aclimatização. Este período foi relatado como o ponto de máximo acúmulo de biomassa e benzopiranos na espécie (BERNARDI et al., 2008) e resultou em aumentos significativos especialmente na produção de uliginosina B e HP1, após a imposição de estresse hídrico nas plantas.

O estabelecimento do cultivo *in vitro* de raízes adventícias da mesma espécie demonstrou que a indução e a manutenção do cultivo dos tecidos podem ser alcançados com o uso da auxina ácido indol butírico, mantendo-se o crescimento estável em meio líquido. Por outro lado, o perfil fitoquímico das raízes adventícias, que no início do seu cultivo ainda apresentava o acúmulo de

derivados do floroglucinol, altera-se drasticamente comparativamente com as plântulas *in vitro* após a estabilização das culturas, passando a apresentar o predomínio da produção de uma variedade de xantonas. Esta mudança na composição química dos extratos indica a diferenciação no padrão da expressão gênica entre os tecidos.

Este mesmo fato, observado quando da análise das culturas de células em suspensão da espécie, embasaram as investigações de enzimas policetídeo sintases do tipo III na espécie, envolvidas, por exemplo, com a síntese de floroglucinois e precursores para a síntese de xantonas. O padrão diferencial de metabólitos secundários entre células em suspensão/raízes e plantas *in vitro* de *H. polyanthemum* apresentam-se como uma chance fortemente encorajadora para o estudo, nas plantas, de enzimas relacionadas à síntese de derivados benzopirânicos e do floroglucinol, ainda não completamente entendidas.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

A partir do delineamento, execução e análise do presente trabalho, é possível destacar que:

- ✓ O cultivo *in vitro* de *H. teretiusculum* foi estabelecido e plântulas cultivadas em meio MΔ suplementado com 0,5 mg/L de AIB foram aclimatizadas.
- ✓ Após 18 semanas de aclimatização, as plantas de *H. teretiusculum* desenvolveram-se satisfatoriamente, com taxa de sobrevivência de 100% e, além de uliginosina B, verificada em traços na planta *in natura*, apresentaram a capacidade de acumularem japonicina A, hiperbrasilol B e isohiperbrasilol B, não detectados na planta *in natura*.
- ✓ Após avaliada juntamente com a imposição de dano mecânico, aplicação de ácido salicílico (sozinhos ou combinados), fertilização e fertilização juntamente com estresse hídrico, a condição de seca ao qual plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* foram submetidas apresentou-se como uma eficiente maneira de incrementar a produção de uliginosina B (40 vezes nas folhas e 6 vezes nas flores) e HP1, metabólitos produzidos pela planta que destacam-se pelas suas atividades biológicas apresentadas, como antidepressiva e analgésica.
- ✓ Quando fertilizadas, estas mesmas plantas aclimatizadas apresentaram maior acúmulo de biomassa vegetal e, quando a fertilização foi aplicada simultaneamente ao tratamento de seca, mostrou-se capaz de mitigar os danos causados pela condição de limitação hídrica das plantas.
- ✓ Culturas de raízes adventícias de *H. polyanthemum* foram estabelecidas *in vitro*, comparadas quanto ao seu crescimento a partir de diferentes quantidades iniciais de raiz e em meios contendo diferentes



concentrações de sacarose resultando em maior acúmulo de biomassa vegetal quando 20 g/L de raízes foram cultivadas por 8 semanas em meio MA contendo de 3% a 5% de sacarose.

- ✓ O perfil fitoquímico observado nas culturas de raízes adventícias após estabilização do cultivo *in vitro* revelou-se consideravelmente diferente do observado nas plântulas *in vitro*, com predomínio da biossíntese de xantonas em detrimento da produção de derivados benzopirânicos e do floroglucinol.
- ✓ A investigação de enzimas policetídeo sintases do tipo III em culturas de células em suspensão de *H. polyanthemum* revelou a presença de cDNA codificante de uma benzofenona sintase, catalizadora da formação de 2,4,6-tri-hidroxibenzofenona, molécula precursora na síntese de xantonas, estruturas estas verificadas nas células
- ✓ A partir de plantas *in vitro* de *H. polyanthemum* foi isolado um fragmento 3'-terminal de cDNA específico de enzimas policetídeo sintase do tipo III, denominado HpoPKS2. Embora não seja possível sua caracterização bioquímica devido ao mesmo não constituir-se em um quadro de leitura aberta completo (em inglês, ORF = *open reading frame*), comparações da sequência parcial com outras sequências de enzimas do tipo benzofenona sintases (BPS) e a presença de derivados benzopirânicos e do floroglucinol ao invés de xantonas e outros derivados de atividade BPS, sugere-se que HpoPKS2 seja parte integrante de um cDNA codificador de uma enzima isobutirofenona sintase.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-MAWLA, A.M.A. Xanthonés from cell cultures of *Hypericum gnidioides* Seem. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, pp.105-111, 2005.
- ABE, I, WATANABE, T., NOGUCHI, H. Chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases from rhubarb (*Rheum palmatum*). **Proceedings of the Japan Academy Series B – Physical and Biological Sciences**, v. 81, pp. 434-440, 2005.
- ABE, I. Engineering of plant polyketide biosynthesis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, pp. 1505—1514, 2008.
- AGARWAL, P. Molecular cloning of a type III polyketide synthase from root cultures of *Swertia chirata*. **Dissertação de mestrado**, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, 2013, 95p.
- AHMED, S.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Aeration volume and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in bioreactor cultures of *Morinda citrifolia*. **Journal of Plant Biology**, v. 51, pp. 209–212, 2008.
- AUSTIN, M.B., NOEL, J.P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Natural Products Reports**, v. 20, pp. 79-110, 2003.
- AUSTIN, M.B., BOWMANN, M.E., FERRER, J.F., SCHRODER, J., NOEL, J.P. An Aldol Switch Discovered in Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity of Type III Polyketide Synthases. **Chemistry & Biology**, v. 11, pp. 1179–1194, 2004.
- BAQUE, M.A.; HAHN, E.-J.; PAEK, K.-P. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 46, pp. 71–80, 2010.
- BAQUE, M.A.; Moh, S.-H.; Lee, E.-J.; Zhong, J.-J.; Paek, K.-Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v. 30, pp. 1255–1267, 2012a.
- BAQUE, M.A.; ELGIRBAN, A.; LEE, E.-J.; PAEK, K.-Y. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, pp. 405–415, 2012b.
- BEERHUES, L. Hyperforin. **Phytochemistry**, v. 67, pp. 2201–2207, 2006.
- BEERHUES, L., LIU, B., FERRER, J., Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. **Phytochemistry**, v. 70, pp. 1719–1727, 2009.

- BEERHUES, L., LIU, B. Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. **Phytochemistry**, v. 70, pp. 1719–1727, 2012.
- BELHADJ EP HADDAD, I. cDNA-Klonierung, Mutagenese und Lokalisation der Isobutyrophenon-Synthase aus *Hypericum perforatum*. **Tese de doutorado**. *Teschnische Universität Braunschweig*, Braunschweig, 2013, 178p.
- BERNARDI, A.P.M. Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas in vitro de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, UFRGS, 2007.
- BERNARDI, A.P.M.; MAURMANN, N.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured in vitro. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, pp. 165-170, 2007.
- BERNARDI, A.P.M.; NUNES, J.M.; MARCHIORO, M.K.; ROSA, L.M.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Phenolic compounds profiles during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, pp. 694-700, 2008.
- BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John's wort and depression, efficacy, safety and tolerability – an update. **Life sciences**, pp. 3077-3096, 2002.
- BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 66, pp. 43-68, 1995.
- BOUBAKIR, Z.; BEUERLE, T.; LIU, B.; BEERHUES, L. The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, pp. 51–57, 2005.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248-254, 1976.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U. 02 de junho de 2003.
- BRISKIN, D.P.; GAWIENOWSKI, M.C. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, pp. 1075-1081, 2001.
- BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A.; Solubilized which other constituents of St. John's wort contribute to its hypericin

- and pseudohypericin from *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v. 64, pp. 291–294, 1998.
- BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H.; Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v. 66, pp. 3-6, 2000.
- BRUTOVSKÁ, R.; ČELLÁROVÁ, E.; DOLEŽEL, J. Cytogenetic variability of *in vitro* regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. **Plant Science**, v. 133, pp. 221-229, 1998.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. MEIOS NUTRITIVOS. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed) Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas. EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, Brasília, 1998.
- CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology – Review. **Trends in Biotechnology**, v. 23, pp. 180-185, 2005.
- CARDONA, M.L.; FERNANDEZ, I.; PEDRO, J.R.; SERRANO A. Xanthenes from *Hypericum reflexum*. **Phytochemistry**, v. 29, pp. 3003-3006, 1990.
- CARDOSO, M.A., DE OLIVEIRA, D.E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, pp. 91-94, 1996.
- CARGNING, S.T.; VIEIRA, P.B.; CIBULSKI, S.; CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; MONTANHA, J.A.; ROEHE, P.; TASCA, T.; VON POSER, G.L. Anti-Trichomonas vaginalis activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. **Parasitology International**, v. 62, pp. 112–117, 2013.
- CHAN, L.K.; DEWI, P.R.; BOEY, P.L. Effect of plant growth regulators on regeneration of plantlets from bud cultures of *Cymbopogon nardus* L. and the detection of essential oils from the *in vitro* plantlets. **Journal of Plant Biology**, v. 48, pp.142-145, 2005.
- CHATTERJEE, S., NÖLDNER, M., KOCH, E.; ERDELMEIER, C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. **Pharmacopsychiatry**, v. 31, pp. 7- 15, 1998.
- ÇIRAK, C.; SAĞLAM, B.; AYAN, A.K.; KEVSEROĞLU, K. Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the

- course of ontogenesis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, pp. 1-13, 2006.
- ÇIRAK, C.; RADUŠIEN, J.; KARABÜK, B.S.; Janulis, V. Variation of bioactive substances and morphological traits in *Hypericum perforatum* populations from Northern Turkey. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, pp. 403 – 409, 2007.
- ÇIRAK, C.; RADUŠIEN, J.; ÇAMAS, N. Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish *Hypericum* species: Variation among plant parts and phenological stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, pp. 377-382, 2008.
- ÇIRAK, C., RADUŠIENE, J., AKSOY H.M., MACKINAITE, R., STANIUS, Z., CAMAS, N., Odabas, M.S. Differential phenolic accumulation in two *Hypericum* species in response to inoculation with *Diploceras hypericinum* and *Pseudomonas putida*. **Plant Protection Science** v. 50, pp. 119-128, 2014;
- CHOI, S.M.; SON, S.H.; YUN, S.R.; KWON, O.W.; SEON, J.H.; PAEK, K.-Y. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 62, pp. 187- 193, 2000.
- COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annual Reviews in Plant Physiology**, v, 33, pp. 403-30, 1982.
- COSTE, A.; VLASE, L.; HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COLDEA, G. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 106, pp. 279-288, 2011.
- COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. **Plant Science**, v. 170, pp. 128–134, 2006.
- CONCEIÇÃO, L.F.R.; FERRERES, F.; TAVARES, R.M.; DIAS, A.C.P. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. **Phytochemistry**, v. 67, pp. 149-155, 2006.
- CUI, X.-H.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.-J., PAEK, K.-Y. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, pp. 4708–4716, 2010a.
- CUI, X.-H.; MURTHY, H.N.; WU, C.-H.; PAEK, K.-Y. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 103, pp. 7–14, 2010b.

- CUI, X.-H.; MURTHY, H.N.; WU, C.H.; PAEK, K.Y. Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, pp. 437–44, 2010c.
- CUI, X.-H.; MURTHY, H.N.; JIN, Y.-X., YIM, Y.-H., KIM, J.-Y., PAEK, K.-Y. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, pp. 10072–10079, 2011.
- DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, pp. 511-516, 2003.
- DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Bioassay guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytotherapy Research**, v. 19, pp. 291-293, 2005.
- DANOVA, K.; CELLÁROVÁ, E.; MACKOVÁ, A.; DAXNEROVÁ, Z. KAPCHINA-TOTEVA, V. *In vitro* culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 46, pp. 422-429, 2010.
- DAUDT, R.; VON POSER, G. L.; STAATS, C.; NEVES, G.; RATES, S. M. K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, pp. 344-346, 2000.
- DE ABREU, I.K.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, pp. 241-248, 2005.
- DIAS, A.C.P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERNANDES-FERREIRA, M.; FERRERES, F. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v. 48, pp. 1165-1168, 1998.
- DIAS, A.C.P.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B.; FERREIRA, M.F. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. **Plant Science**, v. 150, pp. 93-101, 2000.
- DIAS, A.C.P.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; FERREIRA, M.F. Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, pp. 821-827, 2001.

- DORNENBURG H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzymes and Microbiology and Technology**, v. 17, pp. 674-684, 1995.
- EBERHARDT, M. Phytochemische Untersuchung von *Hypericum irazuense* Kuntze und *Clusia valerioi* Standley (Clusiaceae). **Dissertação de Mestrado**. *Fakultät der Karl-Franzens-Universität Graz*, Graz, 2009.
- FAHEEM, M.; SINGH, S.; TANWER, B.S.; KHAN, M.; SHAHZAD, A. *In vitro* Regeneration of multiplication shoots in *Catharanthus roseus*- An important medicinal plant. **Advances in Applied Science Research**, v. 2, pp. 208-213, 2011.
- FARAHANI, H.A.; VALADABADI, S.A.; DANESHIAN, J.; SHIRANIRAD, A.H.; KHALVATI, M.A. Medicinal and aromatic plants farming under drought conditions. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 1, pp. 86-92, 2009.
- FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S. M. K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E. E. S., ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 12, pp. 236-240, 2005.
- FERRAZ, A.B.F.; BORDIGNON, S.A.L.; STAATS, C.; SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, pp. 1227-1230, 2001.
- FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPEMA J.; POHLMAN, A.R.; VON POSER, G.L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, pp. 989-991, 2002.
- FERRAZ, A. B. F.; LIMBERGER, R. P.; BORDIGNON, S. A. L.; VON POSER, G. L.; HENRIQUES, A. T. Essential oil in composition of six *Hypericum* species from Southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, pp. 335-339, 2005a.
- FERRAZ, A.; FARIA, D.H.; BENNETI, M.N., DA ROCHA, A.B; SCHWARTSMANN, G., HENRIQUES, A., VON POSER, G. Screening for the antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v. 12, pp. 112-115, 2005b.
- FERRAZ, A.; GRIVICICH, I.; VON POSER, G.L.; HENRIQUES, A.T.; SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA; A.B Antiproliferative activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 2, pp. 210-215, 2005c.
- FRANCK, T.; KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J.; DEBY, J.; GREIMERS, R.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots

- cultured on gelrite: a controlled stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, pp. 519-527, 2004.
- FRANKLIN, G.; OLIVEIRA, M.; DIAS, A.C.P. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. **Plant Science**, v. 172, pp. 1193-1203, 2006.
- FRANKLIN, G.; CONCEIÇÃO, L.F.R.; KOMBRINK, E.; DIAS, A.C.P. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. **Phytochemistry**, v. 70, pp. 60-68, 2009.
- FERRER, J.L., JEZ, J.M., BOWMAN, M.E., DIXON, R.A., NOEL, J.P. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. **Nature Structural Biology**, v. 6, pp. 775-784, 1999.
- FLORES-SANCHEZ, I.J., VERPOORTE, R. Plant Polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, pp.167–174, 2009.
- GAID, M.M.; SIRCAR, D.; MÜLLER, A.; BEUERLE, T.; LIU, B.; ERNST, L.; HÄNSCH, R.; BEERHUES, L. Cinnamate:CoA ligase initiates the biosynthesis of a benzoate-derived xanthone phytoalexin in *Hypericum calycinum* cell cultures. **Plant Physiology**, v. 160, pp. 1267-1280, 2012.
- GEORGIEV, M.I.; WEBER, J.; MACIUK, A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, pp. 809-823, 2009.
- GNERRE, C.; VON POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, V.; TESTA, B.; RATES, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, pp. 1273-1279, 2001.
- GÓMEZ-AGUIRRE, A.Y.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; TREJO-TAPIA, G. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. **Industrial Crops and Products**, v. 36, pp. 188–195, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. MICROPROPAGAÇÃO. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ª ed. Brasília: Embrapa- SPI /Embrapa- CNPH, 1998. v. 1., p. 183-260.
- GRIVICICH, I.; FERRAZ, A.; FARIA, D.H.; REGNER, A.; SCHWARTSMANN, G; HENRIQUES, A.T.; VON POSER, G.L.; ROHA, A.B. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, pp. 1273-1279, 2001.



- GREESON, J.M.; SANFORD, B.; MONTI, D.A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. **Psychopharmacology**, v. 153, pp. 401-414, 2001.
- GUO, Y., MA, L., JI, Y., PU, G., LIU, B., DU, Z., LI, G., YE H., WANG H. Isolation of the 5'-end of plant gene by TATA-box Degenerate Primers polymerase chain reaction. **Molecular Biotechnology**, v. 47, pp.152-156, 2011.
- HAAS, J.S. Isolamento e avaliação biológica de compostos fenólicos de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2010, 128p.
- HAAS, J.S.; VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.M.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The antinociceptive effect of a benzopiran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test blocked by naloxone. **Planta Medica**, v. 76, pp. 1-5, 2010.
- HOSNI, K.; MSAADA, K.; TAÂRIT, M.B.; MARZOUK, B. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, pp. 43-50, 2011.
- HOUSTI, F.; ANDARY, C.; GARGADENNEC, A.; AMSSA, M. Effects of wounding and salicylic acid on hydroxycinnamoylmalic acids in *Thunbergia alata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, pp. 761-769, 2002.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTRON, A.; WOLFENDER, J.L. Strategy in the search for new biologically active plant constituents. In: Hostettmann K, Marston A, Maillard M, Hamburger M (eds) *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 17-45, 1995.
- HU, L.H.; YIP, S.C.; SIM, K.Y. Xanthenes from *Hypericum ascyron*. **Phytochemistry**, v. 52, pp. 1371-1373, 1999.
- ICH. Internatioal Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Topic Q2B, 1996. ICH Steering Committee, 1996.
- IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, pp. 145 – 150, 2005.
- JEONG, C.S.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.-J.; LEE, H.-L.; PAEK, K.-Y. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production

- in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, pp. 252–263, 2006.
- JEONG, C.S.; MURTHY, H.N.; HAHN, E.J.; LEE, H.L., PAEK, K.Y. Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, pp. 219–222, 2009a.
- JEONG, J.A.; WU, C.H.; MURTHY, H.N.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, pp. 91-98, 2009b.
- JEZ, J.M., AUSTIN, M.B., FERRER, J.L., BOWMAN, M.E., SCHRÖDER, J., NOEL, J.P. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. **Chemistry and Biology**, v. 7, pp. 919-930.
- KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase in vitro culture using sorbitol increasing shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, pp. 207-215, 2001.
- KAPAI, V.Y.; KAPOOR, P.; RAO I.U. *In Vitro* Propagation for Conservation of Rare and Threatened Plants of India – A Review. **International Journal of Biological Technology**, v. 1, pp. 1-14, 2010.
- KARPPINEN, K.; HOKKANEN, J.; MATTILA, S.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Octaketide-producing type III polyketide synthase from *Hypericum perforatum* is expressed in dark glands accumulating hypericins. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 275, pp. 4329–4342, 2008.
- KIRAKOSYAN, A.; HAYASHI, H.; INOUE, K.; CHARCHOGLYAN, A.; VARDAPETYAN, H. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, v. 53, pp. 345-348, 2000.
- KASPER, S. *Hypericum perforatum*: a review of clinical studies. **Pharmacopsychiatry**, v. 34, pp. S51-S55, 2001.
- KIM, Y.S.; HAHN, E.J.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.-Y. Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of ginseng. **Journal of Plan Biology**, v. 47, pp. 356- 360, 2004.
- KLINGAUF, P.; BEUERLE, T.; MELLENTHIN, A.; EL-MOGHAZY, S.A.M.; BOUBAKIR, Z.; BEERHUES, L. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 66, pp. 139-145, 2005.
- KLUNDT, T., BOCOLA, M., LÜTGE, M., BUERLE, T., LIU, B., BEERHUES, L. Synthase benzophenone synthase into phenylpyrone a single amino acid

- substitution converts benzophenone synthase into phenylpirone synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, pp. 30957-30964, 2009.
- KOLEWE, M. E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmacology**, v. 5, pp. 243–256, 2008.
- LAEMMLI UK.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, pp. 680-685, 1970.
- LAIA, C.-C.; LINB, H.-M.; NALAWADEC, S.M.; FANGA, W.; TSAY, H.-S. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, pp. 355-361, 2005.
- LANGHANSOVA, L.; MARSIK, P.; VANEK, T. Regulation of tissue differentiation by plant growth regulators on tTCLs of *Panax ginseng* adventitious roots. **Industrial Crops and Products**, v. 35, pp. 154– 159, 2012.
- LEE, C.W.T.; SHULER, M.L. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of Ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, pp. 61-71, 2000.
- LEE, E.J.; MOBIN, M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.-Y. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. **Journal of Plant Biology**, v. 49, pp. 427-431, 2006.
- LEE, E.J.; MOHC, S.-H.; PAEK, K.-Y. Influence of inoculum density and aeration volume on biomass and bioactive compound production in bulb-type bubble bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum*. **Bioresource Technology**, v. 102, pp. 7165–7170, 2011.
- LEE, E.-J.; PAEK, K.-Y. Enhanced productivity of biomass and bioactive compounds through bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai adventitious roots affected by medium salt strength. **Industrial Crops and Products**, v. 36, pp. 460–465, 2012.
- LIU, B., RAETH, T., BEUERLE, T. AND BEERHUES, L. Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. **Planta**, v. 225, pp. 1495-1503, 2007.
- LOAKE, G.; GRANT, M. Salicylic acid in plant defence - the players and protagonists. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, pp. 466–472, 2007.
- LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, v. 34, pp. 785–801, 2011.

- LUCCHESINI, M.; MENSUALI-SODI, A. Plant Tissue Culture - An Opportunity for the Production of Nutraceuticals. *In* GIRARDI, M.T.; REA, G.; BERRA, B. Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. Landes Bioscience e “Springer Science + Business Media”, Pisa, 2010, v.1, p 185-202.
- MAURMANN, N.; DE CARVALHO, C.M.B.; SILVA, A.L.; FETT-NETO, A.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 42, pp. 50–53, 2006
- MAURMANN, N., RECH, S.B., FETT-NETO, A.G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 44, pp. 209–215, 2008.
- MEIRELLES, G.; PINHATT, A.V.; SOSA-GOMEZ, D.; ROSA, L.M.G. RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Influence of fungal elicitation with *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in the metabolism of acclimatized plants of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 112, pp. 374-375, 2013.
- MENDES F.R., MATTEI, R., CARLINI, E.L.A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, pp. 462-471, 2002.
- MELZER, J. BRIGNOLI, R.; KECK, M.E.; SALLER, R. A *Hypericum* extract in the treatment of depressive symptoms in outpatients: an open study. **Forsch Komplementmed**, v. 17, pp. 7-14, 2010. [Consulta ao Resumo]
- MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. Effect of substrate, medium composition, irradiance and ventilation on jojoba plantlets at the rooting stage of micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v. 121, pp. 113-118, 2009.
- MIN, J.Y.; JUNG, H.Y.; KANG, S.M.; KIM, Y.D.; KANG, Y.M.; PARK, D.J.; PRASAD, D.T.; CHOI, M.S. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scoplia parviflora* adventitious roots. **Bioresource Technology**, v. 98, pp. 1748–1753, 2007.
- MOGHADDAM, P.R.; FALLAHI, J.; SHAJARI, M.A.; MAHALLATI, M.N. Effects of harvest date, harvest time, and post-harvest management on quantitative and qualitative traits in seedless barberry (*Berberis vulgaris* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 42, pp. 30-36, 2013.
- MOORE, B.S., HOPKE, J.N. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. **European Journal of Chemical Biology**, v. 2, pp.35-38, 2005.

- MOURA, M. Conservation of *Hypericum foliosum* Alton, an endemic Azorean species, by micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 34, pp. 244-248, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, pp. 473-497, 1962.
- MURCH, S.P., RUPASINGHE, H.P.V., SAXENA, P.K. An *in vitro* and hydroponic growing system for hypericin, pseudohypericin, and hyperforin production of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv New Stem). **Planta Medica**, v. 68, pp. 1108-1112, 2002.
- NCUBE, B., FINNIE, J.F., VAN STADEN, J. Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants: Review Article. *South African Journal of Botany*, v. 82, pp. 11-20, 2012.
- NETO, C.P.C.; HERNANDEZ, F.F.F.; BEZERRA, F.C.B.; SOUZA, R.F.; CAVALCANTI, M.L.F. Efeito da concentração salina da solução nutritiva na aclimação de plantas micropropagadas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, pp. 1-8, 2004.
- NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ A.B.F.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILLAUME, D.; VON POSER, G.L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, pp. 517-519, 2004.
- NUNES, J.M.; PINTO, P.S.; BORDIGNON, S.A.L.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Phenolic compounds in *Hypericum* species from the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, pp. 224-228, 2010.
- NUNES, J.M.; PINHATTI, A.V.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Promotive effects of long term fertilization on grown of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. **Industrial Crops and Products**, v. 30, pp. 329-332, 2009a.
- NUNES, J.M.; PINHATTI, A.V.; ROSA, L.M.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Roles of *in vitro* plantlet age and growing period in the phenolic constituent yields of acclimatized *Hypericum polyanthemum*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, pp. 204-208, 2009b.
- OCHATT, S.J.; MUNEAUX, E.; MACHADO, C.; JACAS, L.; PONTÉCAILLE, C. The hyperhydricity of *in vitro* regenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, pp. 1021-1028, 2002.

- PAEK, K.-Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, pp. 287–300, 2005.
- PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, H.S.; PARK, Y.M., ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 99, pp. 199-205, 2004.
- PASQUA, G.; AVATO, P.; MONACELLI, B.; SANTAMARIA, A.R.; ARGENTIERI, M.P. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Science**, v. 165, pp. 977-982, 2003.
- PASSALACQUA, N.G.; GUARRERA, P.M.; DE FINE, G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in *Calabria region* (Southern Italy). **Fitoterapia**, v. 78, pp. 52-58, 2007.
- PASTÍROVÁ, A.; REPČÁK, M.; ELIAŠOVÁ, A. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. **Plant Science**, v. 167, pp. 819-824, 2004.
- PAYNE, G.F.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SCHULER, M.L. Plant cell and tissue culture in liquid systems. Munich: Hanser Publ., 1991. 346p.
- PETERS, S., SCHMIDT, W., BEERHUES, L. Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. **Planta**, v. 204, pp. 604-609, 1998.
- PINHATTI, A.V.; NUNES, J.M.; MAURMANN, N.; ROSA, L.M.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p 675-681, 2010.
- RADOMIR, A.M.; TUDOR, C. M. Preliminary results concerning the *in vitro* multiplication of *Ginkgo biloba* species. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, v. 15, pp. 227-232, 2011.
- RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20 pp. 101–153, 2002.
- RIBEIRO, V.L.S.; TOIGO, E.; BORDIGNON, S.A.L.; GONÇALVES, K.; VON POSER, G.L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, pp. 199-203, 2007.

- ROBSON, N.K.B. STUDIES in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the genus. **Botany Series**, v. 2, pp. 55-226, 1981.
- ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. Bulletin British Museum (Natural History) **Botany Series**, 1990, v. 20, pp. 1-151.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI- EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTSMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, pp. 1381-1385, 1994.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI- EVANS, H.; HOSTETTSMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, pp. 1447-1452, 1995.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; HOSTETTSMANN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, pp. 185-188, 1996.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, pp. 675–709, 2006.
- ROUT, G.R.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, pp. 91–120, 2000.
- RUSSOWSKI, D.; MAURMANN, N.; RECH, S.B.; FETT-NETO, A.G. Improved production of bioactive valepotriates in whole-plant liquid cultures of *Valeriana glechomifolia*. **Industrial Crops and Products**, v. 46, pp. 253– 257, 2013.
- RYU, D.D.; LEE, S.O.; ROMANI, R.J. Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, pp. 305-311, 1990.
- SAMBROOK J, MACCALLUM P. Molecular cloning: a laboratory manual, 3<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; PRADO, B.; RABANAL, R. M. Antidepressant effects of the methanol extracts of several *Hypericum* species from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, pp. 119-127, 2002.
- SARASAN, V., CRIPPS, R., RAMSAY, M.M., ATHERTON, C., MCMICHEN, M., PRENDERGAST, G., ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants - progress in the past decade. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 42, pp. 206-214, 2006.

- SARASAN, V.; KITE, G.C.; SILESHI, G.W.; STEVENSON, P.C. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. **Plant Cell Reports**, v. 30, pp. 1163–1172, 2011.
- SAVIO, L.E.B.; ASTARITA, L.V. ; SANTARÉM, E.R. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 108, pp. 465-472, 2012.
- SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 42, pp. 558-566, 2013.
- SCHRÖDER, J. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions . **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 373, 1997.
- SHAHMURADOV, I.A., GAMMERMAN, A.J., HANCOCK, J.M., BRAMLEY, P.M., SOLOVYEV, V.V. PlantProm: a database of plant promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v., 31, pp. 114-117, 2003.
- SCHIPPMANN, U., LEAMAN, D., CUNNINGHAM, A.B. A Comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. *In*: BOGERS, R.J., CRAKER, L.E., LANGE, D. Medicinal and Aromatic Plants: Agricultural, Commercial, Ecological, Legal, Pharmacological and Social Aspects. Springer, Dordrecht, 2006, pp. 75-96.
- SCHMIDT, W.; BEERHUES, L. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. **FEBS Letters**, v. 420, pp. 143-146, 1997.
- SCHMIDT, W., PETTERS S., BEERHUES, L. Xanthone 6-hydroxylase from cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. **Phytochemistry**, v. 53, pp. 427-431, 2000.
- SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, pp. 239-245, 2001.
- SIMÕES, C.; DE MATTOS, J.C.P.; SABINO, K.C.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; COELHO, M.G.P.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L. Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea*. **Fitoterapia**, v. 77, pp. 94-99, 2006.
- SINGH, S.K., RAI, M.K., ASTHANA, P., SAHOO, L. An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L through transverse thin layer culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, pp. 693-698, 2009.



- SIVAKUMAR, G.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Production of biomass and ginsenoside from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. **Engineering in Life Science**, v. 5, pp. 333–342, 2006.
- SLUSARSKI, S.R.; CERVI, A.C.; GUIMARÃES O.A. Taxonomy of native species of *Hypericum* L. (Hypericaceae) in Paraná, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, pp. 163-174, 2007.
- SNYMAN, S.J.; NKWANYANA, P.D.; WATT, M.P. Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. **South African Journal of Botany**, v. 77, pp. 685-692, 2011.
- STANZIANI, A. Defining “natural product” between public health and business, 17th to 21st centuries. **Appetite**, v. 51, pp. 15-17, 2008.
- STEIN, A.C.; VIANA, A.F.; MÜLLER, L.G.; NUNES, J.M.; STOLZ, E.D.; DO REGO, J.C.; COSTENTIN, J.; VON POSER, G.L.; RATES S.M. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behavioural Brain Research**, v. 228, p.66-73, 2012.
- STOLZ E.D.; VIANA A.F.; HASSE D.R.; VON POSER G.L.; DO REGO J.-C.; RATES S.M.K. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, p. 80-87, 2012.
- STEWART JR, C., VICKERY, C.R., BURKART, M.D., NOEL, J.P. Confluence of structural and chemical biology: plant polyketide synthases as biocatalysts for a bio-based future. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 365-372, 2013.
- SULTANBAWA, M.U.S. Xanthenes of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, p. 1465-1506, 1980.
- THAN, N.T.; MURTHY, H.N.; YU, K.W.; JEONG, C.S.; HAHN, E.J., PAEK, K.Y. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, pp. 1337–1341, 2006.
- THE UNITED STATE PHARMACOPEIA. 34 ed. Rockville: United State Pharmacopeia Convention, 2011.
- THIYAGARAJAN, M.; VENKATACHALAM, P. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. **Industrial Crops and Products**, v. 37, pp. 111-117, 2012.

- TOCCI, N. *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium*: study of xanthone biosynthesis in planta and in vitro systems. **Tese de doutorado, Sapienza Università di Roma**, Roma, 2013, 145p.
- VERPOORTE, R.; CONTINI, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, pp. 13- 25, 2002.
- VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.; FENNER, R.; RATES, S.M.K. Antinociceptive activity of *Hypericum* spp. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, pp. 631-634, 2003.
- VIANA, A.; DO REGO, J. -C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A. P.; COSTENTIN, J.; RATES, S. M. K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, pp. 1042-1052, 2005.
- VIANA, A.; RATES, S.M.K.; NAUDIN, B.; JANIN, F.; COSTENTIN, J.; DO REGO, J-C. Effects of acute or 3-day treatments of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttd. (Guttiferae) extract or of two established antidepressants on basal and stress-induced increase in serum and brain corticosterone levels. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, pp. 681-690, 2008.
- VLOT, A.C.; KLESSIG, D.F.; PARK, S.W. System acquired resistance: the elusive signal(s). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, pp. 1-7, 2008.
- VON POSER, G.L.; RECH, S.B.; RATES, S.M.K. Chemical and pharmacological aspects of southern Brazilian *Hypericum* species. *In*: Teixeira da Silva, J. A. (Ed.). Floriculture and Ornamental Plant Biotechnology. **Advances and Tropical Issues**, London: Global Science Book, 2006.
- WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; VIVANCO, J.M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, v. 60, pp. 289-293, 2002.
- WANG, D.; BAI, J.; SUN, F.; YANG, D. Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum ensiense* occurring in China. **Phytomedicine**, v. 17, pp. 410-413, 2010.
- WU, C.-H.; DEWIR, Y.H.; HAHN, E.-J., PAEK, K.-Y. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. **Journal of Plant Biology**, v. 49, pp. 193-199, 2006.

- YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I.A. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, pp.2837-2849, 2013.
- YU, K.W.; GAO, W.Y.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Effects of micro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). **Journal of Plant Biology**, v. 44, pp. 179–184, 2001.
- WANIBUCHI, K., ZHANG, P., ABE, T., MORITA, H., KOHNO, T., CHEN, G., NOGUCHI, H., ABE, I. An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrate*. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 274, pp. 1073-1082, 2007.
- WU, Q.L.; WANG, S.P.; DU, L.J.; YANG, J.S.; XIAO, P.G. Xanthenes from *Hypericum japonicum* and *H. henryi*. **Phytochemistry**, v. 38, pp. 284-391, 1998.
- ZARENA, A.S.; SANKAR, K.U. Supercritical carbon dioxide extraction of xanthenes with antioxidant activity from *Garcinia mangostana*: characterization by HPLC/LC–ESI-MS. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, pp. 330-337, 2009.
- ZOTCHEV, S.B. Biosynthesis of natural products applied to drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, pp. 616-617, 2008.
- ZHOU, Y.; HAN, Q.B.; SONG, J.Z.; QIAO, C.F.; XU, H.X. Characterization of polyprenylated xanthenes in *Garcinia xipshuanbannaensis* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 60, pp. 71-79, 2012.
- ZHANG, J.; GAO, W.-Y.; WANG, J.; LI, X.-L. Effects of explant types and media salt strength on growth and secondary metabolite accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, pp. 2447–2452, 2011.
- ZHANG, J.; GAO, W.-Y.; WANG, J.; LI, X.-L. Effects of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, pp. 1345–1351, 2012.
- ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, pp. 283-333, 2005
- ZHU, Z.; LIANG, Z.; HAN, R.; WANG, X. Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb *Bupleurum chinense* DC: growth and saikosaponin production. **Industrial Crops and Products**, v. 29, pp. 629-663, 2009.

ZOBAYED, S.M.A.; MURCH, S.J.; RUPASINGHE, H.P.V.; SAXENA, P.K. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). **Plant Science**, v. 166, pp. 333–340, 2004.

ZOBAYED, S.M.A; KOZAY, A.T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, pp. 109-116, 2007.

## **ANEXO 1**

Manuscrito do artigo intitulado **Efficient plant regeneration and increased accumulation of phloroglucinol in regenerated plants of *Hypericum teretiusculum* A. St. Hil.**, submetido para publicação na revista **Acta Physiologiae Plantarum**.

Efficient plant regeneration and increased accumulation of phloroglucinol in regenerated plants of *Hypericum teretiusculum* A. St. Hil.

Jéssica de Matos Nunes<sup>a</sup>, Bianca Chamorro Darde<sup>a</sup>, Thayse Viana de Oliveira<sup>a</sup>, Luis Mauro Gonçalves da Rosa<sup>b</sup>, Gilsane Lino von Poser<sup>a</sup>, Sandra Beatriz Rech<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, UFRGS.

Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Faculdade de Agronomia, Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 7712, Caixa-Postal: 15100, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author. Tel.: +55 51 33085686; fax: +55 51 33085437

E-mail address: sandrar@farmacia.ufrgs.br (S.B. Rech)

Key-words: Micropropagation, *Hypericum teretiusculum*, phloroglucinol derivatives, acclimatization, plant breeding

### Abstract

An efficient regeneration system for *in vitro* micropropagation and acclimatization of *Hypericum teretiusculum* was developed. Multiple shoots and substantial rooting were induced from apical explants of wild plants cultured on semisolid MS modified medium, named MΔ, only or supplemented with different IBA concentrations. Growth analysis revealed that plantlets from MΔ + 0.5 mg/L IBA accumulated highest fresh biomass, thus being acclimatized together with MΔ grown plantlets after 6 weeks of *in vitro* culture. Followed *ex vitro* adaption period, successful acclimatization of rooted plantlets was achieved after transference to vessels containing non-fertilized commercial soil watered as needed. After 18 weeks of field growth, fresh and dry biomass of different plant parts were similar despite of the presence of the auxin during *in vitro* development. Valuable phloroglucinol derivatives uliginosin B, isohyperbrasilol B, hyperbrasilol B and japonicin A were quantified in all acclimatized plants, being the first two metabolites detected only as traces and the last two not detected in wild plants. The results presented in this study

indicate the possibility of medicinal plant resource use with concomitant plant and environmental preservation, leading to optimized amounts of phytomolecules of pharmaceutical interest.

## **Introduction**

The dimeric phloroglucinols hyperbrasilol B, japonicin A and uliginosin B are considered chemotaxonomic markers of the native *Hypericum* species of southern Brazil (Ferraz et al. 2002; Nör et al., 2004; Ccana-Ccapatinta et al. 2013) and several species have been target of phytochemical studies highlighting the phloroglucinol derivatives *in vitro* and *in vivo* activities (Stein et al. 2012; Stolz et al. 2012; Barros et al. 2013). Due to the low amount of these metabolite in wild plants and to the fact that native *Hypericum* species from southern Brazil are restricted distributed, protocols for plant propagation and optimization of valuable secondary metabolites are mandatory (Ncube et al. 2012).

Effective protocols for the propagation of *Hypericum* species lead to large quantities of plants for the extraction of valuable metabolites while avoiding the exploitation of wild populations. Additional factors such as climate, water availability and susceptibility to diseases may also influence the content and composition of secondary metabolites (Zobayed and Saxena, 2004; Bruni and Sacchetti 2009). The limitations discussed above can be overcome using *in vitro* propagation methods under controlled environmental conditions, facilitating the rapid multiplication of superior clones and the extraction of valuable metabolites throughout the year without seasonal constraints (Canter et al. 2005; Sarasan et al. 2006).

Given the biological activities demonstrated by compounds and that the source of raw material is often only seasonally available, we describe the establishment of *in vitro* propagation of *H. teretiusculum*, the evaluation of the micropropagated plants growth on different nutrient concentrations and the assessment of phenolic compounds accumulation *in vitro* and on field grown acclimatized plants.

## Materials and methods

### Plant material

Plants of *H. teretiusculum* A. St. Hil. were collected at flowering stage in the city of Quevedos, state of Rio Grande do Sul, Brazil, in the spring of 2010. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN S. Bordignon and R.B. Macedo 248). The aerial parts of the plant were thoroughly washed with tap water, surface sterilized in 70% EtOH for 1 min, rinsed twice with sterile-distilled water, immersed in 1.5% sodium hypochlorite for 10 min, and rinsed four times with sterile-distilled water.

### Culture conditions

Shoot tips (0.3 – 0.5 cm long) were excised and the segments were vertically implanted into 175 mL glass jars with 25 mL of MS modified medium (Murashige and Skoog 1962), named M $\Delta$  (Maurmann et al. 2008), supplemented with 30 g/L sucrose without plant growth regulators or with 0.1 and 0.5 mg/L of isobutyric acid (IBA). The pH was adjusted to 5.8 and the medium was solidified with 6 g/L agar. The cultures were maintained at  $25 \pm 1$  °C with 16 h light photoperiods (light intensity of 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). After 4 weeks of incubation under these conditions, the new shoots formed were separated and transferred to fresh medium for a new round of multiplication. Regenerated plantlets were transferred to the same medium and subcultured every 6 weeks. The analysis of the influence of nutrient concentration in solid medium on *in vitro* growth was performed by transferring the plantlets to the M $\Delta$ , to full strength MS medium (MS), to half strength MS medium (MS 50), or to diluted MS containing one-quarter of the original concentration of inorganic salts (MS 25). These plants were maintained for three cycles of 6 weeks each, with subculture to the corresponding medium at the end of each cycle, using individual shoot tips as explants, and maintained in the same conditions mentioned earlier. Upon completion of the three passages on the appropriate media for adaptation to the specific medium conditions, growth parameters – fresh and freeze-dried mass (DM), root and shoot number and root and shoot length – and total phenolic compounds were evaluated.



### Acclimatization and field growth conditions

Prior field grown acclimatization, plantlets cultured *in vitro* in MΔ and MΔ + 0.5 mg/L IBA medium for 6 weeks were adapted to *ex vitro* conditions by transference to plastic pots containing a sterile mixture of nonfertilized commercial soil and vermiculite (1:2, v/v), covered with transparent plastic sheets and kept under controlled environmental conditions ( $25 \pm 1$  °C, 16 h photoperiod, irradiance of 70  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  and weekly irrigation with sterile distilled water) for 30 days. After this period, plants were transplanted to pots (18 cm diameter x 14 cm high) containing unfertilized commercial soil and grown on open field with irradiance of 2000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  at plant level (measured in the middle of sunny days without clouds with a sensor Quantum Li-cor). The pots were randomly rearranged fortnightly to minimize possible positional effects, and the plants were watered as needed. After 18 weeks of acclimatization, plants were collected, reproductive (green buds, yellow buds, flowers, senescent flower and fruit) and vegetatives parts separated and their fresh and dry mass (DM) after freeze-drying were recorded.

### Determination of total phenol content

Crude methanolic extracts were obtained from 0.1 g DM of freeze-dried powdered plant extracted five times at room temperature with 5 mL of methanol, under 20 min sonication. Total phenol concentration was determined according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method with a slight modification (Singleton and Rossi 1965). Appropriate dilutions of the samples were oxidized with 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent (Merck Darmstadt, Germany, 2 N, diluted tenfold) and after 5 min, the reaction was neutralized with saturated sodium carbonate (75 g/L). The absorbance of the resulting blue color was measured at 765 nm with an ultraviolet-visible Biospectro SP 220 spectrophotometer after incubation for 30 min at room temperature. Quantification was performed on the basis of the standard curve of quercetin (Ivanova et al. 2005), and the results were expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry plant mass (QE g/DM).

## Phloroglucinols extraction and HPLC quantification

Hexanic extracts from 0.05 gDM were obtained through ultrasound assisted extraction (5 times of 20 minutes sonication with 5 mL of *n*-hexane) and analyzed by HPLC means. Phloroglucinol derivatives quantification was performed using a Shimadzu liquid chromatography instrument equipped with a Waters Nova Pack C18 column (4  $\mu\text{m}$ , 3.9 x 150 mm) and a Waters Nova-Pack C18 60 $\text{\AA}$  guard column (3.9 x 20 mm). Metabolites separation was carried out at 1 mL/min with phases A (ACN:MeOH-80:60 + 0.1% HCOOH) and B (H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH) ratio as follows: linear gradient from 75% to 100% B in 10 min, held at 100% B for 10 min and re-equilibrated with 75% B for 5 min. A calibration curve was constructed in the range of 1 to 500  $\mu\text{g/mL}$  with each purified substance (Ccana-Ccapatinta, 2014) except for japonicin A, expressed as mass of uliginosin A. Detection was performed at 350 nm with a deuterium UV lamp, and limits of detection and quantification were 0.68 and 2.05  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

## Statistical analysis

Experiments were performed using at least three samples of each treatment. SPSS version 16.0 software was used to calculate independent *t*-test when comparison of two means were required and ANOVA followed by Tukey's test where three or more means of different treatments were analysed.

## Results and discussion

### *In vitro* cultures establishment

It is well known that wild plants adaptation to *in vitro* environment is dependent of factors such as exhaustive morpho-physiological changes in the explants, mainly rooting process (Lucchesini and Mensuali-Sodi 2010) and the artificial support given for this tissue, through media formulation and growth regulators supplementation (Coste et al. 2011). A modified MS formulation successfully used for

micropropagation of *Hypericum* species (Bernardi et al. 2007; Pinhatti et al. 2010), the MΔ medium, and different concentrations of IBA that presented superior performance for *in vitro* shoot-rooting and root-rooting for *H. perforatum* (Goel et al. 2009) was also employed for *H. teretiusculum*. Complete plants were obtained in semisolid MΔ medium regardless the presence of 0.1 or 0.5 mg/L IBA. It is important to point out that both shoots and roots formation on the same medium eliminated one step of medium transfer in the establishment of propagation protocol, consequently reducing the total time and cost required for plant regeneration. Similar results were also reported for *H. ternum* (Pinhatti et al. 2010), *H. perforatum* (McCoy and Camper 2002) and *H. brasiliense* (Cardoso and de Oliveira 1996).

After the establishment of *in vitro* development, plants from hormone-free and IBA supplemented medium were analyzed according to their growth parameters. Plants were well propagated both in the presence or in absence of the auxin being the higher fresh biomass observed in plants cultivated on MΔ medium with 0.5 mg/L IBA (Fig. 1A). *In vitro* plant biomass is a feature known to be determinant for field grown acclimatization (Zobayed et al. 2004). Considering this point, plants cultivated in MΔ + 0.5 mg/L IBA medium were acclimatized together with plants grown without auxin supplementation. Additionally, further analysis of *in vitro* growth of plantlets cultivated in different strength of MS medium revealed that fresh and dry mass, shoots and roots length as well as shoot number were not affected by basal MS salts concentration (Fig. 1B and 1C). On the other hand, root number was higher in plants cultivated in MS 50 medium, followed by plants from MS 25, MΔ and MS medium (Fig. 1C). Reduced concentration of MS medium has been reported as an efficient formulation for root formation (Goel et al. 2009; Zhang et al. 2011). Nevertheless, no difference was observed on fresh biomass of roots of plants cultured on MS 50 medium and, therefore, MΔ cultured plants were chosen for acclimatization.

### Acclimatization

The acclimatization of *H. teretiusculum* produced *in vitro* was straightforward showing 100% of plant survival and growth analysis performed after 18 weeks of growth (at full flowering) showed that after acclimatization process no difference between fresh biomass of plants from MΔ compared to plants from MΔ + 0.5 mg/L IBA medium was verified, with similar amounts of reproductive and vegetative parts at harvest time. Reproductive parts were recorded as  $12.27 \pm 2.56\text{g}$  and  $12.46 \pm 2.23\text{g}$  for plants cultivated in

solid medium with or devoid of IBA, respectively, and  $26.69 \pm 3.59$  g and  $24.98 \pm 3.52$  g for vegetative parts of plants cultivated in medium with and without auxin supplementation, respectively. The equivalence reached for biomass values after acclimatization accomplishment might be due to the fact that open field growth is the final and longest period in the protocol comprising about 60% of the plant developmental time from *in vitro* subdivision to harvest from open field, providing similar growth conditions for plantlets micropropagated in the presence or absence of IBA.

Considering secondary metabolites, four phloroglucinol derivatives were identified in the hexane extracts of acclimatized plants. Japonicin A, uliginosin B, hyperbrasilol B and isohyperbrasilol B were identified in the flowers of these plants, while hyperbrasilol was not detected in vegetative parts. Japonicin A was the major phloroglucinol quantified in reproductive ( $1.04 \pm 0.12$  and  $0.81 \pm 0.08$  mg% DM) and vegetative parts ( $0.07 \pm 0.01$  and  $0.13 \pm 0.06$  mg% DM) of acclimatized plants from  $M\Delta$  and  $M\Delta + 0.5$  mg/L, respectively, not differing statistically (Fig. 2). Total phenolic compounds were  $27.96 \text{ g} \pm 3.53$  QE/gDM and  $25.98 \pm 2.8$  QE/gDM in flowers of acclimatized plants cultivated in solid medium with and without IBA addition, respectively, and  $49.74 \text{ g} \pm 4.03$  QE/gDM and  $42.57 \text{ g} \pm 3.75$  QE/gDM in vegetative parts of field grown plants micropropagated *in vitro* with and without the auxin.

The accumulation of phytochemical in plants is a finely adjusted process in response to plant age, organ and environmental conditions (Hosni et al. 2011; Ncube et al. 2012). Phloroglucinols derivatives quantified in *H. teretiusculum* were found to be present in reproductive and vegetative parts of the plants after 18 weeks of acclimatization. *H. ternum*, another species native from south Brazil was evaluated at different developmental stages and showed that uliginosin B was quantified in leaves at 15 weeks (before flowering) of field growth but not after this period (Pinhatti et al. 2010). Several protocols have been proposed for medicinal plants showing that beyond external factors, genetic properties are also determinant of plant multiplication success (Sarasan et al. 2006) justifying studies directed for each species of interest.

It is interestingly to point out that in wild *H. teretiusculum* plants that originated the *in vitro* cultures, only traces of uliginosin B and isohyperbrasilol B were detected, certifying the important achievement resulted from the *in vitro* and field grown cultivation of the specie. Nevertheless, similar results were reported for *H. brasiliense* where isouliginosin B was detected in the roots but not in the shoots of plants at flowering stage (de Abreu et al. 2004) while leaves of plants from another locality displayed the presence of the same metabolite (Rocha et al. 1995). Such alteration in phytochemical profile might be explained by numerous factors, from endogenous regulation of physiological processes to environmental characteristics.

## Conclusion

While *in vitro* propagation provides the chance to select the germoplasm and to improve its metabolic capability, acclimatization to field growth is a determinant step in plant performance aiming the scale up of compounds of interest from medicinal plants. The present study described a rapid and efficient protocol for *H. teretiusculum* A. St.- Hil multiplication, with plants from wild being successfully adapted to *in vitro* conditions, affording complete plantlets with excellent survival rate and production of four bioactive phloroglucinol derivatives displayed after acclimatization. Noteworthy is that acclimatization process not only increased the concentration of metabolites in plant tissue but also promoted the biosynthesis of japonicin A and hyperbrasilol B production, not detected in wild accession. The combined results show the relevance of the described protocol for rapid propagation of vegetal biomass with increased level of biosynthetic activity for production of valuable secondary metabolites.

## References

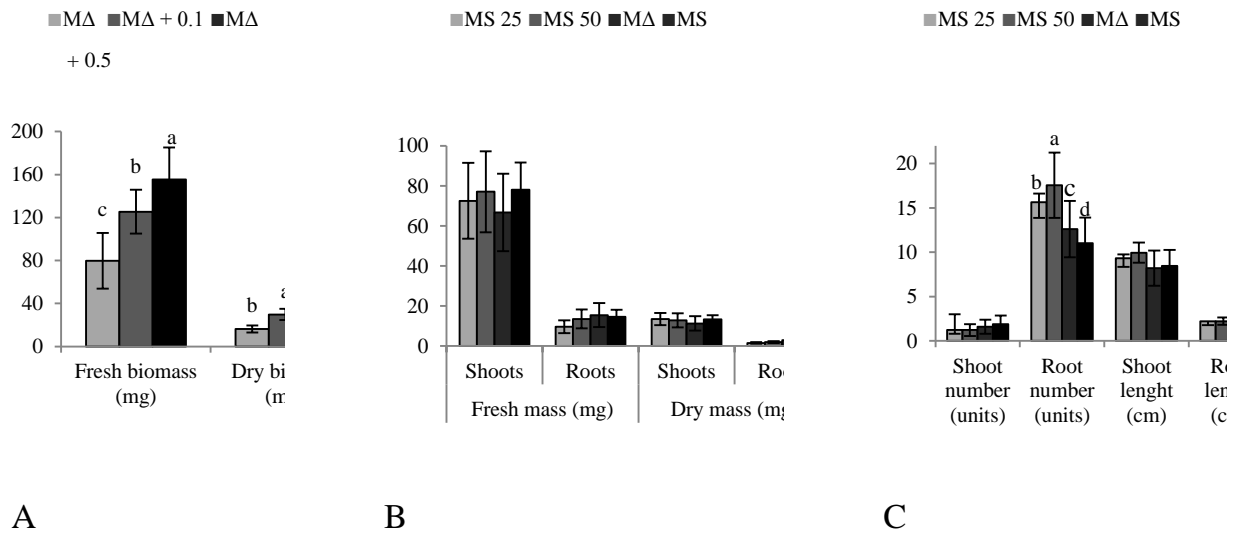
- Barros FMC, Pippi B, Dresch RR, Dauber B, Luciano SC, Apel MA, Fuentefria AM, Poser GL (2013) Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. *Ind Crop Prod* 44: 294-299
- Bernardi APM, Maurmann N, Rech SB, von Poser GL (2007) Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiol Plant* 29: 165-170
- Bruni R, Sacchetti G (2009) Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* 14:682-725
- Canter PH, Thomas H, Ernst E (2005) Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology – Review. *Trends Biotechnol* 23:180-185

- Cardoso MA, de Oliveira DE (1996) Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44:91-94
- Ccana-Ccapatinta GV, Barros FMC, Bridi H, von Poser GL (2013) Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections *Brathys* and *Trigynobrathys*. *Phytochem Rev* (*In press*) doi: 10.1007/s11101-013-9332-2
- Ccana-Ccapatinta GV (2014) Aspectos químicos e biológicos de espécies de *Hypericum* (Hypericaceae) das secções *Brathys* e *Trigynobrathys* nativas dos Páramos Peruanos. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Coste A, Vlase L, Halmagyi A, Deliu C, Coldea G (2011) Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106: 279-288
- Couceiro MA, Afreen, F, Zobayed SMA, Konzai T (2006) Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: effects of harvesting time, temperature and germplasm. *Plant Sci* 170:128-134
- de Abreu IN, Porto ALM, Marsaioli AJ, Mazzafera P (2004) Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Sci* 167:949-954
- Ferraz A, Bordignon S, Mans DRA, Schmitt A, Ravazzolo AP, von Poser GL (2002) Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). *Pharm Biol* 40:294-297
- Goel MK, Kukreja AK, Bisht NS (2009) *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96:1-9
- Hosni K, Msaada K, Taârit MB, Marzouk B (2011) Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochem Syst Ecol* 39: 43-50

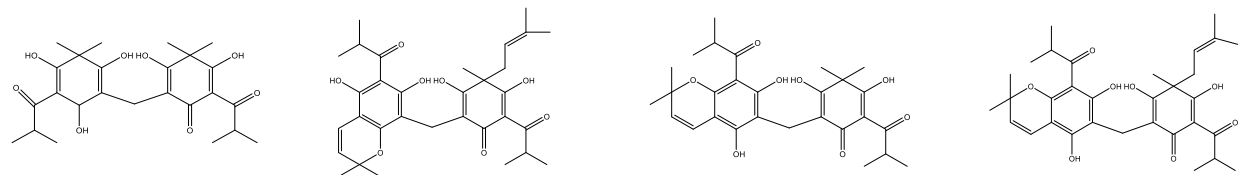
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T (2005) Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 96:145-150
- Lucchesini M; Mensuali-Sodi A (2010) Plant tissue culture – an opportunity for the production of nutraceuticals. In GIRARDI, M.T.; REA, G.; BERRA, B (ed) *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Landes Bioscience and “Springer Science + Business Media”, Pisa, pp. 185-202
- Maurmann N, Rech SB, Fett-Neto AG (2008) Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:209-215
- McCoy JA, Camper ND (2002) Development of a micropropagation protocol for St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Hort Sci* 37:978-980
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Ncube B, Finnie JF, Van Staden J (2012) Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *S Afr J Bot* 82: 11-20
- Nör C, Albring D, Ferraz ABF, Schripsema J, Pires V, Sonnet P, Guillaume DD, von Poser GL (2004) Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. *Biochem Syst Ecol*, 32: 517-519
- Jian Zhang J, Gao WY, Wang J, Li XL (2011) Effects of explant types and media salt strength on growth and secondary metabolite accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. *Acta Physiol Plant* 33: 2447-2452
- Pinhatti AV, Nunes JM, Maurmann N, Rosa LMG, von Poser GL, Rech SB (2005) Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. *Acta Physiol Plant* 32:675-681

- Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MAC, Stoecklievans H, Hostettmann K (1995) Antibacterial phloroglucinois and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40:1447-1452
- Singleton VL, Rossi Jr. JA (1965) Colorimetry of total phenolics with hosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticul* 16:144-153
- Stein AC, Viana AF, Müller LG, Nunes JM, Stolz ED, Do Rego J-C, Costentin J, von Poser GL, Rates SM (2012) Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res* 228:66–73
- Stolz ED, Viana AF, Hasse DR, von Poser GL, Do Rego JC, Rates SM (2012) Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39:80–87
- Zobayed SMA, Saxena PK (2004) Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 40:108-114
- Zobayed SMA, Murch SJ, Rupashinghe HPV, Saxena PK (2004) *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). *Plant Sci* 166: 333-340





**Fig. 1** Analysis of *H. teretiusculum* plants cultivated *in vitro* for 6 weeks: (A) fresh and dry biomass of micropropagated plants in MΔ medium without auxin and supplemented with 0.1 or 0.5 mg/mL IBA; (B) fresh and dry biomass obtained after growth in MS 25, MS 50, MΔ and MS medium and (C) number and length of shoots and roots in the same micropropagated plants analysed in graph B. Different letters was adopted to indicate statistical difference at the level of  $p < 0.05$  after ANOVA with Tuckey test.



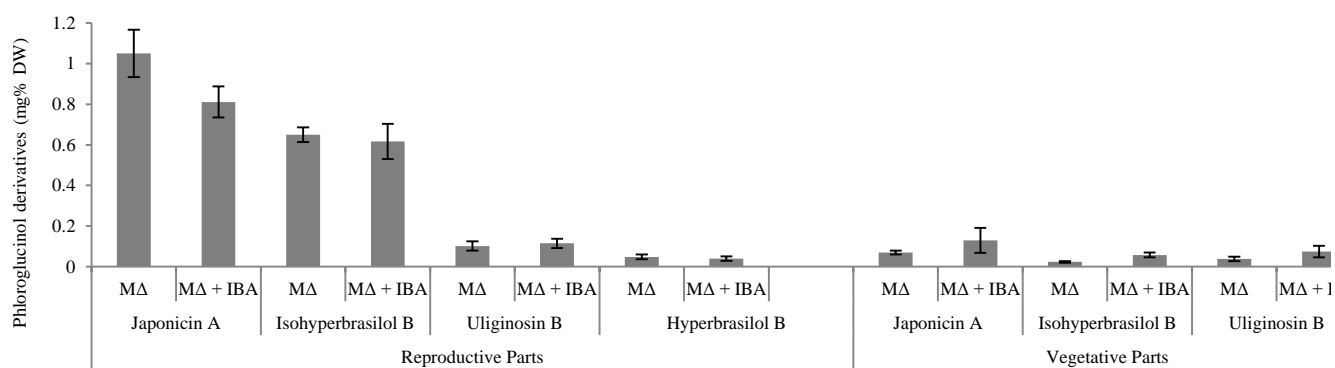
Japonicin A

Isohyperbrasilol

Uliginosin B

Hyperbrasilol B

B



**Fig. 2** Phloroglucinol derivatives identified in 18 weeks acclimatized plants of *H. teretiusculum* after *in vitro* cultivation in MΔ only or MΔ with 0.5 mg/L IBA. Statistical analysis did not indicate any difference after *t*-test ( $p < 0.05$ ) between acclimatized plants prevented from IBA supplemented and auxin-free MΔ medium.