

**Caracterização química e molecular de amostras de *Coriandrum  
sativum* L. obtidas *in vivo* e *in vitro***

**Maria Inês Moreira Figueiredo Dias**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau  
de Mestre em Biotecnologia*

Orientada por

**Maria João Almeida Coelho Sousa**

**Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira**

**Maria Helena Machado Trindade Donato**

**Bragança**

**2010/2011**

## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras, Professoras Doutoras Maria João Sousa, Isabel Ferreira e Helena Trindade, pela amizade, apoio e confiança que depositaram em mim. São as três professoras excepcionais e serão sempre um exemplo a seguir, não podendo expressar de todo o quanto vos estou agradecida.

À coordenadora do Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança (ESA), Professora Doutora Ana Carvalho, e à responsável pelo laboratório de Biologia, Professora Doutora Anabela Martins, por permitirem a execução deste trabalho e por todo o apoio logístico.

À responsável pelo Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da ESA, Professora Doutora Isabel Ferreira, e à Doutora Lillian Barros por todo o apoio prestado neste trabalho; foi uma ajuda imprescindível, obrigada por tudo.

Ao Centro de Biotecnologia Vegetal (DVB) da Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, liderado pelo Professor Doutor José Barroso. Aos Professores Doutores Luís Pedro, Cristina Figueiredo e José Barroso, pelo apoio na análise dos compostos voláteis.

Ao Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL) da Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, liderado pelo Professor Doutor Celestino Santos-Buelga e à Doutora Montserrat Dueñas, pela análise dos compostos fenólicos.

À Sandra por, numa primeira parte do trabalho, ter também contribuído para o mesmo. À Dona Isabel, Ricardo, Professora Maria José, Carla, Marta, Jorge, Luísa, Fernando e Inês pela ajuda, pelo apoio e principalmente por todos os bons momentos proporcionados nas longas horas de trabalho.

Aos meus pais pelo apoio incondicional dado todos estes anos e por me terem ensinado a nunca desistir mesmo em maus momentos e quando a vida nos empurra no sentido oposto. À minha irmã Joana, aos meus avôs Zé e Fernanda. À minha grande amiga Filipa e à minha prima Sara que não se cansam de me ouvir. À minha tia Elizabete por me dar guarida e ao meu tio Zé pelo seu sentido de humor. Ao Bruno.

Aos meus avôs Jaime e Lena que estavam sempre do meu lado e foram uma peça fundamental para a construção da pessoa que sou hoje.

A todos aqueles que mesmo não se encontrando aqui mencionados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

# Índice

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>1.Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Coriandrum sativum</i> .....	1
1.2 Cultura <i>in vitro</i> .....	6
1.2.1 Aspectos nutricionais .....	7
1.2.2 Fitorreguladores.....	8
1.2.3 <i>Coriandrum sativum in vitro</i> .....	11
1.3 Metabolismo Secundário .....	12
1.3.1 Óleos essenciais.....	14
1.3.2 Compostos terpénicos .....	15
1.3.3 Voláteis em <i>Coriandrum sativum</i> .....	19
1.4 Stresse oxidativo e Actividade antioxidante .....	20
1.4.1 Stresse oxidativo.....	20
1.4.2 Compostos antioxidantes .....	21
1.4.3 Avaliação do potencial antioxidante.....	27
1.4.4 Actividade e potencial antioxidante no coentro .....	30
1.5 Marcadores Genéticos.....	31
1.5.1 ISSR ( <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> ) .....	33
1.5.2 Marcadores moleculares no coentro .....	35
1.6 Objectivos .....	37
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>39</b>
2.1 Reagentes e padrões.....	39
2.2 Cultura <i>in vitro</i> .....	39
2.2.1 Esterilização das sementes e inoculação .....	39
2.2.2 Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	40
2.2.3 Diferenciação das linhas e taxa de crescimento .....	40
2.3 Estudo dos voláteis .....	41
2.3.1 Isolamento dos voláteis.....	41
2.3.2 Cromatografia Gasosa.....	41
2.3.3 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa .....	42
2.4 Potencial antioxidante.....	42
2.4.1 Material vegetal e sua preparação .....	42
2.4.2 Antioxidantes lipofílicos .....	43
2.4.2.1 Tocoferóis .....	43
2.4.2.2 Carotenóides e clorofilas .....	43
2.4.3 Antioxidantes hidrofílicos .....	44
2.4.3.1 Açúcares .....	44
2.4.3.2 Ácido ascórbico.....	44
2.4.3.3 Grupos de compostos fenólicos .....	45
2.4.4 Ensaio de avaliação da actividade antioxidante.....	46
2.4.4.1 Actividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril- hidrazilo) .....	46
2.4.4.2 Poder redutor.....	46

2.4.4.3 Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno .....	46
2.4.4.4 Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS (espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico) .....	47
2.4.5 Análise de ácidos fenólicos e flavonóides .....	48
2.4.5.1. Extração .....	48
2.4.5.2 Análise por HPLC-DAD-ESI/MS.....	48
2.4.6 Análise de antocianinas.....	49
2.4.6.1 Extração .....	49
2.4.6.2. Análise por HPLC-DAD-ESI/MS.....	49
2.5 Amplificação por ISSRs .....	50
2.5.1 Material vegetal.....	50
2.5.2 Extração de DNA.....	51
2.5.3 Amplificação por ISSR.....	51
2.6 Análise estatística .....	52
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>68</b>
3.1 Avaliação das condições de cultura <i>in vitro</i> para a espécie <i>Coriandrum sativum</i> .....	68
3.1.1 Taxa de germinação das sementes.....	68
3.1.2 Diferenciação das linhas A e B .....	69
3.2 Caracterização dos voláteis das amostras de coentro obtidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ... ..	73
3.3 Potencial antioxidante das amostras de coentro obtidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	77
3.3.1 Antioxidantes lipofílicos, hidrofílicos e avaliação da actividade antioxidante.....	77
3.3.2. Perfil individual em ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas .....	83
3.4 Análise molecular e variabilidade intraspecífica das amostras obtidas <i>in vitro</i> ... ..	94
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>99</b>
<b>5. Referências bibliográficas.....</b>	<b>103</b>
<b>6. Anexos .....</b>	<b>116</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática dos caules e folhas do coentro.....	4
<b>Figura 2.</b> Representação das influorescências (A) e dos frutos (B) do coentro .....	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da IAA (Ácido 3-indolbutírico).....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da trans-zeatina.....	9
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da benzilaminopurina (BAP).....	10
<b>Figura 6.</b> Esquemática de várias vias biossintéticas. ....	14
<b>Figura 7.</b> A- Unidade isoprênica (difosfato de isopentenilo – IPP); B – Isômero alílico do IPP, difosfato dimetialilo (DMAPP).....	16
<b>Figura 8.</b> Estrutura base dos compostos fenólicos.....	22
<b>Figura 9.</b> Estrutura das antocianinas. ....	23
<b>Figura 10.</b> Estrutura química do ácido L-ascórbico.....	25
<b>Figura 11.</b> Estrutura química dos tocoferóis .....	25
<b>Figura 12.</b> Estrutura química do $\beta$ -caroteno.....	27
<b>Figura 13.</b> Esquema de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). ....	28
<b>Figura 14.</b> Formação do cromóforo avermelhado MDA-TBA.....	30
<b>Figura 15.</b> Plantas <i>in vivo</i> de <i>Coriandrum sativum</i> .....	41
<b>Figura 16.</b> Taxa de germinação de sementes de <i>Coriandrum sativum</i> .....	68
<b>Figura 17.</b> Plantas <i>Coriandrum sativum</i> obtidas <i>in vitro</i> .....	69
<b>Figura 18.</b> Relação massa seca e massa fresca em quatro semanas de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Coriandrum sativum</i> . ....	71
<b>Figura 19.</b> Relação massa fresca/massa seca em quatro semanas de cultivo <i>in vitro</i> das linhas A e B de <i>Coriandrum sativum</i> .....	72
<b>Figura 20.</b> Actividade captadora de radicais DPPH (%), poder redutor a 690 nm, inibição da descoloração do $\beta$ -Caroteno (%) e inibição da formação de TBARS (%) em amostras obtidas <i>in vivo</i> e amostras obtidas <i>in vitro</i> .....	82
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas individuais das amostras de coentro obtidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . ....	83
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico individual das antocianinas da linha A de coentro....	92
<b>Figura 23.</b> Dendograma.....	94
<b>Figura 24.</b> Gel de eletroforese após amplificação com primer 899.....	96

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1 .</b> Diversidade de compostos que surgem na composição dos óleos essenciais. 17	
<b>Tabela 2.</b> Descrição e comparação entre os principais marcadores moleculares, suas vantagens e desvantagens. .... 33	33
<b>Tabela 3.</b> Características fenotípicas identificadas nas linhas de <i>Coriandrum Sativum</i> .51	51
<b>Tabela 4.</b> Determinação da taxa relativa de crescimento (RGR) para as linhas cultivados <i>in vitro</i> , linha A e B, de <i>Coriandrum sativum</i> . .... 72	72
<b>Tabela 5.</b> Composição percentual dos voláteis isolados das amostras <i>in vivo</i> (partes aéreas e sementes) e <i>in vitro</i> (linha A e B) de <i>Coriandrum sativum</i> . .... 73	73
<b>Tabela 6.</b> Compostos lipofílicos no coentro: sementes, amostras obtidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . .... 77	77
<b>Tabela 7.</b> Compostos hidrofílicos no coentro: sementes, amostras obtidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . .... 79	79
<b>Tabela 8.</b> Actividade antioxidante em valores de EC <sub>50</sub> do coentro: sementes, amostras obtidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . .... 81	81
<b>Tabela 9.</b> Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de absorção máxima na zona do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados do espectro de massa, identificação provisória e concentração dos ácidos fenólicos e flavonóides nas amostras de coentro obtidas <i>in vivo</i> . .... 85	85
<b>Tabela 10.</b> Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de absorção máxima na zona do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados do espectro de massa, identificação provisória e concentração dos ácidos fenólicos e flavonóides em amostras de coentro obtidas <i>in vitro</i> . .... 86	86
<b>Tabela 11.</b> Tempo de retenção (Rt),comprimentos de onda de absorção maxima na zona do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados dos espectros de massa, identificação provisória e concentração das antocianinas na linha A de coentro. .... 91	91

## Abreviaturas

<b>A</b>	Absorvância
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>AFLP</b>	Amplified Fragments Length Polimorphisms
<b>BAP</b>	Benzilaminopurina
<b>BHA</b>	Butil-hidroxianisol
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CAE</b>	Equivalentes de ácido clorogénico
<b>DAD</b>	Detector de diodos
<b>DB-1</b>	Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de metilsilicone
<b>DB-1/HT</b>	Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de fenilmetilsilicone
<b>DAMPP</b>	difosfato de dimetilalilo
<b>DNTP's</b>	Desoxinucleótidos trifosfatados: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
<b>Dw</b>	Massa seca
<b>e<sup>-</sup></b>	Electrão
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor e inibição da peroxidação lipídica
<b>Ex</b>	Exemplo
<b>FID</b>	Detector de ionização de chama
<b>FPP</b>	difosfato de farnesilo
<b>fw</b>	Massa fresca
<b>GC-MS</b>	espectrometria de massa
<b>GPP</b>	difosfato de geranilo
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IAA</b>	Ácido 3-indolacético

<b>IBA</b>	Ácido indolbutírico
<b>IPP</b>	difosfato de isopentenilo
<b>ISSR</b>	Inter-Simple Sequence Repeat
<b>Kb</b>	Kilo pares de bases
<b>L•</b>	Radical alquilo
<b>LO•</b>	Radical alquoxilo
<b>LOO•</b>	Radical peroxilo
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>ME</b>	Equivalentes de malvidina 3- glucósido
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>MS</b>	Murashige & Skoog
<b>Nº</b>	Número
<b>NAA</b>	Ácido naftalenoacético
<b>nd</b>	Não detectado
<b>PAGE</b>	Gel de electroforese de sulfato de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase
<b>Psi</b>	Libra por polegada quadrada
<b>PUFA</b>	Ácidos gordos polinsaturados
<b>QE</b>	Equivalentes de quercetina
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlação
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RGR</b>	Taxa de crescimento relativo
<b>RI</b>	Índice de retenção relativa
<b>RID</b>	Detector de índice de refração
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>RSA</b>	Actividade captadora de radicais
<b>RubisCo</b>	Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
<b>SD</b>	Desvio-padrão
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism

<b>SPSS</b>	Pacote estatístico para as ciências sociais
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeat
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TFA</b>	Ácido trifluoracético
<b>TLC</b>	Cromatografia em camada fina
<b>T<sub>máx</sub></b>	Temperatura máxima
<b>T<sub>mín</sub></b>	Temperatura mínima
<b>TO•</b>	Radical tocoferoxilo
<b>TOH</b>	Tocoferol
<b>U</b>	Unidades de enzima
<b>UPGMA</b>	Agrupamento segundo a média
<b>UV</b>	Radiação Ultravioleta
<b>v</b>	Vestígios
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>WHO</b>	Organização mundial de saúde

## Resumo

A espécie *Coriandrum sativum* L., vulgarmente conhecida como coentro, é frequentemente usada na alimentação, mas também em aplicações medicinais, na cosmética e perfumaria. É uma fonte de polifenóis e outros fitoquímicos, relacionados com a sua elevada actividade antioxidante e com a sua utilização no combate a indigestões, reumatismo e na prevenção dos danos provocados pela peroxidação lipídica. A cultura de células vegetais é um meio para estudar e produzir alguns compostos activos nomeadamente, voláteis, polifenóis e outros metabólitos secundários.

No presente trabalho, foram germinadas sementes de coentro em condições de cultura *in vitro*, após excisão dos meristemas das plântulas e inoculação em meio modificado MS contendo IBA e BAP. Após seis meses em cultura, diferenciaram-se duas linhas pela sua pigmentação: a linha A, apresentando uma elevada coloração púrpura e a linha B, com uma coloração verde. A taxa de multiplicação dos meristemas foi de 50% para ambas as linhas após 3 semanas, apesar do padrão de crescimento não ser o mesmo. Estudou-se a taxa relativa de crescimento relacionando massa fresca e seca das duas linhas. A linha A revelou um maior crescimento apesar da relação massa fresca/massa seca ter sido maior na linha B, o que pode ter sido devido a uma maior concentração de água na planta. No final da 4ª semana do ciclo de micropropagação, a linha A ainda mostrava crescimento activo, em oposição à linha B, que apresentava um declínio do crescimento no final da 3ª semana.

Foram estudadas amostras obtidas *in vivo* (partes aéreas e sementes) e as amostras obtidas *in vitro* (linhas A e B). Caracterizaram-se os voláteis (maioritariamente compostos terpénicos) presentes nas amostras após isolamento por hidrodestilação e análise por GC e GC-MS. O linalol foi o volátil predominante nas sementes (82%), seguido de  $\gamma$ -terpineno (4%), cânfora (3%) e geraniol (3%). O linalol estava também presente nas fracções voláteis das amostras obtidas *in vitro*, linhas A e B, e também nas partes aéreas obtidas *in vivo*, sempre em pequenas quantidades relativas (0,1%, 0,1% e 0,3%, respectivamente). O dodecanal (17%), o dodecanol (17%), o *n*-tetradecanol (15%) e o decanal (10%) foram os voláteis maioritários nas partes aéreas obtidas *in vivo*. O  $\beta$ -felandreno (37% em A, 45% em B), o terpinoleno (9% em ambos), o  $\beta$ -sesquifelandreno (4% em A, 6% em B) e o  $\alpha$ -felandreno (2% em A, 3% em B) foram os voláteis maioritários identificados nas amostras obtidas *in vitro*, linhas A e B. Apesar da coloração púrpura observada nas plantas da linha A, o seu perfil volátil foi

quantitativa e qualitativamente muito semelhante ao da linha B. A composição de voláteis nas amostras obtidas *in vitro* foi qualitativamente semelhante à das sementes e muito diferente das amostras obtidas *in vivo*.

Quantificaram-se também os compostos antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e clorofilas) e hidrofílicos (açúcares, ácido ascórbico, fenóis, flavonóis e antocianinas) presentes nas amostras. Além disso, as suas propriedades antioxidantes foram avaliadas através da actividade captadora de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica. As partes aéreas obtidas *in vivo* mostraram maior actividade antioxidante principalmente devido aos seus níveis mais elevados de compostos hidrofílicos. Pelo contrário, as amostras obtidas *in vitro*, em especial a linha A, apresentaram maior concentração em compostos lipofílicos mas um perfil distinto quando comparado com as partes aéreas obtidas *in vivo*. As linhas A e B revelaram ausência de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ - e  $\delta$ -tocoferóis, um decréscimo em  $\alpha$ -tocoferol e um aumento em  $\gamma$ -tocoferol e clorofilas, comparativamente às amostras obtidas *in vivo*.

Foi ainda realizada uma análise detalhada dos compostos fenólicos individuais presentes nas amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*. As partes aéreas obtidas *in vivo*, mostraram conter derivados de quercetina como flavonóides maioritários, em especial 3-*O*-rutinósido de quercetina (3296 mg/kg dw). As sementes revelaram apenas a presença de ácidos fenólicos e derivados, com o hexósido de cafeoil *N*-triptofano como maioritário (45,33 mg/kg dw). As amostras obtidas *in vitro* demonstraram também uma grande variedade de polifenóis, sendo a apigenina *C*-glucosilada o composto maioritário (2983 mg/kg dw). As antocianinas foram encontradas, exclusivamente, na linha A o que está certamente relacionado com a sua pigmentação púrpura; a peonidin-3-*O*-feruloilglucósido-5-*O*-glucósido foi a antocianina maioritária (1,70  $\mu$ g/kg dw).

Recorrendo a uma análise molecular e, utilizando as partes aéreas do indivíduo *in vivo* como controlo externo, foi possível distinguir os indivíduos crescidos *in vitro*, linhas A e B, com base em diferenças fenotípicas. O cluster ISSR não mostrou correlação entre as amostras obtidas *in vivo* e *in vitro* (índice de similaridade inferior a 0,30). Os indivíduos obtidos *in vitro* revelaram um maior índice de similaridade (0,70), o que indica que as variações genéticas são baixas e não podem explicar as diferenças fenotípicas encontradas entre os dois clones.

A cultura *in vitro* pode ser útil para explorar as potencialidades das plantas para aplicações industriais, controlando as condições ambientais para produzir maior

quantidade de alguns produtos bioactivos. Pode ser também utilizada para explorar novas potencialidades industriais, farmacêuticas e medicinais, nomeadamente a produção de metabolitos secundários tais como voláteis e compostos fenólicos.

## Abstract

*Coriandrum sativum* L. (known as coriander) is commonly used for medicinal purposes, food applications, cosmetics and perfumes. It is a source of a variety of polyphenols and other phytochemicals, related to its high antioxidant activity and to its use for indigestion, rheumatism, and prevention of lipid peroxidation damage. Plant cell cultures are a mean to study or to produce some active metabolites such as volatiles, polyphenols and other secondary metabolites.

In the present work, seeds of coriander were germinated *in vitro* and shoots were excised from the seedlings and inoculated in a modified MS medium containing IBA and BAP. After six months in culture, two stable clones were differentiated by their pigmentation: clone A, presenting a high purple coloration and clone B, with the normal green coloration. The rate of shoots multiplication was 50% for both clones after 3 weeks, although the growth pattern was not the same. The relative growth rate was studied relating fresh and dry weight of the two clones. Clone A plants revealed a higher growth although the relation fresh weight/dry weight was higher in clone B, which can be due to a higher water concentration on the plant. At the end of the 4<sup>th</sup> week of the micropropagation cycle, clone A still showed an active growth, in opposition to clone B that declined in growth at the end of the 3<sup>th</sup> week.

The studied samples were *in vivo* aerial parts and seeds, and *in vitro* clones A e B. The volatiles (mainly terpenic compounds) were characterized after isolation by hydrodistillation and analysis by GC and GC-MS. The seeds volatiles were dominated by linalool (82%), with  $\gamma$ -terpinene (4%), camphor (3%) and geraniol (3%) as other compounds. Linalool was present in the volatile fractions of clones A and B *in vitro* samples and of *in vivo* aerial parts, always in small relative amounts (0.1%, 0.1% and 0.3%, respectively). Dodecanal (17%), dodecanol (17%), *n*-tetradecanol (15%) and decanal (10%) were the dominant volatiles in the *in vivo* vegetative parts.  $\beta$ -Phellandrene (37% in A, 45% in B), terpinolene (9% in both),  $\beta$ -sesquiphellandrene (4% in A, 6% in B) and  $\alpha$ -phellandrene (2% in A, 3% in B) were the major identified volatiles in clones A and B *in vitro* samples. Despite the purple coloration in clone A plants, the volatile profile was quantitative and qualitatively very similar to clone B. The volatiles composition of *in vitro* grown plants was qualitatively similar to the seeds volatiles and very different from the *in vivo* aerial parts volatiles.

Lipophilic (tocopherols, carotenoids and chlorophylls) and hydrophilic (sugars, ascorbic acid, phenolics, flavonols and anthocyanins) compounds were quantified.

Furthermore, the antioxidant properties were evaluated by free radical scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *In vivo* aerial parts showed the highest antioxidant activity mainly due to its highest levels of hydrophilic compounds. Otherwise, *in vitro* samples, mainly clone A, gave the highest concentration in lipophilic compounds but a different profile when compared to the *in vivo* vegetative parts. Clones A and B revealed a lack of  $\beta$ -carotene,  $\beta$ - and  $\delta$ -tocopherols, a decrease in  $\alpha$ -tocopherol, and an increase in  $\gamma$ -tocopherol and chlorophylls in comparison to the *in vivo* sample.

A detailed analysis of individual phenolic compounds present in *in vivo* and *in vitro* grown samples, was also performed. *In vivo* aerial parts showed quercetin derivatives as the main flavonoids, and quercetin-3-*O*-rutinoside was the main polyphenol found in this part of coriander (3296 mg/kg dw). The seeds revealed only phenolic acids and derivatives, being caffeoyl *N*-tryptophan hexoside the most abundant phenolic derivative (45.33 mg/kg dw). *In vitro* samples also gave a high diversity of polyphenols, being *C*-glycosylated apigenin the main compound (2983 mg/kg dw). Anthocyanins were only found in clone A, which was certainly related to its purple pigmentation, and peonidin-3-*O*-feruloylglucoside-5-*O*-glucoside was the major anthocyanin found (1.70  $\mu$ g/kg dw).

With molecular analysis we could distinguish *in vitro* grown individuals of clone A and clone B based on phenotypic differences, using *in vivo* aerial parts individuals as an out group control. The ISSR cluster showed no correlation between *in vivo* and *in vitro* grown samples (similarity index below 0.30). *In vitro* individuals revealed a high similarity index (0.70), meaning that the genetic variation is low and could not explain the phenotypic differences found between the two clones.

*In vitro* culture might be useful to explore the plants potentialities for industrial applications, controlling environmental conditions to produce higher amounts of some bioactive products. It can also be used to explore new industrial, pharmaceutical and medicinal potentialities, such as the production of secondary metabolites like volatiles and phenolic compounds.

# I ntrodução



## 1. Introdução

As plantas são organismos complexos, captam a luz solar e assimilam o dióxido de carbono, realizando fotossíntese, resultando da mesma hidratos de carbono e oxigénio. O seu metabolismo e bioquímica são muito complexos sendo tema de estudo de muitos investigadores em todo o mundo. Representam um dos grupos de organismos vivos de maior importância para a sobrevivência da vida na Terra. A sua produção de oxigénio, carbono, energia e nutrientes permite o desenvolvimento de seres unicelulares e pluricelulares. Das muitas potencialidades das plantas, os produtos do seu metabolismo secundário, na grande maioria moléculas de grande complexidade, têm variadas aplicações em áreas como a protecção contra agente patogénicos e herbívoros, biorremediação, medicina, farmácia, indústria alimentar e agrícola.

O uso das plantas remonta ao “início da Humanidade” onde eram um bem essencial para a sobrevivência do Homem, usadas na alimentação e na medicina tradicional. Desde então a procura de novos usos para as diferentes espécies de plantas desenvolveu-se, tendo esta procura evoluído com as novas tecnologias da química, bioquímica, biologia, biotecnologia, biologia molecular e engenharia genética.

A procura de novas fontes de metabolitos secundários tem vindo a ganhar nos últimos anos um grande valor económico no mercado da oferta/procura, sendo necessário complementar essa procura com novos métodos de produção, como a cultura *in vitro*, não havendo ainda muitas fontes rentáveis produzidas através desta metodologia. Os métodos de avaliação molecular complementam ainda mais estes estudos na medida que nos permitem ter uma melhor caracterização e identificação da planta em estudo.

### 1.1 *Coriandrum sativum*

A família das Apiaceae é uma das maiores e com maior importância científica e económica no mundo das plantas, encontrando-se largamente distribuída em zonas de clima temperado (Sitri *et al*, 2010). Segundo Plunkett (1996), esta família contém 300 a 462 géneros e 2500 a 3750 espécies. A classificação taxonómica das Apiaceae já sofreu várias alterações ao longo dos anos, com vários autores a considerar diferentes características fenotípicas como descritores morfológicos. Uma das características que melhor diferencia esta família é a presença de inflorescências, geralmente compostas em umbelas. É também uma família de plantas aromáticas com produção de compostos

poliacetilénicos, saponinas triterpenóides, cumarinas e monoterpenos acumulados em canais secretores esquizogéneos, que em conjunto dão a esta família um perfil distinto e original (Plunkett *et al*, 1996). As relações filogenéticas desta família têm vindo a ganhar importância devido, em grande parte, ao crescimento do seu valor económico, sendo os métodos moleculares os mais usados para realizar este tipo de estudos (Trindade, 2010).

*Coriandrum sativum* L. vulgarmente designado por Coentro, pertence ao género *Coriandrum* L., subfamília Apioidae e família Umbellifera (Apiaceae), segundo a classificação de Pimenov e Leonov de 1993 (Diederichsen, 1996). A nomenclatura botânica do coentro foi aceite em 1753, e devido à existência de variedades intraespecíficas relativas à massa e diâmetro das sementes o nome correcto é *Coriandrum sativum* L. var. *Sativum* (1000 sementes com massa superior a 10 g e com diâmetro superior a 3 mm) e *Coriandrum sativum* L. var. *Microcarpum* (1000 sementes com massa inferior a 10 g e diâmetro igual ou inferior a 3 mm).

A origem desta espécie cultivada permanece desconhecida, contudo pode ser considerada como uma espécie silvestre, tendo sido já descrita como erva infestante de algumas culturas de cereais, ocorrendo espontaneamente na beira das estradas, conseguindo crescer em diferentes tipos de solo e climas, até mesmo em latitudes e altitudes extremas (López *et al*, 2008).

O coentro encontra-se disseminado por todo o mundo, sendo largamente cultivado na zona mediterrânica, na Europa Central e de Leste, na Ásia e nos Caucasus (López, 2008). Segundo este autor, os principais países com crescente importância no mercado do coentro são a Polónia, Roménia, República Checa, Marrocos, Canadá, Irão, Turquia, Guatemala, México e Argentina. No Paquistão a área de cultivo para a produção de coentro chega as 4,7 mil hectares, tendo sido produzido no ano de 2003, 2,2 toneladas de coentro (Qureshi, 2009). A Índia é também um dos maiores exportadores de coentro, sendo os Estados Unidos da América, Médio Oriente e o Sudoeste da Ásia os principais importadores desta planta (Ravi, 2006). No Brasil não só tem uma grande importância económica, como também desempenha um papel social muito importante, sendo o segundo vegetal mais consumido (Bertini, 2010).

O uso do coentro remonta a muitas centenas de anos, onde tradicionalmente eram usados os seus frutos e a própria planta na medicina tradicional para a cura de problemas gastrointestinais, flatulência e perda de apetite, mas também na culinária pela sua cor e sabor (Daly *et al*, 2010; Samojlik *et al*, 2010). Tem vindo a ser usado desde a

Antiguidade para realçar o sabor e propriedades organolépticas dos alimentos e para combater algumas perturbações fisiológicas (Samojlik *et al*, 2010).

Com a evolução dos processos químicos e biológicos pode-se conhecer a composição química do coentro e avaliar as verdadeiras potencialidades do mesmo, aplicado em várias áreas tais como a medicina, farmácia, alimentar, indústria e ambiente. Uma das grandes vantagens do coentro é que diferentes partes da planta podem ser usadas assim como, as sementes, a planta jovem ou adulta, ou mesmo os óleos essenciais extraídos das mesmas (Diederichsen, 1996). A planta do coentro é usada em todo o mundo principalmente para confecção de molhos e temperos (Bhandar *et al*, 1991). As sementes são a parte mais usada da planta, com aplicações na indústria alimentar (em pó) servindo de condimento e aromatizante para produtos à base de carne e peixe, em refrigerantes, pickles, pastelaria e em produtos como o caril (Bhandar *et al*, 1991; Ravi *et al*, 2006). As sementes têm propriedades diuréticas, hipoglicémicas, combatendo também o reumatismo e as nevralgias articulares, podendo assim também ser usada em medicina (Wangenstein *et al*, 2004). O óleo essencial extraído das sementes e da planta de coentro tem uma grande importância a nível nutricional, industrial e farmacêutica, é dos 20 mais usados em todo o mundo, dependendo o seu valor comercial das suas propriedades físicas, composição química e aroma (López *et al*, 2008; Ramadan *et al*, 2003). Pode ser usado como aromatizante de gin, cacau, chocolate e em medicamentos com sabor amargo, também usado contra cólicas e reumatismos (Anilakumar *et al*, 2001; Ravi *et al*, 2006; Sitri *et al*, 2010). Wangenstein *et al* (2004), descreveram que o óleo essencial do coentro pode também condicionar o crescimento e proliferação de alguns microorganismos. Recentemente uma equipa de investigadores portugueses comprovou uma vez mais a actividade antibactericida do coentro através de citometria de fluxo (Silva *et al*, 2011).

Existem inúmeros estudos com o coentro nos quais ficou comprovada a sua capacidade anti-edémica, anti-inflamatória, anti-séptica, anti-diabética e anti-hipertensiva (Sitri *et al*, 2006). Existem ainda referências comprovativas da sua actividade antioxidante, devido à presença de derivados do ácido cafeico, flavonóides, terpenos e outras moléculas com igual actividade (Wangenstein *et al*, 2004). Devido às altas concentrações em moléculas antioxidantes pode ser usado no combate à formação de radicais livres prevenindo o stress oxidativo, que contribui para algumas das doenças mais comuns no ser Humano, como Alzheimer, Cancro, Parkinson, doença de Chron e todo o processo de envelhecimento (Isabelle *et al*, 2010; Manda *et al*, 2010).

Com base nestas características, é um substituto de antioxidantes sintéticos não só na indústria farmacêutica, mas na indústria alimentar prevenindo a peroxidação lipídica e actuação de alguns microrganismos que deterioram os alimentos (Daly *et al*, 2010; Samojlik *et al*, 2010). É usado na fitoterapia e, como produz valores consideráveis de néctar, tem também um grande valor ecológico e eventualmente apícola (Diederichsen, 1996).

O coentro é uma cultura anual, podendo crescer de inverno ou verão dependendo das condições climáticas. A germinação desta erva é epigeal, o que significa que o hipocótilo é o primeiro a alongar elevando o cotilédono e as primeiras folhas para o exterior (Hopkins & Hüner, 2004).

Nas Figuras 1, 2A e 2B está representada a anatomia dos caules e folhas, flores e frutos do coentro, respectivamente. O caule do coentro é geralmente verde, podendo na altura da floração ficar vermelho ou violeta e chegar aos 0,2 e 1,4 m de altura. Na planta adulta o caule é oco e a parte basal pode chegar a um diâmetro superior a 2 mm. É mais ou menos erecto tendo por vezes vários ramos no nóculo basal, terminando cada ramo, com uma inflorescência como se pode ver na Figura 1.

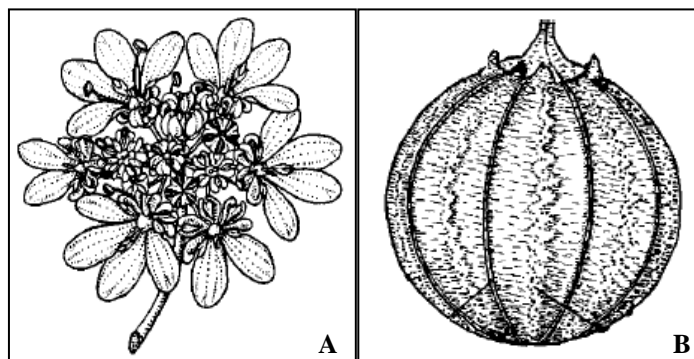


**Figura 1.** Representação esquemática dos caules e folhas do coentro (Diederichsen, 1996).

É uma planta diversifolium, o que significa que durante o seu ciclo de vida apresenta diversos tipos de folhas. São de coloração verde ou verde-claro, sendo que na parte inferior da folha têm um aspecto cerácio brilhante e assim como os caules, durante a floração, as folhas podem ficar vermelhas ou roxas, murchando antes dos primeiros frutos amadurecerem, começando esse processo nas folhas basais. As primeiras folhas a

surgirem são as folhas basais estando reunidas numa roseta em forma de lâmina e estão divididas em três lóbulos (trilobadas), enquanto as folhas que se encontram um nível acima são pinatífido. Quanto mais elevadas estão inseridas as folhas, mais pinatífidas são, tendo as folhas superiores uma forma lanceolada estreita ou filiforme (Figura 1).

A inflorescência é uma umbela composta (Figura 2A), contendo uma a duas brácteas lineares. As flores centrais são estaminadas, sendo que as flores de um nível mais elevado são mais estaminadas, no entanto com um período de floração mais curto. Os cinco filamentos dos estames estão localizados entre as 5 pétalas, sendo visíveis quando as flores abrem pois estão dobrados e os sacos de pólen escondidos no centro da flor. O ovário é inferior com cinco dentes no cálice de diferentes comprimentos, ainda visíveis no fruto quando maduro. Os frutos do coentro (Figura 2B), comumente designados de sementes, são globulares ou ovais com um diâmetro até 6 mm; no centro do fruto encontra-se o carpóforo, e na parte convexa interior estão dois canais longitudinais que contêm o óleo essencial do fruto maduro, sendo o linalol o seu composto maioritário (Diedrichsen, 1996).



**Figura 2.** Representação das inflorescências (A) e dos frutos (B) do coentro (Diedrichsen, 1996).

Apesar desta descrição geral do coentro há que ter em conta o alto nível de variação intraespecífica que ocorre nesta espécie, estando envolvidos caracteres ou traços que influenciam largamente o seu interesse agronómico e económico. A primeira descrição intraespecífica do coentro já foi descrita acima, sendo referente à massa e ao diâmetro dos frutos. No entanto já foram registadas outras variações com base noutras características, tais como o conteúdo em óleo essencial e a composição do mesmo. Por esta razão, e também por ser uma planta diplóide com 22 cromossomas ( $2n=22$ ), torna-se uma planta muito atractiva para programas de melhoramento.

O coentro é uma planta com um elevado potencial biotecnológico não só pelas suas características fenotípicas que fazem dele um óptimo candidato para programas de melhoramento, mas também pelas suas características biológicas e fisiológicas, importantes em áreas como a medicina e indústria alimentar e até mesmo cosmética sendo assim necessário o estudo de novas aplicações para esta espécie.

## 1.2 Cultura *in vitro*

A cultura *in vitro* teve um maior desenvolvimento no final do século XX, e é uma técnica que permite a rápida multiplicação de células e órgãos sob condições laboratoriais controladas, tendo aplicações a nível agronómico, industrial e académico. Em termos biológicos esta técnica baseia-se na capacidade de totipotência que as células vegetais apresentam. Este termo foi criado por Morgan em 1921 (Doods & Roberts, 1985), que afirmou que uma célula totipotente é aquela que consegue regenerar um indivíduo completo. No entanto Schwann em 1839 (Doods & Roberts, 1985) tinha já expresso a ideia de que uma célula isolada de qualquer organismo multicelular teria a capacidade de se desenvolver se as condições externas fossem adequadas ao seu crescimento. A cultura *in vitro* permite então separar células, tecidos e órgãos de um determinado organismo e estudá-los como sendo uma única unidade biológica. Em 1902, foi realizada a primeira tentativa de cultura de células isoladas num meio artificial, por Haberlandt (Mulder-Krieger *et al*, 1988). No entanto, não obteve qualquer crescimento das células num meio que consistia na solução de Knop, aspargina, peptona e sacarose. Um outro problema da tentativa de Haberlandt é que não se sabia de que forma as contaminações bacterianas e fúngicas poderiam limitar o crescimento.

Robbins em 1922 (Doods & Roberts, 1985) realizou a primeira cultura de tecidos em assépsia usando extremidades de raízes, por serem zonas com grande capacidade de crescimento. Em 1951, White (Doods & Roberts, 1985) levantou dois grandes problemas sobre a cultura de células já realizada pelos seus pares entre o período de 1902 e 1934 (entre 1939 e meados da década de 40 não houve qualquer investigação devido à Segunda Guerra Mundial), a difícil escolha do material vegetal para o estudo, a par com uma escolha igualmente difícil da melhor fórmula para o meio nutritivo de crescimento.

O conhecimento e compreensão da acção dos fitorreguladores foi também uma mais-valia para a cultura de células, tendo sido também Haberlandt quem formulou a

teoria das “hormonas de divisão”. Haberlandt usou hormonas associadas a tecidos vasculares (como o floema) e a processos de ferida nos tecidos vegetais para os seus estudos. Mais tarde Skoog e Miller (Doods & Roberts, 1985) na década de 50 do século passado descobriram um grupo de hormonas vegetais, designadas de citocininas, que estimulam a divisão celular. Também eles revolucionaram a cultura *in vitro* ao descobrirem que regulando as concentrações e tipos das várias hormonas nos meios de cultura poderiam obter as porções da planta que pretendiam para o seu estudo, desde raízes, folhas ou mesmo células indiferenciadas (*calli*).

A cultura de células tem sido largamente usada na agroindústria e em micropropagação florestal de flores e plantas ornamentais de elevado valor comercial. A cultura *in vitro* é usada também para produzir plantas livres de vírus através de termoterapia e de cultura de meristemas, tornando-se uma ferramenta de grande importância em fitopatologia (Matkwoski, 2008). Na década de 70 tornou-se evidente o seu contributo na agricultura, indústria e ciências da saúde envolvendo hoje em dia a produção de compostos, maioritariamente, do metabolismo secundário, em larga escala como vitaminas, aromatizantes, alcalóides, enzimas, entre outros. No entanto, ainda não existem muitas aplicações industriais de produção de compostos secundários, a não ser a produção de ácido rosmarínico, tocoferóis e algumas antocianinas a partir do girassol (Matkwoski, 2008).

### 1.2.1 Aspectos nutricionais

O meio nutritivo é um dos aspectos mais determinantes da cultura *in vitro* pois os requerimentos nutricionais de apenas uma parte da planta são completamente distintos do organismo completo. A escolha do meio depende principalmente da espécie de planta (ou mesmo variedade), do tecido ou órgão a ser colocado em cultura e do objectivo da experiência.

Um dos componentes mais importantes do meio de cultura são os compostos inorgânicos, na sua maioria, sais, que têm que ser fornecidos em elevadas quantidades, sendo assim designados de macronutrientes, ou pequenas quantidades sendo então designados por micronutrientes. O azoto é um dos compostos maioritários, podendo ser colocado sob a forma de ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amónia ( $\text{NH}_4^+$ ) dependendo das preferências nutricionais das diferentes espécies de plantas. O magnésio e o enxofre são fornecidos simultaneamente através do composto  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de magnésio

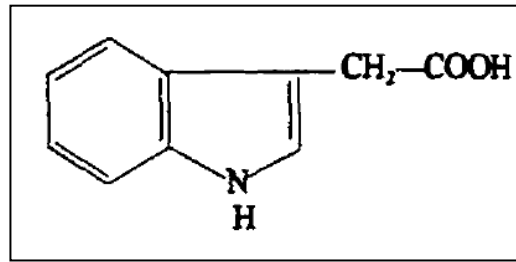
hepta-hidratado). O ião potássio, fósforo e cálcio são também macronutrientes muito importantes para o bom desenvolvimento das plantas. Iões como o ferro, manganês, zinco, bório, cobre e molibdénio são alguns exemplos de micronutrientes necessários também para um bom desenvolvimento da cultura em estudo, no entanto as quantidades necessárias destes compostos é mínima podendo chegar a concentrações de microgramas por litro ( $\mu\text{g/l}$ ). A fonte de carbono e energia é usualmente sacarose ou D-glucose em concentrações que variam dos 20-30 g/l, tendo sido já descrito que o tipo de açúcar influencia a diferenciação de certo tipo de tecidos, ex: xilema (Doods & Roberts, 1985).

Devido às condições controladas de luz, temperatura e humidade, às condições de assepsia e às concentrações elevadas de açúcar e nutrientes, podem ocorrer alterações morfo-fisiológicas nas plantas que não ocorreriam se fossem cultivadas em solo, numa estufa ou ao ar livre. Em cultura *in vitro* pode haver uma deficiente evolução do aparelho fotossintético levando a uma deficiente concentração de clorofila (com concomitante baixo desenvolvimento dos tilacóides e grana), inactividade ou ausência da enzima RubisCO (Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) responsável pela fotossíntese, sendo necessário uma alta concentração de açúcares para um melhor desenvolvimento da mesma. *In vitro*, as plantas habitualmente perdem grandes quantidades de água devido a modificações da anatomia dos estomas e da deficiente deposição de ceras que formam a cutícula, perdendo mais água por transpiração. Pode também ocorrer modificação da anatomia das próprias folhas sendo possível, assim, encontrar plantas cultivadas *in vitro* com as folhas mais finas e com fraco desenvolvimento do mesofilo em paliçada (Hazarika, 2006).

### 1.2.2 Fitorreguladores

Os fitorreguladores (ou hormonas vegetais) são substâncias orgânicas que ocorrem naturalmente nas plantas, que afectam os seus processos fisiológicos em concentrações muito baixas, estando a um nível de concentrações ainda mais baixo que os dos nutrientes e vitaminas. Os fitorreguladores mais usados na cultura *in vitro* são as auxinas e citocininas.

As auxinas foram identificadas em 1928 por Went (Doods & Roberts, 1985), descobrindo que a auxina presente em maior quantidade nas plantas é o IAA (ácido 3-indolacético), com a estrutura química representada na Figura 3.

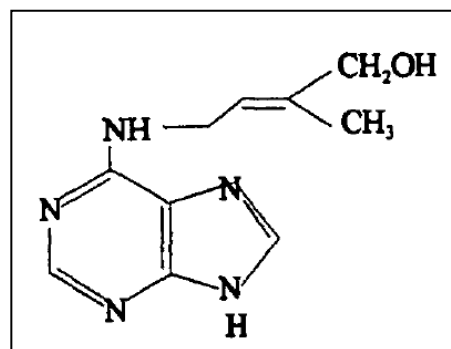


**Figura 3.** Estrutura química da IAA (Ácido 3-indolbutírico) (Gaspar *et al*, 1996).

Existem outras moléculas com actividade de auxina, assim como o ácido indolbutírico (IBA), indolacetaldeído, ácido fenilacético e alguns compostos conjugados do IAA, como o indoleacetaldeído aspartato e 4-cloro-IAA. Para aplicações comerciais são usadas auxinas sintéticas como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético. O IAA é sintetizado nas folhas primárias e jovens e nos ápices radiculares, mas também nas sementes em desenvolvimento.

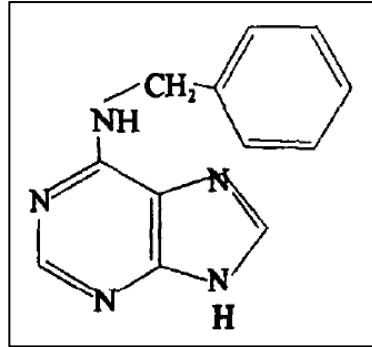
As auxinas exercem acção sobre o desenvolvimento celular e crescimento do caule e raiz, estimulando a divisão celular na zona cambial e em combinação com as citocininas exercem esta mesma acção em cultura *in vitro*. Estimulam a diferenciação do floema, xilema e das raízes também em cultura. Medeiam as respostas morfofisiológicas induzidas pela luz e a força gravitacional, auxiliando processos como a dominância apical, crescimento das partes florais e frutos. Inibem por sua vez a senescência precoce das folhas e frutos, podendo ser tóxicas ou inibidoras quando em concentrações muito elevadas (Gaspar *et al*, 1996).

As citocininas são compostos derivados de adenina, sendo a citocinina natural mais comum nas plantas a zeatina (Figura 4).



**Figura 4.** Estrutura química da *trans*-zeatina (Gaspar *et al*, 1996).

Foram identificadas pela primeira vez em 1958 em DNA de arenque, tendo sido somente em 1963 identificada a primeira citocinina natural das plantas, a zeatina. Existem outros compostos que exercem actividade de citocinina, tendo exactamente os dois anéis da zeatina e diferenciando-se apenas pelos radicais, como é o caso da BAP (benzilaminopurina; Figura 5).



**Figura 5.** Estrutura química da benzilaminopurina (BAP) (Gaspar *et al*, 1996).

As citocininas são sintetizadas nas zonas meristemáticas das raízes e dos ápices vegetativos em desenvolvimento. Actuam sobre a divisão celular em conjunto com as auxinas. Também em cultura actuam na morfogénese da planta, promovendo o crescimento dos rebentos e dos ramos laterais, e também na expansão das folhas podendo ter uma maior área foliar. Assim como as auxinas inibem a senescência das folhas. Podem também desenvolver os cloroplastos por uma maior acumulação de clorofila e, em algumas espécies, podem aumentar a abertura estomática (Gaspar *et al*, 1996).

Como já foi referido, Skoog & Miller descobriram que ao manipular a razão entre a concentração de auxinas e a concentração de citocininas poderiam afectar a organogénese da planta em estudo. Os níveis de auxina são geralmente mais elevados que os de citocininas, mas dependendo do grau de diferença entre estes níveis podemos obter diferentes partes da planta em cultura. Quando a diferença é muito elevada no sentido de maior presença de auxinas pode haver formação de raízes; no sentido contrário levará a um direccionamento para a formação de rebentos. Pode também ocorrer a formação de uma massa de células indiferenciadas, *calli*, quando os níveis de auxina e citocininas são muito próximos.

### 1.2.3 *Coriandrum sativum in vitro*

São inúmeros os estudos nos quais se aplica a técnica de cultura *in vitro* para o coentro, com as mais variadas aplicações e objectivos. Um dos estudos mais antigos sobre a cultura *in vitro* do coentro foi em 1969 por Steward *et al* no seu trabalho “Growth and morphogenesis in tissue and free cell culture” no qual induziu a organogénese de várias plantas, incluindo o coentro, num meio suplementado com NAA (ácido naftalenoacético) e em meio suplementado com leite de côco (Lee & Fossard, 1974). Kim *et al* (1996) estudaram a frequência regenerativa de uma suspensão de células de *Coriandrum sativum* via embriogénese somática, partindo de sementes de coentro colocadas em meio MS (Murashige & Skoog) e, posteriormente, em meio MS suplementado com a auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Outro estudo sobre a frequência regenerativa *in vitro* de coentro a partir da embriogénese somática, foi realizado em 2008 por Murthy *et al*, que estabeleceu a cultura de coentro a partir das suas sementes, que após germinação lhes foi retirado o cotilédone e o hipocotilo tendo estas plântulas sido transferidas para meio MS suplementado com 2,4-D e subcultivadas a cada 3 semanas de forma a obter *calli*. Martin *et al* (2004) usaram, da família das Apiaceae, o *Eryngium foetidum* L., conhecido como o coentro espinhoso, também para estudo da eficiência regenerativa baseando-se no estudo de Steward *et al* (1969) usando e comparando resultados obtidos em meio MS com NAA e meio MS com leite de côco. Kataeva & Popowich (1993) realizaram um trabalho com coentro, no qual estudaram a maturação e rejuvenescimento deste durante a micropropagação de rebentos. O material inicial incluía sementes de coentro inoculadas em meio MS com citocinina tendo, as plântulas originadas após germinação, sido transferidas para um meio básico de acordo com Murashige & Skoog (1962) suplementado com citocinina e IAA.

Uma das várias aplicações do coentro foi descrita por Wang & Kumar (2004) que o usaram para o estudo da senescência nas plantas provocada pelo fitorregulador etileno; neste caso, foram transformadas plantas de coentro com o gene indutor da produção de etileno obtido de *Arabidopsis*, e observaram as várias alterações a nível dos processos de desenvolvimento.

Apesar dos estudos referidos acima descreverem condições de cultura distintos para a manutenção da planta de coentro *in vitro*, o objectivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de novas metodologias para a produção de metabolitos secundários baseado no facto de esta planta poder ser uma fonte dos mesmos, sendo por isso necessário estudar a planta e o seu comportamento em termos de produção desses

compostos do metabolismo secundário em cultura. Segundo Mulder-Krieger *et al* (1988), a produção de metabolitos em cultura *in vitro* é menor que 1%, sendo assim importante desenvolver novos protocolos que permitam explorar as potencialidades das plantas obtidas *in vitro*.

### 1.3 Metabolismo Secundário

Os compostos primários estão directamente relacionados com os processos de desenvolvimento e crescimento da planta (Kroymann, 2011). Para além destes, e sendo as vias metabólicas das plantas das mais complexas de todos os seres vivos, também são produzidos compostos secundários que estão relacionados com a manutenção da viabilidade das plantas, protegendo-as contra infecções virais e microbianas (fungos e bactérias), ataque de herbívoros e radiações UV, podendo também actuar como atractivos para polinizadores e dispersores de sementes, na alelopatia e sinalização (Aharoni & Galli, 2011; Kroymann, 2011).

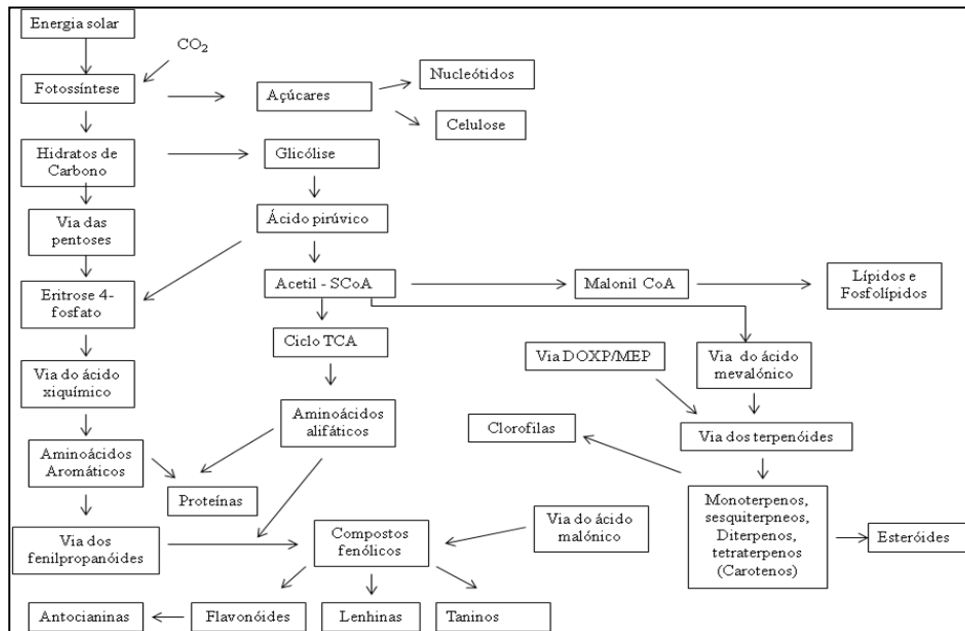
O conceito de metabolismo e produto secundário foi apresentado por Sachs na segunda metade do século XIX em 1873, sendo ele, um dos fundadores da fisiologia vegetal. No entanto em 1806, muito antes desta designação ter sido proposta, Friedrich Wilhulm Schürner isolou a morfina (*principium sonniferum*) de *Opium poppy* (papoila do ópio), tendo sido o primeiro composto activo a ser isolado de uma planta. Somente no meio do século XX se iniciou a investigação das potencialidades dos compostos secundários, descobrindo-se compostos terpénicos, alcalóides, policétidos e fenilpropanóides; foi também estudada a sua ocorrência nas plantas e acumulação nos tecidos vegetais. O desenvolvimento desta área foi rápido e influenciou a química orgânica, farmacêutica e analítica assim como a síntese química. Apenas 150 anos após a descoberta do primeiro composto activo, as plantas estavam já a ser utilizadas como fontes rentáveis e inesgotáveis deste tipo de compostos (Hartmann, 2007).

Os compostos secundários encontram-se em todas as plantas superiores, geralmente com uma grande diversidade estrutural, existindo paralelamente grandes famílias de genes que codificam para a produção de enzimas do metabolismo secundário (Kroymann, 2011; Wink, 2003). Existem mais de 200 000 estruturas identificadas estando entre elas 21 000 alcalóides, 2200 terpenóides e 5000 flavonóides, conhecendo-se também as suas funções fisiológicas e bioquímicas relacionando aspectos funcionais e evolutivos (Hartmann, 2007). A composição destes compostos

pode variar muito qualitativa e quantitativamente entre e intra-espécies, sendo que no mesmo organismo pode também variar, dependendo do tecido ou órgão e do estado de desenvolvimento em que se encontra a planta; nos órgãos responsáveis pela sobrevivência e reprodução encontram-se os compostos mais eficazes (Kroymann, 2011). Podem-se encontrar activos ou inactivos nas plantas, ficando activos através de um estímulo externo, que pode ser uma ferida ou infecção, ou mesmo quando a planta é consumida por um herbívoro. O Homem usa estes compostos maioritariamente como corantes, aromatizantes, em fragrâncias, estimulantes, alucinogéneos insecticidas e agentes terapêuticos, sendo este último o de maior interesse actualmente devido à elevada potencialidade para serem usados na prevenção de doenças (Aharoni & Galli, 2011). Um dos maiores objectivos dos biotecnólogos é criar um sistema superprodutor de compostos secundários com o aumento do número de cópias dos genes responsáveis pela produção destes. Uma vez que estes compostos não são necessários para o desenvolvimento e crescimento da planta, estão em contínua modificação e adaptação devido ao facto dos genes responsáveis pela sua produção terem como característica principal uma elevada plasticidade a uma pressão externa ambiental, fazendo com que estes metabolitos sejam únicos, diversos e adaptivos (Hartmann, 2007). Alguns metabolitos podem apresentar funções primárias e secundárias podendo ser este facto explicado pela própria evolução, onde os metabolitos secundários apresentariam uma reserva muito rica e da qual foram recrutados para assumir funções primárias essenciais à sobrevivência da planta (Hartmann, 2007).

As maiores famílias de metabolitos secundários podem ser classificadas em três grandes grupos: 1-Compostos fenólicos; 2- Compostos terpénicos e 3- Compostos nitrogenados e sulfíticos. Os compostos secundários são produzidos a partir de alguns intermediários do metabolismo primário, sendo as vias de produção de precursores dos compostos secundários, a glicólise, o ciclo TCA, vias dos aminoácidos alifáticos e aminoácidos aromáticos, via das pentoses e via do ácido xiquímico, entre outras (Aharoni & Galli, 2011). Na Figura 6 estão esquematizadas algumas vias precursoras principais de alguns compostos secundários. Tudo se inicia na fotossíntese, processo no qual a radiação solar absorvida pelas plantas converte o carbono inorgânico ( $\text{CO}_2$ ) em substâncias orgânicas, como hidratos de carbono, e oxigénio (Lobo & Lourenço, 2007). Estes hidratos de carbono produzidos a partir deste processo são essenciais à sobrevivência e crescimento das plantas, actuando também como um ponto de partida para a produção de outros compostos como aminoácidos, compostos lipídicos e

proteínas. É também a partir destes que se formam alguns dos compostos intermediários que vão dar origem às vias biossintéticas do metabolismo secundário.



**Figura 6.** Esquematização de várias vias biossintéticas de produtos do metabolismo secundário a partir do metabolismo primário, baseado no esquema apresentado por Cseke *et al* (2006).

No presente trabalho foram estudados vários compostos incluindo metabolitos primários (ex: açúcares e vitaminas), secundários (ex: compostos fenólicos e terpénicos) e alguns, que tal como já foi dito, estão no limiar entre compostos essenciais para o desenvolvimento da planta e metabolitos secundários, tal como as clorofilas que apresentam uma estrutura (secundária) isoprénica na sua constituição. Alguns dos compostos serão mencionados no próximo capítulo onde se avalia o seu potencial antioxidante no combate ao stress oxidativo.

### 1.3.1 Óleos essenciais

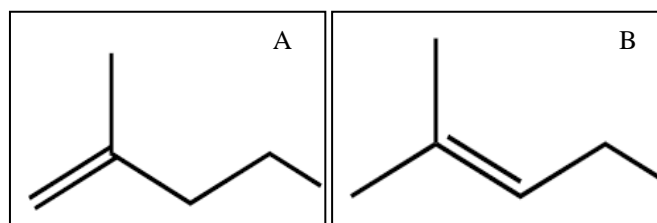
Um dos objectivos propostos para este trabalho consistiu na identificação e quantificação dos compostos terpénicos presentes no óleo essencial do coentro. Os óleos essenciais incluem maioritariamente compostos de baixa massa molecular como mono e sesquiterpenos, os seus análogos oxigenados e derivados fenólicos (Misharina & Samusenko, 2008). São produtos naturais complexos e voláteis, caracterizados pela presença de um aroma forte, lípidos e raramente coloridos; são normalmente lípidos de baixa densidade (menor que a da água) existindo no entanto excepções, solúveis em

solventes orgânicos, sendo produzidos como metabolitos secundários por plantas das famílias da Apiaceae, Asteraceae, Laureaceae, Fabaceae, entre outras, de zonas temperadas e quentes, como a área mediterrânea e países tropicais (Bakkali, 2008; Figueiredo, *et al.*, 2008). Podem ser sintetizados em todos os órgãos da plantas, caules, folhas, sementes, frutos, raízes e até mesmo na casca, sendo depois armazenados em estruturas muito específicas da planta, podendo ser células secretoras e epidérmicas, cavidades e canais, ou em tricomas glandulares (Bakkali, 2008). Uma vez que, os óleos essenciais são uma mistura complexa de compostos, existem muitos factores que podem influenciar a sua produção e composição, sendo eles de natureza fisiológica, ambiental, geográfica, genética, armazenamento, entre outros (Figueiredo *et al.*, 2008). Os factores de ordem fisiológica estão relacionados com o estágio de desenvolvimento no qual se encontram os tecidos e órgãos dos quais se isolam os óleos, pois se forem órgãos maduros vão ter composições distintas às dos jovens, que ainda não desenvolveram por completo as vias biossintéticas de produção dos compostos e os locais de síntese e acumulação (além de ser importante o estágio de desenvolvimento, a variação diurna de produção também é importante, há variações ao longo de um ciclo diário, a produção pode variar em composição mas principalmente em quantidade ao longo do dia). Não só o estágio de desenvolvimento é importante aquando do estabelecimento do perfil de voláteis de uma planta, mas a escolha do material vegetal também influencia grandemente este mesmo perfil, podendo haver modificações consoante o órgão estudado (flores, caules, sementes, raízes), por exemplo, é nas flores que se encontram a maior parte dos compostos voláteis e com também a maior diversidade dos mesmos, ao contrário do que ocorre nos tecidos vegetativos que produzem pouca quantidade de óleos (Figueiredo *et al.*, 2008) (Dudareva, 2004) Factores ambientais como a luz e temperatura podem também afectar a composição dos óleos essenciais, sendo a cultura *in vitro* eficaz para a obtenção deste tipo de compostos secundários devido ao stresse inerente à própria metodologia (Dudareva, 2004; Matkowski, 2008). O maior grupo de compostos presentes nos óleos essenciais são terpenos ou terpenóides sendo os restantes compostos aromáticos e alifáticos (Bakkali, 2008).

### 1.3.2 Compostos terpénicos

Os terpenos ou terpenóides (terpenos ligados a um oxigénio) são uma das maiores famílias de produtos naturais, sendo provenientes da via biossintética do ácido mevalónico, tendo como base inúmeras unidades de isopreno ou isoprénicas (difosfato

de isopentenilo – IPP, Figura 7A). Todos os compostos terpénicos são classificados consoante o número de carbonos tal como os hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpénicos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) e diterpenos ( $C_{20}$ ). A síntese destes compostos é realizada através da condensação do IPP com o seu isómero alílico, difosfato de dimetilalilo (DMAPP, Figura 7B), podendo ser condensações cabeça-cabeça, cauda-cauda e cabeça-cauda, dando origem aos diferentes tipos de terpenos (Dudareva, 2004; Mahmoud & Croteau, 2002). As condensações do IPP e DMAPP são realizadas com a ajuda de um conjunto de enzimas, terpeno sintases e preniltransferases, actuando posteriormente outro tipo de enzimas modificadores que levam à formação da enorme variedade de compostos terpénicos (Matkowski, 2008).



**Figura 7.** **A**- Unidade isoprénica (difosfato de isopentenilo – IPP); **B** – Isómero alílico do IPP, difosfato de dimetilalilo (DMAPP).

Os compostos terpénicos estão envolvidos na sobrevivência das plantas uma vez que asseguram defesas contra factores bióticos e abióticos. Interações entre plantas competidoras podem ser um factor na redução da síntese, acumulação e emissão de compostos terpénicos, uma vez que estas levam à competição por recursos que vão afectar as funções primárias das plantas, afectando depois também a produção de compostos (Ormeño *et al*, 2007). Por outro lado, a competição pode também levar à maior produção de óleos como “arma” alelopática de domínio e eliminação da concorrência. Na Tabela 1 encontram-se alguns exemplos de compostos que podem estar presentes nos óleos essenciais, podendo ser mono ou sesquiterpenos e em menor quantidade, compostos aromáticos. Existem inúmeras estruturas com diferentes modificações químicas o que lhes permite realizar diferentes funções nas plantas.

Os monoterpénicos são compostos com unidades isoprénicas  $C_{10}$ , representando 90% da constituição do óleo essencial. A sua síntese é realizada através do produto de condensação entre o IPP e DMAPP, o difosfato de geranilo (GPP), que após acção das terpeno sintases, se vai transformar no esqueleto primário para a formação de monoterpénicos (Dudareva, 2004). A este grupo estão já associadas cerca de 1000

metabolitos voláteis e lipofílicos, que para além dos óleos essenciais constituem o cheiro floral de algumas espécies de plantas e resinas das mesmas. A sua acção fisiológica nas plantas ainda não está totalmente esclarecida, sabendo-se apenas que actuam como atractivos e defensores das plantas. Têm grande aplicação industrial como agentes aromatizantes, insecticidas e perfumes. Devido à baixa toxicidade destes compostos contra vertebrados, têm também grande potencial para aplicação como agentes de controlo de pestes sendo a grande maioria já metabolizada por inúmeros microrganismos não persistindo no meio ambiente como um agente tóxico (Mohmoud & Croteau, 2002).

**Tabela 1 .** Diversidade de compostos que surgem na composição dos óleos essenciais.

Compostos presentes nos óleos essenciais	Tipo de substituição	Exemplos
Monoterpenos	Carbonetos	mirreno, ocimeno
		terpinenos, <i>p</i> -cimeno, felandrenos
		pinenos, canfeno, sabineno
	Alcoóis	geraniol, linalool, lavandulol
		mentol, $\alpha$ -terpeniol, carveol
		borneol, fenchol, crisanteol
	Aldeídos	citral, neral, citronelal
	Cetonas	tegetona cânfora, fenchona,
		mentonas, carnova, pelegona
		pinocanfona, pinocarvona
Estéres	propionato, acetato citronelil	
	mentil acetato isobornil	
Éteres	1,8.cineole, mentofurano	
Peróxidos	Ascaridole	
Fénois	timol, carvacrol	
Sesquiterpenos	Carbonetos	azuleno, $\beta$ -bisaboleno cadinenos , cariofileno ,curcumenos
	Alcoóis	bisabol, cedrol, farnesol, carotol
	Cetonas	germacrone, turmerones
	Epóxidos	oxido de cariofileno, epoxido humuleno
Aromáticos	Aldeídos	Cinamaldeido
	Alcoóis	alcoól cinámico
	Fenóis	chavicol, eugenol
	Derivados metoxi	anetole, elemicine, estragole
	Dioxi-metileno	apiole, miristicine, safrole

Os segundos maiores compostos presentes nos óleos essenciais são os sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), junção de três unidades IPP, sendo a síntese destes compostos

ligeiramente distinta à dos monoterpenos, pois o produto de condensação que originará o esqueleto primário destes compostos é o difosfato de farnesilo (FPP), tendo assim uma estrutura completamente distinta, sendo as homodiméricas preniltransferases, ou FPP sintases, as enzimas responsáveis pela formação dos mesmos (Dudareva, 2004; Mohmoud & Croteau, 2002).

Os métodos de extracção dos óleos essenciais ou da mistura completa de voláteis pode variar muito consoante o objectivo do estudo ou mesmo consoante a área de aplicação destes produtos. As extrações podem ser realizadas através de solventes orgânicos, ou em condições supercríticas de dióxido de carbono, metodologias usadas principalmente na área da cosmética (Figueiredo *et al*, 2008; Illés *et al*, 2000). Podem ainda ser realizadas através do método de hidrodestilação, que se baseia na passagem à fase gasosa dos compostos, arrastados pelo vapor de água, após o que passam à fase líquida por arrefecimento; esta metodologia pode ter a desvantagem dos compostos sensíveis a altas temperaturas serem facilmente alterados ou destruídos (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007). Este tipo de extracção permite determinar funções bactericidas e fungicidas por não se utilizar nenhum solvente potencialmente tóxico sendo assim preferencialmente usada na farmácia e na área alimentar (Bakkali, 2008; Figueiredo *et al*, 2008). Depois de realizadas as extrações é necessária a análise dos óleos e/ou mistura de voláteis usando e complementando técnicas de separação e identificação dos compostos. Actualmente a cromatografia gasosa (GC) é o método mais usual de separação de compostos operando até a um máximo de 1500 unidades de massas moleculares, que irão definir o tipo de voláteis que apresentam, sendo os compostos com massa molecular muito baixa considerados gases permanentes, até às 200 unidades de massa são considerados compostos voláteis e a partir destas unidades são compostos semi-voláteis. Os compostos terpénicos presentes nos óleos essenciais inserem-se entre as categorias de compostos voláteis e semi-voláteis apresentando massas moleculares entre cerca de 120 e de 300 unidades. Segundo Marriott (2001), a cromatografia gasosa é o método analítico mais apropriado para a separação dos compostos dos óleos essenciais apesar das inúmeras estruturas com diferentes modificações químicas que levam a sobreposições nos índices de retenção. Esta metodologia de separação é complementada com a espectrometria de massa (GC-MS) para identificação dos compostos, designando-se este processo de Hifenização, obtendo um método de dimensão ortogonal que permite melhorar a separação e a qualidade da análise dos dados (Marriott, 2001). O sistema de espectrometria de massa é um método

de separação de alta resolução baseada na polaridade e/ou ponto de ebulição, sendo um método em constante evolução para uma melhor resolução e que compete em larga escala com outros métodos de hifenização (Marriott, 2001).

### 1.3.3 Voláteis em *Coriandrum sativum*

O interesse por óleos essenciais em novas culturas tem vindo a crescer nos últimos anos, razão pela qual a família das Apiaceae (Umbelliferas) tem ganho cada vez mais importância por a ela pertencerem espécies aromáticas como a salsa, pimenta, aipo e o coentro (Ramadan & Mörsel, 2002).

No coentro, o aroma e sabor são devidos à presença do óleo essencial nas glândulas/canais do mericarpo, sendo o conteúdo do mesmo, geralmente, de apenas 0,03% tendo sido já descrito um máximo de 2,7% (López *et al*, 2008; Ravi *et al*, 2006). O principal e mais abundante composto do óleo essencial dos frutos do coentro é o  $\alpha$ -linalol, tendo sido já referido e confirmado por vários autores, que este composto pode representar até 70% do conteúdo do óleo (Illés *et al*, 2000; López *et al*, 2008; Ravi *et al*, 2006). Nas sementes existem ainda compostos como o  $\alpha$ -pineno, acetato de geraniol, cânfora,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, citronelol, geranil e limoneno (López *et al*, 2008). Devido ao seu grande interesse comercial, existem vários estudos sobre o perfil do óleo essencial dos frutos do coentro e as suas potencialidades no mercado em áreas de aplicação distintas. Em 1996, Diederichsen realizou um relatório para o Instituto Internacional de Recursos Genéticos na Alemanha, onde utilizou várias amostras de coentro de vários bancos de germoplasma por todo o mundo e estudou toda a sua fisionomia, fisiologia, realizando também um perfil genético e dos óleos essenciais para todas as amostras. Em 2008, López, fez um estudo semelhante no qual recolheu várias amostras de coentro crescidas no campo, por todo o mundo e no qual estimou a diversidade fenotípica, bioquímica e molecular dessas mesmas amostras. Tanto Diederichsen como López utilizaram frutos do coentro para obter o perfil de óleos. Misharina & Samusenko (2008), Ramadan & Mörsel (2002) e Ravi (2006) estabeleceram um perfil de óleos essenciais de sementes de coentro extraídos por hidrodestilação, enquanto Illés *et al* (2000) realizaram essa mesma extração usando diferentes concentrações de dióxido de carbono e propano. Gil (2002) usou dois génotipos distintos de coentro e analisou os óleos obtidos a partir dos frutos crescidos em condições ambientais distintas, enquanto López *et al* (2008) analisaram os

compostos tóxicos presentes no óleo essencial do coentro. Existem poucos estudos sobre o perfil de óleos essenciais das partes aéreas do coentro devido ao baixo rendimento das mesmas nestes tecidos e ao baixo interesse comercial, no entanto Potter (1996) efectuou um estudo às partes aéreas de dois lotes comerciais de coentro onde caracterizou e identificou os compostos existentes no óleo essencial dos mesmos tentando estabelecer uma explicação para as diferenças que encontrou. No entanto, nunca se realizou um estudo comparativo entre coentro cultivado *in vitro*, coentro comercial e frutos de coentro; sendo assim, o presente trabalho é um estudo inovador e necessário para o enriquecimento académico e comercial das potencialidades da plantas de coentro.

## 1.4 Stresse oxidativo e Actividade antioxidante

### 1.4.1 Stresse oxidativo

Ao longo do século XX inúmeras doenças e distúrbios, como o cancro, doenças cardiovasculares e inflamatórias, foram estudadas tendo-se encontrado provas irrefutáveis que as relacionam, directa ou indirectamente, com o stresse oxidativo, o que aumentou exponencialmente o interesse pelos produtos naturais, especialmente na área da saúde (Laguerre, 2007; Niki, 2010). O organismo humano, assim como outros organismos aeróbios, tem um rede endógena de defesa contra o stresse oxidativo que foi evoluindo e adaptando-se às diferentes condições adversas às quais o organismo é sujeito (Niki, 2010). Esta rede de defesa inclui fontes enzimáticas, como a catalase, peroxidases e a superóxido dismutase, mas também fontes não enzimáticas que incluem moléculas como o ácido úrico, estrogénio, coenzima Q, melanina e melatonina (Laguerre, 2007).

O stresse oxidativo é provocado por um desequilíbrio entre esta rede endógena de defesa e a produção de compostos oxidativos, sobretudo na forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Laguerre, 2007). Estas ROS estão constantemente a ser produzidas nos sistemas biológicos, incluindo radicais livres e outras substâncias não radicalares como o anião superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e singlete de oxigénio (Blokhina, 2003). Estas ROS são produzidas quando ocorre a redução parcial de um a três electrões ( $e^-$ ) na cadeia transportadora de electrões, activando a molécula de oxigénio pela doação de um  $e^-$ , geralmente realizado por metais de transição (como o  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) (Blokhina, 2003). Em condições naturais

de stresse são geradas grandes quantidades de ROS, sendo consideradas por alguns moléculas sinalizadoras da concentração de oxigénio no meio onde se encontram, oxidando proteínas, lípidos, glúcidos e ácidos nucleicos, levando ao desenvolvimento de inúmeras fitopatologias humanas (Blokina, 2003; Laguerre, 2007). A sua concentração pode estar também relacionada com factores ambientais tais como o consumo de tabaco e álcool, fadiga, dieta excessiva de calorias e gorduras, mas também com o envelhecimento com o qual a absorção de nutrientes e antioxidantes diminui gradualmente (Anusha, 2011).

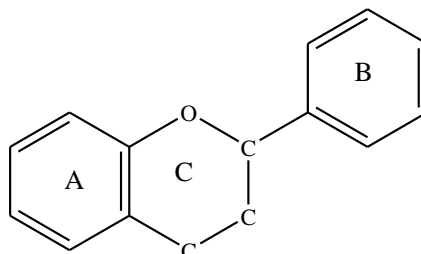
Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), mais de 80% da população mundial depende da medicina tradicional com recurso a extractos de plantas e aos seus componentes activos para obter cuidados primários de saúde. Em particular, as plantas podem constituir fontes de compostos antioxidantes suplementados através da alimentação e de outros usos (Krishnaiah, 2011). Alimentos funcionais ou suplementos de antioxidantes ricos em  $\alpha$ -tocoferóis, vitamina C, licopenos e compostos fenólicos, assim como antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) têm vindo a ter muita procura no mercado, apesar da segurança dos antioxidantes sintéticos ter vindo a ser posta em causa (Anusha, 2011; Krishnaiah *et al*, 2011; Ramadan *et al*, 2003). Os compostos antioxidantes podem funcionar ou actuar contra as ROS de maneira diferenciada tendo uma acção quelante e/ou captadora dos radicais antes da ocorrência de danos em qualquer parte do organismo; após estes danos, podem também funcionar como reparadores dos tecidos (Niki, 2010). A metodologia de cultura *in vitro* de plantas pode proporcionar inúmeras vantagens na produção e estudo de antioxidantes facilitando a sua extracção e purificação, o que aumenta o seu valor económico; do ponto de vista meramente ecológico, com esta metodologia não é necessário a sobreexploração de espécies em perigo ou raras (Matkowski, 2008). Pela importância que os compostos antioxidantes assumem na actualidade é essencial a procura de novas fontes seguras e viáveis para a produção dos mesmos.

#### 1.4.2 Compostos antioxidantes

Devido à grande variedade de compostos que apresentam potencial antioxidante serão apenas abordados o conjunto que apresenta maior potencial como os compostos fenólicos, algumas vitaminas (tocoferóis e ácido ascórbico), compostos terpénicos (carotenóides), mas também alguns produtos do metabolismo primário (clorofilas e

açúcares). Salienta-se ainda o facto de todos estes compostos terem sido alvo de análise experimental no presente trabalho.

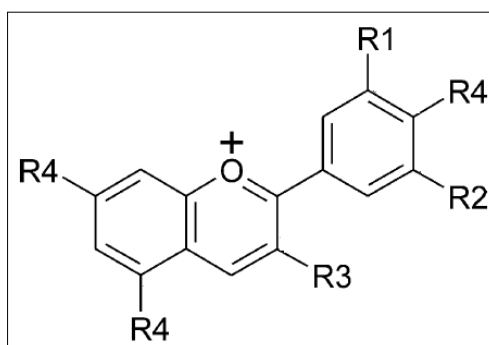
Os compostos fenólicos representam uma das maiores famílias de metabolitos secundários, albergando compostos como os flavonoides, taninos, lenhinas, ácidos fenólicos, entre outros (Justesen & Knuthsen, 2001). A sua contribuição para a saúde humana desenvolveu-se consideravelmente na década de 90, com provas irrefutáveis da sua contribuição para a prevenção de algumas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, mas também contra o cancro e a osteoporose (Scalbert *et al*, 2005). Uma dieta rica em frutos, vegetais, cereais, chocolate e até mesmo vinho tinto, pode aumentar o consumo de compostos fenólicos, responsáveis pelo seu grande potencial antioxidante (Scalbert *et al*, 2005). A sua biossíntese deriva de duas vias distintas, a do ácido xiquímico e a do ácido cinâmico. Da via do ácido xiquímico recebe o anel fenilpropano que funciona como iniciador da síntese ao qual se vão ligar três moléculas de ácido acético provenientes da via do ácido cinâmico, fechando-se num segundo anel que, após várias hidroxilações e reduções, forma um terceiro anel (Figura 8) (Carlo *et al*, 1999; Matkowski, 2008).



**Figura 8.** Estrutura base dos compostos fenólicos. **A** – Anel constituído das três moléculas de ácido acético provenientes da via do ácido cinâmico; **B** – Anel fenilpropano proveniente da via do ácido xiquímico; **C** – Anel formado após as hidroxilações e reduções.

Esta estrutura parece ser ideal para o sequestro dos radicais livres funcionando como quelante das reações responsáveis pela peroxidação lipídica que ocorre, por exemplo, nos alimentos (Ramadan, 2003). Têm alta reactividade na doação de electrões e radicais de hidrogénio, sendo considerados mais efectivos que as vitaminas (tocoferóis e ácido ascórbico) (Blokhina, 2003). Os flavonóides são o maior grupo dentro dos compostos fenólicos apresentando mais de 4000 estruturas, incluindo flavonas, isoflavonóides, flavanonas, catequinas e antocianidinas. Na formação destes compostos estão envolvidas reacções de hidroxilação, metilação dos grupos hidroxilo,

prenilação e glucosilação dos anéis A e B (Matkwocki, 2008). Todas estas modificações estruturais conferem-lhes distintas propriedades antioxidantes, podendo mesmo ter a capacidade de alterar a cinética da peroxidação lipídica através da modificação do empacotamento lipídico e da diminuição da flexibilidade da membrana, diminuindo a difusão dos radicais livres e restringindo as reacções de peroxidação (Blokhina, 2003). Podem comportar-se como antioxidantes e prooxidantes, actuando directamente sobre as ROS ou activando enzimas antioxidantes; inibem também algumas oxidases e funcionam como quelantes de metais (Procházková *et al*, 2011). Kong *et al* (2003) reportou que os pigmentos têm um papel vital na prevenção da peroxidação lipídica das membranas celulares, sendo esse o caso das antocianinas. As antocianinas são flavonóides, ou mais concretamente, são glucósidos de derivados polihidroxilados e polimetoxilados de sais flavílicos, querendo isto dizer que desde a estrutura base dos flavonóides até a formação de compostos antocianos ocorrem muitas reacções de modificação e ligação de radicais como se pode verificar na Figura 9. Dependendo dos radicais que se ligam à molécula, da posição e do número de aminoácido aromáticos ou alifáticos obtêm-se antocianinas distintas sendo conhecidas até à data mais de 400 estruturas antocianas, das quais a cianidina-3-glucósido é a mais abundante em todo o reino vegetal (Kong *et al*, 2003). São solúveis em solventes polares, sendo normalmente extraídas do material vegetal usando metanol com uma pequena quantidade de ácido clorídrico.

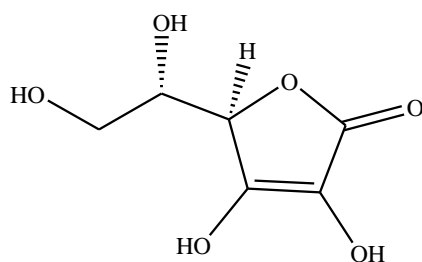


**Figura 9.** Estrutura das antocianinas. Existência de quatro sítios onde se podem ligar vários radicais,  $R_1=R_2=H$ , OH ou  $OCH_3$ ,  $R_3=$ glucosil ou H e  $R_4=OH$  ou glucosil, dando origem a diferentes compostos antocianos.

O método de Folin-Ciocalteu (FC) é um método de determinação dos fenóis totais, tendo sido adaptado do método de Folin-Denis pela adição do reagente sulfato de lítio que não permite a formação de precipitados que poderiam interferir com as

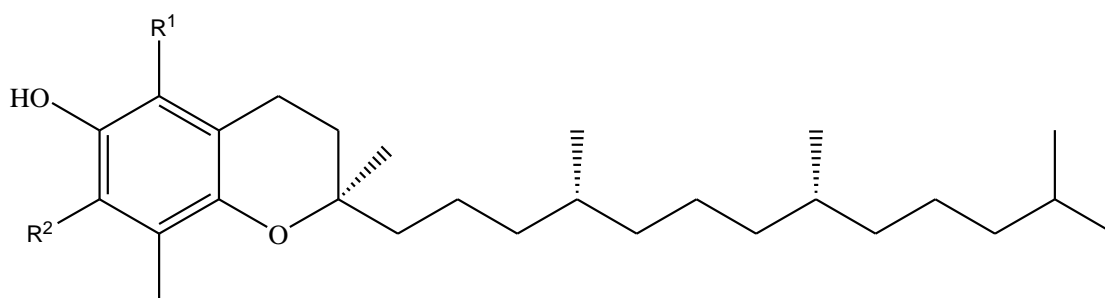
análises espectrofotométricas. Este método não é direcionado para um grupo específico de compostos fenólicos, determina mono- e polifenóis, quantificando a concentração total dos mesmos no extracto da planta em estudo (Schofield, 2001). Tungsténio e molibdénio são usados num meio aquoso altamente básico contendo 5-10% de carbonato de sódio, meio no qual os compostos fenólicos se oxidam muito facilmente e em consequência há uma maior formação de ROS, nomeadamente  $O_2^{\bullet-}$ . Este último reage com o molibdénio formando o cromóforo de óxido de molibdénio ( $MoO^{4+}$ ), que absorve a um comprimento de onda de 740 nm, sendo a concentração dos compostos proporcional ao valor de absorvância obtido; os resultados são normalmente expressos em equivalentes de ácido gálico, devido à inespecificidade da reacção (Roginsky & Lissi, 2005; Schofield, 2001). É um método sensível em comparação com outros métodos usados também para calcular a concentração dos compostos fenólicos; no entanto, compostos não fenólicos, como as proteínas, podem interferir na leitura da absorvância, tendo também um problema com a standartização da própria metodologia (Roginsky & Lissi, 2005). No entanto, nos dias de hoje são usados métodos cromatográficos como o HPLC, hifenizados a detectores DAD-ESI/MS entre outros para um melhor, mais detalhado e fiável conhecimento do perfil fenólico da planta em estudo.

As vitaminas são também compostos com um elevado potencial antioxidante. A vitamina C ou, mais commumente conhecida, ácido ascórbico (Figura 10), desempenha funções biológicas vitais, não sendo sintetizada pelos humanos e outros primatas devido a uma deficiência na enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase, que converte a L-gulonolactona em ácido ascórbico, sendo assim fundamental a sua ingestão através da alimentação. As suas principais funções no organismo são, ser cofactor de várias enzimas, sobretudo hidroxilases, e funcionar como antioxidante, sendo reconhecido como um dos mais estudados e poderosos antioxidantes (Blokhina, 2003). A capacidade de doar electrões numa grande variedade de reacções enzimáticas e não enzimáticas faz do ácido ascórbico um dos maiores desintoxicadores de ROS em fase aquosa, podendo sequestrar radicais superóxido, hidroxilo e singletos de oxigénio através da via peroxidase ascorbato e através da via de redução da vitamina E, prevenindo a peroxidação lipídica (Blokhina, 2003; Traber & Stevens, 2011).



**Figura 10.** Estrutura química do ácido L-ascórbico

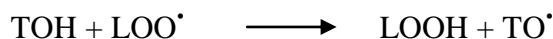
A vitamina E engloba uma família de compostos lipídicos denominados de tocoferóis (TOH) e tocotrienóis (Abidi, 2000). São componentes essenciais nas membranas biológicas podendo actuar como antioxidantes ou não. Em 1964, o investigador Pennock reportou a existência de quatro isómeros dos tocoferóis, sendo eles  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol, que estruturalmente possuem um grupo cromanol e uma cadeia lateral isoprénica (fítol) que confere um carácter anfipático a estes compostos (Figura 11).



**Figura 11.** Estrutura química dos tocoferóis;  $\alpha$ -tocoferol ( $R_1=R_2=CH_3$ ),  $\beta$ -tocoferol ( $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$ ),  $\gamma$ -tocoferol ( $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ) e  $\delta$ -tocoferol ( $R_1=R_2=H$ ).

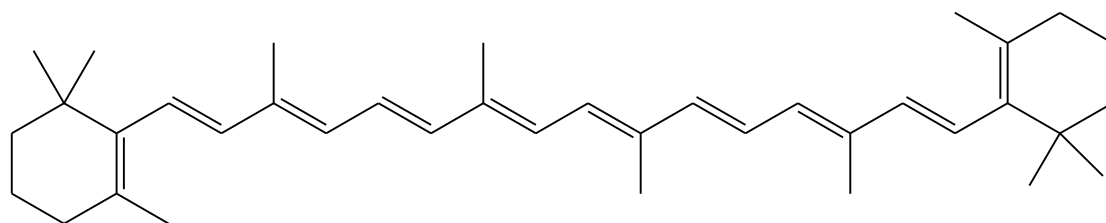
O  $\alpha$ -tocoferol é extremamente importante na nutrição humana para a prevenção dos sintomas da falta de vitamina E, apresentando uma maior actividade biológica e antioxidante que os restantes isómeros (Traber & Stevens, 2011). Os tocoferóis são sintetizados exclusivamente em organismos fotossintéticos, existindo em maior quantidade nos cloroplastos; no entanto, podem ser produzidos em todas as partes das plantas, incluindo nas sementes (Blokhina *et al*, 2003; Zing, 2007). O potencial antioxidante dos tocoferóis foi já descrito por muitos autores tendo sido Tappel e seus colaboradores os primeiros a descrever esse mesmo potencial. Os isómeros não apresentam o mesmo potencial antioxidante tendo o  $\alpha$ -tocoferol uma maior actividade sequestradora de radicais livres seguindo-se o  $\gamma$ -,  $\beta$ - e  $\delta$ -tocoferol em ordem

decrecente de potencial (Zing, 2007). A sua actividade baseia-se no facto de repararem directamente os radicais que oxidam, prevenindo a propagação da peroxidação lipídica. Reagem com os radicais  $LO^{\bullet}$ ,  $LOO^{\bullet}$  e  $L^{\bullet}$ , derivados da degradação autocatalítica provocada pelos ácidos gordos polinsaturados (PUFA), na interface membrana-água formando o radical estável tocoferoxilo ( $TO^{\bullet}$ ) que não reage com o oxigénio, podendo voltar à sua forma original pela via do ascorbato (Blokhina, 2003; Traber & Stevens, 2011).



As diferenças existentes entre os vários isómeros, em termos de potencial antioxidante, são devido ao facto de todos eles terem uma capacidade completamente diferente de doar radicais hidrogénio, devido aos substituintes presentes na sua estrutura. Um anel com grupos metilo parece ser mais eficiente o que faz do  $\alpha$ -tocoferol a mais potente de todas as isoformas. Sendo estes compostos antioxidantes lipídicos, a sua actividade depende também da sua solubilidade, localização e regeneração do radical  $TO^{\bullet}$  na via do ascorbato (Abidi, 2000; Traber & Atkinson, 2007).

Os carotenóides são, de uma maneira geral, tetraterpenos que apresentam nas extremidades anéis de 5 ou 6 carbonos (Rao & Agarwal, 1999). A sua concentração nos tecidos vegetais depende não só de factores genéticos mas também de factores ambientais como o cultivo da planta, o clima, a zona geográfica, as práticas agrícolas, as técnicas de colheita e a própria embalagem e armazenamento. Estes compostos têm como principal função antioxidante actuar contra os singletos de oxigénio, quelatando-os. (Rodriguez-Amaya, 2010; Tanaka *et al*, 2008). O licopeno ( $C_{40}H_{56}$ ) é um exemplo de carotenóide, sendo um composto lipofílico e hidrofóbico localizado entre as membranas celulares e outros compostos lipoproteicos, com um comprimento de absorção na zona do visível. Devido ao seu alto número de dienos conjugados, ficou comprovado através de inúmeros estudos, que o licopeno é um dos mais potentes quelantes de singletos de oxigénio entre os carotenóides naturais. Tem a capacidade de sequestrar radicais como o dióxido de azoto ( $NO_2^{\bullet}$ ), tiilo ( $RS^{\bullet}$ ) e sulfonilo ( $RSO_2^{\bullet}$ ) (Rao & Agarwal, 1999). O  $\beta$ -caroteno é outro carotenóide pertencente à classe dos terpenos. Apresenta uma estrutura poliisoprénica com uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas responsável pela sua reactividade química e propriedades de absorção de luz. Em cada extremidade da molécula apresenta um ciclo-hexeno substituído (Lehninger *et al*, 2008) (Figura 12).



**Figura 12.** Estrutura química do  $\beta$ -caroteno.

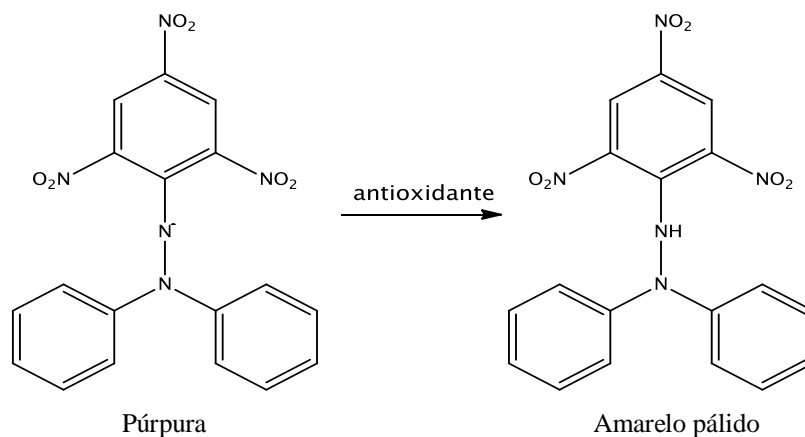
Os carotenóides funcionam como antioxidantes interrompendo reacções em cadeia em ambiente lipídico. A presença de várias ligações duplas torna os carotenóides suscetíveis ao ataque dos radicais peróxido ( $\text{LOO}\bullet$ ), originando produtos inactivos. Também já foram descritas interacções sinérgicas entre o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -tocoferol na inibição da peroxidação lipídica membranar (Chew, 1995). Salienta-se, ainda, o facto de os carotenóides parecerem exercer efeitos benéficos na prevenção de doenças nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose (Rao & Rao, 2007).

Por último, os açúcares e as clorofilas apresentam também alguma actividade antioxidante, apesar destas últimas não estarem presentes em muitos dos estudos sobre este tópico, provavelmente devido ao facto de a sua obtenção ser morosa e difícil em alguns tecidos. Sabe-se contudo que a actividade antioxidante das clorofilas deve-se à transferência de energia de um singlete-excitado de clorofila para uma molécula de oxigénio que viria a formar uma ROS, prevenindo a autooxidação dos vegetais pelo mecanismo de doação de radicais de hidrogénio (Lanfer-Marquez *et al.*, 2005). Quanto aos açúcares, as moléculas redutoras, exibem alguma actividade captadora de ROS, contudo os mecanismos envolvidos não estão completamente entendidos.

#### 1.4.3 Avaliação do potencial antioxidante

Existem inúmeras metodologias de avaliação do potencial antioxidante, e visto ser, maioritariamente, através da alimentação que se introduzem os compostos antioxidantes no organismo humano é essencial conhecer e dominar as técnicas que permitem avaliar a capacidade antioxidante de plantas. A avaliação da capacidade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um dos métodos mais usados em todo o mundo para avaliar o potencial antioxidante de uma espécie, isto devido ao facto deste radical apresentar algumas similaridades a nível estrutural com os radicais peróxido, sendo também um método simples, rápido e pouco dispendioso

(Kedare, 2011; Mishra, 2012). Foi desenvolvido por Marsden Bois em 1958, onde usou a cisteína como antioxidante modelo, tendo ao longo dos anos sofrido vários desenvolvimentos e melhorias no sentido de melhor adaptação a cada caso cinético (Bondet, 1997). É um radical estável devido ao electrão que se encontra desemparelhado se deslocar por toda a molécula não ocorrendo a dimerização, dando origem a uma cor violeta escura, com uma absorção a 520 nm numa solução de etanol, permitindo esta também uma melhor extracção dos compostos antioxidantes da amostra em estudo (Kedare, 2011). Este electrão desemparelhado é reduzido quando recebe um radical de hidrogénio de uma molécula dadora, segundo a equação (Figura 13):



**Figura 13.** Esquema de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

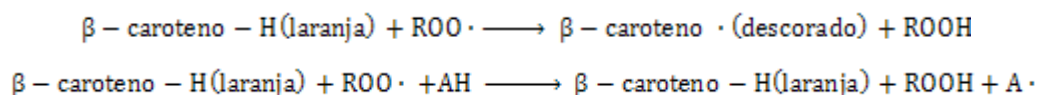
O DPPH reage com um antioxidante (RH) que ficará reduzido ( $R^{\bullet}$ ), mudando a cor da solução para um amarelo pálido (Milardóvic, 2006). Esta reacção permite perceber o que ocorre num sistema oxidante, quantificando antioxidantes em sistemas biológicos complexos, em forma líquida ou sólida, sendo estes antioxidantes hidrofílicos ou lipofílicos, e com uma actividade forte ou fraca (Kedare, 2011). Na década de 90, Brand-Williams e Bondet introduziram o parâmetro de  $EC_{50}$  (concentração eficiente) para interpretar os resultados obtidos por esta metodologia, sendo definido como a concentração de substrato que provoca a perda de 50% da actividade do DPPH, o que em termos biológicos significa que quanto maior a actividade antioxidante menor é o valor de  $EC_{50}$  (mais baixa a concentração da amostra), sendo o antioxidante Trolox um dos mais usuais para controlo e realização de rectas de calibração (Kedare, 2011; Milardóvic, 2006).

Outra metodologia implementada para a avaliação da actividade antioxidante, é o poder redutor que, por exemplo, os compostos fenólicos apresentam para reduzir a espécie  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Berker, 2007). Esta metodologia foi desenvolvida em 1982 por Liu para quantificar ácido ascórbico numa amostra de soro e plasma, no entanto ainda apresenta vários problemas a nível protocolar que obriga os investigadores a complementar esta metodologia com outras para avaliar a capacidade antioxidante da amostra em estudo (Moon & Shibamoto, 2009). Segundo Berker (2007), a quantificação dos compostos fenólicos por esta metodologia requer um ligando cromogénico associado ao composto  $\text{Fe}^{3+}$  que quando reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  produz uma resposta colorimétrica visível e quantificável. Ou seja, os compostos fenólicos ao actuarem sobre a molécula  $\text{Fe}^{3+}$ /complexo ferricianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ), coloração amarelada, obtêm a molécula  $\text{Fe}^{2+}/([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-})$  que apresenta uma intensa cor azul violeta (Persian Blue ou azul da Prússia) que pode ser quantificada a 700 nm. Os seus resultados são também quantificados em valores de  $\text{EC}_{50}$ , sendo também o Trolox usado como controlo.

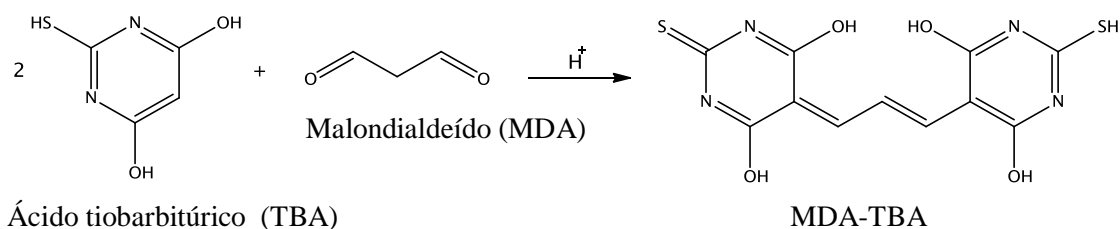
Ambos os métodos acima referidos são métodos indirectos da avaliação da actividade antioxidante de uma determinada amostra, uma vez que são usados radicais estáveis que simulam sistemas oxidáveis complexos. Por outro lado, os métodos directos usam estes mesmos sistemas medindo a capacidade inibitória de uma substância antioxidante quando em contacto com um substrato sujeito a condições de oxidação natural ou acelerada pelo próprio processo laboratorial (Laguerre, 2007). Estes substratos consistem, maioritariamente, em compostos lipídicos podendo também ser usadas proteínas, cromóforos, lipoproteínas e membranas biológicas. Estas metodologias directas assentam na teoria da peroxidação lipídica, sendo esta um processo metabólico natural que ocorre em condições de aerobiose sendo umas das consequências do “ataque” das ROS mais estudadas em todo o mundo (Blokina, 2003; Roginsky & Lissi, 2005).

Um dos ensaios realizados para avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra através da quantificação da inibição da peroxidação lipídica, é a inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno. Esta metodologia foi desenvolvida por Marco em 1968 tendo já sofrido alterações por vários autores, devido ao crescente interesse deste composto como antioxidante (Laguerre, 2007). Consiste na reação da molécula de  $\beta$ -caroteno com um lípido, ácido linoleico, que em presença de ROS forma um radical peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ). Este radical  $\text{LOO}\cdot$  vai-se ligar ao  $\beta$ -caroteno formando um radical

estável (LOO•/ $\beta$ -caroteno) reduzindo assim a quantidade deste último em solução. No entanto, se houver na amostra em estudo, um composto antioxidante este vai competir pelo radical LOO•, retardando a descoloração do  $\beta$ -caroteno que pode ser monitorizada a 470 nm (Moon & Shibamoto, 2009). A oxidação do ácido linoleico é conseguida somente com um tratamento térmico (50°C), sendo um método sensível e rápido, mas inespecífico podendo haver variabilidade nos resultados obtidos (Laguerre, 2007). O ensaio pode ser traduzido pelas seguintes equações:



Uma outra metodologia directa para avaliação da actividade antioxidante é o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), tendo sido desenvolvida na década de 40 (Laguerre, 2007). Consiste na reação de um produto secundário da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico formando um cromóforo avermelhado com uma absorvância a 532 nm (Figura 14). Este produto corado resulta da junção de duas moles de TBA com uma mole de MDA; no entanto, como o TBA reage com muitos compostos com o grupo carbonilo e o produto final absorve no mesmo comprimento de onda que o complexo TBA-MDA, os resultados desta metodologia são expressos em unidades de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico), (Moon & Shibamoto, 2011). É uma das metodologias mais usuais para avaliar o potencial antioxidante de vários produtos naturais (Moon & Shibamoto, 2011)



**Figura 14.** Formação do cromóforo avermelhado MDA-TBA através da reação de uma mole de malondialdeído (MDA) com duas moles de ácido tiobarbitúrico (TBA).

#### 1.4.4 Actividade e potencial antioxidante no coentro

Como já foi referido em parágrafos anteriores, o coentro foi já estudado pelas suas potencialidades aplicadas a várias áreas industriais, farmacêuticas e alimentares,

sendo a sua semente o objecto de muitos desses estudos. Na aplicação desta planta em termos de combate ao stresse oxidativo e potencial antioxidante ocorre o mesmo, tendo sido estudada a actividade antioxidante e combate à peroxidação lipídica das sementes de coentro por Wangensteen *et al* (2004) e Samojlik *et al* (2010). A actividade antioxidante da parte vegetativa do coentro foi também já estudada e caracterizada (Isabelle *et al*, 2010; Wangensteen *et al.*, 2004). Anilakumar *et al* (2001) estudou o efeito das sementes do coentro na prevenção da peroxidação lipídica induzida em fígado de rato, podendo representar um ponto de partida e comparação para a metodologia de TBARS. Em termos de compostos fenólicos, as partes aéreas e os óleos essenciais foram já caracterizados e identificados por Justesen & Knuthsen (2001), Melo *et al.*, 2005 e Nambiar *et al.*, 2010, e Ramadan *et al* (2003), respetivamente. O conteúdo em tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides foi também já estudado e devidamente caracterizado em sementes e na planta de coentro (Abidi, 2000; Daly *et al.*, 2010; Isabelle *et al*, 2010; Guerra *et al.*, 2005; Marero *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 2001). No entanto, não há nenhum estudo que compare as sementes e partes aéreas de coentro crescidas em ambiente natural, com culturas *in vitro*, podendo esta técnica apresentar um grande potencial para obtenção de compostos com grande interesse no combate à peroxidação lípida e outros processos relacionados com o stresse oxidativo, em ambiente controlado e livre de pressões externas, bióticas e abióticas.

### 1.5 Marcadores Genéticos

No último capítulo será abordada a temática do uso dos marcadores moleculares na diferenciação de várias espécies, aplicada principalmente às plantas aromáticas, como é o caso do coentro. Os métodos moleculares têm vindo a ganhar nas últimas décadas uma importância não só académica, mas também económica e ecológica, revolucionando a biotecnologia vegetal e os estudos evolutivos e taxonómicos das espécies (Kumar *et al*, 2009; Triest, 2008). São a base dos estudos genéticos em várias culturas vegetais, revelando poliformismos ao nível do DNA. Estas metodologias evoluíram muito sendo cada vez mais precisas e rápidas, obtendo-se o resultado final relativamente fácil, não podendo no entanto ser aplicadas em algumas áreas, pois para cada tipo de estudo é exigido um protocolo diferente adaptado às necessidades do mesmo (Kumar *et al*, 2009). Os marcadores genéticos podem ser divididos em duas classes distintas: marcadores morfológicos e marcadores moleculares. Os primeiros

baseiam-se nas características fenóticas, o que a nível molecular significa o estudo de apenas um *loci* do genoma da espécie em estudo, não necessitando de técnicas moleculares e bioquímicas que complementem a sua acção, no entanto são limitados em número e pelo facto de serem alterados por interações epistáticas e pleiotrópicas (Trindade, 2010). Por outro lado os marcadores genéticos, usados no presente estudo, ultrapassam todas estas limitações sendo os marcadores de eleição usados por muitos investigadores, visto o poliformismo ser mais facilmente detectado a nível molecular que a um nível fenotípico. Um poliformismo genético é definido como sendo uma ocorrência simultânea de um traço numa mesma população com dois genótipos distintos (Kumar *et al*, 2009). Estes marcadores moleculares são sequências de DNA facilmente detectáveis e cuja herança pode ser facilmente monitorizada, isolando apenas um gene, não sendo afectados por pressões externas, como o meio ambiente e interacções pleiotrópicas o que permite estudar um número ilimitado de marcadores numa única população (Kumar *et al*, 2009; Trindade, 2010). Um bom marcador molecular deve ter como características principais elevado polimorfismo, capacidade de distinção entre indivíduos homo e heterozigóticos, ter grande frequência e distribuição no genoma, facilidade de detecção, ser económico e apresentar alta reprodutibilidade, entre outros. Não se verifica até ao presente a complementação num só marcador de todas estas características (Kumar *et al*, 2009). Os marcadores moleculares têm vindo a ser aplicados em técnicas de *fingerprinting*, construção de mapas genéticos de *linkage*, análise de filogenia, fluxo genético, análise de híbridos ou clones e análise genética de populações (Bussell *et al*, 2005).

A metodologia de PCR inventada por Kary Mullis em 1983 baseia-se numa reacção de replicação enzimática levada a cabo pela enzima DNA polimerase, que permite a replicação de uma cadeia simples de DNA obtendo múltiplas cópias da mesma (Semagn *et al*, 2006). Permitiu o desenvolvimento de outras técnicas baseadas nesta mesma metodologia, com uso de marcadores moleculares como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Agarwal *et al*, 2008). Na Tabela 2 estão descritas as características deste tipo de marcadores, suas vantagens e desvantagens, estando também descrita outra classe de marcadores, as isoenzimas e os RFLP (*Restriction fragment-length polymorphisms* - marcadores baseados em técnicas de hibridização).

**Tabela 2.** Descrição e comparação entre os principais marcadores moleculares, suas vantagens e desvantagens.

Marcadores moleculares	Caraterísticas principais	Vantagens	Desvantagens	Referências
<b>RFLP's</b>	-Digestão enzimática por várias endonucleases, criando fragmentos distintos de DNA; -Poliformismos (inserção e deleção de apenas um nucleótido) detectados pela hibridização com DNA marcado;	-Bastante polimórficos; -Marcador co-dominante; -Reprodutibilidade elevada;	-Metodologia complexa, demorada e de difícil execução; -Implica trabalhar com compostos radioactivos e tóxicos; -Requer grandes quantidades de material genómico;	-Agarwal <i>et al</i> , 2008.
<b>RAPD's</b>	-Amplificação diferencial do genoma usando sequências de oligonucleótidos pequenas (10pb);	- Não é necessário o conhecimento <i>a priori</i> do genoma a analisar;	- Não distingue entre indivíduos homo e heterzigóticos; -Os resultados dependem inteiramente das condições de PCR, o que pode originar diferentes resultados entre grupos de trabalho.	-Agarwal <i>et al</i> , 2008; -Trindade, 2010.
<b>AFLP's</b>	-Amplificação de fragmentos resultantes de digestão enzimática; -Por sequenciação detectam-se os polimorfismos existentes na cadeia nucleotídica modificando o sítio de ligação dos <i>primers</i> .	- Metodologia fácil e rigorosa devido ao uso de <i>primers</i> longo com melhor ancoragem e maisaltas T's de emparelhamento; - Elevado nº de poliformismos detectados;	-Não reconhecimento entre indivíduos di- e poliplóides, originando fragmentos não espectados; -A interpretação dos dados pode ser errónea; -Custos iniciais elevados;	-Bussel <i>et al</i> , 2005.
<b>SSR's</b>	-Repetições de mono-, di-, tri-, tetra ou pentanucleótidos em genomas de organismos eucarióticos;	-Marcador co-dominante; -Distuição alta e aleatória no genoma; -Alta reprodutibilidade; -Requer baixas concentrações de DNA; -Baixos custos.	-Ocorrência de mutações resultantes do emparelhamento dos <i>primers</i> ; -Presença de artefactos provenientes de más reacções de PCR.	-Kumar <i>et al</i> , 2009; -Kalia <i>et al</i> , 2011.
<b>SNP's</b>	-Variações de um único nucleótido, maioritariamente, em regiões não-codificantes do genoma; -Resultado de uma modificação de um aa, alterando o fenótipo.	-Altos rendimentos em metodologias de genotipagem; -Automatização fácil do método usado; -Construção de mapas genéticos de alta-densidade.	-Custos elevados;	-Agarwal <i>et al</i> , 2008:
<b>Isoenzimas</b>	-Múltiplas formas moleculares de uma enzima,tendo as mesmas propriedades enzimáticas; -Diferem na composição de aa, levando a alterações na sua carga e estrutura, podendo ser detectados variações alélicas devido às migrações distintas deste tipo de enzimas por electroforese.	-Marcador co-dominante (diferenciação entre indivíduos homo- e heterozigóticos); -Metodologia fácil e rápida; - Baixos custos.	- Abundância baixa e baixos níveis de poliformismo; -Podem sofrer alterações nos processos pós-transcricionais; -As condições ambientais podem também exercer um efeito negativo sobre as mesmas.	-Trindade, 2010; -Kumar <i>et al</i> , 2009.

### 1.5.1 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

No presente trabalho foram usados os ISSR, tendo sido descritos inicialmente por Zietkiewicz (1994) no seu trabalho “*Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification*”, onde explica não só o fundamento da técnica mas também a importância que estes marcadores poderiam vir a ter em vários estudos genéticos, como se veio a comprovar ao longo dos anos após

publicação do mesmo (Bussel *et al*, 2005). É uma técnica baseada em PCR, no qual há a amplificação de um segmento de DNA entre duas regiões idênticas de microssatélites (SSR), orientadas em sentido oposto (Reddy *et al*, 2002). Os microssatélites, SSR, são utilizados como *primers* e consistem em repetições pequenas de conjuntos de nucleótidos (1- 4), não ultrapassando as 16 a 25pb (pares de bases), podendo ser di-, tri-, tetra- ou pentanucleótidos. Este tamanho dos *primers* confere alta reprodutibilidade à reacção, com a possibilidade subsequente do uso de temperatura de emparelhamento mais altas (45°C a 60 °C) levando a um maior rigor nos resultados obtidos. Surgem para superar limitações de outras técnicas, tais como os marcadores RAPD, AFLP e SSR's, pois têm baixa reprodutibilidade (RAPD), altos custos (AFLP) ou a zona flanqueada é desconhecida (SSR). Por outro lado os ISSR combinam muitas vantagens dos anteriores, sendo a alta reprodutibilidade um dos mais importantes (até 99%) (Reddy *et al*, 2002; Trindade, 2010). Têm vindo a ser aplicados em diversas áreas de investigação, como na área da diversidade genética, estudos filogenéticos, mapas genéticos, biologia evolutiva e melhoramento de espécies e cultivares. Podem ser *primers* não ancorados, ou mais usualmente *primers* ancorados em 3' ou 5' (tendo estes de 1 a 4 bases degeneradas na zona final das regiões flanqueadas) o que leva à amplificação de produtos muito distintos. Os não ancorados, como emparelham de forma aleatória no DNA podem levar à formação de *smear* (bandas inespecíficas no géis de electroforese). Os *primers* ancorados em 3' e 5' emparelham em zonas específicas do DNA levando à formação de bandas largas e de fácil visualização em electroforese (com ou sem o uso de brometo de etídio), ou mesmo em géis de poliacrilamida, ou detecção por fluorescência em detectores automáticos (Bussel *et al*, 2005). Seguindo as regras da hereditariedade Mendeliana, os ISSR são marcadores dominantes, nalguns casos conseguindo ter alguma co-dominância, distinguindo indivíduos homo e heterozigóticos (Reddy *et al*, 2002).

Sendo um método simples, rápido e eficiente, a síntese dos *primers* pode ser efectuada por qualquer investigador, tendo a possibilidade de modificar o comprimento e o sítio de ancoragem do *primer*. Os produtos resultantes desta amplificação têm entre 200 a 2000 pb de tamanho, podendo a variabilidade e poliformismo deste tipo de marcadores ser explicado pela conjugação de vários factores inerentes à própria técnica como a pureza do DNA molde, o tipo de *primer* usado (ancorado ou não) e ainda o método de visualização e resolução dos resultados (Reddy *et al*, 2002; Bussel *et al*, 2005). Apresenta também, assim como as restantes metodologias, várias limitações

como a amplificação de regiões não-homólogas distorcendo as estimativas de similaridade genética entre indivíduos, podendo também ocorrer emparelhamento entre *primers* o que interferirá com a reacção da polimerase (reduzindo o seu rendimento). Uma das grandes vantagens dos ISSR em termos de perspectivas futuras é o facto de assegurarem um melhor conhecimento das variedades de plantas pela sua eficiência elevada na distinção de germoplasma muito semelhante, devido ao uso dos microssatélites que estão ligados a regiões codificantes e por isso regiões ricas em informação para os investigadores e académicos desta área de estudos (Reddy *et al*, 2002).

#### 1.5.2 Marcadores moleculares no coentro

Segundo Trindade (2010), as características morfológicas micro e macroscópicas eram a base da análise sistemática e filogenética das plantas aromáticas, sendo reconhecida na actualidade a importância da quimiotaxonomia apesar de todas as variáveis inerentes à produção de compostos secundários pelas plantas. As técnicas moleculares vieram contribuir, juntamente com a quimiotaxonomia, para um melhor entendimento das relações filogenéticas inter e intra-específicas. As maiores famílias de plantas aromáticas estudadas relacionando quimiotaxonomia e marcadores moleculares são as Lamiaceae, Cupressaceae, Asteraceae e Apiaceae (da qual faz parte o coentro). Têm sido muitos os estudos publicados com uso a marcadores moleculares em áreas tão distintas como o estudo da biogeografia dos mangueirais (Triest, 2008) até a estudo da diversidade genética em populações de plantas invasoras (Ward & Jasieniuk, 2009) e em populações de árvores de floresta com grande importância económica de conservação e exploração (Jump & Peñuelas, 2007). Na família Apiaceae existem inúmeros estudos com marcadores moleculares, tendo sido publicado por Gaudel *et al* (2004) a diversidade genética existente entre indivíduos da espécie *Erygium alpinum* L. (Apiaceae) comparando resultados entre os marcadores AFLP e microssatélites. Foram também já usados os microssatélites para o desenho de mapas genéticos e análise da diversidade genética e distribuição genómica em populações de cenouras (Apiaceae) (Cavagnaro *et al*, 2011). Os marcadores moleculares ISSR foram já usados por Fu *Cet al* (2004) para aferir a variabilidade genética da espécie endémica da China *Changium smyrnioides* (Apiaceae), e por Mendes *et al* (2009) no estudo da variabilidade genética da espécie endémica do arquipélago dos Açores, *Chaerophyllum azoricum*, no estudo da

caracterização molecular de duas espécies endémicas portuguesas da família das Apiaceae, *Angelica lignescences* e *Melanoselinum decipiens* (Mendes *et al*, 2009). Mais recentemente, Mendes *et al* (2011) descreveram a caracterização molecular com o uso a ISSR de *Pittosporum undulatum*.

A informação existente na actualidade sobre o coentro com recurso a marcadores moleculares é muito escassa, havendo ainda menos estudos sobre a variabilidade genética de coentro cultivado *in vitro*. Como já foi dito nos itens anteriores, Diederichsen (1996) ao serviço do Instituto internacional dos recursos fitogenéticos fez um estudo bastante amplo sobre todas as características do coentro, incluindo a diversidade genética, baseando-se principalmente em características fenotípicas, que não podem ser comparadas com os resultados obtidos através de metodologias usando marcadores moleculares. Um trabalho semelhante a Diederichsen foi realizado por Bhandary & Gupta (1991). López *et al* (2008) caracterizaram a diversidade genética no coentro em termos fenotípicos, bioquímicos e moleculares, onde usaram várias amostras de plantas provenientes de vários países (Afeganistão, Canadá, entre outros) e estudaram a variação molecular usando 80 marcadores AFLP; obtiveram um dendograma representativo das relações filogenéticas das amostras de coentro usadas.

## 1.6 Objectivos

O presente trabalho teve como principais objectivos:

- Colocar em cultura e otimizar o meio de crescimento *in vitro* para a espécie *Coriandrum sativum*;
- Seleccionar diferentes linhas, da população crescida *in vitro*, com base no seu fenótipo, após o período de tempo em cultura;
- Caracterizar os compostos terpénicos presentes nos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação, em sementes de coentro, amostras obtidas *in vivo* (partes aéreas – folhas e caules) e amostras obtidas *in vitro* (linhas seleccionadas previamente);
- Avaliar a actividade antioxidante dos extractos não terpénicos por métodos químicos e bioquímicos, em sementes de coentro, e amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*;
- Caracterizar compostos antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e clorofilas) e hidrofílicos (compostos fenólicos e açúcares) presentes nas amostras de *Coriandrum sativum*;
- Determinar, utilizando os marcadores moleculares ISSR (*Inter sequence simple repeat*), eventuais variações genéticas presentes nas amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*.

A caracterização dos compostos terpénicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O potencial antioxidante das amostras em estudo foi avaliado por quatro métodos distintos: actividade captadora de radicais DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica. Os tocoferóis foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fluorescência. Os açúcares foram avaliados também por HPLC acoplada a um detector de índice de refração (RID). Os ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas foram analisados e quantificados por HPLC-DAD-ESI/MS. As variações genéticas presentes nas amostras foram determinadas usando uma matriz binária gerada pelo coeficiente de Dice.

# **M**aterial e **M**étodos



## 2. Material e Métodos

### 2.1 Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados na cultura *in vitro* foram obtidos em diferentes casas comerciais: solução de hipoclorito de sódio (lixívia) sem detergente (), Tween 80 (Merck), sacarose (Fisher Scientific, RU), IBA (Merck, Alemanha) e BAP (Fluka chemic, Suíça). Os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8% eram de grau HPLC e foram obtidos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). Os padrões ácido ascórbico, tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) açúcares (D(-)-frutose, D(+)-glucose anidra, D(+)-rafinose penta-hidratada, D(+)-sacarose, D(+)-trealose), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ácido clorogénico, quercetina e malvidina 3-glucósido foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO). O tocol racémico, 50 mg/ml, foi adquirido na Matreya (Chalfont, PA). O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Na cromatografia gasosa e espectrometria de massa foram usados ar (Alphagaz 1 B50), azoto (Alphagaz 1 B50), pentano (Riedle P.A.), hidrogénio (Alphagaz 1 B50) e hélio (Alphagaz 1 B50). Clorofórmio (Chemlab, Analyt), álcool isoamílico (Merck, p.a.) e  $\beta$ -mercaptoetanol (CalBiochem, grau Biologia Molecular), foram usados para a extracção de DNA. A água bi-distilada foi tratada num sistema de purificação Water Pro (Labconco). A água ultra-pura, usada no isolamento dos voláteis e no estudo da actividade antioxidante, foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (Pure Water Systems, Brea, CA).

### 2.2 Cultura *in vitro*

#### 2.2.1 Esterilização das sementes e inoculação

Sementes de coentro, provenientes de um lote comercial, foram esterilizadas numa solução de hipoclorito de sódio contendo Tween 20 numa razão de 2 gotas para 10 ml de hipoclorito de sódio, e agitadas durante 10 min. Depois de filtradas e lavadas com água destilada estéril, as sementes foram tratadas com uma solução de Etanol (70%) durante 5 min sendo novamente lavadas com água destilada estéril, e secas sobre um papel de filtro estéril. As sementes foram então inoculadas em meio de germinação

básico com 0,9% de ágar e água da torneira, onde metade das sementes foram colocadas no escuro e as restantes expostas à luz durante uma semana, tendo-se procedido ao cálculo da taxa de germinação e viabilidade das sementes.

### 2.2.2 Condições de cultura *in vitro*

As plântulas crescidas após germinação das sementes foram transferidas para meio modificado de Murashige & Skoog (MS) (1962) (Anexo A1) com metade dos micronutrientes, 2% de sacarose, 0,1mg/l IBA (ácido indolbutírico) e 0,1mg/l BAP (benzilaminopurina). O pH do meio MS foi ajustado para 5,5 antes de autoclavagem, sendo que as repicagens ocorreram numa câmara de fluxo laminar horizontal (Hareus, HERAGuard). As condições de crescimento na sala de cultura, onde o material inoculado foi colocado foram: Temperatura mínima (T<sub>min</sub>) de [16-19]°C, Temperatura máxima (T<sub>máx</sub>) [23-26]°C, fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro) fornecido por lâmpadas Silvana day light (Phillips).

Decorridas cinco semanas, os rebentos foram separados e inoculados em meio MS completo (Anexo A1) com 0,1mg/l IBA e 0,1mg/l BAP, pH 5,5. Foram mantidos sobre as mesmas condições de cultura referidas acima e a cada quatro semanas houve nova subcultura, retirando as folhas e caules para estudos posteriores, sendo pesadas, armazenadas e congeladas a -20 °C.

### 2.2.3 Diferenciação das linhas e taxa de crescimento

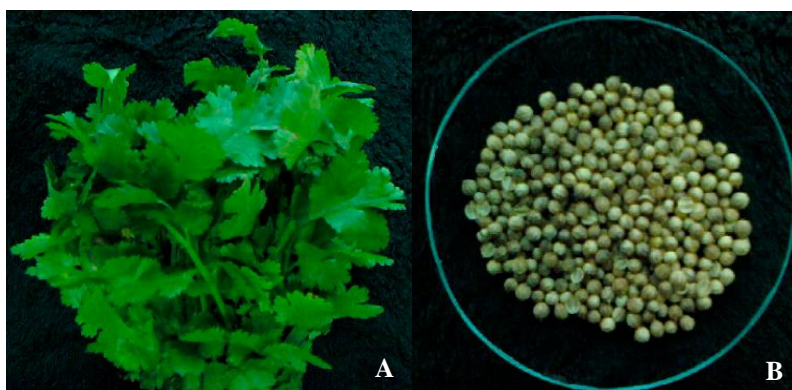
Após seis semanas em cultura, diferenciaram-se duas linhas em relação à sua pigmentação nas folhas e caules. A linha A mostrava uma notória pigmentação arroxeadada, por outro lado a linha B mostrava as folhas e caules verdes. À medida que estas linhas mostraram estabilidade fenotípica, iniciaram-se os ensaios de avaliação da taxa de crescimento das mesmas. Durante quatro semanas a massa fresca (fw) e massa seca (dw) foram registadas. A massa seca foi avaliada após 36h a 60°C (Estufa Memmert).

O número de meristemas por planta em cada subcultura foi também registado, para determinar a taxa de multiplicação de cada linha. A Taxa Relativa de Crescimento (RGR) (Coelho, 1999) foi calculada a partir da seguinte equação:  $[(1/dw_1) \times (dw_f - dw_1)/n^\circ \text{ dias de crescimento}]$ , sendo  $dw_1$  = massa seca na 1ª semana e  $dw_f$  = massa seca na 4ª semana.

## 2.3 Estudo dos voláteis

### 2.3.1 Isolamento dos voláteis

Os voláteis foram extraídos a partir de amostras obtidas *in vivo* (partes aéreas e sementes, Figura 15) e amostras obtidas *in vitro* (Linha A e Linha B). A metodologia de extracção foi através de hidrodestilação por 3h usando um equipamento do tipo Clevenger de acordo com o método da Farmacopeia Europeia (Council of Europe, (2007). O isolamento procedeu-se a uma velocidade relativa de destilação de 3ml/min. As fracções voláteis foram armazenadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ao escuro, para posterior análise.



**Figura 15.** Plantas *in vivo* de *Coriandrum sativum*. **A** – Partes aéreas; **B** - Sementes.

### 2.3.2 Cromatografia Gasosa

Os voláteis isolados foram analisados usando um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL (Perkin Elmer, Shelton, CT) equipado com dois detectores de chama (FID), sistema de tratamento dos dados e um injector de vaporização no qual foram instaladas duas colunas de diferente polaridade:

- DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada em metilsilicone ( $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$  d.i. espessura de filme  $0,25\text{ }\mu\text{m}$ ; J & W Scientific Inc.);

- DB-17HT de fase imobilizada em fenilmetilsilicone ( $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$  d.i., espessura de filme de  $0,15\text{ }\mu\text{m}$ ; J & W Scientific Inc.).

A temperatura do forno foi programada de  $45^{\circ}\text{C}$  a  $175^{\circ}\text{C}$ , com incrementos de  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e subsequentemente a  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $300^{\circ}\text{C}$ . Atingidos os  $300^{\circ}\text{C}$  a temperatura foi mantida durante 10 min. As temperaturas do injector e dos detectores foram programadas para  $280^{\circ}\text{C}$  e  $300^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Foram injectados volumes de

amostras na ordem dos 0.1 µl. O hidrogénio foi utilizado como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s e utilizada uma relação de repartição de fluxo 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

### 2.3.3 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa

Nas análises de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC-MS) utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um espectrómetro de massa Perkin Elmer Turbomass (versão do software 4.1). A temperatura do forno foi programada como descrito na secção anterior. O injektor foi programado para uma temperatura de 300°C, a linha de transferência para 280°C e a câmara de ionização para os 220°C. Foi utilizado o hélio como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s. As amostras foram injectadas com uma repartição de fluxo de 1:40, foi utilizada uma energia de ionização de 70 eV, a corrente de ionização de 60 µA e uma gama de massas, 40-300 u. O tempo de varrimento foi de 1 s, sendo injectados volumes da ordem de 0,1 µl. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, relativos ao C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub> *n*-alcanos, e espectros de massa, com os padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

## 2.4 Potencial antioxidante

### 2.4.1 Material vegetal e sua preparação

Para a análise dos antioxidantes lipofílicos, hidrofílicos e avaliação da actividade antioxidante utilizaram-se partes aéreas (folhas e caules) e sementes de coentro obtidas *in vivo* (Figura 15), e amostras de partes aéreas obtidas por cultura *in vitro* (Linha A e Linha B). Todas as amostras foram liofilizadas e reduzidas a pó (~20 mesh), antes das análises.

## 2.4.2 Antioxidantes lipofílicos

### 2.4.2.1 Tocoferóis

O conteúdo em tocoferóis foi determinado a partir de uma metodologia implementada no laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Guimarães *et al*, 2010), usando tocol como padrão interno. Uma solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em *n*-hexano (10 mg/ml; 100 µl) e de padrão interno (PI) também em *n*-hexano (tocol; 2,0 µg/ml; 250 µl) foram adicionados às amostras a analisar antes da extração. As amostras (500 mg) foram homogeneizadas com 4 ml de metanol num vórtex durante 1 min. De seguida, adicionaram-se 4 ml de *n*-hexano e voltou-se a homogeneizar no vórtex (1 min). Foram adicionados 2 ml de uma solução aquosa concentrada de NaCl e levou-se mais 1 min ao vórtex. Centrifugou-se a mistura durante 5 min a 4000g e aproveitou-se o sobrenadante. As amostras foram re-extraídas duas vezes com *n*-hexano. Os extractos combinados foram secos numa corrente de azoto, redissolvidos em 2 ml de *n*-hexano e desidratados com sulfato de sódio anidro. Após filtração por um filtro de 0,22 µm, os extractos foram injectados e analisados. O sistema de HPLC utilizado consistiu num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer, Berlim, Alemanha), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático AS-2057 e um detector UV a 295 nm (Knauer) ligado em série a um detector de fluorescência FP-2020 (Jasco, Easton, Maryland, EUA) programado para comprimentos de onda de excitação de 290 nm e emissão de 330 nm. Os resultados obtidos foram analisados recorrendo ao “software” Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi feita numa coluna de poliamida II (250 × 4,6 mm) de fase normal (YMC Water, Dinslaken, Alemanha) a operar a 30°C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada constituiu uma mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com fluxo de 1 ml/min e o volume de injeção foi de 20 µl. Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões comerciais. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, utilizando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi expressa em mg por 100 g de massa seca (dw).

### 2.4.2.2 Carotenóides e clorofilas

β-Caroteno, licopeno, clorofilas a e b foram determinadas segundo o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Martins *et al*, 2011), medindo a absorvância a 453, 505, 645 e 663 nm

(espectrofotómetro AnalytikJena, Jena, Alemanha). A 500 mg de amostra liofilizada adicionaram-se 10 ml de acetona/hexano (4:6 v/v) agitando-se no vortex (1 min). Filtrou-se através de papel de filtro e mediu-se a absorvância. A quantificação foi feita de acordo com as seguintes equações:  $\beta$ -caroteno (mg/100 ml) =  $0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$ ; Licopeno (mg/100 ml) =  $-0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$ ; Clorofila a (mg/100 ml) =  $0.999 \times A_{663} - 0.0989 \times A_{645}$ ; Clorofila b (mg/100 ml) =  $-0.328 \times A_{663} + 1.77 \times A_{645}$ , e posteriormente expressos em mg por 100 g de massa seca.

### 2.4.3 Antioxidantes hidrofílicos

#### 2.4.3.1 Açúcares

O conteúdo em açúcares livres foi determinado por HPLC acoplado a um detector de índice de refração (RID), de acordo com o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Guimarães *et al*, 2010), utilizando melezitose como padrão interno (PI, 25 mg/ml). A amostra liofilizada (1 g) foi enriquecida com o PI e extraída com 40 ml de etanol a 80% durante 1h30min a 80 °C. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion K240R-2003) a 15.000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado sob pressão reduzida; os vestígios de lípidos foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 ml de éter etílico. Após a concentração a 40°C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 ml.

Os açúcares foram determinados por HPLC num sistema integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um RID (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando Clarity 2.4 Software (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971 R). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 ml/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

#### 2.4.3.2 Ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico foi realizada utilizando o método implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Martins *et al*, 2011),

com 2,6-dicloroindofenol, medindo-se a absorvância a 515 nm. A extracção foi feita com ácido metafosfórico a 1%, tendo-se adicionado 10 ml do mesmo a 500 mg de amostra liofilizada. A mistura permaneceu sob agitação magnética (45 min) à temperatura ambiente e foi, por fim, filtrada usando filtros Whatman n.º 4. A 0.5 ml de filtrado foram adicionados 4,5 ml de 2,6-dicloroindofenol, agitou-se no vórtex e deixou-se repousar (15 min) para posteriormente, ler a absorvância no espectrofotómetro acima referido. A concentração de ácido ascórbico foi calculada com base na curva de calibração de ácido L-ascórbico ( $6 \times 10^{-3}$ -0.1 mg/ml), e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de massa seca.

#### 2.4.3.3 Grupos de compostos fenólicos

A extracção da amostra liofilizada (~1 g) foi feita com metanol (50 ml) a 25°C, sob agitação magnética a 150 rpm durante 1 hora sendo posteriormente filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 4. Os resíduos foram re-extraídos com um volume adicional de 50 ml de metanol e filtrou-se novamente. Os extractos metanólicos foram levados à secura num evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) a pressão reduzida, re-dissolvidos em metanol numa concentração de 40 mg/ml, utilizada posteriormente para preparar soluções do extracto em diferentes concentrações. Todas as soluções foram armazenadas a 4°C até à análise dos grupos compostos fenólicos e avaliação da actividade antioxidante.

Para o cálculo das concentrações dos grupos de compostos fenólicos existentes, misturou-se a solução de extracto 0,625 mg/ml (250 µl) com HCl 0,1% em etanol 95% (250µl) e HCl 2% (4425 µl). Após 15 min, a absorvância foi medida a 280, 320, 360 e 520 nm. As absorvâncias obtidas a estes quatro comprimentos de onda diferentes foram utilizadas para estimar, respectivamente, o teor de fenóis totais, flavonóis e antocianinas (Abidi, 2000). Para a construção das rectas de calibração utilizou-se ácido clorogénico (0,2-3,2 mM) sendo os resultados dos fenóis expressos em mg equivalentes de ácido clorogénico (CAE) por grama de extracto, quercetina (0,2-3,2 mM) sendo os resultados dos flavonóis expressos em mg equivalentes de quercetina (QE) por grama de extracto, malvidina 3-glucósido (0,1-2,3 mM) sendo os resultados de antocianinas expressos em mg equivalentes de malvidina 3-glicósido (ME) por grama de extracto.

#### 2.4.4 Ensaios de avaliação da actividade antioxidante

##### 2.4.4.1 Actividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

Esta metodologia foi realizada recorrendo a um Leitor de Microplacas ELX800 (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT). A mistura de reacção usada consistia em 30 µl de cada uma das soluções do extracto (0,125-1 mg/ml) e uma solução metanólica (80:20 v/v, 270µl) contendo radicais DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l). A mistura foi mantida no escuro durante 60 min. A redução do radical DPPH foi determinada medindo a absorvância a 515 nm. O efeito captador de radicais livres (RSA) foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH usando a seguinte equação: % RSA =  $[(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$ , onde  $A_S$  é a absorvância da mistura quando a amostra de extracto foi adicionada e  $A_{DPPH}$  é a absorvância da solução de DPPH.

A concentração de extracto que fornece 50% de RSA foi calculada a partir do gráfico da percentagem de RSA em função da concentração de extracto. O composto usado como padrão foi o Trolox.

##### 2.4.4.2 Poder redutor

Esta metodologia foi realizada usando o Leitor de Microplacas descrito acima. Misturou-se cada uma das diferentes soluções de extracto (0,3125-10 mg/ml) (0,5ml) com tampão de fosfato de sódio (200 mmol/l, pH 6,6, 0,5 ml) e ferricianeto de potássio (1% m/v, 0,5ml). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 min, após os quais se adicionou ácido tricloroacético (10% m/v, 0,5 ml). Um volume de 0,8 ml da mistura foi então colocado nos poços da microplaca, juntamente com 0,8 ml de água desionizada e 0,16 ml de cloreto de ferro (0,1% m/v). A absorvância foi medida a 690 nm.

A concentração de extracto que fornece 0,5 de absorvância ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico da absorvância a 690nm em função da concentração de extracto. O composto usado como padrão foi o Trolox.

##### 2.4.4.3 Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno

Preparou-se uma solução de  $\beta$ -caroteno dissolvendo 2 mg deste composto em 100 ml de clorofórmio. Pipetaram-se 2 ml desta solução para um balão de fundo redondo e procedeu-se à remoção do clorofórmio a pressão reduzida. Posteriormente, foram adicionados 40 mg de ácido linoleico, 400 mg do emulsificador Tween 80 e 100

ml de água destilada, agitando-se vigorosamente. Desta emulsão, foram transferidas alíquotas de 4,8 ml para tubos de ensaio contendo 0,2 ml de extracto em diferentes concentrações (0,3125-10 mg/ml). Imediatamente após esta adição, a absorvância da mistura foi determinada a 470 nm, de modo a obter a medição do tempo inicial ( $T_0$ ). De seguida, os tubos de ensaio foram colocados sob agitação num banho a 50°C durante 2h, após as quais foram novamente medidos os valores de absorvância ao mesmo comprimento de onda. A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:  $[(Abs_{470} \text{ após } 2h / Abs_{470} \text{ inicial}) \times 100]$ . A concentração de extracto que providenciou uma actividade antioxidante de 50% ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico da % da inibição de descoloração do  $\beta$ -caroteno em função da concentração de extracto, sendo o Trolox usado como padrão.

#### 2.4.4.4 Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS (espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico)

Neste método de determinação da inibição da peroxidação lipídica foi utilizado tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*). O tecido foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v). A mistura foi agitada e centrifugada a 3000g durante 10 min. Adicionou-se a cada uma das diferentes soluções de extracto (0,3125-10 mg/ml; 200  $\mu$ l), ácido ascórbico (100  $\mu$ l), sulfato de ferro (100  $\mu$ l) e sobrenadante do homogeneizado cerebral (100  $\mu$ l), e incubou-se durante 1 hora a 37,5°C. Adicionou-se então, ácido tricloroacético (28% w/v; 500 $\mu$ l) com o objectivo de interromper a reacção, e TBA (2%, w/v; 380  $\mu$ l), colocando-se novamente a incubar a 80°C durante 20 min. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min com o intuito de remover as proteínas precipitadas, e leu-se a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $[(A - B)/A] \times 100\%$ , onde A e B eram a absorvância do controlo e da solução com o extracto, respectivamente. A concentração de extracto que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extracto, tendo sido usado o Trolox como padrão.

## 2.4.5 Análise de ácidos fenólicos e flavonóides

### 2.4.5.1. *Extracção*

Adicionou-se à amostra liofilizada (1 g) 30 ml de metanol:água 80:20 (v/v) e agitou-se à temperatura ambiente, a 150 rpm, durante 1h. Filtrou-se através de papel Whatman nº 4 e re-extraíu-se o resíduo mais duas vezes com 30 ml de metanol:água 80:20 (v/v). Os filtrados foram evaporados até remoção completa do metanol. A fase aquosa foi, então, liofilizada e re-dissolvida em de metanol aquoso (20%) a 5 mg/ml e, posteriormente, filtrada através de discos descartáveis LC de 0,22- $\mu$ m.

### 2.4.5.2 *Análise por HPLC-DAD-ESI/MS*

Os extractos foram analisados usando um cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) com uma bomba quaternária e um detector de díodos (DAD) acoplado com uma estação de processamento de dados HP Chem Station (rev. A.05.04). Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C8, 3  $\mu$ m (4,6 mm  $\times$  150 mm) termostaticada a 35°C. A fase móvel foi (A) 0,1% de ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi de 10% B a 15% B até 5 min, 15-25% B mais 5 min, 25-35% B mais 10 min, isocrático 50% B mais 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0.5 ml/min. Realizou-se uma detecção dupla online nm DAD a 280 nm e 370 nm como comprimentos de onda preferenciais e no espectrómetro de massa (MS) ligado ao sistema de HPLC.

A detecção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte ESI num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1. Usou-se ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400 °C, 40 psi). O azoto serviu como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). A tensão de spray dos iões foi definida a -4500V em modo negativo. O detector MS foi programado para executar, em série, dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do ião produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espectros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os iões na amostra. As configurações usadas foram: potencial de não-cluster (DP) -45V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre m/z 100 e 1000. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos iões obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros: DP -50 V, EP -6 V, CE -25V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0 V.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção em comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/ml): 6-C-glucósido de apigenina ( $y=246,05x-309,66$ ;  $R^2=0,9994$ ); ácido cafeico ( $y=617,91x-691,51$ ;  $R^2=0,9991$ ); ácido clorogénico ( $y=600,27x-763,62$ ;  $R^2=0,9998$ ); ácido cinâmico ( $y=1020,8x-775,68$ ;  $R^2=0,9944$ ); ácido *p*-cumárico ( $y=447,12x-1580,7$ ;  $R^2=0,9962$ ); ácido ferúlico ( $y=779,11x-869,22$ ;  $R^2=0,9987$ ); 3-*O*-glucósido de isoramnetina ( $y=262,31x-9,8958$ ;  $R^2=1$ ); 3-*O*-rutinósido de canferol ( $y=175,02x-43,877$ ;  $R^2=0,9999$ ); 6-C-glucósido de luteolina ( $y=365,93x-17,836$ ;  $R^2=0,9997$ ); 3-*O*-glucósido de quercetina ( $y=316,48x-2,9142$ ;  $R^2=1$ ) e 3-*O*-rutinósido de quercetina ( $y=222,79x-243,11$ ;  $R^2=0,9998$ ). Os resultados foram expressos em mg por Kg de massa seca.

#### 2.4.6 Análise de antocianinas

##### 2.4.6.1 Extração

A amostra liofilizada (1 g) foi extraída com 30 ml de metanol contendo TFA 0,5% e filtrada através de papel Whatman nº4. O resíduo foi então re-extraído duas vezes com 30 ml de TFA 0,5% em metanol. Os filtrados foram evaporados para remoção do etanol e re-dissolvidos em água. Para purificação, fez-se passar a solução de extracto num cartucho C-18 SepPak<sup>®</sup> Vac 3 cc (Phenomenex), previamente activado com metanol e, posteriormente, água; os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando 15 ml de água e os pigmentos antocianos foram eluídos com 5 ml de metanol/água (80:20, v/v) contendo 0,1% de TFA. O extracto metanólico foi concentrado sob vácuo, liofilizado, re-dissolvido em 1 ml de metanol aquoso 20% e, depois, filtrado através de discos LC descartáveis 0,22-µm.

##### 2.4.6.2. Análise por HPLC-DAD-ESI/MS

Os extractos foram analisados através do sistema de HPLC descrito anteriormente, de acordo com o procedimento descrito por Garcia-Marino *et al* (2010). A separação foi conseguida numa coluna C18 da AQUA<sup>®</sup> (Phenomenex) de fase reversa (5 µm, 150 mm × 4,6 mm i.d) termostaticada a 35°C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente usado foi: isocrático 10% B até 3 min, 10 a 15% B mais 12 min, isocrático 15% B mais 5 min, 15

a 18% B mais 5 min, 18 a 30% B mais 20 min e 30 a 35% mais 5 min, a uma taxa de 0.5 ml/min. A detecção foi realizada através do DAD, usando 520 nm como comprimento de onda preferencial, e do equipamento de MS já descrito anteriormente. Usou-se ar de grau zero como gás nebulizador (40 psi) e gás turbo (600°C) para secagem do solvente (50 psi). O azoto serviu como cortina (100 psi) e gás de colisão (alto). A energia de *spray* dos iões foi fixada nos 5000V em modo positivo. Os métodos EMS e ESI foram usados para aquisição de espectros de alta resolução e padrões de fragmentação dos iões percursores, respectivamente. Os parâmetros definidos para o modo EMS foram: potencial de não-cluster (DP) 41 V, potencial de entrada (EP) 7.5 V, energia de colisão (CE) 10 V, e os parâmetros para o modo EPI foram: DP 41 V, EP 7.5 V, CE 10 V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0 V.

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (50-0,25 µg/ml): 3-*O*-glucósido de cianidina ( $y=63027x-153,83$ ;  $R^2=0,9995$ ), 3-*O*-glucósido de malvidina ( $y=477014x-38,376$ ;  $R^2=0,9991$ ) e 3-*O*-glucósido de peonidina ( $y=537017x-71,469$ ;  $R^2=0,9997$ ). Os resultados foram expressos em µg por Kg de massa seca.

## 2.5 Amplificação por ISSRs

### 2.5.1 Material vegetal

Para a diferenciação molecular foram usadas duas linhas distintas cultivadas *in vitro*: linha A com coloração púrpura nas suas folhas e caules e linha B apresentando uma cor verde. Dentro de cada linha foram identificados sete indivíduos com base em diferentes características fenotípicas descritas por Diederichsen (1996), estando referidas na Tabela 3. Foram usadas as partes aéreas de coentro comercial como controlo externo. Em cada amplificação por ISSR foi realizado um controlo negativo. Os caules e folha das amostras em estudos foram congeladas a -80°C antes de se proceder a extracção de DNA.

**Tabela 3.** Características fenotípicas identificadas nas linhas de *Coriandrum Sativum*.

Características fenotípicas	Linha A							Linha B						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Folhas grandes expandidas	X	x	x	x				x	x	x	x			
Folhas pequenas não expandidas					x	x	x					x	x	x
Tamanho do eixo de inserção dos folíolos ≥ 1.5 cm	X	x			x			x	x			x		
≤ 1.5 cm			x	x		x	x			x	x		x	x
Tamanho dos pecíolos ≥ 4 cm	X		x				x	x		x				x
≤ 4 cm		x		x	x	x			x		x	x	x	

### 2.5.2 Extracção de DNA

O DNA total dos quinze indivíduos foi extraído dos caules e folhas usando o *kit* de extracção HP Plant DNA Kit (EZNA) da Omega presente no Anexo A2.

### 2.5.3 Amplificação por ISSR

As reacções de PCR ocorreram em misturas de 15 µl, contendo água destilada, 5X de tampão de reacção da enzima, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP's, 10 µg/µl de BSA, 25 pmol/µl de *primer*, 1U de Taq polimerase (Promega) e 10 ng de DNA purificado. Foi sempre realizado um controlo negativo, contendo todos os componentes da reacção excepto o DNA molde.

As amplificações de DNA ocorreram num termociclador (Tgradient) da Biometra, e foram testados 25 *primers* (Anexo A3), sendo seleccionados somente 15 por apresentarem boa amplificação para todos os indivíduos cultivados *in vitro* e também para a amostra de coentros comerciais.

Para os *primers* 807, 823, 825, 836, 840, 841, 857, 858, 880, 899 e 900 (Anexo A3), foi usada uma temperatura de desnaturação de 94°C durante 3 min, seguindo-se um gradiente de 11 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s com temperatura descendente de 52 até 47°C e 2 min a 72°C. Os 29 ciclos finais tiveram uma temperatura de emparelhamento de 47°C, concluindo-se a extensão final durante 7 min a 72°C. Para os *primers* 827, 834 e 835 (Anexo A3) foi usada uma temperatura de desnaturação de 94°C durante 3 min, seguida por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 46,5°C e 2 min a 72°C, e uma extensão final de 72°C durante 7 minutos. Para o *primer* 903 (Anexo A3) a programação do PCR foi semelhante, com temperatura de emparelhamento de 52,5°C.

Os fragmentos resultantes da amplificação por PCR foram separados por electroforese, em gel de agarose a 2%, em tampão TE 1x. Como corante usou-se RedSafe™ (Intron

Biotech), sendo usado o marcador GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). A electroforese foi realizada a 70V durante 3h, visualizando-se sob luz UV, com o equipamento de aquisição de imagem GeneFlash (Syngene). Nos poços do gel foi colocada a mistura completa (15 µl) da amostras de DNA e controlo negativo e 5 µl de marcador de massa moleculares em cada extremo do gel.

## 2.6 Análise estatística

Para a determinação da taxa de crescimento das Linhas A e B submeteram-se os resultados a uma análise de variância (ANOVA). No estudo da actividade antioxidante e determinação da concentração de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos nas amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*, foram realizados ensaios em triplicado. Para cada amostra, foram utilizados três exemplares e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valor médio e desvios-padrão (SD) e submetidos a uma análise de variância seguida do teste HSD Tukey's com  $\alpha = 0,05$ . Este tratamento foi realizado com o software SPSS v. 16.0 Usando uma análise de variância simples (One-Way ANOVA) pois permite aferir diferenças entre as várias amostras para duas ou mais variáveis (Pereira, 1999). Por esta razão o erro associado ( $\alpha$ ) pode-se propagar a todos os resultados pelo que se procedeu a um teste de comparação múltipla de médias, teste de Tukey, onde se obteve um  $\alpha = 0,05$ , o que significa que a probabilidade dos resultados não serem fiáveis é muito baixa. A classificação dos resultados obtidos na One-Way ANOVA foi realizada usando letras, no qual diferentes letras indicam diferenças significativas entre amostras, estando ordenadas alfabeticamente consoante as diferenças existentes entre os mesmos.

Os géis foram analisados usando o software da GeneTools (Syngene), tendo sido usado o marcador como referência para inferir as dimensões das bandas obtidas na amplificação. Dos fragmentos obtidos, só foram considerados aqueles que apresentavam boa definição, reprodutibilidade e dimensão mínima de 200 pb e máxima de 2,8 kb. As bandas foram avaliadas como presentes (1) ou ausentes (0) em cada reacção de ISSR. A semelhança genética entre indivíduos foi estimada usando o princípio estudado por Sneath & Sokal (1973), no qual uma matriz binária é gerada segundo o coeficiente de Dice:  $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$ , o qual permite que a Similaridade ( $S$ ) entre os indivíduos  $i$  e  $j$  seja expressa numericamente, representando  $a$  o número de bandas em comum,  $b$  o número de bandas somente presente em  $i$  e  $c$  presente em  $j$ . Significa isto que a

Similaridade entre indivíduos é definida como o dobro de bandas em comum sobre o número de bandas presentes em  $i$  e  $j$ . Os dendogramas obtidos foram construídos usando o software NTSYS (Rohlf, 1992), no qual se usou a análise de *clusters* baseada na associação média (UPGMA).

# **R**esultados e **D**iscussão

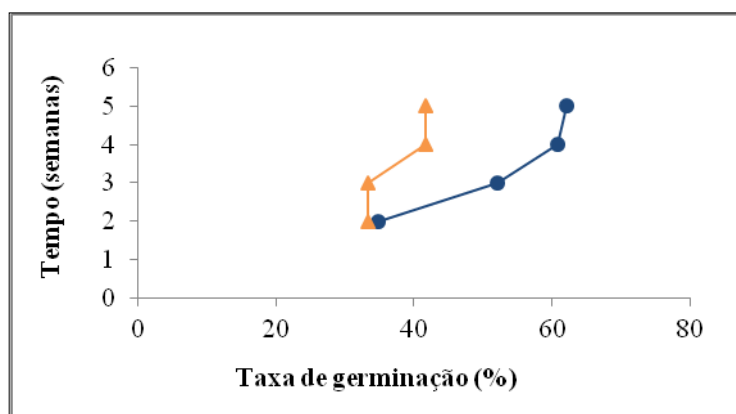


### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Avaliação das condições de cultura *in vitro* para a espécie *Coriandrum sativum*

##### 3.1.1 Taxa de germinação das sementes

Os dados relativos à taxa de germinação das sementes em condições de luz e escuro apresentam-se na Figura 16.



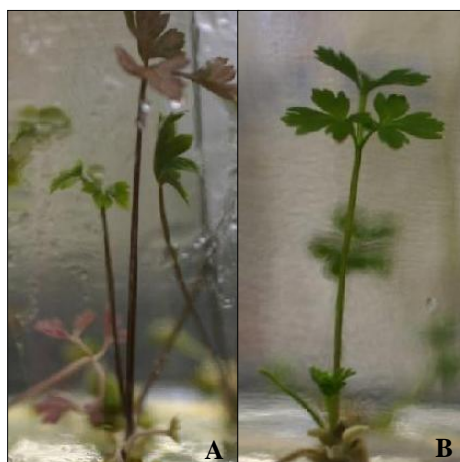
**Figura 16.** Taxa de germinação de sementes de *Coriandrum sativum* em condições distintas de luz (▲) e escuro (●).

Na primeira semana de cultura nenhuma semente germinou. A partir da 2<sup>a</sup> semana, a taxa de germinação foi relativamente semelhante para luz e escuro, 33,3% e 34,8%, respectivamente. A partir da 3<sup>a</sup> semana, foi notória uma maior taxa de germinação das sementes que germinaram no escuro, atingindo uma taxa de germinação máxima na 5<sup>a</sup> semana de 62,2%. As sementes que germinaram à luz não atingiram um máximo tão elevado na 5<sup>a</sup> semana (41,7%). Estes resultados são assim consistentes com os resultados obtidos por Murthy *et al* (2008) que descreveram o isolamento de plântulas de coentro só a partir da 2<sup>a</sup> semana de cultivo, altura da germinação das sementes inoculadas. A germinação das sementes envolve imensos factores como a disponibilidade de água e oxigénio mas também das condições químicas em torno das mesmas, estando estas sementes numa dormência primária facilmente quebrável. A dormência secundária ocorre em sementes maduras e tem uma grande importância ecofisiológica visto ter sido desenvolvida por espécies expostas a condições ambientais indesejáveis, assim como diferentes condições de temperatura, luz e concentração de

nitratos (Bewley & Black, 1994). A própria fisiologia das sementes pode explicar uma maior taxa de germinação ao escuro pois, a incidência de luz pode induzir uma dormência secundária levando à não germinação das mesmas (Bewley & Black, 1994).

### 3.1.2 Diferenciação das linhas A e B

A diferenciação das linhas obtidas em cultura *in vitro*, linha A com uma notória coloração púrpura nas folhas e caules e linha B com coloração verde, é visível na Figura 17.



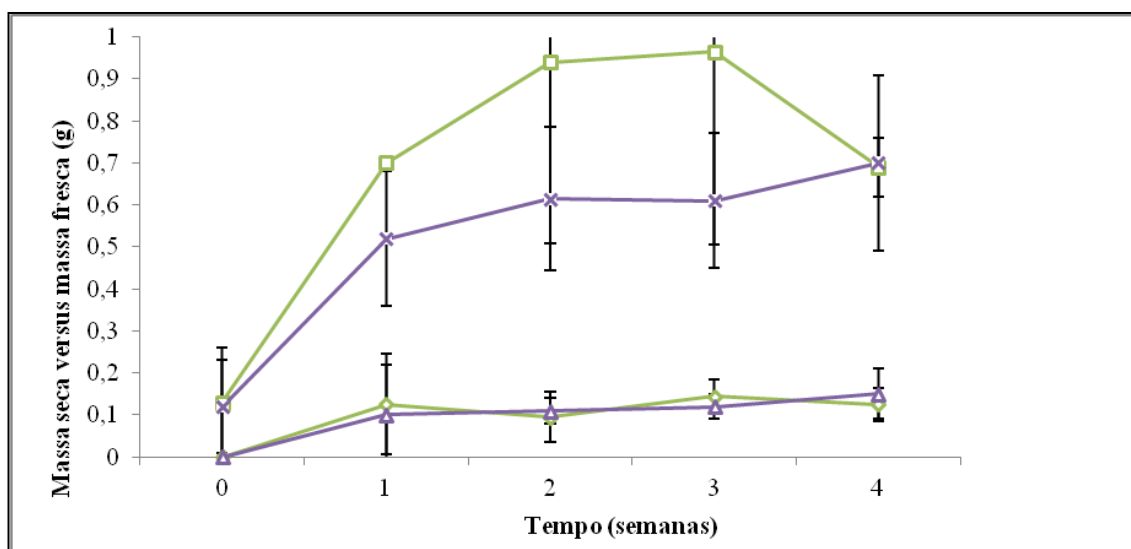
**Figura 17.** Plantas de *Coriandrum sativum* obtidas *in vitro*. **A** - Linha A com coloração púrpura; **B** - Linha B com coloração verde.

A cultura *in vitro* de coentro tinha sido já desenvolvida por Steward *et al* (1969), no entanto o meio de cultura não foi o mesmo utilizado neste trabalho, tendo sido usado meio suplementado com NAA e com leite de côco para estimular a organogénese. Mais tarde Kataeva & Popowich (1993), usaram meio MS suplementado com 4,6  $\mu\text{M}$  de citocina e 1,1  $\mu\text{M}$  de IAA (auxina). Mesmo usando inicialmente o meio de cultura MS/2 e posteriormente meio MS suplementado com IBA e BAP, ambas as linhas mantiveram características juvenis por mais de dois anos em cultura, ao contrário do descrito por outros trabalhos publicados anteriormente (Kataeva & Popowich, 1993) que indicaram uma rápida maturação ou mesmo a morte da cultura em apenas 16 a 17 subculturas *in vitro* (correspondendo a 15 a 16 meses). Estas diferenças nos resultados podem ser explicadas não só pelos fitorreguladores usados mas também pela concentração dos mesmos. O fitorregulador NAA, usado por Steward *et al* (1969), é uma auxina sintética e por isso com uma maior tendência à acumulação nas células por não ser metabolizável pelas vias biossintéticas das mesmas, sendo também mais usual o

seu uso na obtenção de raízes adventícias do que em micropropagação, existindo várias publicações nesse sentido como a de Sharma & Wakhlu (2001), em que obtiveram raízes de *Heracleum candicans* Wall. (Apiaceae) usando NAA. Makunga *et al* (2006) comprovaram também a capacidade de obtenção de raízes adventícias usando NAA em cultura *in vitro* de *Thapsia garganica* L. (Apiaceae). Por outro lado, o fitorregulador IBA encontra-se naturalmente nas plantas, apesar de em pouca quantidade, sendo muito usado em cultura *in vitro* pois, como se desnatura facilmente, a sua metabolização é também ela mais facilitada (Gaspar *et al*, 1996). A benzilaminopurina (BAP) é uma citocinina com grande eficácia na micropropagação e organogénese de meristemas adventícios como reportado por Gaspar *et al* (1996). Kataeva & Popowich (1993) usaram a citocinina e auxina IAA numa concentração (0,98 mg/l e 0,19 mg/l, respectivamente) superior à citocinina (BAP) e auxina (IBA) usadas no presente trabalho (0,1 mg/l ambas). As altas concentrações de fitorreguladores usadas por estes autores podem explicar o envelhecimento precoce e rápido da cultura de coentro observada pelos mesmos e que não se verificou no presente trabalho. A eficiência da relação de IBA e BAP em cultura *in vitro* e na estimulação da organogénese foi comprovada não só por Skoog & Miller mas também por Lee & Fossard (1974) e Gaspar *et al* (1996) na indução de organogénese em eucalipto, e também por Mohapatra *et al* (2008) no estudo da regeneração *in vitro* da *Centelha asiatica* (família das Apiaceae) em meio MS suplementado com NAA, IBA e BAP em diferentes concentrações. Apesar de outros trabalhos científicos descreverem que o aparecimento de uma coloração púrpura, seja devido ao envelhecimento da planta (Huber, 2008), no presente trabalho as plantas com a coloração púrpura não apresentaram quaisquer sintomas de envelhecimento da cultura, nem com maior maturação e eventual morte, pelo que foi considerado não ser esse o caso, mas antes uma acumulação de antocianinas (possivelmente determinada por factores genéticos); essa acumulação foi posteriormente comprovada no estudo do potencial antioxidante e caracterização dos compostos fenólicos existentes no coentro (*vide* secção 3.3). A linha A mostrou esta coloração púrpura e a linha B uma coloração verde durante todo o ciclo de subculturas (3 semanas). Esta subcultura a cada 3 semanas foi também realizada por Musthy *et al* (2008) para obtenção de *calli*, tendo também obtido uma taxa de sobrevivência das plântulas após transplantação superior a 90%, tal como no presente trabalho. A taxa de multiplicação dos rebentos foi a mesma em ambas as linhas, cerca de 50% após as 3 semanas; no entanto, cada linha apresentou um padrão de crescimento diferente,

indicando que esta taxa de multiplicação pode ser semelhante mas o ciclo de crescimento não.

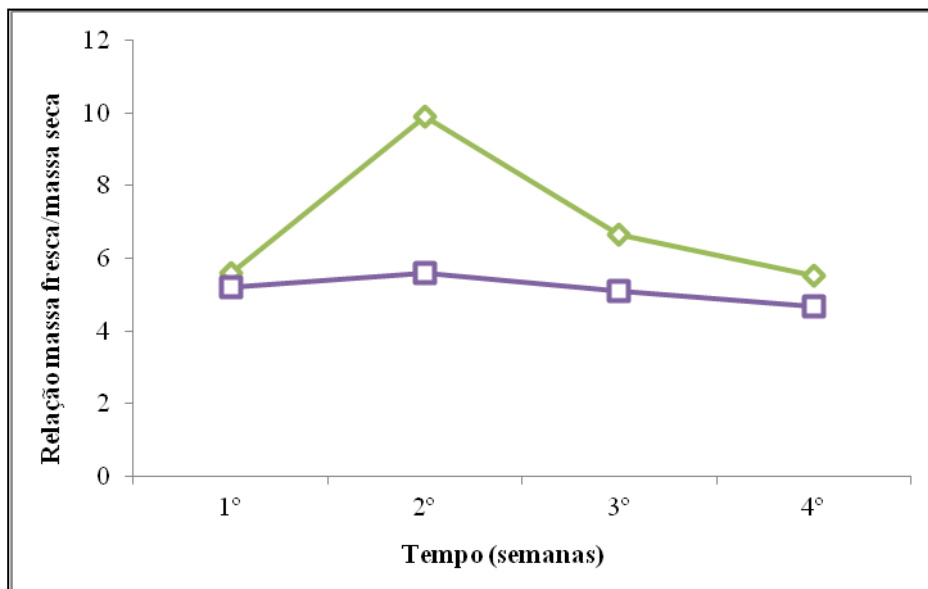
Os dados relativos à massa seca e fresca das linhas A e B cultivadas *in vitro* estão representados na Figura 18.



**Figura 18.** Relação massa seca (Δ- Linha A; ◇- Linha B) e massa fresca (x - Linha A; □ - Linha B) em quatro semanas de cultivo *in vitro* de *Coriandrum sativum*.

Os dados representados na Figura 18 indicam que a taxa de crescimento das duas linhas em relação à massa fresca são muito distintas, tendo um comportamento quase linear em relação a massa seca. Na primeira semana de cultivo, as duas linhas apresentaram uma relação massa seca e fresca muito semelhante, linha A - 0,1 g e 0,52 g e linha B - 0,125 g e 0,7 g, respectivamente. A partir desta primeira semana começaram a verificar-se diferenças muito mais acentuadas entre as duas linhas. Em termos de massa fresca, a linha A apresentou 0,615 g (2ª semana), 0,61 g (3ª semana) e 0,7 g (4ª semana), enquanto a linha B apresentou 0,94 g (2ª semana), 0,965 g (3ª semana) e 0,69 g (4ª semana). Assim, a linha B apresentou quase um terço a mais de massa fresca do que a linha A. No entanto, após a quarta semana, a linha B iniciou o declínio em termos de massa fresca, ao contrário do que ocorre com a linha A que mantém uma ligeira subida no crescimento. Em relação à massa seca, os valores foram muito semelhantes para a linha A e B na 2ª semana (0,11 g e 0,095 g), 3ª semana (0,12 g e 0,145 g) e 4ª semana (0,15 g e 0,125 g), respectivamente.

Os resultados da relação massa fresca/massa seca das linhas A e B e da taxa de crescimento relativo (RGR) das mesmas estão representados na Figura 19 e Tabela 4, respectivamente.



**Figura 19.** Relação massa fresca/massa seca em quatro semanas de cultivo *in vitro* das linhas A (□) e B (◇) de *Coriandrum sativum*.

**Tabela 4.** Determinação da taxa relativa de crescimento (RGR) para as linhas cultivados *in vitro*, linhas A e B, de *Coriandrum sativum*.

Linha	RGR (g/(g.dia))
A	1,45
B	0,95

Na Figura 19, verifica-se que a relação massa fresca/massa seca foi mais elevada na linha B, tal como esperado de acordo com a Figura 18, uma vez que é visível um maior afastamento entre as curvas de crescimento de massa seca e massa fresca na linha B do que na linha A. É também visível na segunda semana, que a linha B apresentou um pico de aumento de massa (9,895 g) e depois começou a decrescer, valores também expectáveis pois houve um maior declínio no seu crescimento. A curva da linha A é constante, havendo também um ligeiro pico na segunda semana de cultivo (5,591 g), o que poderá estar relacionado com o facto de até à segunda semana de cultura o crescimento ser mais intenso com concomitante maior absorção de água, levando a um incremento da massa fresca. Kataeva & Popowich (1993) descreveram que na terceira

semana de cultura as plantas chegam a uma fase, que denominaram madura, com um abrandamento no crescimento.

Na determinação da taxa relativa de crescimento (RGR) para as duas linhas verificou-se que a linha A apresentou uma taxa muito mais elevada (1,45 g/(g.dia)) do que a linha B (0,95 g/(g.dia)), não sendo consistente com os resultados da relação massa seca/massa fresca, onde a linha B apresentou uma relação mais elevada. A taxa relativa de crescimento (RGR) traduz o aumento da biomassa por unidade de biomassa pré-existente e por unidade de tempo ao longo da cultura *in vitro*, representando a eficiência da planta como produtora de nova biomassa (Coelho, 1999). Significando isto que quanto maior é a RGR de uma planta, maior é a capacidade da mesma de produzir mais biomassa a partir da que já tem, tendo assim a linha A maior capacidade de produção e, provando-se uma vez mais, que as diferenças registadas na relação massa seca/massa fresca da linha B podem ser explicadas por uma maior acumulação de água nos seus tecidos não representando um maior crescimento real desta linha.

### 3.2 Caracterização dos voláteis das amostras de coentro obtidas *in vivo* e *in vitro*

O rendimento e a composição química das fracções voláteis isoladas das sementes, das amostras obtidas *in vivo* (Figura 15) e *in vitro* (Linhas A e B; Figura 17) de *Coriandrum sativum* estão descritas na Tabela 5.

**Tabela nº5.** Composição percentual dos voláteis isolados das amostras obtidas *in vivo* (partes aéreas e sementes) e *in vitro* (linha A e B) de *Coriandrum sativum*.

Componentes	RI	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	
		Partes aéreas	Sementes	Linha A	Linha B
Nonano	900	7,3			
$\alpha$ -Pino	930		1,5	0,8	0,6
Canfeno	938		0,2	v	v
Sabineno	958		0,2	0,3	0,2
$\beta$ -Pino	963		0,2	0,5	0,6
$\beta$ -Mirceno	975		0,5	1,8	1,7
$\alpha$ -Felandreno	995			2,7	2,4
<i>n</i> -Decano	1000	0,7			
<i>p</i> -Cimeno	1003		0,9	0,2	0,2
$\beta$ -Felandreno	1005		0,1	45,4	37,1
Limoneno	1009		1,0	1,0	1,9
$\gamma$ -Terpineno	1035		3,8	0,1	0,1
Fenchona	1050			0,1	v
Dimetil estireno	1059			0,4	0,7
Terpinoleno	1064		0,2	9,0	8,8
Linalol	1074	0,3	<b>82,2</b>	0,1	0,1
<b>UI A (O-Monot)</b>	<b>1080</b>			<b>3,6</b>	<b>7,9</b>
Cânfora	1095		3,2		

Continuação na página posterior

Continuação da página anterior				
Undecanal	1100	0,3		
Terpinen-4-ol	1148		0,3	
$\alpha$ -Terpineol	1159		0,4	
Decanal	1180	9,7		
2-E-Decenal	1224	0,3		
Geraniol	1236		2,6	
Undecanal	1288	3,5		
Acetato de $\alpha$ -terpinilo	1334		0,2	0,3
Acetato de geranilo	1370		0,5	
$\beta$ -Elemeno	1388		0,1	0,1
Dodecanal	1397	<b>16,9</b>		
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1414		0,2	0,2
Dodecanol	1468	16,5		
Germacreno D	1474		0,5	0,3
$\alpha$ -Zingibereno	1492		0,4	0,4
Tridecanal	1499	2,4		
$\beta$ -Sesquifelandreno	1508		5,7	4,1
Germacreno B	1533		0,3	0,3
Tetradecanal	1596	2,7		
<b>UI B (O-Sesq)</b>	<b>1639</b>		<b>23,8</b>	<b>29,6</b>
n-Tetradecanol	1659	14,7		
Pentadecanal	1748	4,5		
Hexadecanal	1821	1,3		
Acetato de Fitilo	2047	4,7		
<b>% De identificação</b>		<b>85,8</b>	<b>97,8</b>	<b>97,2</b>
			<b>97,6</b>	
<b>Componentes</b>				
Hidrocarbonetos Monoterpenos	0		8,6	65,4
Monoterpenos oxigenados	0,3		88,7	0,6
Hidrocarbonetos Sesquiterpenos	0		0	0,8
Sesquiterpenos oxigenados	0		0	39,8
Outros	92,5		0,5	0,6
				1
<b>Rendimento óleo (% v/fw)</b>		<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>
				<b>0,4</b>

RI: Índice de retenção relativa a C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub> n-alcanos numa coluna de DB-1; v: vestígios (<0,05%).

A Farmacopeia Portuguesa (Farmacopeia Portuguesa, 2005) indica um mínimo no conteúdo de óleo essencial das sementes de coentro de 3 ml/kg (dw- massa seca), tendo sido obtido um rendimento para as mesmas de 0,7% (v/fw) estando assim muito acima do mínimo requerido. Illés *et al* (2000) descreveram a extracção de óleos essenciais de sementes de coentro usando CO<sub>2</sub> e propano em condições super e subcríticas obtendo rendimentos acima dos 3-8%; no entanto, este tipo de metodologia pode modificar o conteúdo do próprio óleo essencial assim como o de outros compostos, tocoferóis e ácidos gordos. O rendimento obtido para as amostras *in vitro* foi de 0,5% (v/fw) e 0,4% (v/fw) para as linhas A e B, respectivamente, sendo superior ao obtido para as partes aéreas das amostras obtidas *in vivo* (0,3%, v/fw).

A fracção isolada de voláteis das partes aéreas (*in vivo*) era constituída por uma mistura de 15 compostos identificados, perfazendo um total de 85,8% da fracção volátil,

não sendo na sua grande maioria compostos terpénicos mas sim outro tipo de compostos como alcóois e aldeídos, sendo apenas uma pequena fracção (0,3%) monoterpenos oxigenados. Nas sementes foram identificados 16 compostos, representando 97,8% do óleo total, 88,7% dos quais de monoterpenos oxigenados, sendo o linalol (82,2%), a cânfora (3,2%) e o geraniol (2,6%) os compostos mais representativos desta fracção. López *et al* (2008) identificaram estes compostos em sementes de coentro numa percentagem quantitativamente diferente mas qualitativamente igual.

A mistura de voláteis das amostras cultivadas *in vitro*, apesar de notoriamente diferente das restantes, era constituída por 23 compostos tendo sido identificados 97,2% na linha A e 97,6% na linha B, tendo uma grande percentagem de hidrocarbonetos monoterpénicos (65,4% e 61,5% nas linhas A e B, respectivamente) e de sesquiterpenos oxigenados (29,8% e 34% nas linhas A e B, respectivamente).

A fracção volátil das partes aéreas *in vivo* era maioritariamente constituída por aldeídos e alcoóis. Dodecanal (17%), dodecanol (17%), *n*-tetradecanol (15%) e decanal (10%) foram os compostos maioritários encontrados nesta amostra. Linalol, o componente maioritário dos voláteis das sementes, foi o único monoterpeno detectado nos voláteis das partes aéreas das amostras *in vivo* e numa percentagem muito baixa (0,3%). A composição do óleo essencial das partes aéreas do coentro, descrita por outros autores, mostra alguma variabilidade. São indicados diferentes componentes principais: 2-E-decenal (Neffati & Marzouk, 2008), ácido 2-decenóico (Bhuiyan *et al.*, 2009), 2-E-decenal e decanal (Matasyoh *et al.*, 2009) e 1-decanol (Begnami *et al.*, 2010). Mendes *et al* (2009) descreveram a composição volátil de *Angelica lignescences* que, apesar de pertencer à família das Apiaceae, tal como o coentro, apresentou resultados muito díspares dos obtidos aqui, o que contribui para o conceito da variabilidade química presente em plantas da mesma família, género, espécie e, até mesmo, subespécies ou variedades.

Os voláteis das sementes tinham como componente maioritário o linalol (82%), tendo como restantes componentes maioritários o  $\gamma$ -terpineno (4%), cânfora (3%) e geraniol (3%). Os resultados obtidos estão de acordo com estudos recentes que descrevem o linalol como componente maioritário das sementes (Bhuiyan *et al.*, 2009; Grosso *et al.*, 2008; Msaada *et al.*, 2007; Zoubiri & Baaliouamer, 2010). Este composto, linalol, é muito usado na indústria cosmética, tendo sido testada a sua acção toxicológica, reprodutiva, mutagénica, carcinogénica, entre outras. Destaca-se um estudo realizado ao efeito tóxico subcrónico de linalol de coentro administrado

oralmente em ratos, com o objectivo de verificar os efeitos em vários órgãos, tendo provocado lesões degenerativas na zona do cortex renal e na zona não glandular do estômago, mas pelo contrário, não tendo quaisquer efeitos nos órgãos reprodutivos (Letizia *et al*, 2003). O geraniol é um dos compostos voláteis mais importantes comercialmente na actualidade, sendo usado em 76% dos desodorizantes comercializados na Europa. A sua acção repelente, insecticida, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante são também muito reconhecidas (Chen & Viljoen, 2010). Compostos como o linalol, a cânfora e o mirceno são usados em quimiotaxonomia para a classificação infraespecífica do coentro (López *et al*, 2008). Nas fracções das linhas A e B o linalol estava também presente, embora em pequenas quantidades relativas (0,1% em ambos).

Compostos como  $\beta$ -felandreno (37% em A, 45% em B), terpinoleno (9% em ambos),  $\beta$ -sesquifelandreno (4% em A, 6% em B) e  $\alpha$ -felandreno (2% em A, 3% em B) foram os compostos maioritários identificados nos voláteis das amostras obtidas *in vitro*, as linhas A e B. Todos estes compostos foram também descritos por Mendes *et al* (2009) como compostos existentes nas partes aéreas de *Chaerophyllum azoricum*. É de salientar a existência, mesmo em muito baixa percentagem, do  $\beta$ -elemeno (0,1% linhas A e B). Este composto tem vindo a ganhar muita importância na área da medicina pela sua capacidade indutora da apoptose das células cancerígenas, tendo sido estudado por Zhu *et al* (2011) na inibição da proliferação do glioblastoma humano.

Dois compostos não identificados (UI A e UI B) apareceram como componentes principais nos voláteis de ambas as linhas. De acordo com os seus espectros de massa (Anexo A4), o composto UI A apresentou um valor de ião molecular de 150 sendo assim possível considerar que se tratava dum composto monoterpénico oxigenado; UI B apresentou um ião molecular de 223 o que levou a considerar que fosse um composto sesquiterpénico também ele oxigenado. Nenhuma das referências bibliográficas consultadas para o presente trabalho descreve uma situação semelhante, sendo assim, necessários estudos complementares para correcta identificação destes compostos.

### 3.3 Potencial antioxidante das amostras de coentro obtidas *in vivo* e *in vitro*

#### 3.3.1 Antioxidantes lipofílicos, hidrofílicos e avaliação da actividade antioxidante

A composição em compostos lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e clorofilas) de amostras crescidas *in vivo* e *in vitro* está descrita na Tabela 6.

**Tabela 6.** Compostos lipofílicos no coentro: sementes, amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*.

	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	Sementes	Partes aéreas	Linha A	Linha B
<b>Compostos lipofílicos</b>				
$\alpha$ -tocoferol (mg/100 g dw)	0,09 $\pm$ 0,00 c	22,57 $\pm$ 0,98 a	1,47 $\pm$ 0,05 b	1,25 $\pm$ 0,02 cb
$\beta$ -tocoferol (mg/100 g dw)	nd	0,25 $\pm$ 0,01	nd	nd
$\gamma$ -tocoferol (mg/100 g dw)	0,42 $\pm$ 0,09 d	2,79 $\pm$ 0,43 c	12,96 $\pm$ 0,42 a	8,84 $\pm$ 0,03 b
$\delta$ -tocoferol (mg/100 g dw)	0,68 $\pm$ 0,09 a	0,64 $\pm$ 0,19 a	Nd	nd
Total tocoferóis (mg/100 g dw)	1,19 $\pm$ 0,00 d	26,25 $\pm$ 1,21 a	14,43 $\pm$ 0,47 b	10,09 $\pm$ 0,05 c
$\beta$ -caroteno (mg/100 g dw)	nd	98,74 $\pm$ 17,57	nd	nd
Licopeno (mg/100 g dw)	5,11 $\pm$ 1,16 d	38,84 $\pm$ 4,18 c	145,64 $\pm$ 4,73 a	79,97 $\pm$ 3,64 b
Clorofila a (mg/100 g dw)	9,97 $\pm$ 2,15 d	508,51 $\pm$ 5,64 c	519,94 $\pm$ 3,53 b	534,14 $\pm$ 1,57 a
Clorofila b (mg/100 g dw)	13,87 $\pm$ 3,18 d	233,91 $\pm$ 17,33 c	770,42 $\pm$ 21,33 a	422,49 $\pm$ 28,58 b

dw- massa seca; nd- não detetado. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); Média  $\pm$  DP; n=9.

Não foram detectados  $\beta$ - e  $\delta$ -tocoferóis nas amostras obtidas *in vitro*. Por outro lado, foi também observado nessas amostras, especialmente na linha A (13 mg/100 g dw), um decréscimo significativo em  $\alpha$ -tocoferol e um aumento significativo em  $\gamma$ -tocoferol. As amostras obtidas *in vivo* revelaram a concentração mais elevada de tocoferóis (26 mg/100 g dw) devido, maioritariamente, à contribuição do  $\alpha$ -tocoferol (23 mg/100 g dw). Amostras de coentro provenientes da Malásia revelaram valores mais elevados de  $\alpha$ -tocoferol (53 mg/100 g dw; valor calculado a partir da massa fresca e conteúdo de humidade disponível), mas valores mais baixos de  $\delta$ -tocoferol (0,1 mg/100 g dw) e  $\gamma$ -tocoferol (0,7 mg/100 g dw) (Isabelle *et al*, 2010). Já Marero *et al* (1986) praticamente não encontraram tocoferóis em amostras de coentro. Os tocoferóis inibem o processo de peroxidação lipídica dos ácidos gordos polinsaturados e outros compostos das membranas celulares, devido sobretudo às suas propriedades antioxidantes em ambientes lipídicos (Abidi, 2000). O  $\beta$ -caroteno foi somente encontrado nas amostras obtidas *in vivo* (99 mg/100 g dw), enquanto o licopeno foi identificado em todas as amostras. Os níveis mais elevados foram obtidos nas amostras

*in vitro*, sobretudo na linha A. Diferentes autores descreveram baixas concentrações de  $\beta$ -caroteno em amostras de coentro provenientes da Índia (47 mg/100 g dw; valor calculado a partir da massa fresca e conteúdo de humidade disponível), estimado colorimetricamente após cromatografia de separação (Singh et, 2001), da Malásia (56 mg/100 g dw; valor calculado a partir da massa fresca e conteúdo de humidade disponível) (Isabelle et al, 2010) e Israel (10 mg/100 g dw) (Daly et al, 2010), quantificado por HPLC. Posteriormente, Guerra et al (2005) também descobriram  $\beta$ -caroteno em baixas concentrações após análise por TLC (33 mg/100 g dw). Está provado que os carotenóides estão relacionados com efeitos antioxidantes, incrementando a actividade e a imunomodulação da provitamina A, sendo muito importante para a prevenção de algumas doenças crónicas (Daly et al, 2010).

Os compostos lipofílicos maioritários foram as clorofilas e, tal como esperado, foram encontradas em maior concentração nas amostras obtidas *in vivo* do que nas sementes. Mais uma vez, as amostras obtidas *in vitro*, principalmente na linha A, revelaram níveis mais elevados do que as amostras crescidas *in vivo*. Isto pode ser devido às condições controladas de luz/escuro e temperatura de crescimento inerentes à cultura *in vitro*. A alteração das condições de cultura leva por vezes a modificações morfológicas e estruturais, como mesófilos pouco densos e aparelhos estomáticos pouco desenvolvidos, podendo estas alterações contribuir para uma possível redução na fotossíntese, não estando associado a uma maior concentração de açúcar no meio (Mohamed & Alsadon, 2010). Hazarika (2006), por sua vez, refere que devido à grande quantidade de açúcar existente no meio de cultura o aparelho fotossintético das plantas não se desenvolve normalmente, podendo levar a um conteúdo muito baixo em clorofilas, o que não ocorre nas linhas A e B crescidas *in vitro*, ou a uma ausência ou inactividade das enzimas responsáveis pela fotossíntese. Por outro lado, com o decréscimo da quantidade de luz absorvida pelas culturas *in vitro*, podem levar a um decréscimo no conteúdo de clorofilas, levando a uma redução na fotossíntese. Sendo assim as plantas *in vitro* com maior conteúdo em clorofilas têm maior capacidade de sobrevivência na aclimatização tendo sido já referido por Mohamed e Alsadon (2010) que altas concentração de açúcar em cultura *in vitro* não interfere no desenvolvimento do aparelho fotossintético mas que por outro lado baixas concentrações leva ao desenvolvimento de células fotomixotróficas que estão melhor adaptadas aos choques próprios deste tipo de cultura. No presente trabalho a suplementação de açúcar é inferior (20g/L) ao usado em outras referências em coentro, Kataeva & Popowich

(1993), Murthy *et al* (2008) e Kim *et al* (1996) (30 g/L), podendo ter assim plantas mais próximas um pouco das células fotomixotróficas. Dito isto, apesar de uma maior acumulação, nas linhas A e B, de clorofilas estas podem ser pouco funcionais ou reactivas, só podendo ser verificada essa hipótese com testes enzimáticos e registos de taxas de fotossíntese nas duas linhas comparativamente com as partes aéreas *in vivo*. Tem vindo a ser sugerida uma actividade pro-oxidante das clorofilas, sob luz, provavelmente relacionada com a energia transferida de um sigleto-excitado da clorofila para o oxigénio que formaria espécies reactivas de oxigénio. No entanto, está também descrito que as clorofilas também conferem protecção prevenindo a autoxidação de óleos alimentares vegetais armazenados no escuro, sugerindo ainda um mecanismo de doação de hidrogénios para interrupção das reacções em cadeia. Os autores sugerem, ainda, que uma estrutura química intacta de porfirina parece ser essencial para a actividade antioxidante (Lanfer-Marquez *et al*, 2005).

A composição em antioxidantes hidrofílicos (açúcares, ácido ascórbico, fenóis, flavonóis e antocianinas) é apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7.** Compostos hidrofílicos no coentro: sementes, amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*.

	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	Sementes	Partes aéreas	Linha A	Linha B
<b>Compostos hidrofílicos</b>				
Frutose (g/100 g dw)	nd	4,33 ± 0,24 a	3,64 ± 0,45 a	3,54 ± 0,37 a
Glucose (g/100 g dw)	nd	5,22 ± 0,23 b	6,67 ± 0,92 a	6,32 ± 0,29 ba
Rafinose (g/100 g dw)	1,32 ± 0,06 a	nd	nd	0,86 ± 0,14 b
Sacarose (g/100 g dw)	0,35 ± 0,00 c	4,03 ± 0,08 a	0,56 ± 0,01 b	0,18 ± 0,02 d
Trealose (g/100 g dw)	nd	0,88 ± 0,03 b	1,39 ± 0,01 a	0,35 ± 0,00 c
Açúcares totais (g/100 g dw)	1,67 ± 0,06 c	14,46 ± 0,35 a	12,26 ± 1,37 b	11,25 ± 0,83 b
Ácido ascórbico (mg/100 g dw)	54,78 ± 0,46 a	15,91 ± 2,20 d	20,22 ± 2,37 c	52,35 ± 0,70 b
Fenóis (mg CAE/g extracto)	82,81 ± 1,85 c	223,07 ± 6,77 ba	231,33 ± 6,64 a	214,65 ± 10,98 b
Flavonóis (mg QE/g extracto)	44,60 ± 1,73 b	90,70 ± 2,10 a	90,50 ± 3,96 a	89,14 ± 2,49 a
Antocianinas (mg ME/g extracto)	16,63 ± 2,28 d	70,04 ± 1,59 a	48,04 ± 6,86 b	36,93 ± 4,21 c

dw- massa seca; nd- não detetado. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); Média ± DP; n=9.

Os açúcares redutores, como a glucose (monossacárido) e a rafinose (trissacárido), podem actuar como antioxidantes mas, os açúcares não-redutores como a trealose (dissacárido) também já foram referidos como supressores da auto-oxidação de ácidos gordos não-saturados (Higashiyama, 2002). A rafinose não foi detectada nas amostras obtidas *in vivo* nem na linha A. As sementes de coentro revelaram a

concentração mais baixa de açúcares totais (2 g/100g dw) devido à contribuição da sacarose e da rafinose. Pelo contrário, as amostras de coentro obtidas *in vivo* apresentaram concentração mais elevada de açúcares (15 g/100 g dw), seguidas das amostras crescidas *in vitro*.

O ácido ascórbico foi encontrado em todas as amostras, especialmente nas sementes de coentro que apresentaram a concentração mais alta (55 mg/100 g dw); < linha B apresentou uma concentração maior do que a linha A. Outros autores já descreveram anteriormente o teor de ácido ascórbico em amostras de coentro da Malásia (35,2 mg/g fw) e da Índia (98,1 mg/100 g fw) (Singh *et al*, 2001), determinado por HPLC e pelo método do indofenol, respectivamente.

As partes aéreas (amostras *in vivo* e *in vitro*) revelaram maiores concentrações em fenóis e flavonóis do que as sementes. O teor em fenóis totais foi já descrito para amostras de coentro da Malásia, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (4 mg equivalentes de ácido gálico /g fw) (Isabelle *et al*, 2010). Foi também já obtido o perfil fenólico (flavonas, flavonóis e flavanonas) de uma amostra proveniente da Dinamarca, após análise por HPLC-MS (Justesen & Knuthsen, 2001). Os compostos fenólicos estão relacionados com o stresse oxidativo, tendo a capacidade de sequestrar as reações dos radicais, assegurando a estabilidade e as características nutricionais dos produtos vegetais (Ramadan *et al*, 2003).

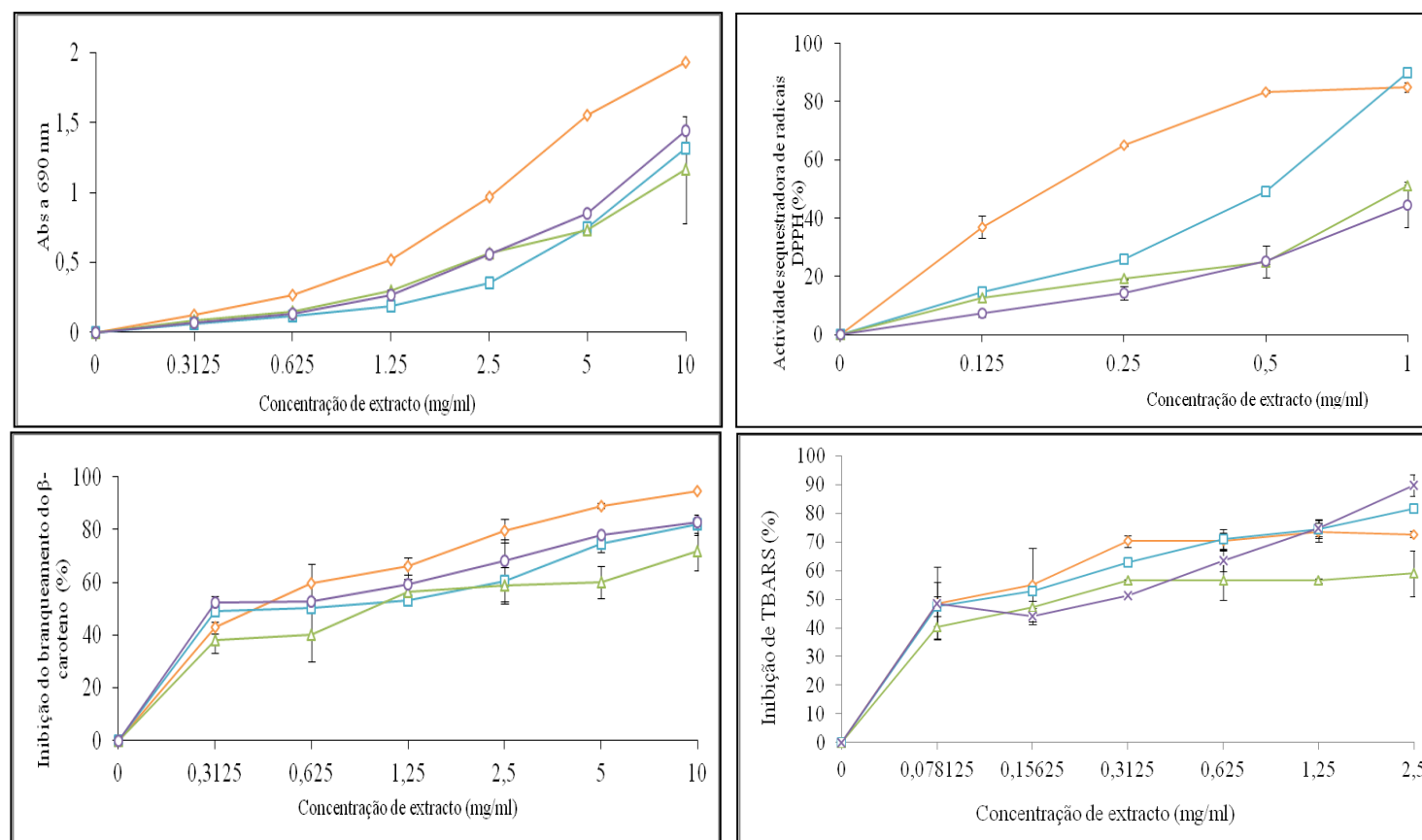
Os níveis de fenóis e flavonóis similares nas amostras de coentro crescidas *in vivo* e *in vitro*, indicando que ambos os ambientes conduzem à sua biossíntese. Quanto às antocianinas, foi observada uma diferença significativa nas amostras obtidas *in vivo* (70 mg ME/g extracto) ou *in vitro*. Além disso, a linha A revelou valores mais elevados (48 mg ME/g extracto) que o clone B (37 mg ME/g extracto), o que pode estar relacionado com a pigmentação púrpura presente nesta amostra (Figura 17).

Devido à complexidade do processo oxidativo, a capacidade antioxidante foi determinada pela actividade captadora do radical DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ - caroteno e inibição da peroxidação lipídica (Tabela 8 e Figura 20).

**Tabela 8.** Actividade antioxidante, expressa em valores de EC<sub>50</sub>, do coentro: sementes, amostras obtidas *in vivo* e *in vitro*.

	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	Sementes	Partes aéreas	Linha A	Linha B
<b>Actividade antioxidante</b>				
Actividade captadora de DPPH (mg/ml)	0,51 ± 0,02 c	0,18 ± 0,01 d	1,10 ± 0,01 a	0,98 ± 0,00 b
Poder redutor (mg/ml)	3,44 ± 0,20 a	1,21 ± 0,02 c	2,10 ± 0,19 b	2,05 ± 0,26 b
Inibição descoloração β-caroteno (mg/ml)	0,54 ± 0,03 b	0,47 ± 0,08 c	0,30 ± 0,01 d	1,06 ± 0,07 a
Inibição de TBARS (mg/ml)	0,10 ± 0,03 c	0,11 ± 0,05 c	0,29 ± 0,01 a	0,20 ± 0,03 b

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ); Média ± DP; n=9.

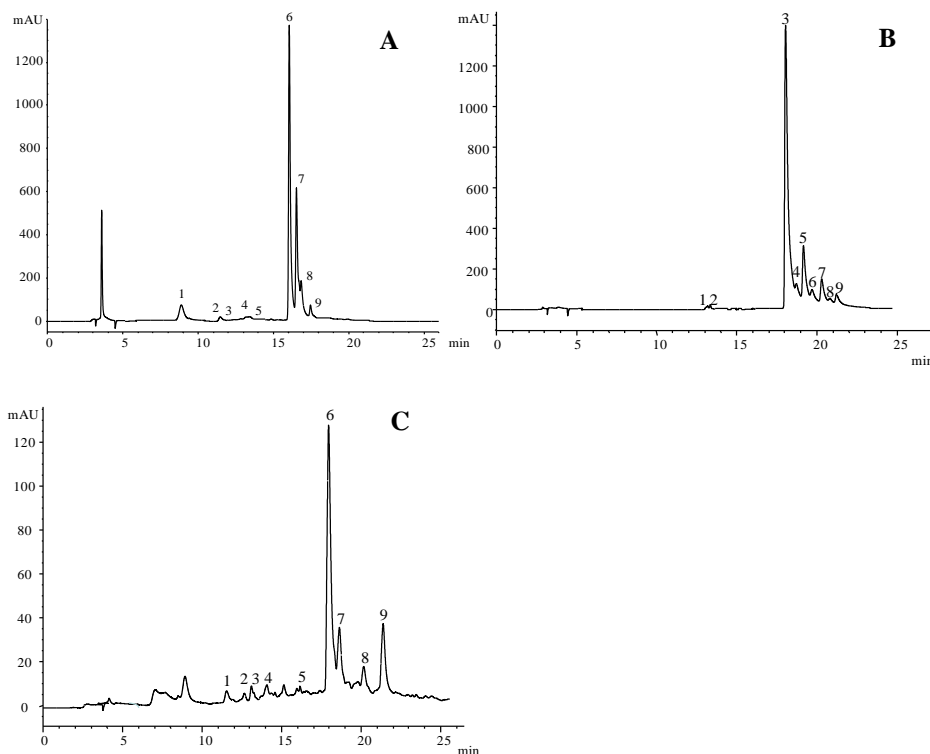


**Figura 20.** Actividade captadora de radicais DPPH (%), poder redutor a 690 nm, inibição da descoloração do β-Caroteno (%) e inibição da formação de TBARS (%) em amostras obtidas *in vivo* (♦ - partes aéreas; ■ - sementes) e amostras obtidas *in vitro* (▲ - linha A; ● - linha B). Valores  $EC_{50}$  do Trolox:  $43,03 \pm 1,71 \mu\text{g/ml}$  para o ensaio do DPPH;  $29,62 \pm 3,15 \mu\text{g/ml}$  para o ensaio do poder redutor;  $3,73 \pm 1,90 \mu\text{g/ml}$  para o ensaio de TBARS e  $2,63 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$  para o ensaio da descoloração do β-caroteno.

Os extractos polares (metanólicos) das amostras obtidas *in vivo* apresentaram maior actividade antioxidante, com menores valores de EC<sub>50</sub>, para a actividade captadora de DPPH (0,18 mg/ml), poder redutor (1,21 mg/ml) e inibição da formação de TBARS (0,11 mg/ml), o que está de acordo com o alto conteúdo em açúcares, fenóis, flavanóis e antocianias destas amostras. Entre as amostras obtidas *in vitro*, a linha B mostrou maior potencial antioxidante do que a linha A. No entanto, esta última amostra revelou a capacidade de inibição da descoloração do β-caroteno mais elevada de todas (EC<sub>50</sub> 0,30 mg/ml). Os extractos metanólicos das amostras obtidas *in vivo* revelaram maior actividade captadora de DPPH do que os extractos metanólicos de folhas de amostras de coentro da Noruega (0,4 mg/ml) (Wangensteen *et al*, 2004). No entanto, o resultado obtido para as sementes foi muito semelhante (0,5 mg/ml) (Wangensteen *et al*, 2004).

### 3.3.2. Perfil individual em ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas

A Figura 21 descreve o perfil de compostos fenólicos de amostras de coentro obtidas *in vivo* (partes aéreas e sementes) e *in vitro* (linhas A e B).



**Figura 21.** Cromatogramas individuais das amostras de coentro obtidas *in vivo* e *in vitro*. **A-** Partes aéreas, registado a 370 nm; **B-** Linha A, registado a 370 nm; **C-** Sementes, registado a 280 nm.

Os resultados do tempo de retenção,  $\lambda_{\max}$  na zona do visível, tentativa de identificação e concentração dos ácidos fenólicos e flavonóides, obtidos por HPLC-DAD-MS são apresentados nas Tabela 9 e 10.

**Tabela 9.** Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de absorção máxima na zona do visível ( $\lambda_{\max}$ ), dados do espectro de massa, identificação provisória e concentração dos ácidos fenólicos e flavonóides nas amostras de coentro obtidas *in vivo*.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Iões Moleculares [M-H] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identificação provisória	Quantificação (mg/Kg, dw)
<b>Partes aéreas</b>						
1	8,90	328	369	207(11), 189(100)	Hexósido de dimetoxicinamoilo	406,39 ± 2,57
2	11,4	324	353	191(100), 179(6), 173(5), 135(4)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	173,51 ± 11,54
3	11,8	322	353	191(100), 179(45), 173(3), 135(7)	Ácido cafeoilquínico	7,92 ± 1,38
4	13,3	328	355	193(100), 149(24)	Glucósido de ácido ferúlico	122,29 ± 12,32
5	14,5	308	337	191(100), 173*, 163*, 146*	Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico	303,83 ± 9,27
6	16,0	354	609	301(100)	3- <i>O</i> -rutinósido de quercetina	3296,16 ± 15,50
7	16,5	355	477	301(100)	3- <i>O</i> -glucurónido de quercetina	1237,13 ± 22,72
8	16,8	356	463	301(100)	3- <i>O</i> -glucósido de quercetina	405,36 ± 10,93
9	17,4	354	593	285(100)	3- <i>O</i> -rutinóido de canferol	320,86 ± 20,76
<b>Total Ácidos fenólicos</b>						<b>1013,95 ± 11,24</b>
<b>Total Flavonóides</b>						<b>5259,52 ± 69,91</b>
<b>Total Compostos fenólicos</b>						<b>6273,47 ± 81,16</b>
<b>Sementes</b>						
1	11,5	325	353	191(100), 179(6), 173(5), 135(4)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	1,44 ± 0,27
2	12,7	320	-	193(6), 149(100)	Derivado de ácido ferúlico	7,96 ± 0,34
3	13,1	323	179	135(100)	Ácido cafeico	3,07 ± 0,95
4	14,0	326	365	203(100)	Cafeoil <i>N</i> - trptofano	0,71 ± 0,04
5	16,1	319	163	119(100)	Ácido <i>p</i> -cumárico	23,81 ± 2,50
6	17,4	324	193	149 (100)	Ácido ferúlico	8,11 ± 0,74
7	17,9	327	527	365(100), 203(11)	Hexósido de cafeoil <i>N</i> - trptofano	45,33 ± 4,36
8	18,6	326	515	353(100), 191(15), 179(50), 173(99), 135(27)	Ácido di- <i>O</i> -cafeoilquínico	9,67 ± 1,62
9	20,2	328	379	203(25), 193(100)	Feruloil <i>N</i> - triptofano	10,56 ± 1,18
10	21,4	326	541	379(100), 203(5)	Hexósido de feruloil <i>N</i> - triptofano	19,27 ± 1,06
<b>Total Ácidos fenólicos</b>						<b>129,94 ± 12,42</b>

Os números entre parênteses após os fragmentos iónicos MS<sup>2</sup> referem a sua abundância relativa. \*Abundância relativa < 2%.

**Tabela 10.** Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de absorção máxima na zona do visível ( $\lambda_{\max}$ ), dados do espectro de massa, identificação provisória e concentração dos ácidos fenólicos e flavonóides em amostras de coentro obtidas *in vitro*.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Iões Moleculares [M-H] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identificação provisória	Quantificação (mg/Kg, dw)
<b>Linha A</b>						
1	13,3	356	639	477(100), 315(62)	Di-hexósido de isoramnetina	16,98 ± 2,34
2	14,2	279	365	203(100)	Hexósido detriptofano	Nq
3	18,0	338	563	443(6), 431(29), 311(3), 269(100)	8-C-hexósido-7-O-pentósido de apigenina	3404,07 ± 19,23
4	18,7	342	593	299(100), 284(7)	Hexoxil-ramnósido de luteolina	321,18 ± 22,34
5	19,1	346	593	299(100), 284(27)	Hexoxil-ramnósido de luteolina	820,11 ± 37,50
6	19,73	338	563	443(6), 431(28), 311(17), 269(100)	8-C-hexósido-5-O-pentósido de apigenina	272,64 ± 13,18
7	20,33	338	605	545(33), 431(33), 311(27), 269(100)	C-hexósido-O-pentósido de apigenina acetilado	354,83 ± 13,56
8	20,84	342	635	299(100), 284(41)	Hexoxil-ramnósido de luteolina acetilada	117,50 ± 3,72
9	21,26	346	635	299(100), 284(34)	Hexoxil-ramnósido de luteolina acetilada	201,75 ± 3,42
<b>Total flavonóides</b>						<b>5509,07 ± 70,62</b>
<b>Linha B</b>						
1	13,09	356	639	477(100), 315(60)	Di-hexósido de isoramnetina	22,44 ± 0,66
2	14,19	279	365	203(100)	Hexósido de triptofano	Nq
3	18,05	338	563	443(7), 431(27), 311(4), 269(100)	8-C-hexósido-7-O-pentósido de apigenina	2982,87 ± 94,89
4	18,70	340	593	299(100), 284(23)	Hexoxil-ramnósido de luteolina	244,89 ± 10,06
5	19,17	346	593	299(100), 284(30)	Hexoxil-ramnósido de luteolina	509,10 ± 27,11
6	19,71	338	563	443(6), 431(20), 311(9), 269(100)	8-C-hexósido-5-O-pentósido de apigenina	255,95 ± 4,85
7	20,31	338	605	545(18), 431(33), 311(22), 269(100)	C-hexósido-O-pentósido de apigenina acetilada	506,43 ± 65,00
8	20,82	342	635	299(100), 284(31)	Hexoxil-ramnósido de luteolina acetilada	109,52 ± 18,36
9	21,24	346	635	299(100), 284(39)	Hexoxil-ramnósido de luteolina acetilada	222,60 ± 0,24
<b>Total flavonóidess</b>						<b>4853,80 ± 98,62</b>

Os números entre parênteses após os fragmentos iónicos MS<sup>2</sup> referem a sua abundância relativa. \*Abundância relativa < 2%; nq- não quantificável.

Todas as amostras estudadas apresentaram perfis diferentes. As amostras crescidas *in vivo* apresentaram derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis (derivados da quercetina e canferol) como compostos fenólicos maioritários, enquanto as sementes apresentaram somente derivados de ácidos hidroxicinâmicos. As linhas A e B mostraram perfis similares de flavonas (flavonóides maioritários) e ausência de ácidos fenólicos. No entanto, somente a linha A revelou antocianinas na sua composição.

Foram encontrados cinco ácidos fenólicos e quatro flavonóis nas partes aéreas das amostras crescidas *in vivo* (Tabela 9). Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 mostraram um espectro UV muito similar aos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos. O pico 1 mostrou um  $\lambda_{\max}$  a 328nm e um ião molecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 369 libertando fragmentos de MS<sup>2</sup> a m/z 207 (-162 u.m.a. correspondentes a uma hexose), que podem ser associados a resíduos de dimetoxicinamoilo, e a m/z 189 (-18 u.m.a., perda de mais uma molécula de água) e, portanto, o composto foi identificado como hexósido de dimetoxicinamoilo. Este composto foi previamente identificado por Alosno-salces *et al* (2009) em grãos jovens de café. O pico 2 apresentou um ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 353 e um  $\lambda_{\max}$  no espectro de UV a 324 nm, coerente com o ácido clorogénico, tendo sido identificado como ácido 3-*O*-cafeoilquínico por comparação com o padrão comercial. O pico 3 apresentou as mesmas características de massa e UV tendo sido identificado como outro ácido cafeoilquínico. O pico 4 mostrou um espectro UV semelhante ao ácido ferúlico com um  $\lambda_{\max}$  a 328 nm, mas eluído num tempo de retenção distinto. Apresentou um ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 355 libertando um fragmento MS<sup>2</sup> a m/z 193 (perda - 162 u.m.a., hexose) atribuída ao ácido ferúlico, que permitiu uma tentativa de identificação como hexósido de ácido ferúlico; a sua eluição antes (maior polaridade) do ácido ferúlico (17,3 min) foi também coerente com esta identificação. O pico 5 mostrou um ião pseudomolecular ([M-H]<sup>-</sup> a m/z 337) e um espectro UV ( $\lambda_{\max}$  a 308nm) semelhante ao ácido *p*-cumárico, mas eluído num tempo de retenção distinto. O espectro MS/MS rendeu frangentos de iões a m/z 191 (-146 u.m.a., perda de uma metade de *p*-cumaroilo) e a m/z 146 (-191 u.m.a., perda de um ácido quínico) e, portanto, foi identificado como ácido *p*-cumaroilquínico.

Os picos 6-9 mostraram espectros UV semelhantes a flavonóis. Os compostos 6, 7 e 8 foram associados aos derivados da quercetina, tendo eles mostrado espectros UV semelhantes à quercetina com um  $\lambda_{\max}$  a 354-356 e iões pseudomoleculares [M-H]<sup>-</sup> a

m/z 609, 477 e 463, respectivamente, tendo todos eles libertado um único fragmento MS<sup>2</sup> a m/z 301 (quercetina). A perda de -308 u.m.a. no pico 6 foi coerente com um rutinósido, e o composto foi identificado como 3-*O*-rutinósido de quercetina por comparação com o padrão comercial. Este composto foi o mais abundante de todos os compostos fenólicos encontrados nesta amostra (3296 mg/kg dw). Picos semelhantes, 7 e 8, foram identificados positivamente como 3-*O*-glucurónido de quercetina e 3-*O*-glucósido de quercetina, de acordo com as características de massa e UV e por comparação com os padrões comerciais. O pico 9 mostrou um espectro semelhante ao canferol e um ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 593, libertando um único fragmento MS<sup>2</sup> a m/z 285 (canferol); a perda de -308 u.m.a. (rutinósido) e a comparação com o padrão comercial permitiu a sua identificação como 3-*O*-rutinósido de canferol.

Os derivados de ácidos fenólicos foram os únicos compostos encontrados nas sementes de coentro (Tabela 9), nas quais os picos 1, 3, 5 e 6 foram associados a derivados do ácido hidroxicinâmico, correspondendo ao ácido clorogénico (ácido 3-*O*-cafeoilquínico), ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, respectivamente, identificados por comparação das características UV, massa e tempo de retenção com os respetivos padrões comerciais. O pico 2 apresentou um espectro UV semelhante ao do ácido ferúlico, mas eluído num tempo de retenção distinto. Não há um sinal claro de que se poderia associar o pico ao seu ião molecular, embora se tenham observado, no mesmo tempo de retenção e usando detecção ESI, m/z 193 (possivelmente ácido ferúlico) e 149 (fragmento característico da quebra do ácido ferúlico). Uma vez que este composto eluiu antes do padrão do ácido ferúlico, identificou-se como um glucósido de ácido ferúlico, tal como já detectado nas partes aéreas das amostras crescidas *in vivo*.

Os picos 4, 7, 9 e 10 foram associados a conjugados cinamoil-aminoácido. O pico 7 foi o maior composto fenólico encontrado nesta amostra (45,33 mg/Kg dw). Estes compostos mostraram um espectro de UV muito semelhante ao ácido hidroxicinâmico com um  $\lambda_{\max}$  a ~327 nm e, todos eles, apresentaram um fragmento MS<sup>2</sup> a m/z 203 coerente com o aminoácido triptofano; adicionalmente, os picos 7 e 10 apresentaram fragmentos iónicos maioritários a m/z 365 e 379, respectivamente, que podem ser atribuídos à perda de hexose (162 u.m.a.). Estas características e comparações com as fragmentações descritas por Alonso-Slases *et al* (2009) para conjugados do ácido cinamoil-aminoácido identificados em grãos jovens de café, permitiram uma identificação destes compostos como sendo cafeoil N-triptofano (pico 4), hexósido de cafeoil N-triptofano (pico 7), feruloil N-triptofano (pico 9) e hexósido

de feruloil N-triptofano (pico 10). O pico 8 apresentou um ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 515 e um  $\lambda_{\max}$  no espectro de UV a 326nm semelhante ao ácido clorogénico, com um fragmento principal no MS<sup>2</sup> a m/z 353 ([M-H-162]<sup>-</sup>), correspondente à perda de cafeoil e, outros fragmentos (m/z a 191, 179, 173 e 135), característicos da quebra do ácido 3-*O*-cafeoilquínico (ver pico 2 nas amostras crescidas *in vivo*); portanto, o composto foi identificado como ácido di-*O*-cafeoilquínico.

As linhas A e B, tal como mencionado anteriormente, apresentaram o mesmo perfil fenólico (Tabela 10), mas a presença de antocianinas só se verificou na linha A. O pico 1 mostrou um ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 639 cuja análise produziu dois fragmentos iónicos a m/z 477 ([M-H-162]<sup>-</sup>) e m/z 351 ([M-H-162-162]<sup>-</sup>), correspondendo a perdas sucessivas de dois hexósidos; o ião a m/z 315 foi coerente com o flavonol isoramnetina, assim como o espectro UV do pico com um  $\lambda_{\max}$  a 356, que permitiram a identificação como di-hexósido de isoramnetina. A posição dos resíduos do açúcar de substituição não pôde ser concluída definitivamente, apesar das sucessivas perdas dos dois hexósidos sugerirem que estão localizadas em diferentes posições da aglicona. Os outros sete picos dos flavonóides correspondem a derivados de flavonas. Os picos 3, 6 e 7 apresentaram um espectro de UV idêntico com  $\lambda_{\max}$  a 388 nm, o que evidencia que eles derivam da mesma aglicona. Os picos 3 e 6 tiveram o mesmo ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a m/z 563 produzindo um fragmento iónico de MS<sup>2</sup> principal a m/z 431 (-132 u.m.a., perda de pentose) e fragmentos menores a m/z 443 (perda de 120 u.m.a, características das *C*-hexosil flavonas) (Ferreret *et al*, 2003), 311 (-132-120 u.m.a.) e 269 (-132-162 u.m.a., perda de pentose e hexose; apigenina). A presença de apigenina como aglicona foi também comprovada pelos espectros UV dos picos com  $\lambda_{\max}$  a 338 nm. A fragmentação padrão desses mesmos picos sugere que os compostos possuem dois resíduos glucosilo, um hexósido e um pentósido, *C*- e *O*-ligados respectivamente em diferentes posições da aglicona. O fragmento [(M-H)-120]<sup>-</sup> é mais abundante em derivados 6-*C*-glucosil do que em derivados 8-*C*-glucosil: Além disso, observa-se normalmente outro fragmento iónico [(M-H)-90] em 6-*C*-glucosil flavonas (Ferreret *et al*, 2007). Portanto, a ausência deste último ião e a abundância do primeiro podem indicar que o hexósido estaria localizado na posição 8-*C*. Em relação ao resíduo *O*-pentósido, a existência de dois picos (3 e 6) com as mesmas características de massa em diferentes tempos de eluição poderia sugerir uma substituição em diferentes locais da aglicona, ex, o grupo hidroxilo nas posições 5- e 7-. Como a posição mais provável

para a substituição seria o grupo hidroxilo na posição 7- (Ferrerres *et al.*, 2011), o pico 3 (maioritário) foi identificado como apigenina-8-*C*-hexósido-7-*O*-pentósido e o pico 6 como apigenina-8-*C*-hexósido-5-*O*-pentósido. As diferenças estruturais entre eles podem também ser atribuídas à presença de diferentes resíduos de açúcar em cada um, apesar desta possibilidade ser menos provável já que os mesmos açúcares de substituição são geralmente encontrados numa determinada planta. O pico 7 apresentou um ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 605, 42 u.m.a. maiores que os compostos 6 e 7 que partilham padrões de fragmentação e espectros de UV. A perda de 42 u.m.a. pode corresponder a um resíduo acetilo e sugere que este composto é um derivado acetilo do pico 3 (ao invés do pico 6 minoritário). O fragmento a *m/z* 545 (-60 u.m.a.) pode resultar da perda parcial de *C*-hexósido (Ferrerres *et al.*, 2003). A perda simultânea dos resíduos de pentósido e acetilo, confirmando pelo fragmento a *m/z* 431 (-132-42 u.m.a.), pode sugerir que o resíduo de acetilo está localizado na pentose em vez da hexose, mas o fragmento a *m/z* 311 (associado a acetil-apigenina) pode também sugerir que o acetilo está ligado à aglicona em vez de localizado na pentose. Logo, este composto foi indentificado como um derivado acetilado de apigenina-*C*-hexósido-*O*-pentósido.

Os picos 4 e 5 apresentaram os mesmo ião pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 593, que originou dois fragmentos iónicos MS<sup>2</sup> a *m/z* 299 e 284, os mesmos dois fragmentos e abundâncias semelhantes em modo negativo aos descritos por Waridel *et al.* (2001) como característicos de *C*-glucósidos de luteolina. Além disso, os espectros UV dos picos ( $\lambda_{\max}$  a 342-346 nm) foram coerentes com derivados da luteolina. Portanto, de acordo com os seus iões pseudomoleculares, os picos 4 e 5 foram identificados como *C*-hexósido-ramnósidos de luteolina mas, devido à falta de outros fragmentos iónicos que suportariam esta identificação, não foi possível atribuir as posições dos açúcares e os compostos de glucolisação; assim, os picos 4 e 5 foram identificados como hexósido-ramnósidos de luteolina indefenidos. Os iões pseudomoleculares dos picos 8 e 9 tiveram 42 u.m.a. maiores que os picos 4 e 5, tendo também características de fragmentação similares, o que permitiu uma tentativa de identificação como derivados acetilados de luteolina. Finalmente, a partir do seu espectro MS, o pico 2 foi identificado como hexósido de triptofano. Este composto não foi quantificado e não é um composto fenólico, mas sim um aminoácido aromático que foi também extraído nas condições descritas (Aguilera *et al.*, 2010; Dueñas *et al.* 2004). A sua presença nas linhas pode ser de resíduos provenientes das sementes a partir das quais foram germinadas; durante o processo de germinação, as enzimas endógenas são activadas e as enzimas relacionadas

com os compostos fenólicos (hidrolases e polifenoloxidasas) levam à libertação deste aminoácido aromático dos ácidos fenólicos encontrados nas sementes (López-Amorós *et al*, 2006).

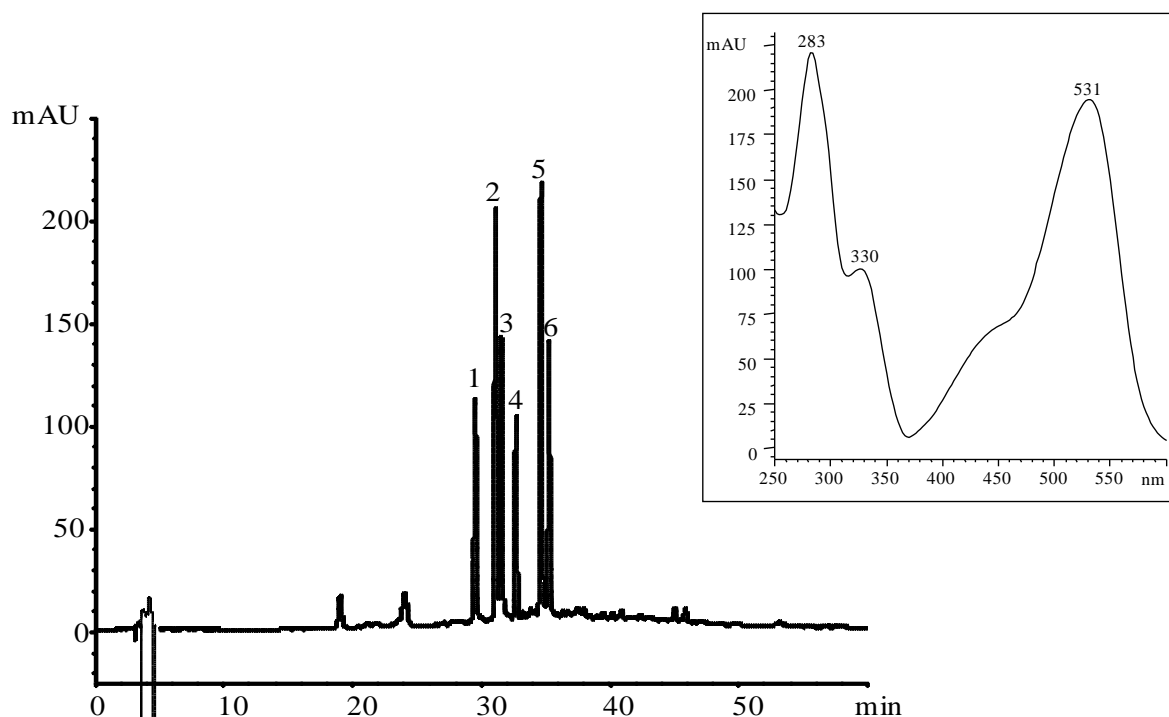
Somente na linha A foram encontradas antocianinas, o que pode explicar a sua coloração pigmentada (Figura 17). Foram detectados seis compostos identificados como antocianinas, com base nos seus espectros UV-visível, apesar dos baixos níveis presentes nas amostras e da sobreposição na corrida de HPLC com outros compostos maioritários, não terem permitido um espectro de absorção e de massa nítido. As características analíticas e a tentativa de identificação destes compostos estão descritas na Tabela 11, assim como as concentrações obtidas na linha A, expressas em  $\mu\text{g}/\text{Kg dw}$ . Todos mostraram um “ombro” aos 316-330 nm na região do UV do seu espectro de absorção, sugerindo que serão antocianinas aciladas com ácidos hidroxinâmicos. A título de exemplo, apresenta-se o espectro do pico 4 correspondente à antocianina detectada em maior quantidade (Figura 22).

**Tabela 11.** Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na zona do visível ( $\lambda_{\text{max}}$ ), dados dos espectros de massa, identificação provisória e concentração das antocianinas na linha A de coentro.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Iões Moleculares $[\text{M-H}]^+$ (m/z)	$\text{MS}^2$ (m/z)	Identificação provisória	Quantificação (mg/Kg, dw)
1	29,3	324sh/534	817	287(100)	3- <i>O</i> -sinapoilglucósido-5- <i>O</i> -glucósido de cianidina	$0,78 \pm 0,01$
2	31,22	330sh/530	787	287(100)	3- <i>O</i> -feruloil glucósido-5- <i>O</i> -glucósido de cianidina	$1,40 \pm 0,01$
3	31,65	316sh/528	757	287(100)	3- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil glucósido-5- <i>O</i> -glucósido de cianidina	$0,95 \pm 0,01$
4	32,74	324sh/532	831	301(100)	3- <i>O</i> -sinapoilglucósido-5- <i>O</i> -glucósido de peonidina	$0,82 \pm 0,01$
5	34,75	330sh/531	801	301(100)	3- <i>O</i> -feruloil glucósido-5- <i>O</i> -glucósido de peonidina	$1,70 \pm 0,01$
6	35,35	319sh/530	771	301(100)	3- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil glucósido-5- <i>O</i> -glucósido de peonidina	$1,08 \pm 0,00$
<b>Total antocianinas</b>						<b><math>6,71 \pm 0,36</math></b>

A identificação dos compostos foram determinadas a partir dos seus iões moleculares e dos fragmentos iónicos únicos  $\text{MS}^2$  correspondentes à aglicona. Os picos 1, 2 e 3 eram antocianinas de cianidinas (fragmentação iónica a m/z 287), e as suas massas eram concordantes com compostos com duas hexoses e resíduos de sinapoilo (pico 1), feruloilo (pico 2) ou cumaroilo (pico 3). As características cromatográficas e espectrais do pico 3 eram também coerentes com a 3-*O*-cumaroilglucósido-5-*O*-

glucósido de cianidina da nossa base de dados, o que permitiu uma tentativa de identificação deste composto. Por analogia com ele, os picos 1 e 2 foram identificados como 3-*O*-sinapoil glucósido-5-glucósido de cianidina e 3-*O*-feruloilglucósido 5-*O*-glucósido de cianidina. Foi feito um raciocínio semelhante para as antocianinas 4, 5 e 6 que foram identificados como derivados de peonidina com o mesmo padrão de acilação dos picos 1, 2 e 3. O 3-*O*-feruloilglucósido-5-*O*-glucósido de peonidina foi a antocianina maioritária encontrada nesta amostra (1,70 µg/Kg dw). Contudo, as identidades sugeridas não combinam totalmente com as suas ordens relativas de eluição; seria expetável que os derivados feruloilo eluíssem depois dos derivados equivalentes de *p*-coumaroilo, que teoricamente são mais polares; assim as identidades atribuídas devem ser vistas como tentativas de identificação.



**Figura 22.** Perfil cromatográfico individual das antocianinas da linha A de coentro, registado a 520 nm (A) e espectro UV do pico 5 (B).

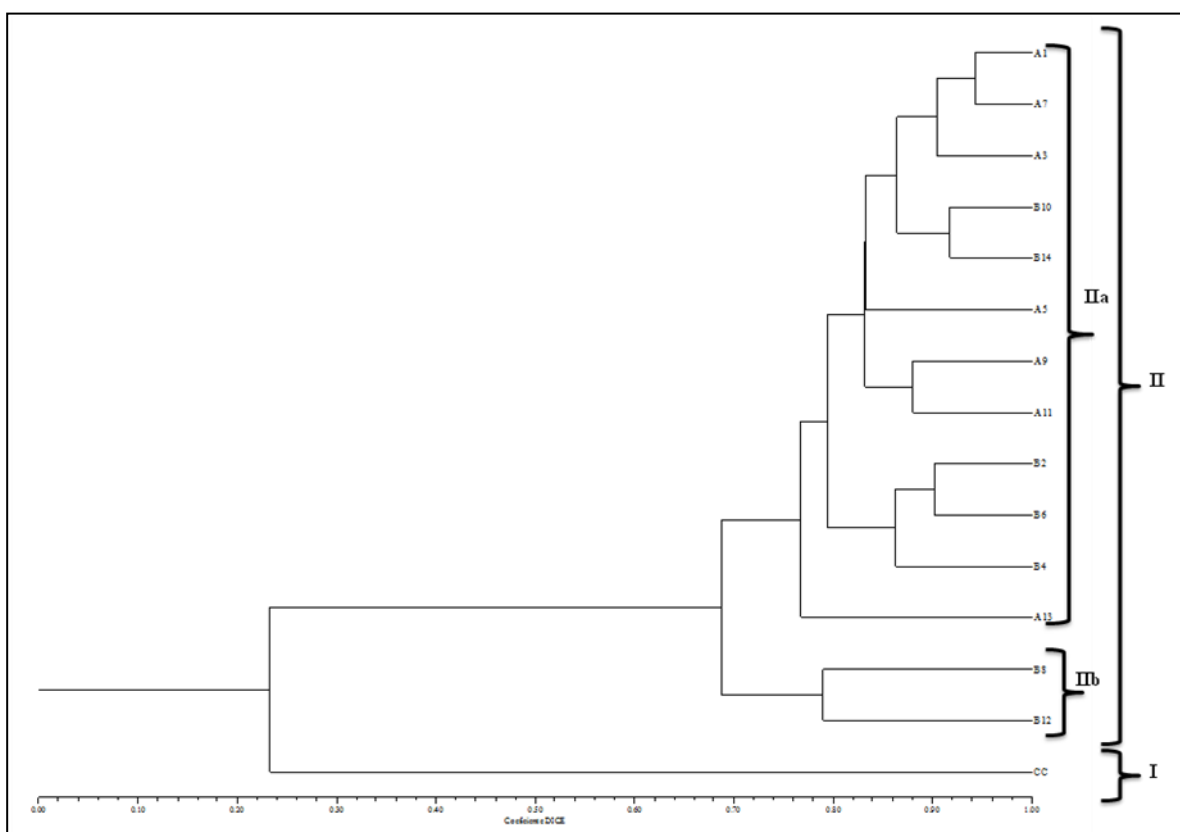
O metabolismo secundário pode responder ao stresse oxidativo e à produção de radicais livres, levando à acumulação de diferentes compostos nas amostras crescidas *in vitro* ou *in vivo*. De facto, as partes aéreas das amostras *in vivo* e as linhas obtidas *in vitro* apresentam perfis diferentes de compostos fenólicos, o que está certamente relacionado com factores genéticos mas também com as condições de crescimento que

conduzem a diferentes condições de stresse oxidativo e, conseqüentemente a respostas diferentes em termos de produção de metabolitos secundários. As sementes apresentaram apenas ácidos fenólicos (e não flavonóides) e em muito menores concentrações. Isto é uma evidência para metabolismos diferentes em cada parte da planta, sendo menor o metabolismo secundário das sementes.

Tal como discutido na secção anterior, as amostras de coentro crescidas *in vivo* (partes aéreas) demonstraram a melhor actividade antioxidante e a maior concentração de fenóis totais. Esses resultados estão também em concordância com os valores mais altos de compostos fenólicos totais (obtidos por análise cromatográfica dos compostos individuais) encontrados nessas amostras. Até ao momento, não havia informação disponível sobre a composição fenólica de sementes de coentro, nem de amostras obtidas por cultura *in vitro*. Havia apenas alguns trabalhos em amostras de folhas de coentro do Brasil (Melo *et al*, 2005), Dinamarca (Justesen & Knuthsen, 2001) e Índia (Nambiar *et al*, 2010), mas esses autores aplicaram metodologias de extracção e detecção diferentes, que não permitem uma comparação adequada dos resultados. As amostras de folhas de coentro da Índia (Nambiar *et al*, 2010) parecem ser ricas em quercetina, e as amostras da Dinamarca (Justesen & Knuthsen, 2001) só apresentaram este composto. Nas amostras estudadas no presente trabalho, os derivados de quercetina são também os compostos maioritários nas partes aéreas obtidas *in vivo*. No entanto, os ácidos fenólicos foram descritos como maioritários em amostras de Brasil (Melo *et al*, 2005), o que pode dever-se à diferente técnica de extracção aplicada e também à diferente técnica de detecção (cromatografia gasosa e cromatografia em camada fina).

### 3.4 Análise molecular e variabilidade intraspecífica das amostras obtidas *in vitro*

Os resultados da análise molecular realizada por ISSR, pode ser observada na Figura 23, onde está representado o dendograma obtido por análise de *clusters* dos 15 *primers* (listados no Anexo A3), utilizando o algoritmo de Dice baseado na associação média de UPGMA nos 14 indivíduos de coentro cultivados *in vitro*, e no indivíduo de coentro comercial (CC).

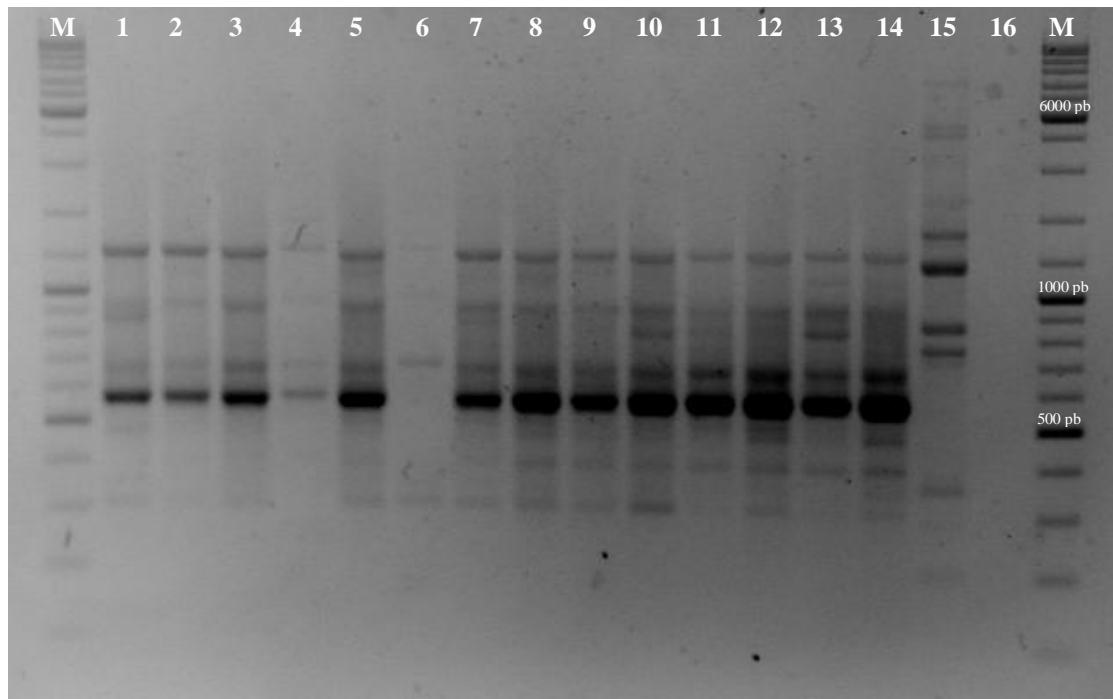


**Figura 23.** Dendograma obtido por análise de *clusters* dos 15 *primers*, utilizando o algoritmo do coeficiente de Dice e a associação média (UPGMA) da amostra de coentro comercial (CC) e dos 14 indivíduos de coentro cultivados *in vitro* (*clusters* I e II) e comparando apenas os 14 indivíduos de coentro *in vitro* (*cluster* IIa e *cluster* IIb).

Numa primeira abordagem à análise do dendograma, podemos ver claramente a formação de dois *clusters* distintos. O *cluster* I correspondente ao coentro *in vivo* e o *cluster* II, formado pelos 14 indivíduos cultivados *in vitro*. O coeficiente de Dice entre estes dois *clusters* é de apenas  $\pm 0,25$ , o que indica um grau de semelhança muito baixo. Esta variação tão acentuada entre o coentro utilizado com controlo externo os coentros *in vitro* pode ser explicada pelo facto de nesta espécie existir uma grande variedade intraespecífica, não só verificada por caracteres meramente fenotípicos (Diedrichsen, 1996), mas por variações moleculares como pode ser visto em López *et al* (2008).

Como foi já descrito anteriormente, a variabilidade em termos de voláteis, compostos antioxidantes e actividade antioxidante, separa estes dois grupos (*in vivo* e *in vitro*) como se pode verificar em termos também moleculares. Comparando somente os indivíduos cultivados *in vitro*, temos a formação de dois clusters distintos, cluster IIa e cluster IIb que apresentam um índice de similaridade superior a 0,65 como se pode ver na Figura 23.

Em termos gerais verifica-se que, apesar de as linhas (A e B) terem sido agrupadas segundo as características fenotípicas, no dendograma não se formam estes mesmos grupos, ou seja, os *clusters* obtidos através da análise molecular não estão de acordo com a existência de características fenotípicas iguais entre indivíduos de linhas distintas. Este facto indica que as características fenotípicas pelas quais os indivíduos obtidos *in vitro* foram separados não revelam uma maior proximidade genética entre os mesmos. Os marcadores moleculares usados no presente trabalho (ISSR- *Inter simple sequence repeat*) não conseguem discriminar com o grau de separação que seria esperado. O cluster IIb é constituído pelos indivíduos B4 e B6, tendo como única característica distinta folhas grandes expandidas e folhas pequenas não expandidas, respectivamente, apresentando um grau de similaridade de  $\pm 0,80$ , querendo dizer que a maioria das bandas obtida nestes dois indivíduos seriam iguais. Na Figura 24, está representado um gel de electroforese com produtos de amplificação após PCR com o primer 899.



**Figura 24.** Gel de eletroforese após amplificação com primer 899. M-Marcador molecular de 10000bp; 1- Indivíduo A1; 2-Indivíduo A2; 3-Indivíduo A3; 4- Indivíduo A4; 5- Indivíduo A5; 6- Indivíduo A6; 7- Indivíduo A7; 8- Indivíduo B1; 9- Indivíduo B2; 10- Indivíduo B3; 11- Indivíduo B4; 12- Indivíduo B5; 13- Indivíduo B6; 14- Indivíduo B7; 15- Amostra de coentro *in vivo*; 16-Controlo negativo.

Nesta imagem do gel pode-se verificar a existência de bandas semelhantes entre os indivíduos B4 (nº11) e B6 (nº13), verificando-se também que a amostra de coentros *in vivo* (nº15) é completamente diferente em termos de amplificação de bandas em comparação com os restantes indivíduos, e como seria de esperar no controlo (nº16) não houve qualquer amplificação o que significa a inexistência de bandas inespecíficas provocadas pela contaminação das amostras.

No dendograma pode-se ainda verificar a existência do *cluster* IIa que engloba a maioria dos indivíduos cultivados *in vitro*, tendo um índice de similaridade de  $\pm 0,80$ . Não há qualquer espécie de padrão na distribuição dos indivíduos ao longo deste *cluster*, havendo sim a formação de *clusters* entre eles, com um índice de similaridade superior a 0,90, o que significa que as amostras são muito semelhantes entre si. No entanto, as características fenotípicas segundo as quais foram agrupados não explicam a formação destes pequenos *clusters*. Em última instância significa que o lote de sementes, a partir do qual foram cultivados e crescidos *in vitro* estas linhas A e B (e consequentemente os 14 indivíduos), apresenta uma grande variabilidade. Estes resultados foram também descritos por López *et al* (2008), após a análise do *cluster*

obtido entre 60 populações de coentro com recurso a marcadores AFLP. Estas populações tinham sido também separadas e analisadas fenotipicamente por Diederichsen (1996), não tendo López *et al* obtido qualquer correspondência entre os grupos separados fenotipicamente e o *cluster* obtido através da análise molecular. Novamente, estes resultados podem ser explicados pela grande variedade intraespecífica em *Coriandrum sativum*, que pode não estar directamente relacionada com factores genéticos agrupáveis através de ISSR ou AFLP.

# C onclusão



#### 4. Conclusão

Desde a descoberta da capacidade de totipotência das células vegetais que a cultura *in vitro* se tornou uma ferramenta essencial para o estudo e produção de metabolitos secundários, entre outras aplicações. Utilizando várias combinações de fitorreguladores podem ser obtidas diferentes partes da planta em estudo nomeadamente, folhas, flores ou mesmo células indiferenciadas, *calli*.

A cultura *in vitro* de coentro foi realizado em meio MS suplementado com 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l BAP e 0,9% ágar, ao contrário de outros autores que utilizaram meios distintos, mas que não conseguiram culturas com estabilização fenotípica durante tanto tempo (Kataeva & Popowich, 1993; Steward *et al* 1969). Este facto pode ser explicado, realmente, pelo uso de fitorreguladores e meios basais distintos. A variação fenotípica encontrada entre as duas linhas obtidas neste estudo, coloração púrpura presente na linha A (mas não na linha B), vai de encontro a outros estudos desenvolvidos por Diederichsen (1996) que descreveram uma variação intraespecífica do coentro provocada pela acumulação de antocianinas. No entanto, parecem não haver estudos sobre a obtenção *in vitro* de uma linha com o mesmo comportamento fenotípico da linha A, obtida no presente trabalho. Apesar de ser notório que a linha B cresceu mais nas primeiras semanas de cultura e de ter apresentado uma melhor relação massa seca/massa fresca, em comparação com a linha A, teve uma RGR mais baixa significando isto que, em termos de massa, a linha B pode acumular mais água nos seus tecidos não formando mais biomassa, para além de na última semana do seu crescimento ter sofrido um declínio bastante acentuado. Pelo contrário, a linha A manteve um ritmo de crescimento bastante mais estável e apresentou também uma RGR mais elevada. Estes resultados sugerem que a produção de antocianinas (metabolitos secundários) pela linha A, pode limitar o crescimento no princípio do ciclo de micropropagação devido ao redireccionamento de esqueletos de carbono e energia para a acumulação de metabolitos secundários em detrimento do desenvolvimento de tecidos e do próprio metabolismo primário. As condições inerentes à cultura *in vitro* podem ter despoletado níveis de stresse oxidativo distintos nas duas linhas que, por sua vez, desencadearam respostas metabólicas diferentes, nomeadamente a produção e acumulação de antocianinas na linha A, o que a pode tornar uma fonte interessante destes metabolitos secundários. Os metabolitos secundários desempenham um papel importante na vida das plantas, evoluindo consoante as suas condições externas e

internas e podendo, assim, a sua composição ser alterada por vários factores, bióticos e abióticos.

Apesar do comportamento fenotípico específico da linha A, o perfil de voláteis foi quantitativa e qualitativamente muito similar ao da linha B. Notório é o facto da composição de voláteis das plantas crescidas *in vitro* ser qualitativamente similar aos voláteis das sementes apesar de, quantitativamente, as diferenças serem evidentes e muito diferentes das partes aéreas obtidas em condições *in vivo*. Isto pode indicar uma grande variabilidade intraespecífica entre as linhas obtidas *in vitro* e as partes aéreas *in vivo*. O composto maioritário nas sementes foi o linalol, como já descrito em outros estudos anteriores e que o referem como um dos compostos voláteis mais importantes devido à sua acção na manutenção da qualidade do sabor de algumas plantas (Lewinsohn *et al*, 2001). A acção biológica dos compostos voláteis assenta na citotoxicidade, fototoxicidade, agente mutagénico nuclear e citoplasmático, carcinogénico, podendo ter propriedades antimutagénicas segundo Bakkali *et al* (2008). Nas linhas A e B, os compostos maioritários foram hidrocarbonetos monoterpénicos e sesquiterpenos oxigenados nomeadamente o  $\beta$ -felandreno, terpinoleno,  $\beta$ -sesquifelandreno e  $\alpha$ -felandreno. O  $\beta$ -elemeno foi também encontrado no perfil de voláteis das linhas A e B apesar de numa percentagem muito baixa. Este composto tem vindo a ganhar muita importância na área da medicina pela sua capacidade indutora de apoptose das células cancerígenas, tendo sido estudado por Zhu *et al* (2011) na inibição da proliferação do glioblastoma humano.

O perfil de compostos lipofílicos, maioritariamente antioxidantes, das amostras obtidas *in vivo* e *in vitro* foi, genericamente, diferente. As linhas A e B revelaram ausência de  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ - e  $\delta$ -tocoferóis, um decréscimo em  $\alpha$ -tocoferol, mas um aumento em  $\gamma$ -tocoferol e clorofilas em comparação com as amostras obtidas *in vivo*. Curiosamente, em trabalhos prévios foi também observado um aumento dos níveis de  $\gamma$ -tocoferol em micélio de fungos ectomicorrízicos produzidos *in vitro*, quando comparado com os seus corpos de frutificação (Reis *et al*, 2011). Globalmente, a concentração de compostos lipofílicos foi mais elevada nas amostras obtidas *in vitro*, principalmente na linha A. As amostras crescidas *in vivo* demonstraram maior actividade antioxidante, provavelmente devido à concentração mais elevada de compostos hidrofílicos, maioritariamente antioxidantes, como açúcares, fenóis, flavonóis e antocianinas. Além disso, a linha A mostrou ser mais rico em pigmentos como as antocianinas e o licopeno.

De uma forma geral, as amostras de coentro obtidas *in vivo* e *in vitro* podem ser consideradas fontes ricas de flavonóides. Estes fitoquímicos têm sido usados para modificar a biossíntese dos eicosanóides (respostas anti-prostanóides e anti-inflamatórias), para proteger lipoproteínas de baixa densidade LDL da oxidação (o que previne a formação da placa aterosclerótica) e promovem o relaxamento da musculatura lisa cardiovascular (efeitos anti-hipertensivos e anti-arrítmicos), tendo também propriedades antivirais e anticarcinogénicas (Middleton *et al.*, 2005). Foi também descrito que o coentro tem propriedades quelantes, sendo um efetivo agente farmacêutico na remoção de metais pesados (Nambiar *et al.*, 2010). Apesar das quantidades de antocianinas presentes no linha de coentro A serem relativamente baixas (concentração total de antocianinas 6,71 µg/kg dw) comparados com outros flavonóides, tem vindo a ser demonstrado que estes compostos têm também vários efeitos nos vasos sanguíneos, plaquetas e lipoproteínas, tendo a capacidade de diminuir doenças coronárias, assim como uma grande variedade de outras actividades biológicas, incluindo actividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-carcinogénica (Mazza, 2007). Assim sendo, a presença de antocianinas valoriza o potencial fitoquímico das amostras.

Em termos moleculares observou-se uma diferença significativa entre os coentros cultivados *in vitro* e as partes aéreas obtidas *in vivo*, apresentando um índice de similaridade menor que 0,30. No entanto, relativamente às linhas obtidas *in vitro* (linhas A e B) não foram observadas diferenças significativas entre as mesmas, apesar dos resultados revelarem alguma variedade genética presente no lote de sementes a partir do qual foram originadas. De uma maneira geral, os agrupamentos obtidos pela análise molecular não estão de acordo com a separação estabelecida com base nos traços fenotípicos, como já tinha sido observado por López *et al.* (2008).

Apesar das diferenças encontradas entre as linhas obtidos *in vitro* serão necessários mais estudos para compreender as condições que conduzem às diferenças fenotípicas desenvolvidas nas mesmas. Contudo, a cultura *in vitro* pode ser usada para explorar novas potencialidades industriais, farmacêuticas e medicinais, através da produção de metabolitos secundários nomeadamente, óleos essenciais, flavonas, flavonóis e antocianinas.

# **R**eferências bibliográficas



## 5. Referências bibliográficas

- Abidi SL (2000) Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants, *J. Chromatog. A*, 881, 197-216.
- Agarwal M, Shrivastava N, Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their application in plant sciences, *Plant Cell. Rep.*, 27, 617-631.
- Aguilera Y, Dueñas M, Estrella I, Hernández T, Benitez V, Esteban RM, Martín-Cabrejas AM (2010) Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of pardina lentil as affected by industrial dehydration. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10101–10108.
- Aharoni A, Galili G (2011) Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22, 239-244.
- Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A (2008) Indian medicinal herbs as source of antioxidants. *Food Res. Int.*, 41, 1-15.
- Alonso-Salces R.M., Guillou C., Berrueta L.A (2009). Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision induced dissociation and tandem mass spectrometry on a tripe quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Mass Spectr.*, 23, 363-383.
- Amarowicza R., Peggb RB, Rahimi-Moghaddamc P, Barld BL, Weilc JA (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, 84, 551–562.
- Anilakumar KR, Nagaraj NS, Santhanam K (2001) Effects of coriander seeds on hepachorocyclohexane induced lipid peroxidation in rat liver. *Nutr. Res.*, 21, 1455-1462.
- Bakkali F., Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446-475.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191-203.
- Begnami AF, Duarte MCT, Furletti V, Rehder VLG (2010) Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chem.*, 118, 74–77.

- Berker KI, Güçlü K, Tor İ, Apak R (2007) Comparative evolution of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165.
- Bertini CHM, Pinheiro EAR, Nóbrega GN, Duarte JML (2010) Desempenho agrônômico e divergência genética de genótipos de coentro, *Revista Ciência Agrônômica*, 41, 409- 416.
- Bewley JD, Black M (1994) Seeds- Physiologi of development and germination, Second Edition, *Plenum Press*, New York.
- Bhandari MM, Gupta A (1991) Variation and association analysis in coriander, *Euphitica*, 58, 1-4.
- Bhuiyan NI, Begum J, Sultana M (2009) Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh J Pharmacol.*, 4, 150-153.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Botan.*, 91, 179-194.
- Bohra L, Zoghalmi N, Lamine M, Kouki K, Ghorbel A, Mougou A (2011) RAPD-based assessment of genetic diversity among annual caraway (*Carum carvi*) populations, *Eur. J. Bioasai.*, 5, 37-47.
- Bondet V, Brand-Williams W & Berset C (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using DPPH free radical method, *Lebenson Wiss Technol.*, 30, 609-615.
- Bussell JD, Waycott M, Chappill JA (2005) Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference, *Persp. Plant Ecol. Evol. Syst.* 7, 3-26.
- Cantore P, Iacobellis NS, Marco A, Capasso F, Senatore F (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7862-7866.
- Cavagnaro PF, Chung SM, Manin S, Yildiz M, Ali M, Alessandro MS, Iorizzo M, Senalik DA, Simon PW (2011) Microsatellite isolation and marker development in carrot genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across. *Apiaceae*, doi: 10.1186/1471-2164-12-386.
- Chen W, Viljoen AM (2010) Geraniol — A review of a commercially important fragrance material, *South African J. Botan.*, 76, 643–651.

- Coelho MT (1999) Influência da concentração de CO<sub>2</sub> na aclimatização de plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*. *Master Thesis*, Universidade de Évora, Portugal.
- Council of Europe (COE) (2007), European Directorate for the quality of medicines. *European Pharmacopeia 6<sup>th</sup> Edition*. Strasbourg.
- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber S, Duke JA, Brielmann HL (2006) Natural products from plants; Second Edition, *Taylor and Francis*, UK.
- Daly T, Jiwan MA, O'Brien NM (2010) Carotenoid content of commonly consumed herbs and assessment of their bioaccessibility using an *in vitro* digestion model. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65, 164-169.
- Diederichsen A (1996) Coriander, *Coriandrum Sativum* L., *IPGRI*, Gatersleben.
- Dodds JH, Roberts JW (1985) Experiments in plant tissue culture, Second edition, *Cambridge University Press*, USA.
- Dueñas M, Estrella I, Hernández T (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 116–123.
- Ellis BE (1994) Genetic engineering of plant secondary metabolism, *Rec. Adv. Phytopatol.*, 28, 368.
- Farmacopeia Portuguesa VIII (CPF), 2005. *Ed. Infarmed*, Lisboa.
- Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Valentão P, Tomás-Barberán FA (2007) Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. A*, 1161, 214-223.
- Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Vinholes J, Grosso C, Valentão P, Andrade PB (2011) Approach to the study of C-glycosyl acylated with aliphatic and aromatic acids from *Spergularia rubra* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Mass Spec.*, 25, 700-712.
- Ferreres F, Silva BM, Andrade PB, Seabra RM, Ferreira MA (2003) Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.*, 14, 352-390.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile compounds and essential oils. *Flav. Frag. J.*, 23, 213-226.

- García-Marino M, Hernández-Hierro JM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT (2010) Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Anal. Chim. Acta*, 660, 134-142.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM, Thorpe T (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol*, 2, 272-289.
- Gaudeul M, Bottraud IT, Barjon F, Manel S (2004) Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, 92, 508-518.
- Gersbach PV, Wyllie SG, Sarafis V (2001) A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secondary structures, *Ann. Botan.*, 88, 521-525.
- Gil A, Fuente E, Lenardis AE, Pereira ML, Suárez SA, Bandoni A, Baren C, Lira PL and Ghersa CM (2002) Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2870–2877.
- Grosso C, Ferraro V, Figueiredo AC, Barroso JG, Coelho JA, Palavra AM (2008) Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chem.*, 111, 197–203.
- Guerra NB, Melo EA, Filho JM (2005) Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum Sativum* L.) etheric extract. *J. Food Compos. Anal.*, 18, 193-199.
- Guimarães R, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR (2010) Studies on chemical constituents and bioactivity of *Rosa micrantha*: An alternative antioxidants source for food, pharmaceutical or cosmetic applications, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 6277-6284.
- Hartmann T (2007) From waste products to echochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.
- Hazarika BN (2006) Morpho-physiological and adaptation *in vitro* culture plants, *Scien. Horti.*, 108, 105-120.
- Higashiyama T (2002) Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.*, 74, 1263-1269.
- Hopkins NG, Hüner NP (2004) Introduction to plant physiology, John Wiley & Sons editors, 3ªEd. USA, ISBN-0-471-37917-4.

- Huber DJ (2008) Suppression of ethylene responses through application of 1-methylcyclopropene: A powerful tool for elucidating ripening and senescence mechanisms in climacteric and nonclimacteric fruits and vegetables. *Horti. Sci.*, 43, 106-111.
- Ignat I, Volf I, Popa VI (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 126, 1821-1835.
- Illes V, Daood HG, Pernecki S, Szokonya L, Then M (2000) Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super- and subcritical conditions, *J. Supercrit. Flui.*, 17, 177-186.
- Isabella M, Lee BL, Lim MT, Koh W-P, Huang D, Ong CN (2010) Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chem.*, 120, 993-1003.
- Jump AS, Peñuelas J (2007) Extensive spatial genetic structure revealed by AFLP but not SSR molecular markers in the wind-pollinated tree, *Fagus sylvatica*. *Molec. Ecol.*, 16, 925-936.
- Justesen U, Knuthsen P (2001) Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem.*, 73, 245-250.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan RA (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177, 309-334.
- Kataeva NV, Popowich EA (1993) Maturation and rejuvenation of *Coriandrum sativum* shoot clones during micropropagation. *Plant Cell. Tiss. Org. Cul.*, 34, 141-148.
- Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.*, 48, 412-422.
- Kim SW, Park MK, Liu JR (1996) High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Plant Cell Rep.*, 15, 751-753.
- Klein BP, Perry AK (1982) Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *J. Food Sci.*, 47, 941-945
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Prod.*, 89, 217-233.
- Kroymann J (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14, 246-251.

- Kumar P, Gupta VK, Misra AK, Modi DR, Pandey BK (2009) Potential of molecular markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics J.*, 2, 141-162.
- Laguere M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lip. Resear.*, 46, 244-282.
- Lanfer-Marquez UM, Barros RMC, Sinnecker P (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.*, 38, 885-891.
- Lee ECM, Fossard RA (1974) The effects of various auxins and cytokins on the *in vitro* culture of stem and lignotuber tissue of *Eucalyptus Bancroftii* Maiden. *New Phytol.*, 73, 707-717.
- Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM (2003) Fragrance material review on linalool. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 943-964.
- Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson F, Matsui F, Tadmor Y, Nam KN, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky E (2001) Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-Linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol.*, 127, 1256-1265.
- Lobo A, Lourenço A (2007) Biossíntese dos produtos naturais, Coleção Ensino da Ciência e tecnologia, *IST press*, Lisboa.
- López-Amorós ML, Estrella I, Hernández T (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 277-283.
- López MD, Jordán MJ, Pascual-Villalobos MJ (2008) Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *J. Stor. Prod. Res.*, 44, 273-278.
- Lopez, PA, Widrlechner MP, Simon PW, Rai S, Boylston, TD, Isbell T, Bailey TB, Gardner CA, Wilson LA (2008), Assessing phenotypic, biochemical and molecular diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) germoplasm. *Genet. Res. Crop. Evol.*, 55, 247-275.
- Mahmoud SS, Croteau RB (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants, *Trends Plant Sci.*, 7, 366-373.
- Makunga NP, Jäger AK, Staden JV (2006) Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 86, 77-86.

- Manda KR, Adams C, Ercal N (2010) Biologically important thiols in aqueous extracts of spices and evaluation of their *in vitro* antioxidant properties. *Food Chem.*, 118, 589-593.
- Marero LM, Homma S, Aida K, Fujimaki M (1986) Changes in the tocopherol and unsaturated fatty acid constituents of spices after pasteurization with superheated steam. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 32, 131-136.
- Marriott PJ, Shellie R, Cornwell C (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatog. A*, 936, 1-22.
- Martin KP (2004) Efficacy of different growth regulators at different stages of somatic embryogenesis in *Eryngium foetidum* L. – A rare medicinal plant, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 40, 459–463.
- Martins D, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR (2011) Nutritional and *in vitro* antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. *Food Chem.*, 125, 488-494.
- Matkowski A (2008) Plant *in vitro* culture, for the production of antioxidants - A review. *Biotechnol Adv.*, 26, 548-560.
- Matasyoh JC, Maiyo ZC, Ngure RM, Chepkorir R (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chem.*, 113, 526–529.
- Mazza G (2007) Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanità*, 43, 369-374.
- Melo EA, Filho JM, Guerra NB (2005) Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *LWT*, 38, 15–19.
- Mendes MD, Lima AS, Trindade H, Correia AI, Barroso JG, Pedro LG, Figueiredo AC (2011) ISSR molecular characterization and leaf volatiles analysis of *Phittosporium unculatum* Vent. Naturalized in the Azores archipelago (Portugal). *Ind. Crops Prod.*, 33, 710-719.
- Mendes MD, Trindade H, Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG (2009) *Chaerophyllum azoricum* Trel. Grown in the Azores archipelago, Portugal: evaluation of the genetic diversity using molecular markers and comparison with volatile profiles, *Flav. Frag. J.*, 24, 259-264.
- Mendes MD, Trindade H, Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso (2009) Volatile and molecular characterization of two Portuguese endemic species: *Angelica dignescens* and *Melanoselium decipiens*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 37, 98-105.

- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2005). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52, 673-751.
- Milardović S, Iveković D, Grabarić BS (2006) A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Biochemistry.*, 68, 175-180.
- Millam S, Mitchell S, Craig A, Paoli M, Moscheni E, Angelini L (1997) *In vitro* manipulation as a mean for accelerated improvement of some new potential oil crop species. *Ind. Crops Prod.*, 6, 213-219.
- Misharina TA, Samusenko AL (2008) Antioxidant properties of essential oils from lemon, Grapefruit, Coriander, Clove and their mixtures. *App. Biochem. Microbiol.*, 45, 438-442.
- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.*, 130, 1036-1043
- Mohamed MA-H, Alsadon AA (2010) Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets, *Sci. Hort.*, 123, 295–300.
- Mohapatra H, Barik DP, Rath SP (2008) *In vitro* regeneration of medicinal plant *Centella asiatica*. *Biol. Plant.*, 52, 339-342.
- Moon JK, Shibamoto T (2009) Antioxidant assays for plant and food components *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1655-1666.
- Msaada K, Hosni K, Taarit BM, Chahed T, Kchouk ME, Marzouk B (2007) Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chem.*, 102, 1131–1134.
- Msaada K, Taarit BM, Hosni K, Hammami M, Marzouk B (2009) Regional and maturational effects on essential oils yields and composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. *Sci. Hort. Amsterdam*, 122, 116–124.
- Mulder-krieger TH, Verpoorte R, Svendsen AB, Scheffer JJC (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.*, 13, 85-154.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.

- Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2008) Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L.. *Sci. Hort.*, 118, 168–171.
- Nagata M, Yamashita I (1992) Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 39, 925–928.
- Nambiar VS, Daniel M, Guin P (2010). Characterization of polyphenols from coriander leaves (*Coriandrum sativum*), red amaranthus (*A. paniculatus*) and green amaranthus (*A. frumentaceus*) using paper chromatography: and their health implications. *J. Herb. Med. Toxicol.*, 4, 173-177.
- Natalia D, Eran P, Jonathan G (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Phys.*, 135, 1893-1902.
- Neffati M, Marzouk B (2008) Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Ind. Crop. Prod.*, 28, 137-142.
- Niki E (2010) Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.*, 49, 503-515.
- Oksman-Caldentey KM, Inzé D (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trend. Plant Sci.*, 9, 433–440.
- Ormeño E, Fernandez C, Mévy JP (2007) Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species, *Phytochemistry*, 68, 840-852.
- Pereira A (1999) SPSS-Guia prático de utilização de SPSS: Análise de dados para ciências sociais e psicologia, Segunda Edição, *Edi.Sil. Lda.*, Lisboa.
- Plunkett GM, Soltis DE, Pamela DS (1996) Evolutionary patterns in Apiaceae: Inference based on matk sequence data. *Syst. Bot.*, 21, 477-495.
- Potter TL (1996) Essential oil composition of cilantro. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1824–1826.
- Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS (2007) Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatog. A*, 1163, 2-24.
- Qiu FC, Kong H. (2004) Genetic variation in the endogenous and endemic species *Changium smynioides* (Apiaceae), *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 583-596.
- Quereshi SN, Anwar R, Kashif M & Ghafoor A (2009) Evaluation of winter vegetables for genetic divergence and characterization of genotypes. *Pak. J. Bot.*, 41, 1117-1126.

- Ramadan MF, Kroh LW, Morsel J-T (2003) Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass) crude seed oils and oil fraction. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6961-6969.
- Ramadan MF, Mörsel JT (2003) Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds. *Food Chem.*, 80, 197-204.
- Ramadan MF, Mörsel JT (2002) Oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit seeds. *Eur. Food Res. Technol.*, 215, 204-209.
- Ravi R, Prakash M, Bhat KK (2007). Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 367-374.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica.*, 118, 9-17.
- Reis FS, Ferreira ICFR, Barros L, Martins A (2011) A comparative study of tocopherols composition and antioxidant properties of *in vivo* and *in vitro* ectomycorrhizal fungi. *LWT*, 44, 820-824
- Rodrigues-Amaya DB (2010) Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *J. Food Compos. Anal.*, 23, 726-740.
- Roginsky V, Lissi EA (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in foods. *Food Chem.*, 92, 235-254.
- Rohlf JF (1992) NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Applied Bioest.* New York.
- Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY (2011) Food-derived peptide antioxidants: A review of their production, assessment and potential applications. *J. Funct. Foods*, 3, 229-254.
- Samojlik I, Lakic N, Mimica-Dukic N, Dakovic-Svajcer K, Bozin B (2010) Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum Sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8848-8853.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 2155-21175.
- Seigler DS (1998) Plant secondary metabolism, *Kluwer Academic*, USA, ISBN 0-412-01981-7.

- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular markers methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 5, 2540-2568.
- Sharma RK, Waakhlu AK (2001) Adventitious shoot regeneration from petiole explants of *heracleum candicans* wall. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 37, 794–797.
- Silva F, Ferreira S, Queiroz JA e Domingues FC (2011) Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Med Microbiol.*, doi: 10.1099/jmm.0.034157-0.
- Singh G, Kawatra A, Sehgal S (2001) Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. *Plant. Foods Hum. Nutr.*, 56, 359-364.
- Sneath PHA (1957) The application of computers in taxonomy. *J. Gen. Microbiol.*, 17, 201-226.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) The principals and practice of numerical classification. *Freeman*, São Francisco.
- Sriti J, Wannes WA, Talou T, Mhamdi B (2010) Lipid, fatty acid and tocol distribution of coriander fruit's different parts. *Ind. Crops Prod.*, 31, 294-300.
- Steward FC, Mapes MO e Ammirato PV (1969) Growth and morphogenesis in tissue and free cell culture. *Plant Phisio.*, 329, Academic Press.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalins and carotenoids, *The plant Jour.* 54, 733-749.
- Traber MG, Atkinson J (2003) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad. Biol. Med.*, 43, 4-15.
- Triest L (2008) Molecular ecology and biogeography of mangrove trees towards conceptual insights on gene flow and barriers: A review. *Aqua. Botan.*, 89, 138-154.
- Trindade H (2010) Molecular biology of aromatic plant and spices. A review. *Flav. Frag. J.*, 25, 272-281.
- Uma PK, Geervani P, Eggum BO (1993) Common Indian spices: nutrient composition, consumption and contribution to dietary value. *Plant. Foods Hum. Nutr.*, 44, 137-148.
- Wang Y, Kumar PP (2004) Heterologous expression of Arabidopsis ERS1 causes delayed senescence in coriander. *Plant Cell Rep.*, 22, 678–683.
- Wangensteen, H., Samuelsen, A.B. and Malterud, K.E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.*, 88, 293–297.

- Ward SM, Jasieniuk M (2009) Review: Sampling weedy and invasive plant populations for genetic diversity analysis. *Weed science*, 57, 593-602.
- Waridel P, Wolfender JL, Ndjoko K, Hobby KR, Major HJ, Hostettmann K (2001) Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoids isomers. *J. Chromatog. A*, 926, 29-41.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- Zhang W, Curtin C, Franco C (2002) Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary. *Enz. Microbiol. Tech.*, 30, 688-896.
- Zhu T, Xu Y, Dong B, Zhang J, Wei Z, Xu Y, Yao Y (2011)  $\beta$ -Elemene inhibits proliferation of human glioblastoma cells through the activation of glia maturation factor  $\beta$  and induces sensitization to cisplatin. *Oncol. Rep.*, 26, 405-13.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994), Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics.*, 20,176-183.
- Zoubiri S, Baaliouamer A (2010). Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. *Food Chem.*, 122, 1226–1228.

**A**nexos



## 6. Anexos

### A1. Meio MS (Murashige & Skoog)

Designação	Reagentes	Fórmula química	Concentração (mg/L)	Marca
<b>Macronutrientes</b>	Nitrato de amónia	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	Panreac (Espanha)
	Nitrato de potássio	$\text{KNO}_3$	1900	Merck (Alemanha)
	Cloreto de cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	Merck (Alemanha)
	Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	Merck (Alemanha)
	Fosfato de potássio dihidrogenado	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	Merck (Alemanha)
	Sódio-Férrico de tetra-acetato de etilenodiamina	$\text{FeNaEDTA}$	80	Merck (Alemanha)
	Mio-Inositol	cis-1,2,3,5-trans-4,6 -Cyclohexanehexol	10	Merck (Alemanha)
<b>Micronutrientes</b>	Iodeto de potássio	$\text{KI}$	0,83	Pronalab (México)
	Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	Merck (Alemanha)
	Sulfato de Manganésio tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	Merck (Alemanha)
	Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	Merck (Alemanha)
	Molibdato de sódio hidratado	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	Merck (Alemanha)
	Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	Merck (Alemanha)
	Cloreto de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Merck (Alemanha)
<b>Vitaminas</b>	Ácido Nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0,5	Merck (Alemanha)
	Piridoxina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0,5	Merck (Alemanha)
	Tiamina HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{67}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0,1	Merck (Alemanha)
	Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	20	Merck (Alemanha)
	Ácido ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	5	Merck (Alemanha)
<b>Fitorreguladores</b>	IBA (Ácido indolbutírico)	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$	0,1	Merck (Alemanha)
	BAP (6-benzilaminopurina)	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$	0,1	Fluka Chemic (Suíça)
<b>Outros</b>	Sacarose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	30	Fisher Scientific (RU)
	Agár	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9$	8	JMGS (Portugal)
	pH		5.5	

## *A2. Protocolo de extracção de DNA*

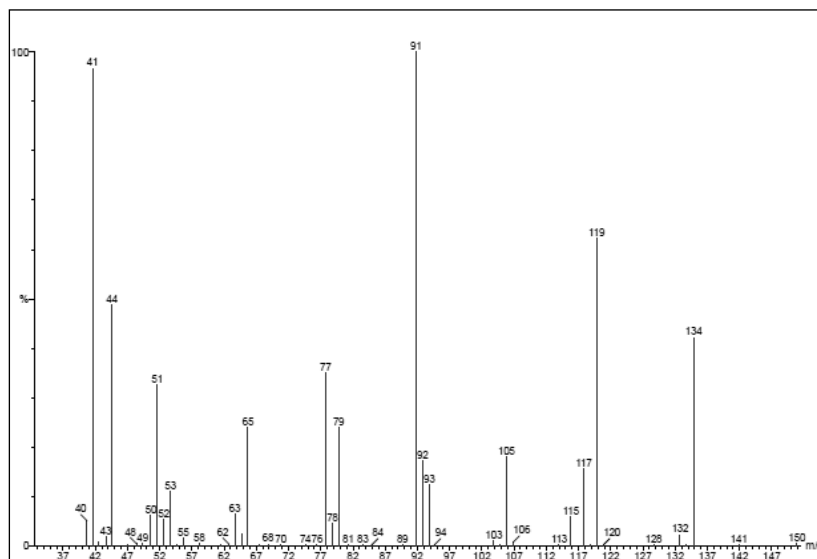
Macerou-se cerca de 100mg dos caules e folhas em azoto líquido e adicionou-se 500µL de Tampão CPL, 2µL de RNase (20mg/mL) e 10µL de β-mercaptoetanol. Misturou-se por inversão e incubou-se durante 15 minutos a uma temperatura de 65°C. Adicionou-se 800µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitando no vortex e posteriormente centrifugou-se durante 15 minutos a 10000g numa centrífuga (Sigma 2K15), à temperatura ambiente. Transferiu-se 300µL do sobrenadante para um novo tubo de centrífuga e adicionou-se 150µL de Tampão CXD e 300µL de etanol absoluto, misturando em vortex até obter uma mistura homogénea, onde houve formação de “novelos” de DNA. Numa coluna Hibind DNA colocou-se 100µL de Tampão de Equilíbrio e deixou-se repousar durante 4 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 20 segundos à velocidade máxima da centrífuga (13500g) e descartou-se o líquido acumulado no tubo colector. Na coluna lavada colocou-se a amostra de DNA incluindo o sedimento e centrifugou-se durante 1 minuto a 10000g para ligar o DNA, descartando o líquido do tubo colector. Adicionou-se 700µL de Tampão de Lavagem diluído em etanol a 100%, centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 10000g, descartou-se o líquido do tubo colector, e efectuou-se nova lavagem. Centrifugou-se novamente à velocidade máxima (13500g) durante 2 minutos para secar a amostra. Colocou-se a coluna num novo microtubo, adicionou-se 100µL de Tampão de Eluição previamente aquecido a 65°C durante 5 minutos, e centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto para eluir o DNA. Efectuou-se nova eluição com 100µL de Tampão de eluição. A concentração e qualidade do DNA foram analisadas por espectrofotometria num Nanodrop a 260nm e 280nm, usando-se 1µL de amostra. Estas foram diluídas a 10 µg.µL<sup>-1</sup> e armazenadas 4 °C.

*A3. Sequências nucleotídicas dos 25 primers utilizados nas análises de ISSRs.*

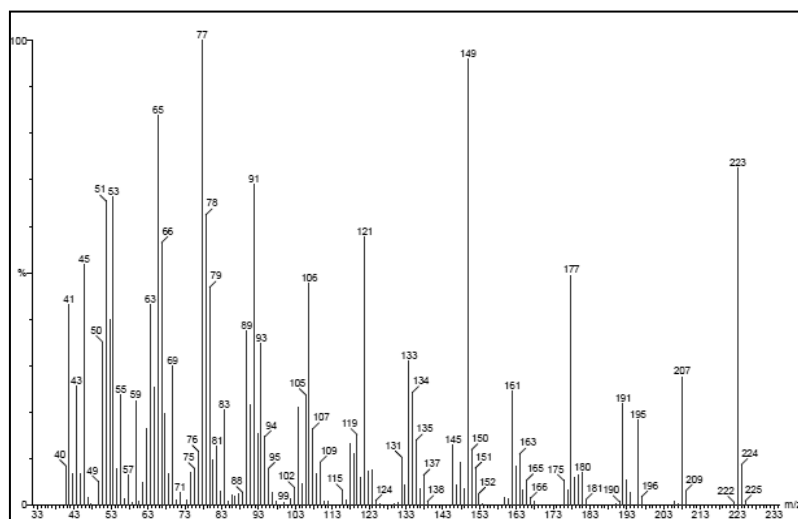
<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
823	TCTCTCTCTCTCTCC
825	ACACACACACACACT
826	ACACACACACACACC
827	ACACACACACACACG
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
846	CACACACACACACART
857	ACACACACACACACYG
858	TGTGTGTGTGTGTGRT
862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
880	GGAGAGGAGAGGAGA
892	TAGATCTGATATCTGAATTCCC
895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC
899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA
900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA
901	DHBCGACGACGACGACGA
903	BDBCACCACCACCACCAC
904	DDCCACCACCACCACCAC

## A4. Espectros de massa

### A4.1 Espectro de massa do composto UI A



### A4.2 Espectro de massa do composto UI B



*A5. Publicações em Congressos Internacionais*

*A6. Publicações em Revistas Internacionais*