



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Sistemas de propagação *in vitro* e análise de compostos da *Salicornia* spp. utilizando técnicas cromatográficas**

**Versão final após defesa**

**João Miguel Tavares Figueiredo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotechnologia**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Clayton De'Carli Debiasi  
Co-Orientador: Professor Luís António Paulino Passarinha

**Covilhã, junho de 2019**



Dedico à minha família e amigos próximos



# Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Clayton De'Carli Debiasi e ao Professor Doutor Luís António Paulino Passarinha por possibilitarem o desenvolvimento deste projeto. Agradeço toda a ajuda e conhecimento transmitido, sendo essencial para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço também todas as palavras de encorajamento e por acreditarem nas minhas capacidades.

Agradeço à Professora Doutora Eugenia Gallardo pela colaboração e partilha do seu conhecimento no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior pelo apoio e condições no desenvolvimento do projeto.

Agradeço à Universidade da Beira Interior, em especial, ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório pela partilha de conhecimento e apoio.

Um especial agradecimento aos amigos e família que sempre me apoiaram, especialmente aos meus pais, irmã e avô.



## Lista de poster

### I. *In Vitro* establishment for the micropropagation of sea asparagus (*Salicornia spp.*)

Figueiredo J.M.T., Lavoura L.M., Pinto R.F.V., Farinha N. Gonçalves J.C., Debiasi C.

XII Congresso f the Spanish Society of plant *in vitro* culture, Madrid (2017) (Anexo I)





## Resumo

A grande maioria das plantas existentes não tolera a presença de elevadas concentrações de sal no seu meio de crescimento, independente das condições edafoclimáticas, sendo essas designadas “plantas galicófitas”. Por outro lado, existem plantas que conseguem realizar todo o seu ciclo de crescimento e reprodução em ambientes com concentrações salinas elevadas, sendo as mesmas designadas por “plantas halófitas”. Ao longo da costa portuguesa, as plantas halófitas são frequentemente encontradas em locais com boa drenagem de água, como por exemplo, salinas, dunas e margens de bacias marítimas.

A *Salicornia spp.* é uma planta halófito também conhecida por espargo do mar, mede entre 25 a 35 cm e apresenta uma morfologia alongada. Esta planta tem vindo a ser descrita como benéfica para a saúde, uma vez que contém vitaminas A e C, assim como, cálcio, ferro, iodo, magnésio, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e sódio. À *Salicornia* estão associados/descritos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, sendo que esta planta também está relacionada com a prevenção de complicações cardiovasculares, como por exemplo a hipertensão.

Tendo em conta os benefícios do consumo da *Salicornia spp.*, tem sido crescente o interesse comercial e científico no estudo dos compostos e na multiplicação desta planta. Neste sentido, e apesar de já se encontrarem descritos alguns resultados relativos à multiplicação *in vitro* da *Salicornia spp.*, no desenvolvimento desta tese de mestrado, otimizaram-se os processos de multiplicação pelo método convencional e, pela primeira vez, foram realizados ensaios em Biorreatores de Imersão Temporária. Os resultados obtidos culminaram numa metodologia simples e eficiente de multiplicação *in vitro*, assim como de pré- aclimatização *ex vitro* da *Salicornia spp.* De seguida identificou-se e quantificou-se o ácido ferúlico, comparando o composto produzido pelas plantas oriundas da multiplicação *in vitro* com as plantas provenientes da fase de pré-aclimatização *ex vitro*. Para tal, foram realizados diferentes ensaios em diferentes fases do processo de multiplicação *in vitro* de plantas: **Desinfecção e Estabelecimento**, sendo o tratamento mais eficiente o ET4 (HgCl<sub>2</sub> a 10% durante 3 minutos); **Micropropagação pela técnica convencional**, analisando-se diferentes parâmetros nos quais se destaca o tratamento MCT17 (DMS com 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA + 513 µM NaCl) e a **Micropropagação pela técnica de biorreatores de imersão temporária**, alcançando-se o melhor desempenho no tratamento com MBT2 (DMS, 5 minutos de Imersão a cada 6 horas e 1 minuto de ventilação a cada 6 horas); **Pré- aclimatização ex vitro**, todos os ensaios obtiveram resultados positivos, não existindo diferenças significativas entre os mesmos.

Por último, quantificou-se o ácido trans-ferúlico existente em amostras provenientes da multiplicação *in vitro* e das amostras pré-aclimatizadas obtendo-se respetivamente 3,39±1,26 µg/mL e 4,17±3,48 µg/mL de ácido trans-ferúlico.

## Palavras chave

Ácido trans-ferúlico, *Biorreatores de imersão temporária*, *Salicornia* spp., Multiplicação *in vitro*.

# Abstract

The large majority of the existent plants does not tolerate large amounts of salt in their growth medium, regardless the soil and climate conditions, being this kind of plants called of “galiphocite plants”. However, there are plants that can perform all their growth and reproduction cycle in environments with high salt levels (being called halophytic plants). It is important to refer that across the Portuguese coast is very common to find this kind of plants near places with good drainage of water (like e.g. saline, dunes, banks of sea basins).

The *Salicornia* spp. is a halophytic also known as asparagus from the sea, measuring between 25 to 35 cm and presenting an elongated morphology. Moreover, it has been described as beneficial to health since present vitamins A and C as well as calcium, iron, iodine, magnesium, p-cumaric acid, trans ferulic acid and sodium. To *Salicornia* are linked antioxidants and anti-inflammatory effects also, this plant is related with the prevention of cardiovascular diseases.

Regarding the benefits of the *Salicornia* spp. consumption there are commercial and scientific interest in study the compounds and the multiplication process of this plant. Although now there are already described results from the *in vitro* multiplication of *Salicornia* spp., there are yet the need to optimize and complete this information. Concerning this, in this work there was optimized the *in vitro* multiplication conventional method. Moreover, for the first time, these plants were grown using Temporary Immersion Bioreactors which enabled in the production of a full methodology of *in vitro* multiplication and *ex vitro* pre-acclimatization of the *Salicornia* spp. After, the trans ferulic acid was identified, quantified and the amount of this acid produced by plants from *in vitro* multiplication and by plants from nature was compared.

To accomplish the above mentioned, there were performed several experiments in different phases of the *in vitro* multiplication process: disinfection and establishment, being the most efficient the treatment ET4 regimen (10% HgCl<sub>2</sub> for 3 minutes); Micropropagation using a conventional methodology, when different parameters *a* analyzed and compared the most relevant treatment was MCT17. Micropropagation using the temporary immersion bioreactors technique, the best performance was assigned to MBT2 treatment (DMS, 5 minutes every 6 hours in duration and 1 minute every 6 hours of ventilation); Pre-acclimatization *ex vitro*, all treatments were successful and there was no difference between treatments.

Finally, the trans-ferulic acid existing in the several *in vitro* and pre-acclimatized samples were quantified, respectively  $3.39 \pm 1.26$  µg/mL and  $4.17 \pm 3.48$  µg/mL of trans-ferulic acid.

## Keywords:

*In vitro* multiplication, Trans-ferulic acid, Temporary immersion bioreactors, *Salicornia* spp.

# Índice

Capítulo 1 .....	1
1. Introdução .....	3
1.1 Plantas halófitas .....	4
1.2 <i>Salicornia</i> .....	7
1.3 Ácido <i>trans</i> -ferúlico .....	9
1.4 Micropropagação <i>in vitro</i> .....	11
1.5 Modelos aplicados à propagação <i>in vitro</i> .....	13
1.5.1 Multiplicação pela técnica de micropropagação convencional.....	13
1.5.2 Multiplicação pela técnica de Biorreatores de imersão temporária .....	15
Capítulo 2 .....	17
2. Objetivos.....	19
Capítulo 3 .....	21
3. Materiais e Métodos .....	23
3.1 Material Vegetal .....	23
3.2 Ensaio para o estabelecimento asséptico <i>in vitro</i> .....	23
3.3 Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i> .....	24
3.3.1 Método de Micropropagação Convencional - Primeiro ciclo experimental .....	24
3.3.2 Método de Micropropagação Convencional- Segundo ciclo experimental .....	27
3.3.3 Método de Micropropagação Convencional com Meta-Topolin - Terceiro ciclo experimental.....	28
3.3.4 Método de Micropropagação por Biorreatores de Imersão Temporária .....	39
3.4 Ensaio de pré aclimatização <i>ex vitro</i> .....	31
3.5 Robustez .....	33
3.6 Quantificação do ácido <i>trans</i> -ferúlico.....	34
3.6.1 Instrumentação.....	34
3.6.2 Recolha e preparação do material vegetal .....	34
3.6.3 Procedimento de extração .....	34
3.6.4 Sistema cromatográfico e de detecção.....	34
Capítulo 4 .....	37
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1 Estabelecimento asséptico <i>in vitro</i> .....	39
4.2 Multiplicação <i>in vitro</i> .....	40
4.2.1 Método de micropropagação convencional - primeiro ciclo experimental.....	40
4.2.2 Método de micropropagação convencional - segundo ciclo experimental .....	47
4.2.3 Método de micropropagação convencional - segundo ciclo experimental (meta-topolin).....	50
4.3 Método de micropropagação por Biorreatores de Imersão Temporária .....	53
4.3.1 Comprimento dos explantes.....	53
4.3.2 Número de rebentos.....	54
4.3.3 Ausência/Presença de raiz .....	55

4.3.4 Robustez dos explantes em BIT's .....	56
4.4 Pré aclimatização <i>ex vitro</i> .....	57
4.4.1 Comprimento dos explantes .....	57
4.4.2 Peso Fresco da parte aérea .....	58
4.4.3 Peso fresco da Raiz .....	59
4.4.4 Robustez.....	60
4.5 Detecção e quantificação do ácido trans-ferúlico .....	61
4.5.1 Identificação dos analitos .....	61
4.5.2 Validação .....	62
4.5.3 Seletividade.....	62
4.5.4. Linearidade e curva de calibração.....	62
4.5.5 Precisão e exatidão.....	64
4.5.6. Aplicação do método em amostras reais .....	67
Capítulo 5 .....	71
5. Conclusões e Perspetivas. Futuras .....	73
Capítulo 6 .....	75
6. Referências .....	77

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Salina presente na costa portuguesa (região de Aveiro) típico habitat natural das plantas halófitas .....	5
<b>Figura 2</b> - Demonstração dos três principais mecanismos de tolerância salina. Adaptado de Roy e colaboradores [2] .....	6
<b>Figura 3</b> - Exemplar de <i>Salicornia</i> spp. (demonstrando aspeto característico de suculência). Adaptada de Mirian [6] .....	7
<b>Figura 4</b> - Estrutura do AF[1] .....	10
<b>Figura 5</b> - Esquema do processo de organogénese direta aplicada à <i>Salicornia</i> spp. (Adaptado de Faria [51]) .....	13
<b>Figura 6</b> - <i>Salicornia</i> spp. proveniente do processo de micropropagação pelo método convencional, utilizando frascos de multiplicação (A) e tubos de ensaio (B) .....	14
<b>Figura 7</b> - Sistema de Biorreatores de Imersão Temporária (BIT) utilizado para a produção de <i>Salicornia</i> spp. ....	16
<b>Figura 8</b> - Diferença visual entre o grau de robustez da <i>Salicornia</i> spp. 2 (A) e o grau de robustez 5 (B) .....	33
<b>Figura 9</b> - Percentagem de explantes viáveis e descartados conforme método de desinfecção utilizado no material vegetal de <i>Salicornia</i> spp. (ET1= NaClO a 50%, 10 minutos de imersão; ET2= NaClO a 50%, 15 minutos de imersão; ET3= NaClO a 33%, 15 minutos de imersão; ET4= HgCl <sub>2</sub> a 10%, 3 minutos de imersão; ET5= HgCl <sub>2</sub> a 50%, 2 minutos de imersão)(n= 120) .....	39
<b>Figura 10</b> - Percentagem de contaminações existentes com base nos meio utilizados na desinfecção do material vegetal de <i>Salicornia</i> spp. (ET1= NaClO a 50%, 10 minutos de imersão; ET2= NaClO a 50%, 15 minutos de imersão; ET3= NaClO a 33%, 15 minutos de imersão; ET4= HgCl <sub>2</sub> a 10%, 3 minutos de imersão; ET5= HgCl <sub>2</sub> a 50%, 2 minutos de imersão) (n= 120) .....	40
<b>Figura 11</b> - Comparação do comprimento dos explantes de <i>Salicornia</i> spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no primeiro ciclo experimental utilizando o meio nutritivo MS. Os dados representam a média ± D.P, n=30. (MCT1= MS; MCT2= MS com 8.87 µM BAP; MCT3= MS, 8.87 µM BAP, 256 µM de NaCl; MCT4= MS, 8.87 µM BAP, 513 µM de NaCl; MCT5= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA; MCT6= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 256 µM de NaCl; MCT7= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 513 µM de NaCl; MCT8= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT9= MS, 13.37 µM	

L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256 µM de NaCl; MCT10= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513 µM de NaCl) ..... 41

**Figura 12** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no primeiro ciclo experimental utilizando o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média ± D.P, n=30. (MCT11= DMS; MCT12= DMS com 8.87 µM BAP; MCT13= DMS, 8.87 µM BAP, 256 µM de NaCl; MCT14= DMS, 8.87 µM BAP, 513 µM de NaCl; MCT15= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA; MCT16= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 256 µM de NaCl; MCT17= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 513 µM de NaCl; MCT18= DMS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT19= DMS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256 µM de NaCl; MCT20= DMS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513 µM de NaCl) ..... 42

**Figura 13** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do primeiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo MS. Os dados representam a média ± D.P, n=30. (MCT1= MS; MCT2= MS com 8.87 µM BAP; MCT3= MS, 8.87 µM BAP, 256 µM de NaCl; MCT4= MS, 8.87 µM BAP, 513 µM de NaCl; MCT5= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA; MCT6= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 256 µM de NaCl; MCT7= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 513 µM de NaCl; MCT8= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT9= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256 µM de NaCl; MCT10= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513µM de NaCl)..... 43

**Figura 14** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do primeiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média ± D.P, n=30. (MCT11= DMS; MCT12= DMS com 8.87 µM BAP; MCT13= DMS, 8.87 µM BAP, 256 µM de NaCl; MCT14= DMS, 8.87 µM BAP, 513 µM de NaCl; MCT15= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA; MCT16= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 256 µM de NaCl; MCT17= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 513 µM de NaCl; MCT18= DMS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT19= DMS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256 µM de NaCl; MCT20= DMS, 13.37µM L BAP+2.28mg/LZEA,513µM de NaCl) ..... 44

**Figura 15** - Percentagem de ausência/ presença de raiz nos explantes de *Salicornia* spp. do primeiro ciclo experimental com meio nutritivo MS (n=30). (MCT1= MS; MCT2= MS com 8.87 µM BAP; MCT3= MS, 8.87 µM BAP, 256 µM de NaCl; MCT4= MS, 8.87 µM BAP, 513 µM de NaCl; MCT5= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA; MCT6= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 256 µM de NaCl; MCT7= MS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA, 513 µM de NaCl; MCT8= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT9= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256 µM de NaCl; MCT10= MS, 13.37 µM L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513µM de NaCl) ..... 45

**Figura 16** - Percentagem de ausência/ presença de raiz nos explantes de *Salicornia* spp. do primeiro ciclo experimental com meio nutritivo DMS (n=30). (MCT11= DMS; MCT12= DMS com 8.87 µM BAP; MCT13= DMS, 8.87 µM BAP, 256 µM de NaCl; MCT14= DMS, 8.87 µM BAP, 513 µM de NaCl; MCT15= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA; MCT16= DMS, 8.87 µM BAP + 5.37 µM NAA,



256  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT17= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP + 5.37  $\mu\text{M}$  NAA, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT18= DMS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT19= DMS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT20= DMS,13.37 $\mu\text{M}$ L BAP+2.28mg/LZEA, 513 $\mu\text{M}$  de NaCl) ..... 46

**Figura 17** - Comparação do grau de robustez de explantes de *Salicornia* spp. sujeitos a diferentes tratamentos: (A) imagem retirada do artigo de Joshia e colaboradores, 2012 (utilizando BA a 8.9  $\mu\text{M}$  + NAA a 5.37  $\mu\text{M}$  e NaCl a 500  $\mu\text{M}$ ) joshia; (B) resultado do tratamento usado nesta dissertação de mestrado mais idêntico ao utilizado pelo autor anteriormente referido (MCT7 - BAP a 8.87  $\mu\text{M}$  + NAA 5.37  $\mu\text{M}$  e NaCl a 513  $\mu\text{M}$  [2] ..... 47

**Figura 18** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo MS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. (MCT2= MS com 8.87  $\mu\text{M}$  BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT9= MS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT10= MS,13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl). ..... 48

**Figura 19** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30 (MCT14= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT15= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP + 5.37  $\mu\text{M}$  NAA; MCT17= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP + 5.37  $\mu\text{M}$  NAA, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT19= DMS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl). ..... 48

**Figura 20** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo MS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. MCT2= MS com 8.87  $\mu\text{M}$  BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT9= MS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT10= MS,13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl). ..... 49

**Figura 21** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. MCT14= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT15= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP + 5.37  $\mu\text{M}$  NAA; MCT17= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP + 5.37  $\mu\text{M}$  NAA, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCT19= DMS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl). ..... 50

**Figura 22** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no terceiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=60. (MCMT1= DMS,513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCMT2= DMS, 0.031  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCMT3= DMS, 0.062  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCMT4= DMS, 0.124  $\mu\text{M}$ , 513  $\mu\text{M}$  de NaCl). ..... 51

**Figura 23** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do terceiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os

dados representam a média  $\pm$  D.P, n=60. (MCMT1= DMS, 513  $\mu$ M de NaCl; MCMT2= DMS, 0.031  $\mu$ M meta-topolin ,513  $\mu$ M de NaCl; MCMT3= DMS, 0.062  $\mu$ M meta-topolin ,513  $\mu$ M de NaCl; MCMT4= DMS, 0.124 $\mu$ M metatopolin, 513 $\mu$ M de NaCl) ..... 52

**Figura 24** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no ensaio de BIT's, utilizando o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. MBT1= DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão; MBT2= DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão; MBT3= DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão.....54

**Figura 25** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do terceiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. MBT1= DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão; MBT2= DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão; MBT3= DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão..... 55

**Figura 26** - Percentagem de ausência/ presença de raiz nos explantes de *Salicornia* spp. do ensaio com BIT'S com meio nutritivo DMS (n=30). . MBT1= DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão; MBT2= DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão; MBT3= DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão..... 56

**Figura 27** - Demonstração da robustez dos explantes de *Salicornia* spp. após o ciclo de BIT's. (A) BIT com explantes de *Salicornia* spp. antes da separação dos mesmos. (B) Explantes de *Salicornia* spp. após o ciclo de BIT já separados.....57

**Figura 28** - Comparação entre os diferentes tratamentos face ao comprimento no ensaio de pré- aclimatização *ex vitro* de *Salicornia* spp.. PCT1= JiffyPlug-7®, DMS; PCT2= JiffyPlug-7®, ½ DMS; PCT3= JiffyPlug-7®, Água; PCT4= JiffyPlug-7®, Solução Nutritiva GroHo®; PCT5= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), DMS; PCT6= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), ½ DMS ; PCT7= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Água; PCT8= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo® .....58

**Figura 29** - Comparação do peso fresco da parte aérea da *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do ensaio de pré-aclimatização *ex vitro*. PCT1= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, DMS; PCT2= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, ½ DMS; PCT3= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, Água; PCT4= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, Solução Nutritiva GroHo<sup>®</sup>; PCT5= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), DMS; PCT6= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), ½ DMS ; PCT7= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), Água; PCT8= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), Solução Nutritiva GroHo<sup>®</sup> .....59

**Figura 30** - Comparação do peso fresco da raiz da *Salicornia* spp. nos diferentes tratamentos do ensaio de pré-aclimatização *ex vitro*. PCT1= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, DMS; PCT2= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, ½ DMS; PCT3= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, Água; PCT4= JiffyPlug-7<sup>®</sup>, Solução Nutritiva GroHo<sup>®</sup>; PCT5= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), DMS; PCT6= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), ½ DMS ; PCT7= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), Água; PCT8= Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), Solução Nutritiva GroHo<sup>®</sup> .....60

**Figura 31** -(A) Demonstração da robustez dos explantes de *Salicornia* spp. provenientes do ensaio de pré-aclimatização *ex vitro* aos 10 dias. (B) Robustez dos explantes sujeitos ao tratamento PC T8 aos 30 dias B demonstra os resultados obITdos usando o tratamento PCT8 (Fibra de coco + Substrato Universal Siro<sup>®</sup> (1:1), Solução Nutritiva GroHo<sup>®</sup>) aos 30 dias ..... 61

**Figura 32** - Padrão AF (tempo de retenção característico de 11 minutos) ..... 61

**Figura 33** - Cromatograma do AF a uma concentração de 3,12 µg/mL ..... 62

**Figura 34** - Cromatograma do AF presente nas amostras *in vitro* de *Salicornia* spp.. Utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor de *diode array* (DAD) modelo 1290 da Agilent Technologies com uma coluna de fase reversa ZORBAX SB-C18, 4,6x150 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies (Soquimica, Lisboa, Portugal) .....67

**Figura 35** - Cromatograma do AF presente nas amostras pré-aclimatadas de *Salicornia* spp. utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor de *diode array* (DAD) modelo 1290 da Agilent Technologies com uma coluna de fase reversa ZORBAX SB-C18, 4,6x150 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies (Soquimica, Lisboa, Portugal) .....68



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Classificação Taxonómica do género <i>Salicornia</i> spp. ....	8
<b>Tabela 2</b> - Tratamentos de desinfecção utilizados nos ensaios de estabelecimento asséptico <i>in vitro</i> da <i>Salicornia</i> spp. ....	23
<b>Tabela 3</b> - Tratamentos de composição de meios de cultura utilizados nos ensaios de micropropagação convencional da <i>Salicornia</i> spp. (Primeiro ciclo).....	25
<b>Tabela 4</b> - Tratamentos de composição de meios de cultura utilizados no ensaio de micropropagação convencional da <i>Salicornia</i> spp. (Segundo ciclo) .....	27
<b>Tabela 5</b> - Tratamentos de composição de meios de cultura utilizados no ensaio de micropropagação convencional da <i>Salicornia</i> spp. (Terceiro ciclo) .....	29
<b>Tabela 6</b> - Tratamentos de composição de meios de cultura e regimes de imersão/ventilação utilizados no ensaio de micropropagação em Biorreatores de Imersão Temporária - BIT.....	30
<b>Tabela 7</b> - Tratamentos de substratos e soluções nutritivas em irrigação utilizados no ensaio de pré aclimatização ex vitro da <i>Salicornia</i> spp. ....	31
<b>Tabela 8</b> - Dados relativos à linearidade do composto.....	65
<b>Tabela 9</b> - Valores de exatidão e precisão relativos à precisão intradia.....	66
<b>Tabela 10</b> - Valores de exatidão e precisão relativos a precisão interdia .....	66
<b>Tabela 11</b> - Valores de exatidão e precisão intermédia .....	66
<b>Tabela 12</b> - Concentração do AF nas amostras <i>in vitro</i> e pré- aclimatadas .....	67
<b>Tabela 13</b> - Concentração do AF proveniente de diferentes amostras (quantificação através de HPLC).....	69

...



## Lista de acrónimos

AF	Ácido trans-ferúlico
ACN	Acetonitrilo
BAP	6-Benzilaminopurina
BIT's	Biorreatores de Imersão Temporária
Ca	Cálcio
CaSO <sub>4</sub>	Sulfato de Cálcio
C.	Chenopodium
DAD	Detetor de diode array
DMS	Dobro da concentração de Macronutrientes Murashige & Skoog
FDA	Food and Drug Administration
NaClO	Hipoclorito de Sódio
HgCl <sub>2</sub>	Cloreto de mercúrio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
IAA	Ácido indolacético
KCl	Cloreto de potássio
K <sub>2</sub> O	Óxido de potássio
MAP	Fosfato onóamónio
MeOH	Metanol
Meta-topolin	6-(3-hydroxybenzylamino) purina).
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgO	Óxido de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MS	Murashige & Skoog
N	Azoto
Na <sup>+</sup>	Ião sódio
ANA	Ácido 1-naftalenoacético
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ião amónia
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ião nitrato
PAL	fenilalanina amoníaco liase
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de Fosfato
PPM	Plant Preservative
SO <sub>3</sub>	Mixture Óxido sulfúrico
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultravioleta
Zea	Zeatina





## Capítulo 1

---



# 1. Introdução

A biotecnologia vegetal apoia-se basicamente sobre duas grandes áreas, a multiplicação *in vitro* e a transformação genética [7]. Neste sentido, as décadas de 40, 50 e 60 foram importantes marcos históricos para o desenvolvimento do sector da multiplicação *in vitro* de plantas. Um dos principais exemplos deste período foi a publicação do meio nutritivo de Murashige & Skoog em 1962 (MS), que até os dias atuais ainda é utilizado como um dos principais meios nutritivos na multiplicação *in vitro* de plantas [8].

Para se compreender melhor o princípio de multiplicação de plantas em geral, tanto *in vitro* como *ex vitro*, é necessário recuar ao ano de 1838, onde Schleiden e seus colaboradores desenvolveram a teoria celular inerente ao conceito da totipotência celular (capacidade de uma única célula se dividir e produzir uma planta inteira) e, no ano seguinte, em 1839, Schwann, reconhece a célula como a unidade primária/elementar de todos os organismos vivos [9]. As teorias anteriormente mencionadas estão diretamente ligadas com a multiplicação e transformação genética de plantas, que por sua vez foi descrita pela primeira vez por Griffith (1928) em bactérias [10]. Em 1983, no Miami Winner Symposium, três grupos de investigação, totalmente independentes, descreveram a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, o que permitiu a produção de plantas transgênicas totalmente férteis [9]. Este marco histórico da biotecnologia vegetal originou o início de um novo ciclo de investigação sobre a transformação genética, permitindo não só originar plantas geneticamente modificadas para os mais diversos fins, como também desenvolver novas metodologias de transformação genética, tais como os equipamentos de bio balística [11].

A par do desenvolvimento de sistemas de produção de plantas *in vitro*, surgiram as primeiras biofábricas de plantas, especulando-se que a primeira bioprodução de plantas tenha sido realizada por Morel em 1960, com a produção de orquídeas através de meristemas [12]. Com o evoluir da tecnologia, e com a necessidade de fornecimento de novas espécies, hoje as biofábricas são uma realidade muito bem implementada. Existindo milhares de protocolos de micropropagação *in vitro*, contribuindo também para o desenvolvimento de novas técnicas, como por exemplo, os biorreatores de imersão temporária, sistemas criados como alternativa ao cultivo de plantas pelo método convencional *in vitro*. O custo de operação de uma biofábrica foca-se substancialmente na mão de obra, sendo que o recurso à utilização de sistemas como os biorreatores de imersão temporária permite diminuir 20 a 40% dos custos fixos e obter plantas de melhor qualidade [13]. Em termos fisiológicos, o processo de expansão em biorreator não causa stress nas plantas, obtendo-se normalmente plantas maior dimensão, com bom desenvolvimento de raiz, o que permite obter melhores resultados na fase de aclimatização [14].

As técnicas de micropropagação podem, e são aplicadas a diferentes espécies, independente da sua caracterização. Nos últimos tempos, e com maior frequência, tem-se observado uma crescente procura pela utilização destas técnicas biotecnológicas em espécies que apresentam compostos bioativos e nutracêuticos na constituição (indústria farmacêutica ou alimentar). Neste sentido cabe ressaltar que não se consegue precisar ao certo desde quando as plantas começaram a ser utilizadas como medicamentos e fonte de tratamento das mais diversas doenças. A realidade é que os compostos ativos presentes em determinadas plantas são utilizados em medicamentos, hoje aprovados pelas mais diversas entidades, nomeadamente a Food and Drug Administration e European Medicines Agency. Sendo, por vezes, replicados sinteticamente. O estudo da identificação de compostos surge com a biotecnologia moderna e, com o desenvolvimento de sistemas cromatográficos eficazes no isolamento de compostos bioativos, acompanhando a evolução dos sistemas de produção de plantas [15].

As plantas halófitas têm sido, desde a II Guerra mundial, utilizadas como alternativa à escassez de alimentos. Mais concretamente, a *Salicornia*, era utilizada para alimentação dos soldados, uma vez que servia como uma excelente fonte nutritiva [16]. A *Salicornia*, segundo Panth [17] apresenta, além de todo o conteúdo rico em nutrientes, o ácido trans-ferúlico (AF), cuja complexa ação, acaba por ser responsável pelo efeito positivo de vaso-proteção no organismo humano [18]. Países como a França, Holanda, Espanha e Portugal, utilizaram as plantas halófitas para alimentação de gado nas zonas costeiras. Neste sentido, têm-se despertado um potencial interesse, não só sobre os seus benefícios alimentares diretos, mas igualmente sobre o ponto de vista económico [19].

Dada a importância da *Salicornia* e de todo contexto nela envolvido e aqui revisto, este trabalho tem o objetivo estabelecer metodologias tecnológicas que permitam obter rentabilidade industrial da espécie em causa, bem como avaliar a presença do AF na sua constituição.

## 1.1 Plantas halófitas

A grande maioria das plantas existentes não tolera a presença de elevadas concentrações de sais no seu meio de crescimento, independente das condições edafoclimáticas, sendo as mesmas designadas por “plantas galicófitas”. Por outro lado, existem aquelas plantas que conseguem realizar todo o seu ciclo de crescimento e reprodução em ambientes cujas concentrações salinas são elevadas, designadas por “plantas halófitas”. Neste sentido, a palavra holófito deriva da junção de *Halos*, que significa sal e *Phyto*, que significa planta [3, 20].

Em Portugal e, mais especificamente ao longo da costa, as plantas halófitas são frequentemente encontradas em locais com boa drenagem de água, como por exemplo, nas salinas (Figura 1), dunas e margens de bacias marítimas [3].



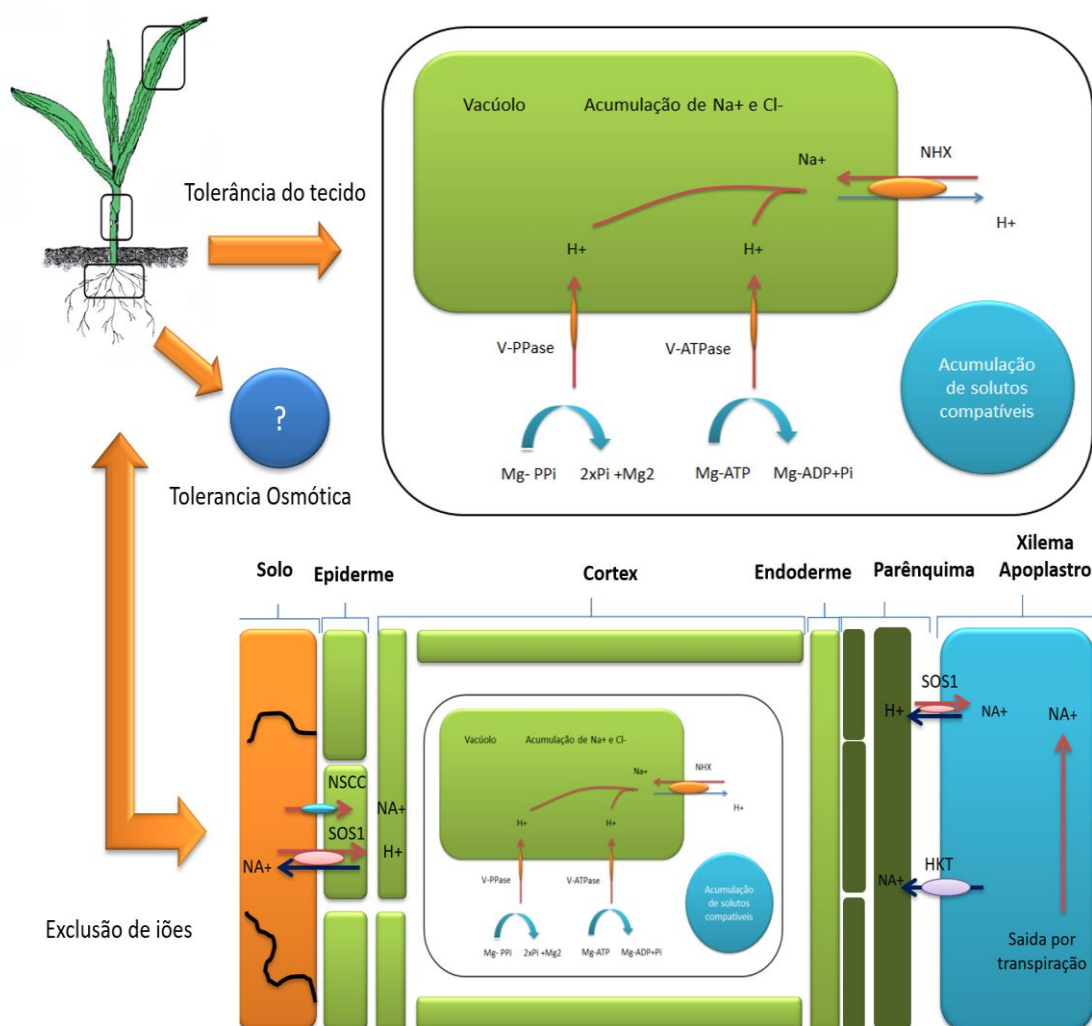
**Figura 1** - Salina presente na costa portuguesa (região de Aveiro) típico habitat natural das plantas halófitas.

Os locais mencionados anteriormente são, por norma, compostos por sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), sulfato de Cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). No caso específico do  $\text{NaCl}$ , este encontra-se com concentrações compreendidas entre os 200 mM e os 1200 mM [3, 20]. Sendo assim, a sobrevivência das plantas halófitas nestes habitats só é possível devido aos seus mecanismos de tolerância a elevadas concentrações de sais, sendo que estes mecanismos podem variar consideravelmente entre as espécies. Por exemplo, a *Atriplex* apresenta uma incorporação elevada de sua biomassa em ambientes com 700 mM de  $\text{NaCl}$ , a *Hastata* tolera concentrações de 300 mM, enquanto a *Salicornia europaea* tem um acentuado crescimento de biomassa entre os 500 e os 1020 mM de  $\text{NaCl}$  [20].

Quando expostas a elevadas concentrações de sal, o desempenho de planta para planta é variável, existindo neste sentido diferentes sistemas complexos para suportarem elevadas concentrações de  $\text{NaCl}$ . Os três principais mecanismos são: (1) tolerância osmótica, que é regulada por sinais de curta e longa distância, que reduzem o crescimento da parte aérea, sendo impulsionado o sinal antes da acumulação de  $\text{Na}^+$  na parte aérea [5]. Apesar do funcionamento dos sistemas de tolerância osmóticos das plantas halófitas não estarem totalmente estudados, constata-se que estas plantas possuem sistemas osmóticos complexos

que surgem da necessidade das mesmas se adaptarem a condições extremas de salinidade; (2) exclusão de íons, cujos processos de transferência de íons nas raízes minimizam a absorção de sais e consecutivamente levam à diminuição da acumulação de diferentes tipos de sais no interior da planta; (3) tolerância do tecido, ou seja, estas plantas desenvolvem suculência, que resulta de um aumento dos vacúolos promovidos pela diluição iônica [21, 22].

Na Figura 2 é possível observar os três principais mecanismos de tolerância salina descritos no parágrafo anterior. No caso específico da *Salicornia* spp., planta objeto de estudo nesta dissertação, segue o último mecanismo descrito, a suculência por diluição iônica. A Figura 3 demonstra claramente o aspecto que caracteriza e comprova a condição de suculência da *Salicornia* spp..



**Figura 2 - Demonstração dos três principais mecanismos de tolerância salina. Adaptado de Roy et al. [5].**



**Figura 3** - Exemplar de *Salicornia* spp. (demonstrando aspeto característico de suculência). Adaptada de Mirian [6].

Outra característica que desperta interesse nas plantas halófitas diz respeito às suas propriedades e composição. Neste sentido, estas plantas têm vindo a desempenhar um papel cada vez mais importante, como por exemplo, na alimentação, sendo utilizadas como excelentes fontes multivitamínicas e como alternativa ao consumo de sal na alimentação (atribuindo destaque à *Salicornia*) [3, 23]. Estas plantas também são utilizadas como alternativa aos combustíveis fósseis na produção de biocombustível [24].

## 1.2 *Salicornia*

*Salicornia* é uma planta halófito que pertence ao género *Salicornia* spp. da família Chenopodiaceae (Tabela 1). A família Chenopodiaceae é essencialmente caracterizada pela tolerância a ambientes salinos, tendo sido descrita pela primeira vez em 1789 por A. J. Jussieu. Segundo a classificação filogenética, pertence à ordem Caryophyllales, sendo constituída por cerca de 180 géneros, e mais de 2500 espécies. Os membros desta família encontram-se dispersos por ambos os hemisférios, contudo com maior prevalência no hemisfério sul, sendo maioritariamente encontrados em locais áridos, salinos e em locais costeiros [4, 21]. As espécies desta família podem ter um ciclo anual perene, e são maioritariamente arbustos lenhosos ou plantas suculentas, apresentando raramente grande dimensão. As folhas podem apresentar uma configuração em espiral com/sem suculência e a maioria das espécies apresentam flores pequenas, com 3 a 5 pétalas de cores pouco vivas. Na Europa esta família é composta por

aproximadamente 30 géneros e mais de 150 espécies [25], como por exemplo, *Chenopodium album*, *C. glaucum*, *C. hybridum* e *C. polyspermum*, *Atriplex*, *Salicornia* spp. e *Sarcocornia* (*Salicornia herbacea*; *Salicornia bigelovii*; *Salicornia brachiata*, *Salicornia persica*, *Sarcocornia fruticosa*, *Sarcocornia decussata*, *Sarcocornia andina*) [20].

**Tabela 1** - Classificação Taxonómica do género *Salicornia* spp.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>	<b>Característica das plantas</b>
<b>Sub-Reino</b>	Tracheobionta	Vasculares
<b>Superdivisão</b>	Spermatophyta	Com sementes
<b>Divisão</b>	Magnollophyta	Com flor
<b>Classe</b>	Magnollopsida	Dicotyledoneas
<b>Subclasse</b>	Caryophyllales	-
<b>Família</b>	Chenopodiaceae	-
<b>Género</b>	<i>Salicornia</i>	-

A *Salicornia* spp. desenvolve-se em ambientes normalmente ricos em argila, com concentrações elevadas de sal, como por exemplo, salinas [18, 26]. Este comportamento advém das características anteriormente descritas na secção 1.1, que confere potencial de adaptabilidade a este tipo de plantas [23]. A *Salicornia* spp. é também conhecida por espargo do mar, mede entre 25 a 35 cm e apresenta uma morfologia alongada, com rebentos carnudos em estado vegetativo e com menor suculência em estado de floração. O processo de perda de suculência deve-se à utilização de nutrientes durante o processo de produção de biomassa durante o período de crescimento, ocorrendo novamente a reposição dos mesmos no final deste período [23]. A *Salicornia* spp. propaga-se por semente em habitat natural ou em estufa, sendo o seu florescimento diretamente relacionado com o fotoperíodo. Segundo Ventura *et al.* em 2011, quando comparado o crescimento sob condições de iluminação artificial com o crescimento com luz natural, verifica-se a existência de um retardamento na floração das plantas com a luz artificial. O seu sistema radicular é do tipo rizoma, com uma



extensão máxima de 12 cm de profundidade e, sendo assim, descrito como uma provável adaptação a solos mal irrigados [18, 20, 27].

As plantas marinhas do género da *Salicornia* spp. têm vindo a ser descritas como benéficas para a saúde, uma vez que contêm vitaminas A e C, cálcio, ferro, iodo, magnésio e sódio [16, 18]. Adicionalmente, proporcionam ainda efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, prevenindo também complicações cardiovasculares [18, 28, 29]. Na última década a *Salicornia* spp. tem vindo a ser cada vez mais utilizada na alimentação como alternativa à utilização de sal na alimentação, como descrito por Ventura em 2011 [30]. Panth em 2016 apresentaram análises por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) realizados com *Salicornia europaea*, revelando que a mesma continha 5- (hidroximetil) furfural, ácido p-cumárico, AF, dando especial atenção a este último composto (o AF), uma vez que é associado a efeitos de vaso proteção, o que lhe confere a capacidade de inibir o aumento da pressão arterial. No estudo *in vivo*, efetuado pelos mesmos autores em ratos hipertensos, verificaram um aumento da pressão arterial com o consumo de sal refinado, quando comparado com a ingestão de *Salicornia* spp. [22].

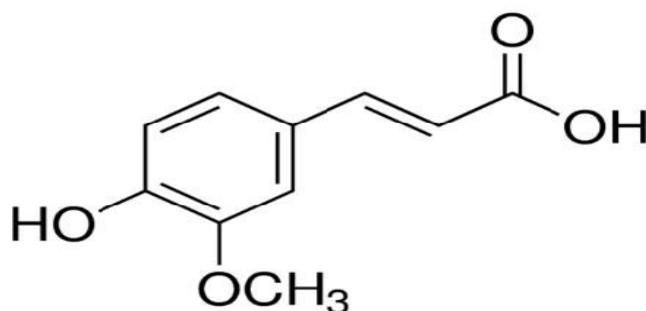
### 1.3 Ácido *trans*-ferúlico

O AF faz parte dos compostos fenólicos, que por sua vez são metabolitos secundários, habitualmente situados na parede celular dos alimentos, como por exemplo, cereais e nos vacúolos das células das plantas, sendo habitualmente classificados através das suas características estruturais e vias biossintéticas [31]. Os compostos fenólicos possuem em comum pelo menos um grupo fenólico, ou seja, um grupo hidroxilo associado a um anel aromático. Ao nível estrutural e biológico é um grupo extremamente diversificado, sendo as suas vias metabólicas de elevada complexidade. Das vias biossintéticas básicas destacam-se a via do ácido chiquímico que é responsável pela síntese da maioria dos polifenóis em plantas e a via do ácido malónico. Esta última via não se observa com tanta frequência em plantas, tendo uma maior preponderância em fungos e bactérias [32].

A maioria dos compostos fenólicos presentes nas plantas provém da fenilalanina. O fosfoenolpiruvato é o precursor da via do ácido cinâmico que tem origem na glicose e na eritrose-4-fosfato proveniente da via das pentoses-fosfato, dando origem ao ácido xiquímico. Após a formação do ácido chiquímico o mesmo liga-se com uma molécula de fosfoenolpiruvato, dando origem ao ácido corísmico que é precursor dos três aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina. Através de uma reação de desaminação a fenilalanina vai originar o ácido cinâmico, sendo esta reação catalisada pela enzima fenilalanina amónia liase (PAL) (a expressão desta enzima é influenciada por condições físicas e meteorológicas). As reações que se sucedem à reação catalisada pela PAL vão originar grupos de compostos fenólicos. [33]. A identificação e classificação destes compostos é gerada através do número dos anéis fenólicos

presentes e da ligação que ocorre entre os mesmos e os elementos estruturais. Um dos subgrupos dos ácidos fenólicos e o dos ácidos hidroxicinâmicos que raramente se encontram na forma livre, ocorrendo com frequência sob a forma de ésteres glicosilados. Os ácidos cinâmicos mais abundantes são o cafeínico (presente maioritariamente em frutos), e o ferúlico (muito abundante em grãos de cereais)[32, 33].

O AF é um potente antioxidante fenólico que abunda nas paredes celulares das plantas. Este ácido encontra-se presente no nosso quotidiano em concentrações mais elevadas em frutas cítricas, trigo, espinafres e cereais [1, 34]. Na área médica o AF destaca-se pela sua capacidade diurética, atividade antioxidante, redutora de colesterol, antimicrobiana e anti-inflamatória estando também relacionado com a prevenção contra a trombose e aterosclerose e pelo seu efeito anticancerígeno [35, 36]. Na área alimentar o AF atua como conservante devido à sua ação antioxidante e antimicrobiana e pela sua capacidade inibidora de gordura, peroxidação ácida e absorção de ultravioletas (UV), sendo bastante utilizado em formulações de loções para a pele e protetores solares, devido ao seu efeito foto protetor. Na Figura 4 é possível observar-se a estrutura do AF [1].



**Figura 4** - Estrutura do AF[1].

O AF pode ser obtido por síntese química e extração de plantas. A síntese química envolve uma reação de condensação da vanilina com o ácido malónico, catalisado pela piperidina. Este processo demora aproximadamente três semanas, mas permite obter elevados rendimentos. Para a extração de AF em plantas os autores fazem referência à utilização de métodos enzimáticos, extração alcalina e ácida, extração pelo método de Soxhlet e maceração [34, 36, 37]. Sendo o AF constituído por um grupo cromóforo pode ser detetado na região do ultravioleta e visível. Deste modo, a literatura faz referência à utilização de sistemas de HPLC para a separação do AF em amostras de *Salicornia*. A utilização do método de HPLC permite obter níveis de deteção mais baixos quando comparado com métodos tradicionais os autores

identificam o AF aos 22 minutos de corrida, a um comprimento de onda de leitura a 305 nm [1, 37, 38].

## 1.4 Micropropagação *in vitro*

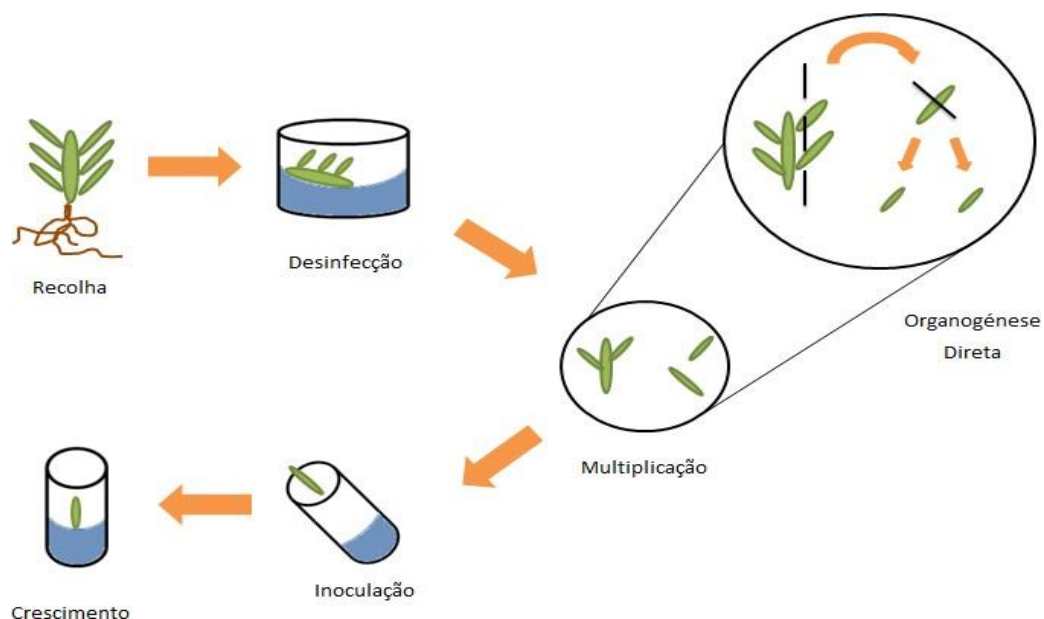
A teoria da totipotência celular, aplicável nos vegetais, ampara todo processo ocorrido de micropropagação *in vitro*. Para tal, são proporcionados em ambiente laboratorial os estímulos químicos (vitaminas, macro e micro nutrientes aminoácidos e fito hormonas) e físicos (temperatura, fotoperíodo, entre outros) necessários para estimular o explante (conglomerado de células, tecidos ou órgão vegetais) promovendo a sua diferenciação e especialização celular até atingir a formação de uma nova planta [39].

Como mencionado anteriormente, as décadas de 40, 50 e 60 são marcos significativos para o desenvolvimento das técnicas de micropropagação *in vitro* [40], e o aperfeiçoamento do meio nutritivo é um exemplo claro da evolução das técnicas de micropropagação. Os primeiros meios nutritivos eram formulados para plantas inteiras e não para segmentos das mesmas, comumente designados por explantes. No início da década de 50, chegou-se a utilizar a solução de Knop que continha aproximadamente 200 mg por litro de sais e, no final da mesma década, Nitsch chegou à conclusão que as quantidades de sais utilizados eram demasiado baixas, sendo elaborado um novo meio com cerca de 4 g de sais por litro [38]. Ao longo da década de 60, e com a necessidade de introduzir novas plantas, verificou-se que as soluções existentes não estavam a surtir efeito no crescimento dos explantes. Murashige e Skoog (1962) desenvolveram um novo meio, com concentrações aproximadamente 25 vezes superiores as concentrações utilizadas por Knop, com maior incidência no aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Esta solução foi continuamente utilizada ao longo das últimas décadas [8].

O meio nutritivo é um dos fatores mais importantes a ter em conta nas técnicas de multiplicação *in vitro*, mas existem outros fatores igualmente relevantes que podem ditar o sucesso ou o insucesso, como por exemplo, a idade do explante utilizado. Neste sentido, o desempenho *in vitro* pode ser condicionado pela sua idade, um tecido fisiologicamente mais jovem confere uma maior rapidez na resposta *in vitro*. Por sua vez, um tecido vegetal mais antigo não tem a mesma resposta, apresentando dificuldade para gerar calos ou de promover um bom alongamento, sendo também mais difícil de serem desinfetados. O tamanho do explante também influencia o resultado *in vitro*, sendo que um explante de maior tamanho dificulta a cultura asséptica, porem pode promover fácil regeneração. Ao passo, que um explante muito pequeno pode resultar em fácil assepsia, porém por não conter reservas nutricionais essenciais podem não responder em regeneração. O método de desinfeção inicial para o estabelecimento *in vitro* também confere grande influência no sucesso do processo. Sabendo que a propagação *in vitro* é operada em condições assépticas, é necessário proceder à desinfeção do material

vegetal recolhido em campo. Assim, a literatura referencia utilização de fungicidas, bactericidas e hipoclorito de cloro ou sódio, combinados com sucessivos ciclos de limpeza em água desionizada. O método de desinfecção deve ser adequado consoante o local de recolha e as condições do material vegetal [41-43].

A propagação vegetativa aplicada convencionalmente, tem vindo a ser utilizada ao longo dos séculos como principal veículo de multiplicação, conservação e manutenção das mais variadas espécies. As técnicas de micropropagação *in vitro*, por sua vez, surgem como alternativa que permite, além da multiplicação, conservação e manutenção, podendo também ser aplicadas ao melhoramento genético, qualificação fitossanitária, aumento considerável do volume produzido, entre outros [44]. De entre os sistemas de propagação *in vitro* destacam-se: o desenvolvimento de gemas axilares, onde é promovido o desenvolvimento de novos brotos de gemas axilares através da adição de fito-hormonas ao meio nutritivo [45]; embriogénese somática, este processo é caracterizado pelo desenvolvimento das células somáticas por meio de diferentes estádios embrionários, dando origem a novas plantas sem ocorrer a fusão dos gametas [46, 47]; organogénese, direta e indireta, ocorrendo através da diferenciação de órgãos e rebentos diretamente do explante (organogénese direta) ou a partir de calos igualmente produzidos *in vitro* (organogénese indireta) [47]. O processo de organogénese é complexo, envolvendo fatores internos e externos, como por exemplo a idade do explante, meio de cultura, fatores ambientais e os reguladores de crescimento exógenos adicionados ao meio de cultura [32]. A organogénese também é uma técnica que, quando associada à formação genética, possibilita a regeneração de plantas transgénicas [48-50]. Na Figura 5 exemplifica-se o processo de organogénese direta tipicamente aplicada à *Salicornia* spp.



**Figura 5** - Esquema do processo de organogênese direta aplicada à *Salicornia* spp. (Adaptado de Faria [51]).

## 1.5 Modelos aplicados à propagação *in vitro*

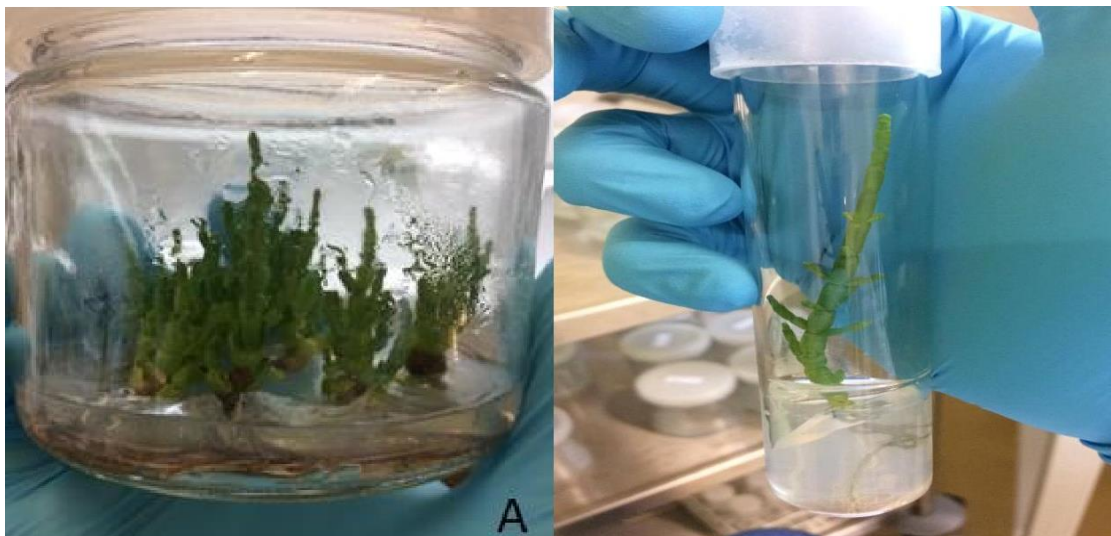
### 1.5.1 Multiplicação pela técnica de micropropagação convencional

A técnica de micropropagação convencional foi a técnica inicialmente desenvolvida para o cultivo de tecidos vegetais, sendo os explantes cultivados em meios sólidos ou semissólidos [52]. A técnica de micropropagação convencional inicia-se após a desinfecção do material vegetal, nesta técnica são comumente utilizados processos de organogênese (direta ou indireta) e embriogênese somática [53]. Na técnica de micropropagação convencional recorre-se à utilização de meios nutritivos como o caso do MS e DMS e de agentes gelificantes (como por exemplo ágar). Na literatura é possível encontrar informação referente à multiplicação *in vitro* de plantas halófitas, sendo descrito a utilização de meios nutritivos de base MS e MS modificado com e sem adição de NaCl, BAP, ácido naftalenoacético (NAA), ácido indolacético (IAA), thidiazuron (TDZ), zeatina (Zea) e cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) [52]. Na figura 6 pode observar-se a *Salicornia* spp. proveniente da técnica de micropropagação convencional em tubo e frasco utilizados no presente trabalho [2, 29].

A micropropagação convencional é uma técnica de multiplicação *in vitro* que à semelhança dos restantes procedimentos é operada em condições assépticas. Através do método convencional é possível utilizar um menor número de explantes do que em outros métodos de micropropagação *in vitro*, permitindo reduzir significativamente o risco de perda de matéria vegetal por contaminação na fase de estabelecimento. A técnica convencional também é muito

utilizada para diferentes tipos de cultivo: Cultivo de meristemas - os meristemas têm um diâmetro muito pequeno e não possuem sistema vascular, estando praticamente isolados de contaminações, sendo preferencial o seu cultivo pelo método convencional [52]; Cultivo de protoplastos - os protoplastos são células cuja parede celular foi removida por ação enzimática, muito utilizado na obtenção de híbridos transgênicos; Cultivo de célula isolada ou de tecido desorganizado (calo) - utilizado na obtenção de plantas resistentes a vírus, bactérias, fungos, herbicidas, entre outros [54].

O método convencional do ponto de vista do estabelecimento de novas culturas ou da utilização de diferentes técnicas de cultivo, é das opções mais utilizadas. No entanto, o método em causa apresenta algumas limitações no momento da produção de novas mudas de plantas, como por exemplo: existir a necessidade de se recorrer à utilização de uma quantidade elevada de material laboratorial e de recursos humanos; baixa rentabilidade na fase de produção de plantas *in vitro*; necessidade de alteração do meio a cada 5/6 semanas de cultivo. Neste sentido, novas técnicas de micropropagação *in vitro* têm vindo a surgir para colmatar as falhas existentes no procedimento de multiplicação convencional, permitindo obter maior rentabilidade e custos menores na fase de multiplicação e produção de novas mudas de plantas, como por exemplo, os BIT's [52].



**Figura 6** - *Salicornia* spp. proveniente do processo de micropropagação pelo método convencional, utilizando frascos de multiplicação (A) e tubos de ensaio (B).

### 1.5.2 Multiplicação pela técnica de Biorreatores de imersão temporária

Visando principalmente a redução nos custos e o aumento nas respostas obtidas *in vitro*, surgiram novas técnicas de micropropagação, neste caso utilizando meio de cultivo líquido em consonância com automação. Neste sentido, Aitken, Christie e Jones em 1987 [55], desenvolveram projetos na micropropagação de *Pinus*, propondo pela primeira vez a utilização de meio de cultivo líquido. Os primeiros documentos divulgados sobre o uso de biorreatores remontam os anos 80, onde Takayama e Misawa (1981) utilizam os biorreatores para a produção de microtubérculos de batata. O sistema de imersão temporária foi idealizado e desenvolvido por Teisson e Alvard em 1994 [56], sendo atualmente utilizado em laboratórios por todo o mundo para as mais diversas espécies.

Biorreatores são equipamentos utilizados na multiplicação de transferência de plantas com potencial segurança, economia e higiene. São usados para o cultivo de gemas, embriões e órgãos em meio de cultura líquido e potencializam produção de mudas de forma automatizada em larga escala, com monitorização e controle das condições de cultivo, além de menor manipulação das culturas. Foram desenvolvidos também para corrigir falhas existentes na produção de novas plantas provenientes das técnicas convencionais, aumentando a rentabilidade das biofábricas [57].

Os dois principais tipos de biorreatores são o convencional de imersão contínua e o de imersão temporária (BIT), sendo que ambos os modelos utilizam meio nutritivo líquido, com renovação de ar durante o cultivo, assim como, a constante monitorização de fatores essenciais, como o pH, oxigênio dissolvido, temperatura, entre outros. Nos biorreatores de imersão contínua, o material vegetal em cultivo permanece imerso continuamente no meio de cultura [58]. Neste tipo de biorreatores o meio permanece estagnado o que causa problemas de hiper-hidratação dos tecidos e órgãos [46]. Dependendo da espécie e do meio nutritivo utilizado a hiper-hidratação pode causar distúrbios fisiológicos graves, afetando o crescimento e desenvolvimento do material vegetal. Este distúrbio é designado por hiper-hidricidade, consistindo em deformações visuais dos explantes (alongamento celular, hastes deformadas, entre outros), o mesmo apresenta baixa taxa de sobrevivência durante a fase de aclimatização [59]. Por sua vez os BIT's permitem um controlo do tempo de permanência entre o material vegetal e o meio nutritivo evitando os problemas anteriormente mencionados. Foi com objetivo de colmatar as falhas existentes nos biorreatores de imersão contínua que Avarde e colaboradores desenvolveu o sistema de BIT's que posteriormente foi modificado por Teisson e colaboradores dando origem ao sistema de biorreatores tipo RITA [60].

As técnicas de micropropagação convencional são extremamente úteis para processos de estabelecimento e manutenção das espécies, nomeadamente quando se trata de promover o enraizamento e alongamento das espécies os BIT's. Estes sistemas conferem a seguinte

vantagem: operam com meio líquido, sendo ideal para a micropropagação, evitando a utilização de agentes gelificantes, como por exemplo, o agar. A utilização de meios líquidos proporciona uma série de vantagens, nomeadamente [14, 61]:

- Permite uniformizar as condições de cultivo;
- É mais simples trocar/remover o meio;
- A esterilização por filtração torna-se mais fácil o que consequentemente possibilita a utilização de recipientes com maior volume do que na técnica de micropropagação *in vitro* convencional;
- Maior capacidade de produção;
- Redução significativa de custos com pessoal especializado.



**Figura 7** - Sistema de Biorreatores de Imersão Temporária (BIT) utilizado para a produção de *Salicornia* spp.



## Capítulo 2

---



## 2. Objetivos

O **objetivo geral** da dissertação de mestrado foi criar protocolos de estabelecimento, multiplicação e pré aclimatização de micropropagação *in vitro* da *Salicornia spp.*, identificando e quantificando o AF presente nas plantas micropropagadas e pré-aclimatadas. Para tal, foram delineados os seguintes **objetivos específicos**:

- Estabelecer a metodologia de desinfecção e estabelecimento asséptico *in vitro* de explantes de *Salicornia spp.*;
- Estabelecer a metodologia de multiplicação *in vitro* de explantes de *Salicornia spp.* através do método de micropropagação convencional;
- Estabelecer a metodologia de multiplicação *in vitro* de explantes de *Salicornia spp.* através do método de micropropagação em biorreatores de imersão temporária (BIT's);
- Estabelecer a metodologia de pré-aclimatização de plantas micropropagadas de *Salicornia spp.*;
- Identificar e quantificar o AF em plantas de *Salicornia spp.* obtidas *in vitro* e pré-aclimatadas.



## Capítulo 3

---



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Material Vegetal

Plantas matrizes de *Salicornia* spp. foram recolhidas na zona sul de Espanha, mais precisamente em Cádiz, e transportadas em recipientes plásticos higienizados até ao Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI) em Castelo Branco, Portugal, local que reúne todas as condições logísticas para a realização dos ensaios de micropropagação.

#### 3.2 Ensaio para o estabelecimento asséptico *in vitro*

Porções apicais, variando entre 5 e 10 cm de comprimento, coletadas das plantas matrizes, foram submetidas a uma fase de pré-asepsia, realizada em ambiente laboratorial, seguindo-se as seguintes etapas sequenciais: inicialmente, mantiveram-se as porções apicais em água corrente por 30 minutos; de seguida, estas porções foram imergidas em solução fungicida (Mancozebe® 1g/L) por 15 minutos sob agitação constante; finalmente, verteu-se a solução de fungicida e manteve-se o material vegetal num frasco estéril, fechado hermeticamente. Imediatamente após a pré asepsia, os materiais foram colocados na câmara de fluxo laminar, imersos em solução de etanol a 70% por 30 segundos sob agitação e então, submetidos à fase de asepsia propriamente dita, conforme os tratamentos descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Tratamentos de desinfecção utilizados nos ensaios de estabelecimento asséptico *in vitro* da *Salicornia* spp.

Tratamentos	NaCl (% na solução)	HgCl <sub>2</sub> (% na solução)	Imersão (minutos)
ET1	50 %	0	10
ET2	50%	0	15
ET3	33%	0	15
ET4	0	10%	3
ET5	0	50%	2

Após passagem pelos tratamentos mencionados na Tabela 2, os materiais foram lavados 5 vezes em água destilada esterilizada, com imersões sob agitação durante 1 minuto e mantidas dentro do frasco estéril e hermeticamente fechado.

Ainda na câmara de fluxo laminar, os materiais vegetais foram cortados, a fim de se obterem os explantes finais, sendo estes constituídos por segmentos apicais de 1,5 cm de comprimento.

Após o isolamento dos explantes, estes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 10 ml/tubo de meio de cultura MS (contendo macro e micronutrientes e vitaminas) suplementado com 30 g/L de sacarose, 7 g/L de agar, a pH 5,8; previamente esterilizados em autoclave (121 °C; 1,5 atm de pressão durante 25 minutos).

Posteriormente, os materiais foram cultivados em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) e intensidade luminosa ( $\pm 35 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ ), por um período de 45 dias.

No final do ciclo de cultivo foi elaborada uma triagem, contabilizando-se os explantes inviáveis por contaminação por fungos, bactérias ou por morte celular.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatório, com 5 tratamentos e 120 repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um explante. Os dados foram expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) mediante análises e testes estatísticos (Análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Turkey) realizados a partir do software GraphPad Prism 6.

### **3.3 Ensaios de multiplicação *in vitro***

#### **3.3.1 Método de Micropropagação Convencional - Primeiro ciclo experimental**

A partir de plantas *in vitro*, estabelecidas conforme definido na etapa de estabelecimento asséptico *in vitro* (secção 3.2), foram preparados explantes de 1,5 cm de comprimento que, posteriormente, foram inoculados em diferentes composições de meios de cultura, na porção de 15 mL/explante, conforme os tratamentos especificados na Tabela 3.



**Tabela 3** - Tratamentos de composição de meios de cultura utilizados nos ensaios de micropropagação convencional da *Salicornia* spp. (Primeiro ciclo).

Tratamentos	Meio de Cultura	Fito hormonas	NaCl ( $\mu\text{M}$ )
MC T1	MS	0	0
MC T2	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	0
MC T3	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	256 $\mu\text{M}$
MC T4	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	513 $\mu\text{M}$
MC T5	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	0
MC T6	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	256 $\mu\text{M}$
MC T7	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	513 $\mu\text{M}$
MC T8	MS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	0
MC T9	MS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	256 $\mu\text{M}$
MC T10	MS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	513 $\mu\text{M}$
MC T11	DMS	0	0
MC T12	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	0
MC T13	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	256 $\mu\text{M}$
MC T14	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	513 $\mu\text{M}$
MC T15	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	0
MC T16	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	256 $\mu\text{M}$
MC T17	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	513 $\mu\text{M}$
MC T18	DMS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	0
MC T19	DMS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	256 $\mu\text{M}$
MC T20	DMS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	513 $\mu\text{M}$

Após a inoculação *in vitro*, os materiais foram cultivados na sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) e intensidade luminosa ( $\pm 35 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ ), por um período de 45 dias.

No final do ciclo de cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos quantitativos e qualitativos: comprimento dos explantes; número de rebentos; presença ou ausência de raiz e robustez do explante.

O desenho experimental foi inteiramente aleatório, com 20 tratamentos e 30 repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um explante. Os ensaios foram repetidos três vezes, sendo os dados expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) mediante análises e testes estatísticos (Análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Turkey) realizados a partir do software GraphPad Prism 6.

### 3.3.2 Método de Micropropagação Convencional- Segundo ciclo experimental

A partir de plantas *in vitro*, estabelecidas conforme definido na etapa de "Ensaio para o estabelecimento asséptico *in vitro*" (tópico 3.2), foram preparados explantes de 1,5 cm de comprimento que, posteriormente, foram inoculados em diferentes composições de meios de cultura, na porção de 15 mL/explante, conforme tratamentos apresentados na Tabela 4, representados neste caso apenas pelos oito melhores tratamentos, face ao número de rebentos obtidos no primeiro ciclo experimental.

**Tabela 4** - Tratamentos de composição de meios de cultura utilizados no ensaio de micropropagação convencional da *Salicornia* spp. (Segundo ciclo)

Tratamentos	Meio de Cultura	Fito hormonas	NaCl ( $\mu\text{M}$ )
MC T2	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	0
MC T3	MS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	15
MC T9	MS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	256 $\mu\text{M}$
MC T10	MS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	513 $\mu\text{M}$
MC T14	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP	513 $\mu\text{M}$
MC T15	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	0
MC T17	DMS	8,87 $\mu\text{M}$ BAP + 5,37 $\mu\text{M}$ ANA	513 $\mu\text{M}$
MC T19	DMS	13,37 $\mu\text{M}$ L BAP + 2,28 mg/L ZEA	256 $\mu\text{M}$

Da mesma forma, uma vez inoculados *in vitro*, os explantes foram cultivados na sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) e intensidade luminosa ( $\pm 35 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ ), por um período de 45 dias. No final do ciclo de cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos quantitativos e qualitativos: comprimento dos explantes; número de rebentos.

A programação experimental foi inteiramente aleatória, com 8 tratamentos e 30 repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um explante. O ensaio foi repetido por três vezes, tendo os dados expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) mediante análises e testes estatísticos (Análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Turkey) realizados a partir do software GraphPad Prism 6.

### 3.3.3 Método de Micropropagação Convencional com Meta-Topolin - Terceiro ciclo experimental

A partir de plantas *in vitro*, estabelecidas conforme definido na etapa asséptica *in vitro* (secção 3.2), foram preparados explantes de 1,5 cm de comprimento que, posteriormente, foram inoculados em diferentes composições de meios de cultura, na porção de 15 mL/explante, conforme tratamentos apresentados na Tabela 5, representados neste caso apenas pelo meio de cultura que apresentou os melhores resultados, relativamente ao número de rebentos no segundo ciclo experimental, suplementado com o fito hormona Meta-topolin 6-(3-hydroxybenzylamino) purina.

**Tabela 5** - Tratamentos utilizados no ensaio de micropropagação convencional da *Salicornia* spp. (Terceiro ciclo)

Tratamentos	Meio de Cultura	Meta-topolin	NaCl ( $\mu\text{M}$ )
MCM T1	DMS	0	513 $\mu\text{M}$
MCM T2	DMS	0.031 $\mu\text{M}$	513 $\mu\text{M}$
MCM T3	DMS	0.062 $\mu\text{M}$	513 $\mu\text{M}$
MCM T4	DMS	0.124 $\mu\text{M}$	513 $\mu\text{M}$

Paralelamente ao que foi descrito anteriormente, uma vez inoculados *in vitro*, os materiais foram cultivados na sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) e intensidade luminosa ( $\pm 35 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ ), por um período de 45 dias.

No final do ciclo de cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos quantitativos e qualitativos: comprimento e número dos explantes.

O delineamento experimental foi inteiramente causalizado, com 4 tratamentos e 60 repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um explante. O ensaio foi repetido por três vezes, tendo os dados expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) mediante análises e testes estatísticos (Análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Turkey) realizados a partir do software GraphPad Prism 6.

### 3.3.4 Método de Micropropagação por Biorreatores de Imersão Temporária

A partir de plantas *in vitro*, estabelecidas conforme definido na etapa de estabelecimento asséptico *in vitro* (secção 3.2), foram preparados explantes de 1,5 cm de comprimento que, posteriormente, foram inoculados dentro de biorreatores modelo Setis®, em diferentes composições de meios de cultura, na porção de 17 mL/explante, e submetidos a diferentes regimes de imersão/ventilação, conforme tratamentos apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Tratamentos de composição de meios de cultura e regimes de imersão/ventilação utilizados no ensaio de micropropagação de *Salicornia* spp. em BIT's.

Tratamento	Meios	Imersão	Ventilação
<b>MBT1</b>	DMS	5 minutos a cada 3 hora	1 minuto a cada 3 horas
<b>MBT2</b>	DMS	5 minutos a cada 6 hora	1 minuto a cada 6 horas
<b>MBT3</b>	DMS	5 minutos a cada 12 hora	1 minuto a cada 12 horas

Após serem inoculados nos BIT's, os explantes foram cultivados em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) e intensidade luminosa ( $\pm 35 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ ), por um período de 45 dias.

No final do ciclo de cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos quantitativos e qualitativos: comprimento dos explantes; número de rebentos; presença/ausência de raiz; robustez.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatório, com 20 tratamentos e 30 repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por um explante. O ensaio foi repetido por três vezes, sendo os dados expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) mediante análises e testes estatísticos (Análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Turkey) realizados a partir do software GraphPad Prism 6.

### 3.4 Ensaios de pré aclimatização *ex vitro*

As plantas micropropagadas, mantidas *in vitro* em meio de cultura DMS sem fito hormonas, devidamente enraizadas, com tamanho aproximado de 3 cm e apresentando 0,750 g de peso fresco de parte aérea e 0,190 g de peso fresco de raiz, foram inicialmente lavados em água corrente até a eliminação total dos resíduos de meio de cultura, e inoculados em diferentes substratos, recebendo diferentes soluções nutritivas em irrigação, conforme tratamentos apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Tratamentos de substratos e soluções nutritivas em irrigação utilizados nos ensaios de pré aclimatização *ex vitro* da *Salicornia* spp.

Tratamentos	Substrato	Solução de irrigação
PCT1	JiffyPlug-7®	DMS
PCT2	JiffyPlug-7®	½ DMS
PCT3	JiffyPlug-7®	Água
PCT4	JiffyPlug-7®	Solução Nutritiva GroHo®
PCT5	Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1)	DMS
PCT6	Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1)	½ DMS
PCT7	Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1)	Água
PCT8	Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1)	Solução Nutritiva GroHo®

Uma vez inoculados nos substratos, as plantas foram colocadas em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão), intensidade luminosa ( $\pm 60 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$ ) e humidade relativa do ar externo (70- 75%), por um período 30 dias.

Sobre as soluções nutritivas utilizadas na irrigação: (a) JiffyPlug-7® é um produto comercial utilizado em processos de crescimento e pré-aclimatização *ex vitro*, no presente trabalho foram utilizados os plugs com 36 mm de diâmetro. (b) Substrato Universal Siro® é um substrato com uma composição rica em húmus, trufas brancas e com fertilização organo-mineral contendo um pH entre os 5,5 e os 6,5. É de salientar que a sua composição inclui 0,8-150 mg/L de azoto/fósforo e 300-500 mg/L de potássio. (c) Solução Nutritiva GroHo® é composta por: sulfato de magnésio - 16% MgO/32% SO<sub>3</sub>; Fosfato monoamónio (MAP) - 12% N/61% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; nitrato cálcio; 15,5% N/19% Ca; nitrato de potássio - 13,5% N/45,5% K<sub>2</sub>O; micronutrientes (sulfato manganês, ácido bórico, cobre, molibdato de amónio, sulfato de zinco, ferro 6%). Devido à elevada concentração desta solução a empresa responsável pela comercialização aconselha adicionar os 4 macronutrientes e 1 micronutriente em 5 garrações de 5 litros de água destilada (1 nutriente por cada garração), e realizar a proporção de 100 ml de solução para cada 20 litros de água.

Após a preparação das diferentes soluções de irrigação, foi adicionado 100 ml de solução num pulverizador manual e foram realizadas duas pulverizações por dia, direcionada a cada planta, durante os primeiros oito dias. Após o oitavo dia as plantas começaram a ser pulverizadas de dois em dois dias, até completar os 30 dias previstos para esta etapa.

Ao final do ciclo de cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos quantitativos e qualitativos: comprimento dos explantes; peso fresco da parte aérea; peso fresco da raiz e robustez.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatório, com 8 tratamentos e 30 repetições por tratamento, onde cada repetição foi representada por uma planta micropropagada. Os dados foram expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) mediante análises e testes estatísticos (Análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Turkey) realizados a partir do software GraphPad Prism 6.

### 3.5 Robustez

A robustez, com base em uma escala definida pelo operador e que permite avaliar o sucesso do ensaio, tendo em conta a qualidade visual associada ao desenvolvimento geral do explante. Esta triagem permite identificar possíveis erros de preparação de soluções nutritivas através das diferentes colorações apresentadas pelos explantes ou identificar a necessidade de substituir o material vegetal [62]. A classificação encontra-se definida entre 1 (menor robustez) e 5 (maior robustez). Neste sentido, um explante com classificação de 1 apresenta necrose em praticamente todo o tecido, por sua vez; um explante de classificação 2 apresenta as partes superiores com aspeto saudável; grau 3 apresenta alguma necrose e algum grau de vitrificação dos tecidos, querendo isto dizer que no momento em que o operador efetua a separação dos tecidos para iniciar a multiplicação, os mesmos desfazem-se apesar de terem um aspeto saudável, a vitrificação nos explantes pode ser reversível e o explante fica apto para uma nova fase de multiplicação; o grau 4 não apresenta necrose, mas apresenta um elevado grau de vitrificação; por último o grau 5 apresenta explantes totalmente saudáveis, sem necrose e sem vitrificação dos tecidos. A Figura 8 representa as diferenças entre um explante de classificação 2 e classificação 5 [63].



**Figura 8** - Diferença visual entre o grau de robustez da *Salicornia spp.* 2 (A) e o grau de robustez 5 (B).

## 3.6 Quantificação do ácido *trans*-ferúlico

### 3.6.1 Instrumentação

- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10® system da Millipore (Algés, Portugal);
- Balança analítica Sartorius S.A. (Via Athena, Sacavém, Portugal);
- Vórtex Mixer da labnet International - modelo 230V (Via Athena, Sacavém, Portugal);
- Câmara Frigorífica de 4 °C Dagard Ibérica (Odivelas, Portugal);
- Micropipetas automáticas de 20µL, 200µL e 1000µL Eppendorf (Madrid, Espanha);
- Centrífuga. Alegria 25R Beckman Coulter (VWR international, Carnaxide, Portugal);
- Agitador de Rolos Mecânico Phoenix Instruments (Via Athena, Sacavém, Portugal);
- Sistema de Evaporação Automático TurVap® LV Biotage (Via Athena, Sacavém, Portugal);
- Filtro de HPLC.

### 3.6.2 Recolha e preparação do material vegetal

Após o término das fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, foram recolhidas plantas provenientes dos métodos anteriormente mencionados.

Após a recolha, as amostras foram desidratadas numa estufa (nome da estufa) a 60 °C durante 12h e de seguida foram recolhidas e armazenadas à temperatura ambiente.

### 3.6.3 Procedimento de extração

O procedimento de extração do AF iniciou-se com a adição da a desidratação num almofariz da salicórnia. De seguida, esta planta seca foi vigorosamente maciada durante alguns minutos. Depois foram pesados 0,2 mg da amostra para um falcon de 15 mL e adicionados 2mL de metanol. Os falcons foram posteriormente colocados num agitador de rolos durante 3 horas. Terminado este período, centrifugou-se durante 5 min a 2000g e descartou-se o sobrenadante. Finalmente ressuspenso-se a amostra em 2 mL de acetonitrilo a 1% e filtrou-se a mistura comum filtro de celulose com um diâmetro de partícula de 0,25 µm.

### 3.6.4 Sistema cromatográfico e de deteção

Na deteção do AF foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor de *diode array* (DAD) modelo 1290 da Agilent Technologies com uma



coluna de fase reversa ZORBAX SB-C18, 4,6x150 mm, 1,8  $\mu$ m, Agilent Technologies (Soquimica, Lisboa, Portugal).

#### **3.6.4.1 Padrões analíticos e outros reagentes**

O padrão analítico do AF puro foi adquirido comercialmente (Sigma Aldrich, Sintra, Portugal). e o acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), ácido fórmico (todos eles de grau HPLC) foram fornecidos pela Enzymatic (Santo Antão do Tojal, Portugal).

Na realização desta parte experimental foi utilizado 1% de AF diluído em MeOH. A partir desta solução foi preparada uma solução de trabalho a 100  $\mu$ g/mL em metanol. Ambas as soluções foram mantidas a -4 °C e em ausência de luz até a sua utilização.

#### **3.6.4.2 Condições cromatográficas**

As condições cromatográficas utilizadas para o desenvolvimento do presente trabalho consistiram na utilização de uma fase móvel de ACN + ácido fórmico 0,1 % (35:65; v/v) pH=5,7. Foram injetados no equipamento 10 $\mu$ L de amostra, foi usado um fluxo de 1 mL/min em modo isocrático, a temperatura da coluna foi 25°C e a temperatura do amostrador 4°C. O comprimento de onda utilizado foi de 305 nm e o ensaio decorreu durante 10 minutos.



## Capítulo 4

---

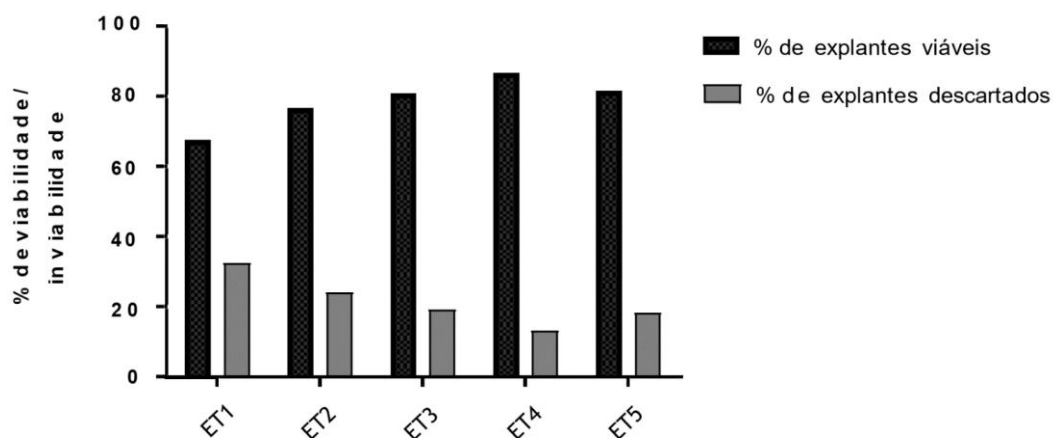


## 4. Resultados e Discussão

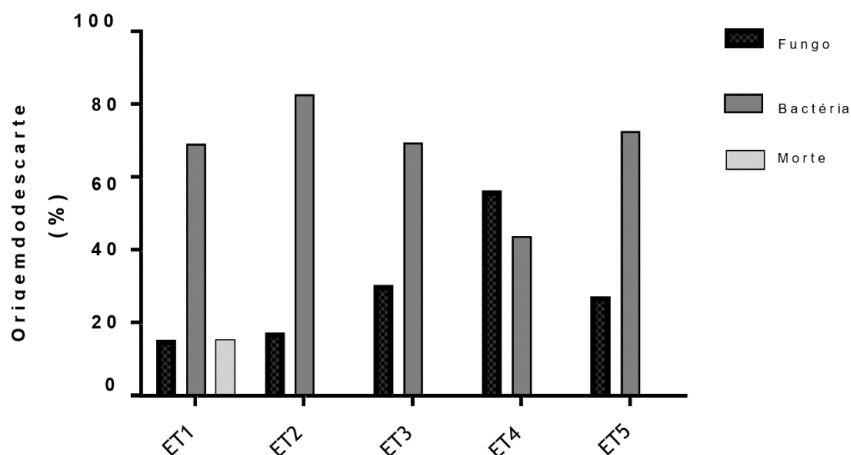
Os tratamentos aplicados nos diferentes ensaios realizados neste trabalho refletiram em significativa influência nos resultados obtidos o que, a partir de agora, será apresentado e discutido.

### 4.1 Estabelecimento assético *in vitro*

A Figura 9 apresenta a percentagem de explantes viáveis e descartados face à utilização dos meios de desinfecção anteriormente mencionados na secção 3.2 (Estabelecimento asséptico *in vitro*). Verificou-se que o método mais eficiente de desinfecção foi o método ET4 (imersão durante 3 minutos em solução de  $\text{HgCl}_2$  a 10%) com 86,67% dos explantes viáveis e apenas 19,17% descartados. Através da Figura 8 é possível verificar a causa dos explantes descartados, ou seja, dos 19,17 % descartados, 43,75 % foram eliminados por estarem contaminados por bactérias e 56,25% devido a contaminação por fungos. A fonte deste tipo de contaminações dificilmente será detetada nesta fase, uma vez, que as plantas matrizes, que fornecem os explantes iniciais, foram coletadas em habitat natural. No entanto, as contaminações podem resultar também de erros do operador. A figura 10 apresenta a percentagem de contaminações existentes.



**Figura 9** - Percentagem de explantes viáveis e descartados conforme método de desinfecção utilizado no material vegetal de *Salicornia* spp. (ET1= NaClO a 50%, 10 minutos de imersão; ET2= NaClO a 50%, 15 minutos de imersão; ET3= NaClO a 33%, 15 minutos de imersão; ET4=  $\text{HgCl}_2$  a 10%, 3 minutos de imersão; ET5=  $\text{HgCl}_2$  a 50%, 2 minutos de imersão)(n= 120).



**Figura 10** - Percentagem de contaminações existentes com base nos meios utilizados na desinfecção do material vegetal de *Salicornia* spp. (ET1= NaClO a 50%, 10 minutos de imersão; ET2= NaClO a 50%, 15 minutos de imersão; ET3= NaClO a 33%, 15 minutos de imersão; ET4= HgCl<sub>2</sub> a 10%, 3 minutos de imersão; ET5= HgCl<sub>2</sub> a 50%, 2 minutos de imersão) (n= 120).

## 4.2 Multiplicação *in vitro*

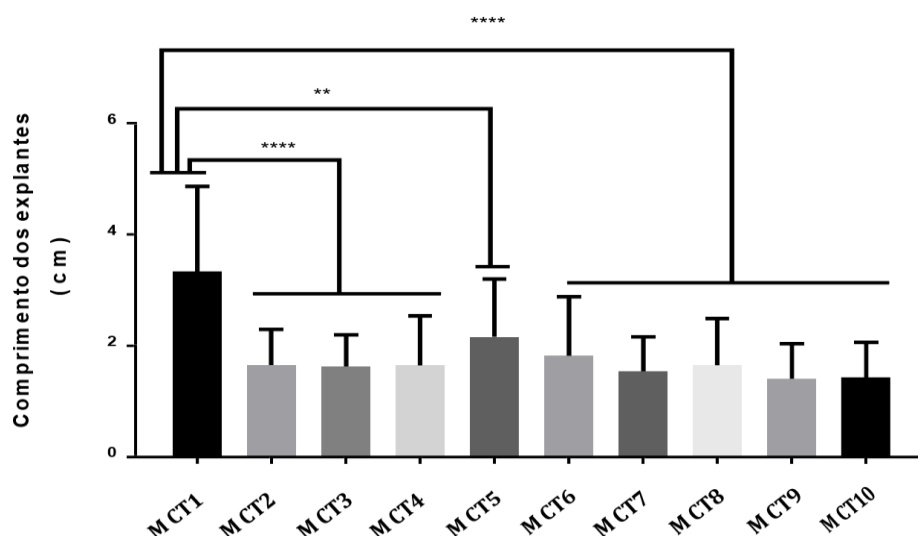
### 4.2.1 Método de micropropagação convencional - primeiro ciclo experimental

#### *Comprimento dos explantes*

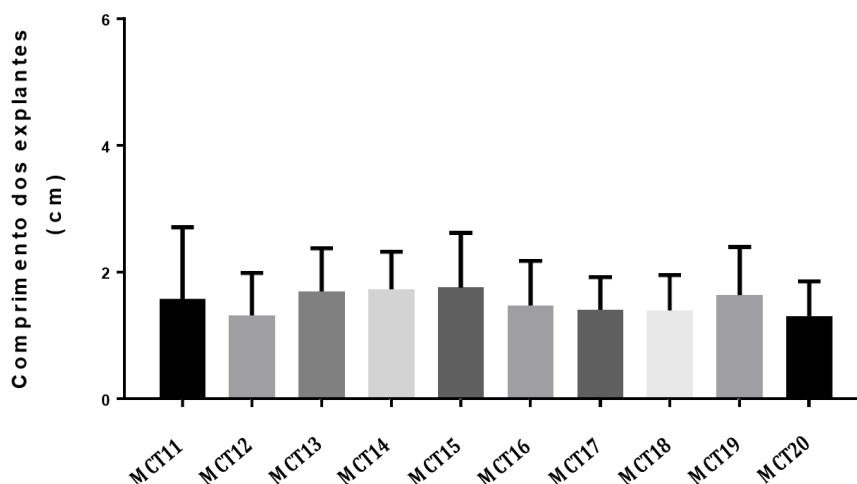
As Figuras 11 e 12 contêm os resultados relativos ao comprimento dos explantes em meios de cultura com bases MS e DMS. Conforme demonstrado na Figura 11, verifica-se claramente que o meio MCT1 (MS sem fito reguladores e sem NaCl) se destaca dos demais meios de base MS e de base DMS, sendo o tratamento onde se obteve maior desenvolvimento dos explantes. O facto dos explantes sujeitos ao tratamento MCT1 (Ms) terem um desenvolvimento tão elevado, comparativamente com os restantes tratamentos, indica que as concentrações de fito hormonas utilizadas podem talvez provocar algum tipo de cito toxicidade, desenvolvendo um deficiente crescimento dos explantes do ensaio. Aliás, estudos já foram realizados neste sentido por Machado e colaboradores em 2011 [64]. Neste estudo, provou-se que o uso de citocininas é vantajoso para a estimulação da parte aérea, mas quando utilizado em concentrações elevadas promovem um crescimento deficiente. Jordan e os seus colaboradores em 2016 descreveram diversas metodologias eficientes de micropropagação de *Lavandula dentata* adulta utilizando concentrações da fitohormona BAP em concentrações de 2 µM (durante a parte prática desta dissertação foram utilizadas 8,86 µM). Apesar de serem espécies diferentes, pode verificar-se

que as concentrações utilizadas no presente trabalho são muito mais elevadas do que as concentrações utilizadas por Jordan (2016), o que pode indicar uma inibição do crescimento por excesso de fito hormonas [65].

Comparando a Figura 11 com a 12 pode observar-se que, os explantes em meio MCT1 (base MS) e em meio MCT11 (base DMS), ambos os meios sem adição de fito hormonas ou NaCl, tiveram resultados significativamente distintos. Neste caso, podemos assumir que provavelmente a citotoxicidade deu-se pela inibição de crescimento por parte da adição do dobro da concentração de macronutrientes nos meios de cultura de base DMS, tanto é que todos os tratamentos apresentados na Figura 11 não atingiram diferenciação significativa face ao comprimento dos explantes. Em comparação com a Figura 10 os tratamentos onde foram adicionadas fito hormonas promoveram um desempenho ligeiramente inferior no crescimento dos explantes frente ao tratamento isento (MCT1). Esta tendência no comportamento dos explantes já havia sido reportada e, neste sentido, já havia sido mencionada a necessidade de se reduzir a concentração de macronutrientes utilizados no ensaio. Sendo que a concentração de macronutrientes em excesso pode ter um efeito inibitório e causar hiper-hidricidade dos tecidos [59].



**Figura 11** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no primeiro ciclo experimental utilizando o meio nutritivo MS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. (MCT1= MS; MCT2= MS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT4= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT5= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT6= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT7= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT8= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT9= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT10= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).



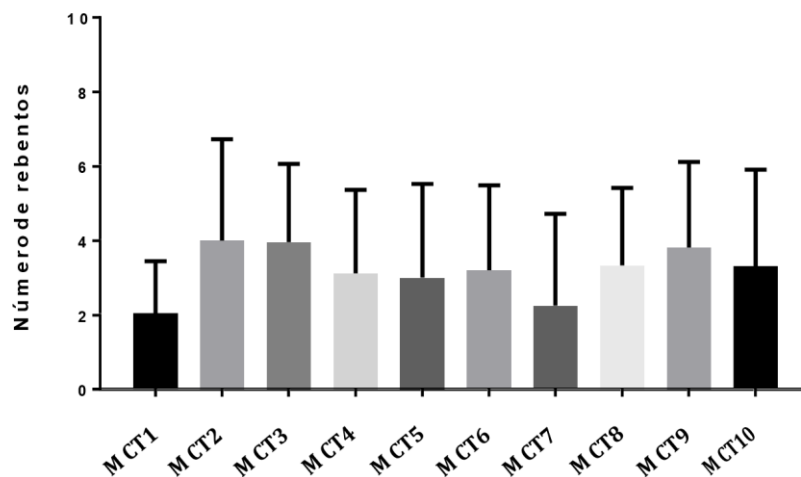
**Figura 12** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no primeiro ciclo experimental utilizando o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. (MCT11= DMS; MCT12= DMS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT13= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT14= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT15= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT16= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT17= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT18= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT19= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT20= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).

### **Número de rebentos**

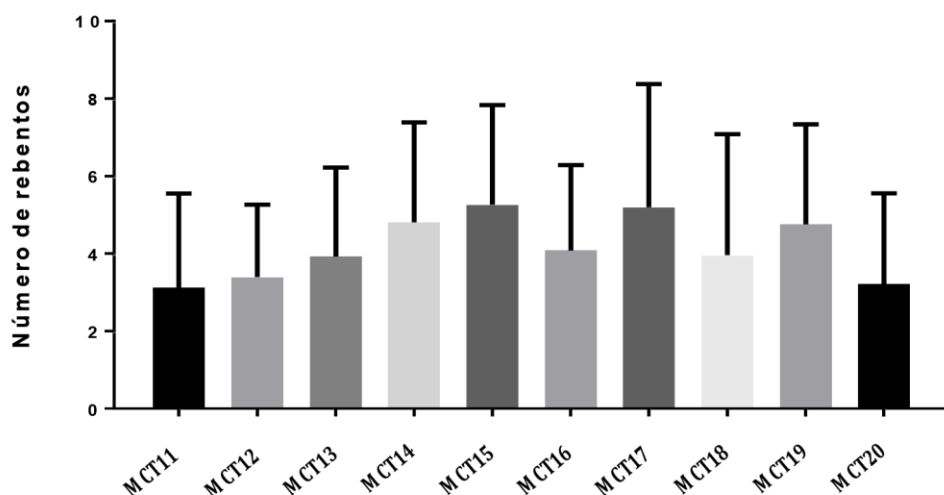
Nas Figuras 13 e 14 podem ser observados os dados relativos ao número de rebentos formados nos explantes de cada ensaio. É importante realçar os quatro tratamentos que apresentaram melhores resultados conforme cada base nutricional: MCT2 (MS, 8.87  $\mu$ M BAP), MCT3 (MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl), MCT9 (MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl), MCT10 (MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl), MCT14 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl), MCT15 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA) MCT17 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl) e MCT19 (DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl). Em geral foram nos tratamentos com base DMS onde se observaram maior número de rebentos formados, com destaque para os tratamentos MCT15 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA) que produziu uma média de 4,26 rebentos e o MCT17 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl) com média de 4,19 rebentos formados. Uma vez que, apesar destas plantas terem sofrido uma possível ação inibitória por parte das fitohormonas adicionadas ao meio, verificou-se que impossibilitou a obtenção de um elevado crescimento, já descrito no capítulo anterior, as



mesmas fitohormonas neste caso foram responsáveis pelo desenvolvimento de um maior número de novos rebentos, o que possibilitará gerar novas plantas através dos processos de multiplicação *in vitro*. Também neste caso em específico de desenvolvimento de novos rebentos, pode ter existido desenvolvimento deficitário dos rebentos por combinações mal efetuada de auxinas com citocininas. No presente ensaio, as combinações de ANA e da citocinina BAP aumentam a formação de brotos, mas não se consegue saber ao certo se o crescimento está maximizado pelas concentrações utilizadas. A diferença do número de novos rebentos obtidos a partir dos tratamentos com meios de cultura de bases nutritivas MS e DMS pode ser justificada pelo dobro de macronutrientes disponíveis no meio, no caso do DMS, apesar de ter provocado uma possível inibição no crescimento conforme descrito no tópico anterior, o mesmo pode ser a justificação para o desenvolvimento de um maior número de rebentos quando aleado a fito hormonas [66].



**Figura 13** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do primeiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo MS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. (MCT1= MS; MCT2= MS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT4= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT5= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT6= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT7= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT8= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT9= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT10= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).

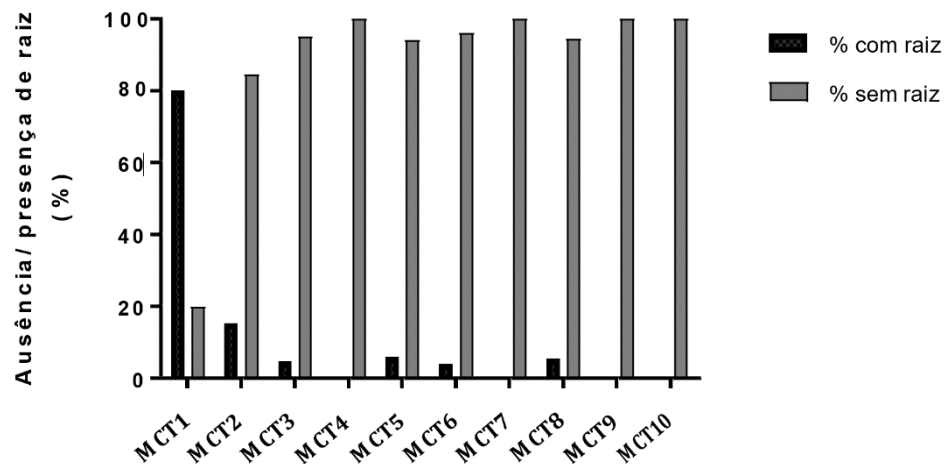


**Figura 14** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do primeiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P,  $n=30$ . (MCT11= DMS; MCT12= DMS com  $8.87 \mu\text{M}$  BAP; MCT13= DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP,  $256 \mu\text{M}$  de NaCl; MCT14= DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP,  $513 \mu\text{M}$  de NaCl; MCT15= DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA; MCT16= DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $256 \mu\text{M}$  de NaCl; MCT17= DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $513 \mu\text{M}$  de NaCl; MCT18= DMS,  $13.37 \mu\text{M}$  L BAP +  $2.28\text{mg/L}$  ZEA; MCT19= DMS,  $13.37 \mu\text{M}$  L BAP +  $2.28\text{mg/L}$  ZEA,  $256 \mu\text{M}$  de NaCl; MCT20= DMS,  $13.37 \mu\text{M}$  L BAP +  $2.28\text{mg/L}$  ZEA,  $513 \mu\text{M}$  de NaCl).

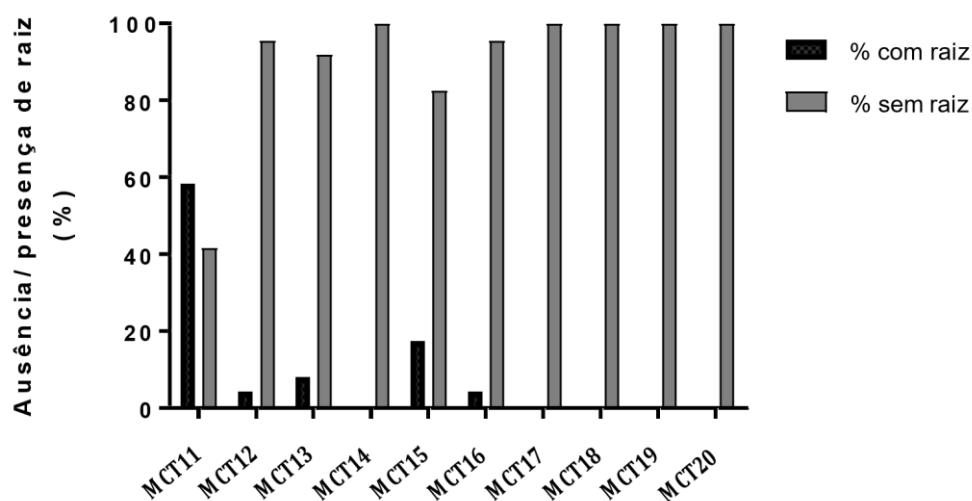
### ***Presença ou ausência de raiz***

Na Figura 15 e 16 pode verificar-se percentagem de explantes com raiz ao longo dos diferentes tratamentos. Em ambas a figura se verifica que os tratamentos que levaram ao desenvolvimento de um maior número de raízes são os tratamentos MCT1 (base MS) e MCT11 (base DMS), ambos os tratamentos sem adição de hormonas. Anteriormente na secção 4.2.1 (Método de micropropagação convencional - primeiro ciclo experimental) foi mencionado que a causa possível do não desenvolvimento dos explantes face ao comprimento e número de rebentos, pode estar diretamente relacionado com a utilização de concentrações elevadas das fito hormonas, o mesmo se verifica no desenvolvimento de raiz, o ANA é uma fito hormona responsável pelo desenvolvimento de raízes em multiplicação *in vitro* [67]. Além do mais, utilizando os tratamentos MCT5 (MS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA), MCT6 (MS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $256 \mu\text{M}$  de NaCl), MCT7 (MS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $513 \mu\text{M}$  de NaCl), MCT15 (DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA), MCT16 (DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $256 \mu\text{M}$  de NaCl) e MCT17 (DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $513 \mu\text{M}$  de NaCl), sendo o ponto em comum entre os diferentes tratamentos a presença de ANA, verificou-se um ligeiro desenvolvimento da raiz,

mesmo sem significância quando comparado com os tratamentos em que não foram utilizadas adição de hormonas. O que pode indicar um possível efeito inibitório no crescimento e desenvolvimento dos explantes, não só pela combinação de hormonas, como devido às concentrações utilizadas.



**Figura 15** - Percentagem de ausência/ presença de raiz nos explantes de *Salicornia* spp. do primeiro ciclo experimental com meio nutritivo MS (n=30). (MCT1= MS; MCT2= MS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT4= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT5= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT6= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT7= MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT8= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT9= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT10= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).



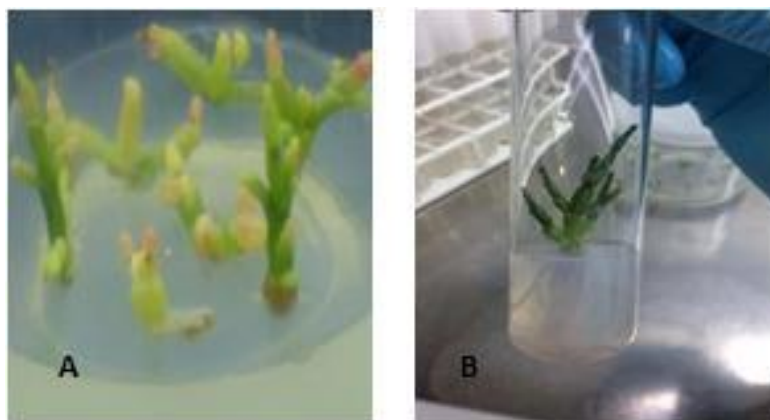
**Figura16** - Percentagem de ausência/ presença de raiz nos explantes de *Salicornia* spp. do primeiro ciclo experimental com meio nutritivo DMS (n=30). (MCT11= DMS; MCT12= DMS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT13= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT14= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT15= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT16= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT17= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT18= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA; MCT19= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT20= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).

Na Figura 17 pode verificar-se a comparação entre os diferentes tratamentos e o resultado da literatura. A Figura 17 B, demonstra resultados do presente trabalho, obtiveram um grau de vigor de 5 enquanto os explantes presentes na Figura 17 A encontra-se com um grau de 1 a 2 [2].

Em 2012, Joshia e colaboradores utilizaram um meio nutritivo MS suplementado com BA a 8.9  $\mu$ M + NAA a 5.37  $\mu$ M e NaCl 500 mM, obtendo ao final de 45 dias o resultado visual apresentado na Figura 17 A. Em comparação os tratamentos mais aproximados utilizados no presente ensaio foram os tratamentos MCT7 (MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl) (Figura 17 B) com 45 dias.

Apesar das concentrações de NAA, NaCl serem praticamente idênticas às utilizadas por Joshia e colaboradores, o presente trabalho utiliza BAP em vez de BA. A literatura refere que estes compostos são quimicamente muito semelhantes (não sendo exatamente iguais) e promovem o mesmo comportamento nas plantas [68]. Os principais motivos que levam à obtenção de uma diferença tão significativa na qualidade dos explantes deve-se: à época e estado de recolha do material vegetal e às condições de crescimento do material vegetal. Apesar do autor não fazer referência à geolocalização do local de recolha e à data da mesma, fazer uma recolha do material vegetal no final do seu ciclo de crescimento afeta o seu desempenho *in vitro*.

Apesar das amostras utilizadas no presente estudo terem sido adquiridas a partir do habitat natural, as mesmas foram adquiridas em julho e, a *Salicornia* tem um tempo de vida útil após colheita de aproximadamente 21 dias a uma temperatura de 1 a 4 °C, encontrando-se na mesma no período do ciclo de vida com maior desempenho [6].



**Figura 17** - Comparação do grau de robustez de explantes de *Salicornia* spp. sujeitos a diferentes tratamentos: (A) imagem retirada do artigo de Joshia e colaboradores, 2012 (utilizando BA a 8.9  $\mu\text{M}$  + NAA a 5.37  $\mu\text{M}$  e NaCl a 500  $\mu\text{M}$ ) joshia; (B) resultado do tratamento usado nesta dissertação de mestrado mais idêntico ao utilizado pelo autor anteriormente referido (MCT7 - BAP a 8.87  $\mu\text{M}$  + NAA 5.37  $\mu\text{M}$  e NaCl a 513  $\mu\text{M}$  [2]

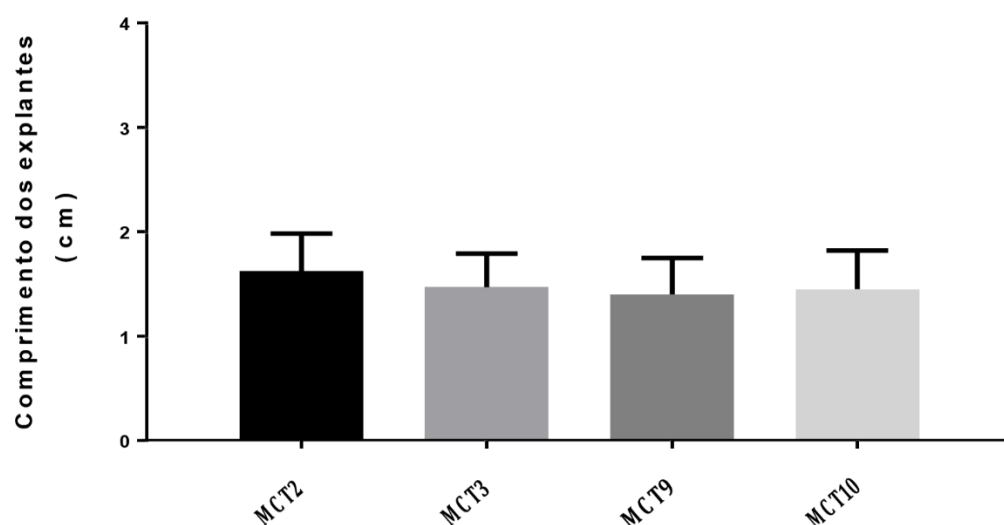
#### 4.2.2 Método de micropropagação convencional - segundo ciclo experimental

##### *Comprimento dos explantes*

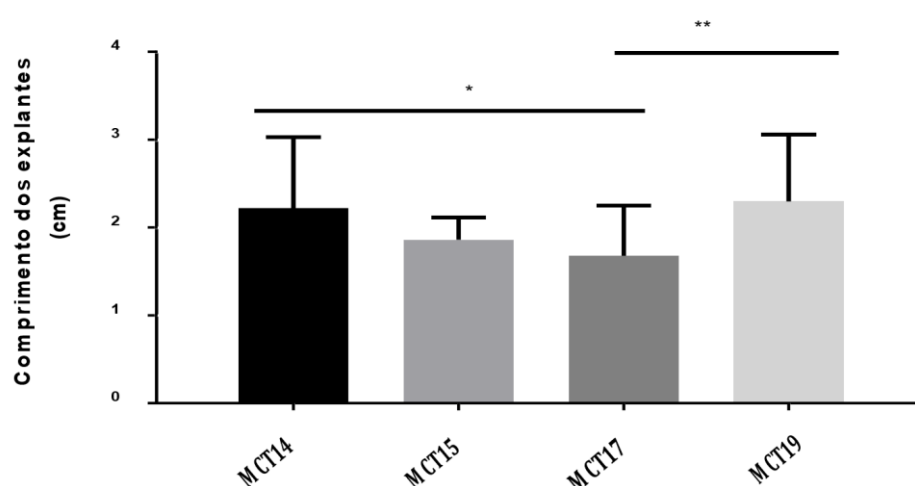
Após o primeiro ciclo experimental realizou-se um segundo ciclo, afunilando com os quatro melhores tratamentos de cada base nutricional (MS/ DMS), tendo em conta o número de rebentos formados. Os resultados podem ser observados nas Figuras 18 e 19.

O segundo ciclo experimental foi realizado com o intuito de verificar o comportamento dos explantes num novo ciclo de multiplicação, validando a reprodutibilidade dos explantes de ciclo para ciclo. A reprodutibilidade dos explantes é importante uma vez que permitem obter vários ciclos de micropropagação sem necessidade de realizar novas introduções *in vitro*, e consequentemente gastos acrescidos ao processo [69]. Relativamente ao comprimento dos explantes (Figura 18 em meios de base MS e Figura 19 em meios de base DMS) o valor mantem-

se praticamente idêntico aos do primeiro ciclo, o que indica que os explantes se mantêm viáveis para um novo ciclo.



**Figura 18** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo MS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. (MCT2= MS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT9= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT10= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).

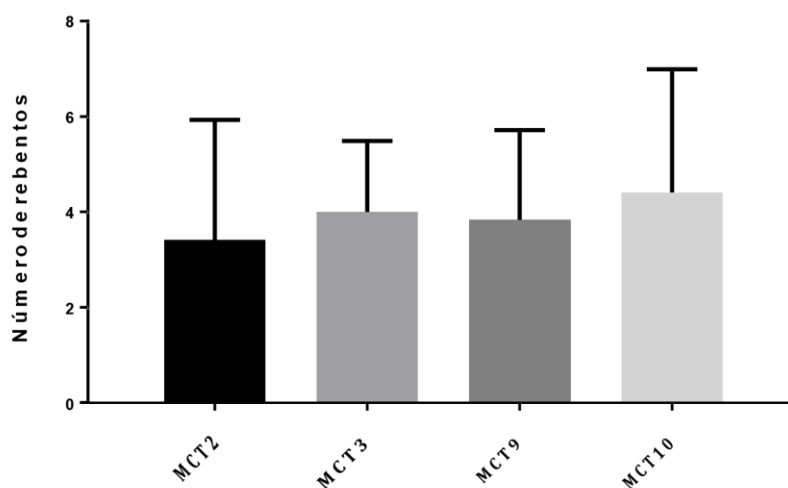


**Figura 19** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. (MCT14= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT15= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT17= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT19= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl).

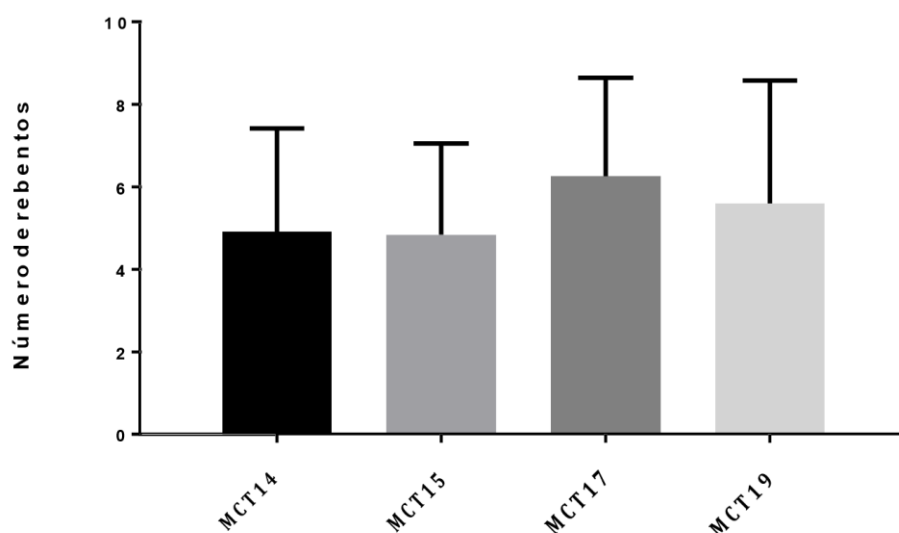
## Número de rebentos

As Figuras 20 e 21 apresentam o número de rebentos do segundo ciclo experimental. Neste ciclo observou-se um ligeiro aumento nos números, o que os tornam de facto positivos e reforçam os resultados apresentados no primeiro ciclo experimental.

É importante que entre cada ciclo se verifique um aumento, ou que se mantenha pelo menos o mesmo número de novos rebentos, uma vez que cada novo rebento irá gerar um novo explante no processo de multiplicação *in vitro*. Por outro lado, o decréscimo deste fator, associado ao não desenvolvimento do comprimento dos explantes, acaba por tornar a adoção da técnica inviável, podendo ser um indicativo de que as condições adotadas não são as ideais ou pior, que os explantes já estejam apresentando alguma incapacidade ou disfunção fisiológica para responderem aos estímulos fornecidos, como por exemplo o meio de cultura.



**Figura 20** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo MS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P,  $n=30$ . MCT2= MS com 8.87  $\mu$ M BAP; MCT3= MS, 8.87  $\mu$ M BAP, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT9= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl; MCT10= MS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 513  $\mu$ M de NaCl).



**Figura 21** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do segundo ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P,  $n=30$ . MCT14= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT15= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA; MCT17= DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl; MCT19= DMS, 13.37  $\mu$ M L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu$ M de NaCl).

#### 4.2.3 Método de micropropagação convencional - segundo ciclo experimental (meta-topolin)

##### *Comprimento dos explantes*

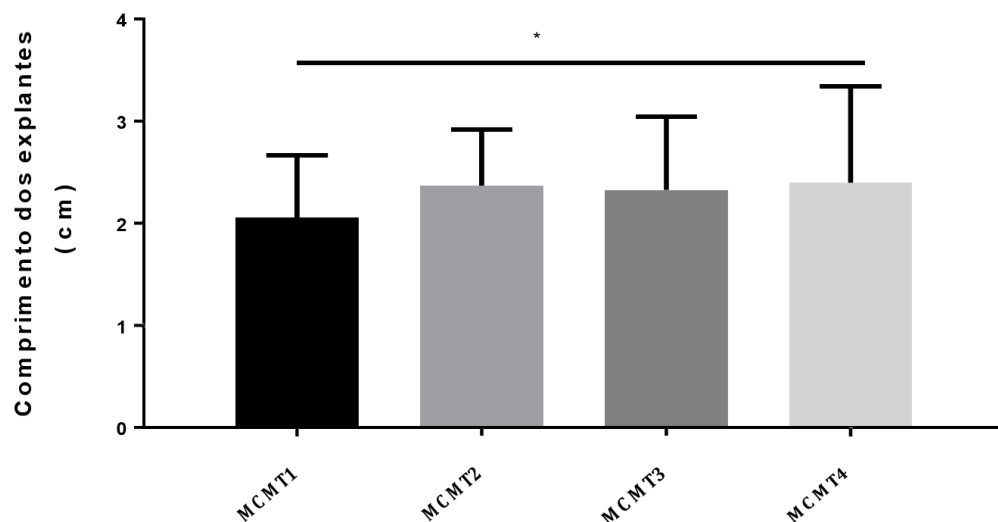
A Figura 22 traduz os resultados do segundo ciclo experimental relativamente ao comprimento dos explantes após utilização do meta-topolin no meio de cultura. Neste ciclo foi utilizado o meio de cultura DMS, com o intuito de verificar se existem alterações no crescimento e no desenvolvimento de novos rebentos, comparando com o desenvolvimento relativo ao crescimento e desenvolvimento de novos rebentos do tratamento MCT14 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl) dos ciclos experimentais 1 e 2.

Esta hormona encontra-se caracterizada na literatura como capaz de promover uma melhor formação de brotos quando comparada com a fito hormona BAP [70]. É possível verificar através dos dados apresentados na Figura 16 que existe uma certa semelhança entre os resultados obtidos nos tratamentos MCMT2 (DMS, 0.031  $\mu$ M meta-topolin ,513  $\mu$ M de NaCl), MCMT3 (DMS, 0.062  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl) e MCMT4 (DMS, 0.124  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl), e uma ligeira discrepância entre os mesmos com o tratamento MCMT1 (DMS,513  $\mu$ M de



NaCl). Quando comparados diretamente com o tratamento MCT14 (DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl), os três tratamentos MCMT2 (DMS, 0.031  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl), MCMT3 (DMS, 0.062  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) e MCMT4 (DMS, 0.124  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) apresentam um comportamento muito semelhante. Ao serem comparados os resultados dos três tratamentos anteriormente mencionados com os restantes tratamentos, independentemente da base nutricional, percebemos que apenas o tratamento MCT1 (DMS, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) apresenta um resultado discrepante, o que reforça as afirmações relativamente à possível inibição por adição de hormonas.

Apesar do tratamento MCMT1 (DMS, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) não conter hormonas, verifica-se que nos ciclos experimentais anteriores, o tratamento de base nutritiva DMS também não apresentava um crescimento significativo, como já foi explicado na secção tópico 4.2.1.1.

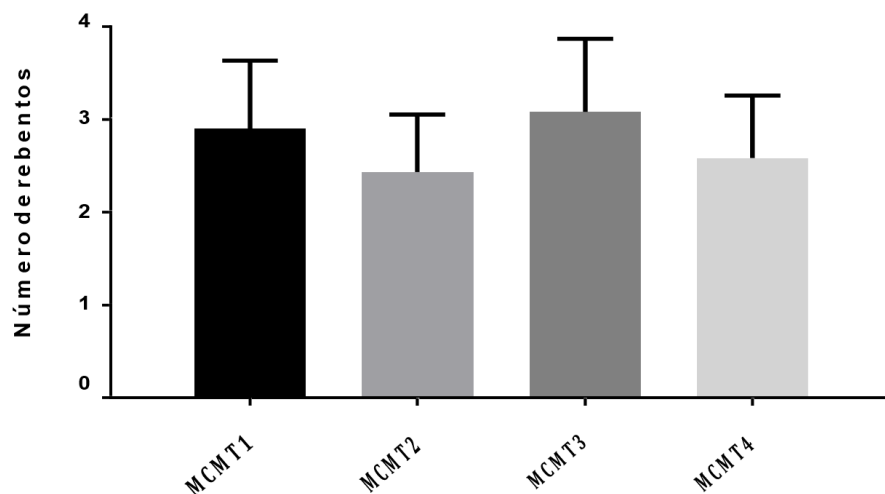


**Figura 22** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no terceiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=60. (MCMT1= DMS, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCMT2= DMS, 0.031  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCMT3= DMS, 0.062  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl; MCMT4= DMS, 0.124  $\mu\text{M}$ , 513  $\mu\text{M}$  de NaCl).

### **Número de rebentos**

A Figura 23 demonstra os resultados do número de novos rebentos presentes após utilização do meta-topolin. Analisando os tratamentos utilizados nesta secção experimental verifica-se que o MCMT1 (DMS, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) e MCMT3 (DMS, 0.062  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) obtiveram um ligeiro destaque, sendo o MCMT3 DMS, 0.062  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl) aquele cujos resultados foram mais notórios.

Comparando o tratamento MCMT3 (DMS, 0.062  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl) com o tratamento MCT14 (DMS, 8.87  $\mu$ M BAP, 513  $\mu$ M de NaCl), verifica-se que utilizando no primeiro o número de rebentos foi inferior aos verificados no segundo. Nesta secção experimental, verifica-se que o meio sem adição de meta-topolin (MCM T1) gerou praticamente o mesmo número de rebentos que o tratamento MCMT3 (DMS, 0.062  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl) o que indica que pode existir a promoção de uma ação inibitória por parte desta fitohormona. Esta afirmação é reforçada pelo facto do tratamento idêntico ao MCMT1 (DMS, 513  $\mu$ M de NaCl), o MCT11 (MCT11= DMS), ter promovido a indução de um número praticamente idêntico de novos rebentos e, pelo facto dos tratamentos MCMT2 (DMS, 0.031  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl) e MCMT4 (DMS, 0.124  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl) levarem à obtenção de um número de novos rebentos inferior ao tratamento MCMT1 (MCMT1= DMS). Sendo assim, comparando estes resultados com os dos restantes tratamentos e, independentemente da base nutricional, verifica-se que a utilização do meta-topolin permitiu o desenvolvimento de um número inferior de novos rebentos quando comparado com os meios de base DMS e também igualmente inferior quando comparado com os meios de base MS, com exceção, dos tratamentos MCT1 (MS) e MCT7 (MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl) que obtiveram um desempenho inferior.



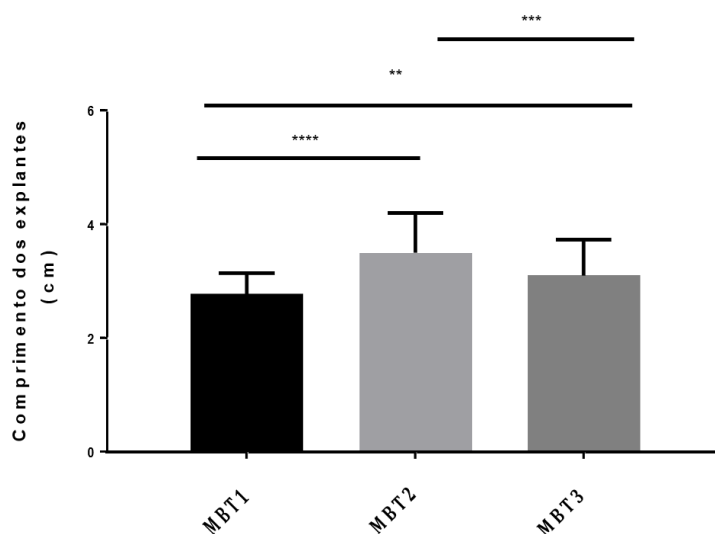
**Figura 23** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes *de Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do terceiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=60. (MCMT1= DMS, 513  $\mu$ M de NaCl; MCMT2= DMS, 0.031  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl; MCMT3= DMS, 0.062  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl; MCMT4= DMS, 0.124  $\mu$ M meta-topolin, 513  $\mu$ M de NaCl)

## 4.3 Método de micropropagação por Biorreatores de Imersão Temporária

### 4.3.1 Comprimento dos explantes

Tendo em conta os resultados obtidos relativamente ao número de rebentos e quantidade de NaCl presente nos tratamentos anteriormente mencionados, para o ensaio de BIT's foram selecionadas as condições relativas ao tratamento MCT17 (MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl). Apesar de não existir diferença estatística entre os tratamentos MC T15 = DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA e MCT17 MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl, optou-se por utilizar as condições relativas ao tratamento MCT17 (MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl, uma vez que contem na sua composição NaCl (as plantas no habitat natural desenvolvem-se em locais com grande concentração de NaCl) na sua formulação, sendo que este tratamento também leva á obtenção de explantes de maior qualidade visual que o tratamento MCT15 DMS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA).

Na Figura 24 é possível observar-se que o tratamento que se destaca relativamente ao comprimento dos explantes obtidos usando BIT's é o MBT2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de Imersão). O facto de promover um aumento do comprimento dos explantes relativamente significativo face aos restantes tratamentos, comprova que os tempos de aeração e imersão dos explantes, apresentaram-se ideais. Sendo este um trabalho pioneiro com esta espécie, futuramente pode ser otimizado o protocolo, com o intuito de perceber quais as condições que promovem um ainda melhor desenvolvimento de biomassa. Assim como já foi referido anteriormente, o controlo da imersão é um passo extremamente importante no uso de BIT's, sendo o que praticamente dita a eficiência da absorção dos nutrientes por parte dos explantes utilizados, evitando a saturação de nutrientes e consecutivamente o stress provocado pela mesma causa [71].

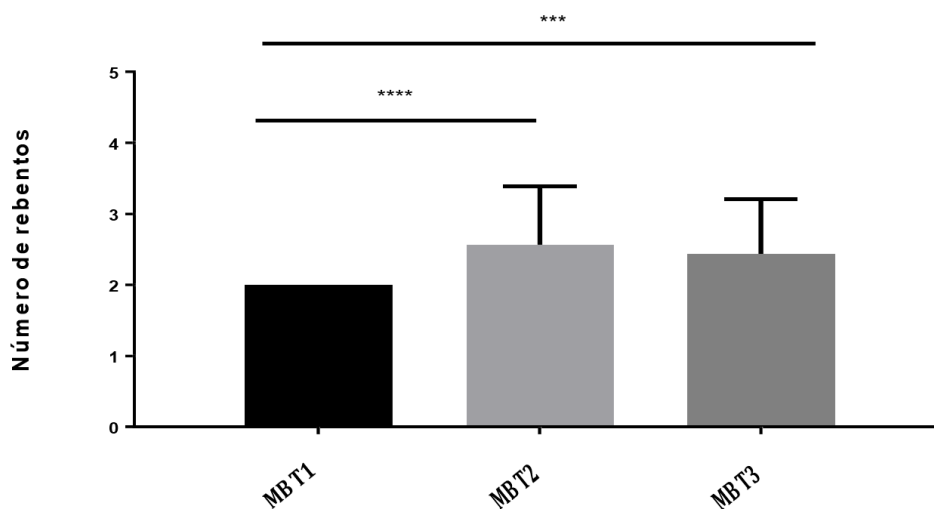


**Figura 24** - Comparação do comprimento dos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos utilizados no ensaio de BIT's, utilizando o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. MBT1= DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão; MBT2= DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão; MBT3= DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão

#### 4.3.2 Número de rebentos

Na Figura 25 podem ser observados os resultados relativos ao número de rebentos laterais dos diferentes ensaios em BIT's. Neste sentido, o tratamento que promoveu um melhor desempenho face ao número de rebentos foi o BMT2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão), com um ligeiro aumento face ao tratamento BMT3 (DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão) e um aumento significativo face ao tratamento BMT1 (DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão), o que reforça os dados descritos na secção anterior (4.3.1 Comprimento dos explantes).

Ao longo do presente trabalho verificou-se que o tratamento com um meio nutritivo de base DMS tende a promover um maior desenvolvimento de novos rebentos. Na secção anterior (4.3.1 Comprimento dos explantes) comprovou-se que todos os tratamentos promoveram desenvolvimento dos explantes e que existe um tratamento que claramente se destaca dos demais, o MBT2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão). O facto do mesmo tratamento apresentar nesta secção o maior desenvolvimento de novos rebentos reforça positivamente as condições escolhidas para operar o BIT.

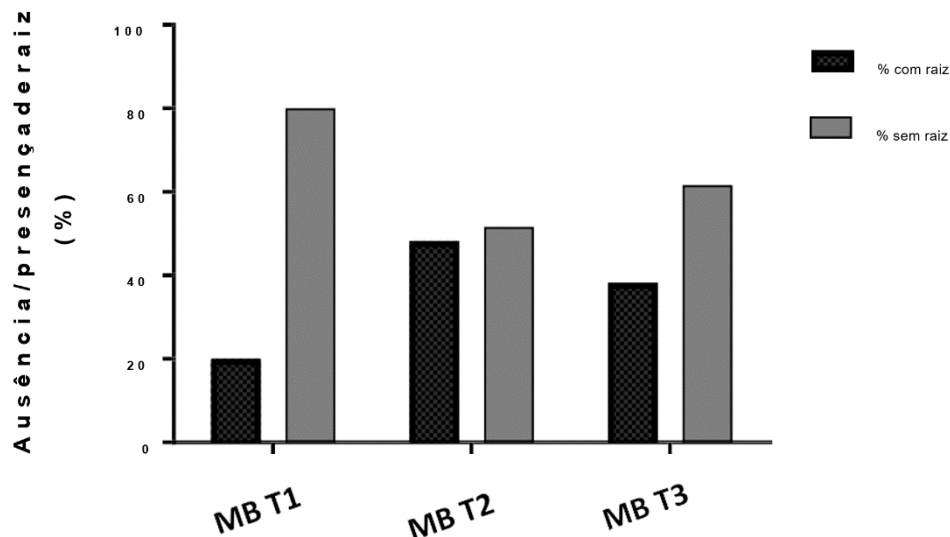


**Figura 25** - Comparação do número de rebentos gerados pelos explantes de *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do terceiro ciclo experimental que utilizam o meio nutritivo DMS. Os dados representam a média  $\pm$  D.P, n=30. MBT1= DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão; MBT2= DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão; MBT3= DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão.

#### 4.3.3 Ausência/Presença de raiz

A Figura 26 apresenta os resultados do ensaio de BIT's tendo como foco a avaliação do desenvolvimento da raiz nos diferentes tratamentos. Verificou-se que todos os tratamentos em biorreatores geraram raiz, contrário ao que foi observado, por exemplo, para o tratamento MCT17 MS, 8.87  $\mu$ M BAP + 5.37  $\mu$ M NAA, 513  $\mu$ M de NaCl) na multiplicação *in vitro* pelo método convencional, mesmo tendo a mesma base nutritiva do presente ensaio.

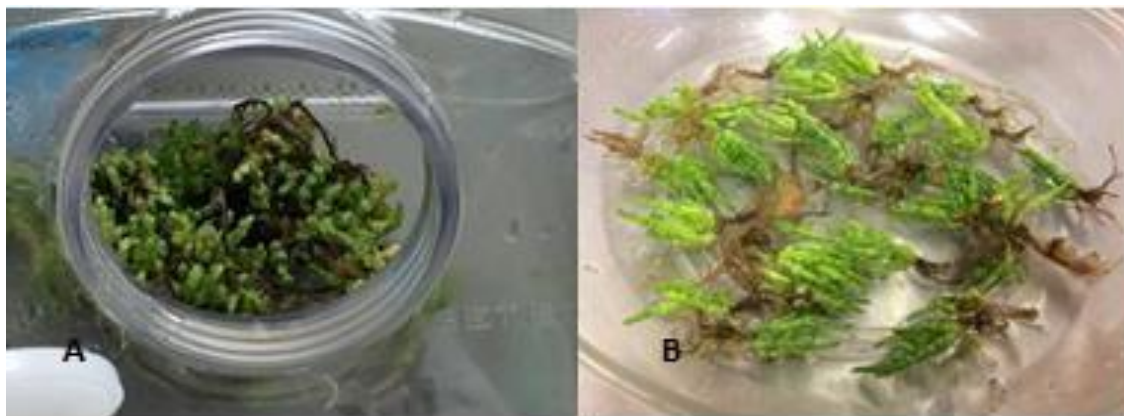
A presença de raiz com a mesma base nutritiva utilizando BIT's pode ser justificada talvez pela eficiente areação e imersão, ao que promove uma melhor absorção de nutrientes e consequentemente um melhor desenvolvimento dos explantes. Os BIT's permitem obter explantes melhor preparados para uma fase de pré aclimatização *ex vitro*. Neste ensaio destaca-se o tratamento MBT2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada), onde se obteve uma maior percentagem de plantas com raiz.



**Figura 26** - Percentagem de ausência/ presença de raiz nos explantes de *Salicornia* spp. do ensaio com BIT'S com meio nutritivo DMS (n=30). . MBT1= DMS, 5 minutos a cada 3 horas de aeração, 1 minuto a cada 3 horas de imersão; MBT2= DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão; MBT3= DMS, 5 minutos a cada 12 anos de aeração, 1 minuto a cada 12 horas de imersão.

#### 4.3.4 Robustez dos explantes em BIT's

As condições aplicadas no desenvolvimento de um ensaio *in vitro* pelo método convencional podem apresentar comportamentos diferentes quando aplicadas aos ensaios de multiplicação *in vitro* pelo método de BIT's. A prova desta afirmação são os resultados apresentados no presente estudo. As condições do tratamento MB T2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada) permitiram desenvolver explantes de forma mais eficiente e evitando a hiper-hidricidade dos tecidos, que consiste na deformação dos explantes *in vitro*, muito caracterizada por condições anômalas associadas ao crescimento dos explantes, como por exemplo, deformações nas hastes e vitrificação dos tecidos por excesso de nutrientes ou, no caso dos BIT's, excesso de tempo de submersão. Na Figura 27 A pode observar-se um biorreator com *Salicornia* spp. com um grau de robustez de 5 (tratamento MB T2 DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada). A Figura 27 B apresenta as mesmas plantas separadas após serem retiradas do BIT.

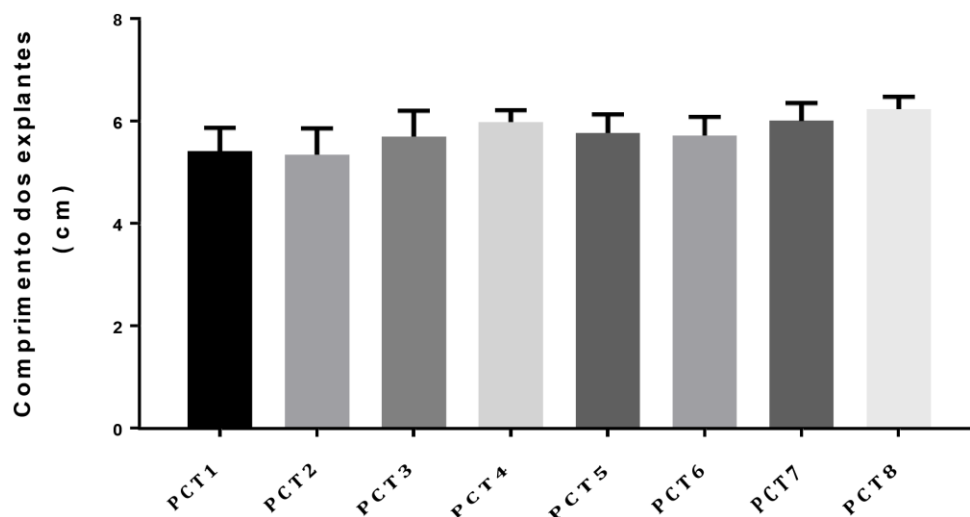


**Figura 27** - Demonstração da robustez dos explantes de *Salicornia* spp. após o ciclo de BIT's. (A) BIT com explantes de *Salicornia* spp. antes da separação dos mesmos. (B) Explantes de *Salicornia* spp. após o ciclo de BIT já separados.

## 4.4 Pré aclimatização *ex vitro*

### 4.4.1 Comprimento dos explantes

A Figura 28 apresenta os resultados relativos à promoção de comprimento das novas plantas pré-aclimatizadas *ex vitro* face aos diferentes tratamentos. Estes resultados indicam que todos os tratamentos foram bem sucessivos, demonstrando que a *Salicornia* spp. se adaptou facilmente aos diferentes tipos de substrato e aos diferentes meios nutritivos, e que não existe uma diferença significativa que justifique a opção por um tratamento em específico, podendo a escolha do método ser efetuada tendo em conta, por exemplo, os custos económicos.

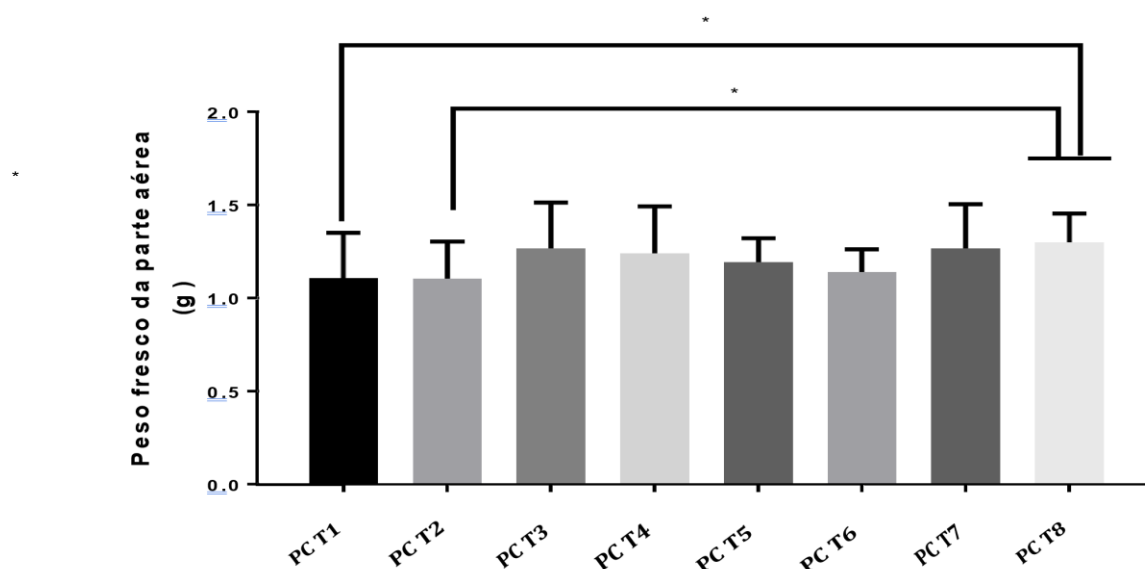


**Figura 28** - Comparação entre os diferentes tratamentos face ao comprimento no ensaio de pré- aclimatização *ex vitro* de *Salicornia* spp. PCT1= JiffyPlug-7®, DMS; PCT2= JiffyPlug-7®, ½ DMS; PCT3= JiffyPlug-7®, Água; PCT4= JiffyPlug-7®, Solução Nutritiva GroHo®; PCT5= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), DMS; PCT6= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), ½ DMS ; PCT7= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Água; PCT8= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo®.

#### 4.4.2 Peso fresco da parte aérea

A Figura 29 apresenta os resultados relativos ao peso fresco da parte aérea das plantas do ensaio de pré aclimatização *ex vitro*. Destaque para o tratamento PCT8 (Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo®.) que promoveu explantes com um peso relativamente superior aos demais, porém com variações mínimas de peso entre os diferentes tratamentos. Com esta afirmação pretende-se dizer que todos os métodos utilizados levaram ao desenvolvimento de um peso de raiz fresco muito similar para todos os casos, facilitando o método de pré aclimatização e permitindo que o operador a nível industrial escolha o método mais económico. Neste sentido, o tratamento mais económico seria o PCT7, constituído por Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1) e utilizando como Solução de irrigação a água.

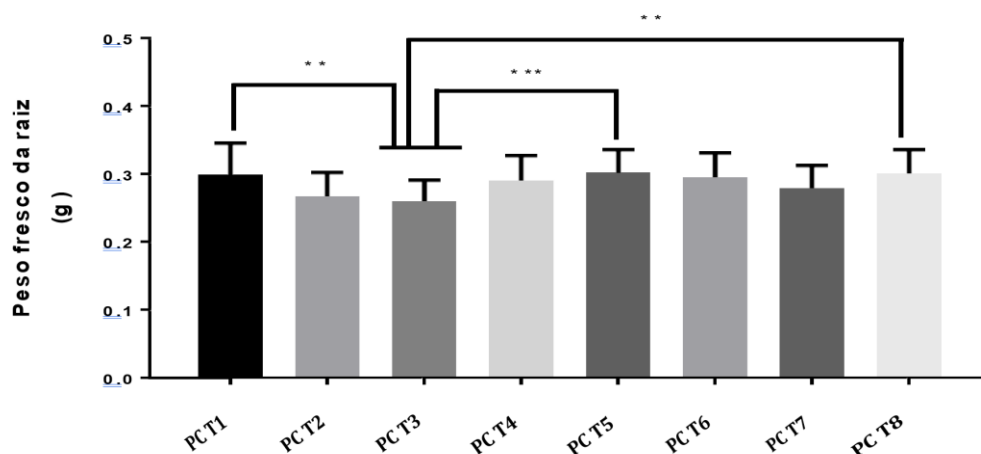




**Figura 29** - Comparação do peso fresco da parte aérea da *Salicornia* spp. entre os diferentes tratamentos do ensaio de pré-aclimatização ex vitro. PCT1= JiffyPlug-7®, DMS; PCT2= JiffyPlug-7®, ½ DMS; PCT3= JiffyPlug-7®, Água; PCT4= JiffyPlug-7®, Solução Nutritiva GroHo®; PCT5= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), DMS; PCT6= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), ½ DMS ; PCT7= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Água; PCT8= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo®.

#### 4.4.3 Peso fresco da raiz

Na Figura 30 pode observar-se o peso fresco de raiz obtida usando os diferentes tratamentos. Observando os resultados obtidos pode dizer-se que todos os tratamentos levaram à formação de raiz, o que indica que a transição do *in vitro* para o *ex vitro* foi realizada com sucesso, existindo uma variação mínima de peso entre os diferentes ensaios. Destaque para os tratamentos PCT1 (JiffyPlug-7®, DMS), PCT5 (Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), DMS) e PCT8 (Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo®.) que induziram um maior peso fresco das raízes.



**Figura 30** - Comparação do peso fresco da raiz da *Salicornia* spp. nos diferentes tratamentos do ensaio de pré-aclimatização *ex vitro*. PCT1= JiffyPlug-7®, DMS; PCT2= JiffyPlug-7®, ½ DMS; PCT3= JiffyPlug-7®, Água; PCT4= JiffyPlug-7®, Solução Nutritiva GroHo®; PCT5= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), DMS; PCT6= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), ½ DMS; PCT7= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Água; PCT8= Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo®.

#### 4.4.4 Robustez

Relativamente ao grau de robustez, as plantas apresentaram um grau 5 para todos os ensaios, como podemos comprovar na Figura 31. O facto das plantas *ex vitro* obterem um grau de 5 valida que todo o processo *in vitro* obteve sucesso na sua execução, assim como, todo o processo de transição para a fase *ex vitro* foi bem planeado e executado. A Figura 31 A apresenta a robustez das plantas em todos os tratamentos aos 10 dias de pré-aclimatização.

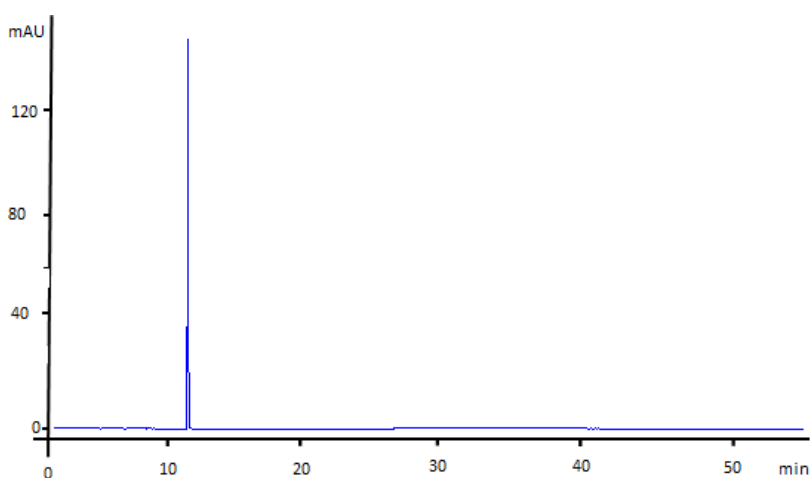


**Figura 31** (A) Demonstração da robustez dos explantes de *Salicornia* spp. provenientes do ensaio de pré- aclimatização *ex vitro* aos 10 dias. (B) Robustez dos explantes sujeitos ao tratamento PC T8 aos 30 dias B demonstra os resultados obtidos usando o tratamento PCT8 (Fibra de coco + Substrato Universal Siro® (1:1), Solução Nutritiva GroHo®) aos 30 dias.

## 4.5 Detecção e quantificação do ácido trans-ferúlico

### 4.5.1 Identificação dos analitos

Tendo em consideração as condições cromatográficas anteriormente descritas e com base ao comprimento de onda e no tempo de retenção, foi possível identificar corretamente o AF numa corrida cromatográfica de um padrão puro. A Figura 22 representa o cromatograma típico do AF obtido para a concentração de 0,05 mg / mL.



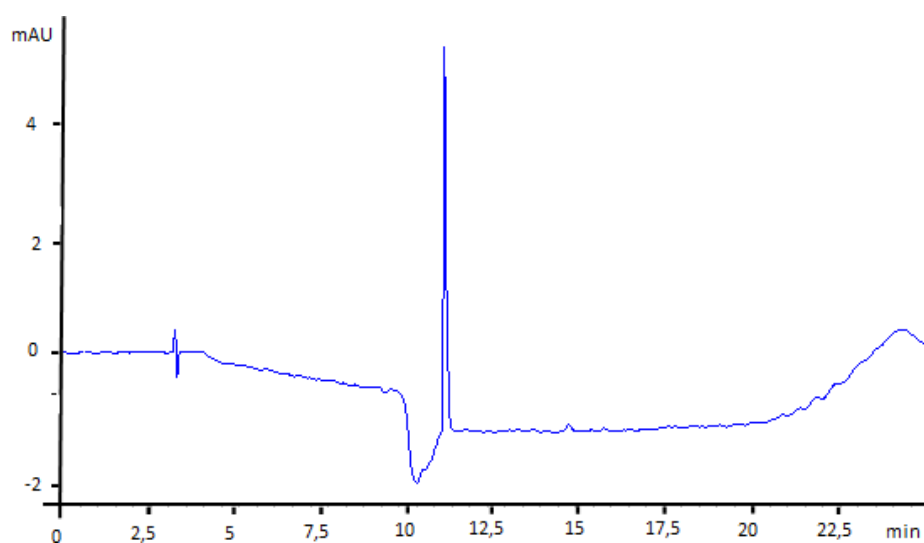
**Figura 32** - Padrão AF (tempo de retenção característico de 11 minutos).

### 4.5.2 Validação

De forma a demonstrar a utilidade e reprodutibilidade do método desenvolvido, procedeu-se à sua validação de acordo com os critérios de validação apresentados pela *Food and Drug Administration* (FDA) [72]. Tendo sido efetuado uma avaliação que englobou os parâmetros de seletividade, linearidade e modelo de calibração, limite de deteção (LOD), limite de quantificação (LLOQ), precisão e exatidão [72, 73].

### 4.5.3 Seletividade

A seletividade permite identificar e diferenciar analitos de interesse como por exemplo, metabolitos, produtos de decomposição ou componentes da matriz dos restantes componentes da amostra [52]. De forma a identificar corretamente o composto e conforme os critérios de positividade o sinal do composto deve ser distinguível do ruído do cromatograma numa relação sinal/ruído 3:1. Na Figura 23 e 24 é possível verificar a identificação inequívoca do AF numa concentração de 3,12 µg/mL.



**Figura 33** - Cromatograma do AF a uma concentração de 3,12 µg/mL.

#### 4.5.4. Linearidade e curva de calibração

A concentração teórica de cada analito e as áreas dos picos cromatográficos obtidos para o AF necessitam de ser relacionadas. Para tal, foi estudada a linearidade com concentrações crescentes do ácido alvo. Este estudo pode ser útil para prever a concentração do analito numa amostra de concentração desconhecida, sendo definida como a função que descreve a resposta do detetor para uma determinada gama de concentrações [74].

A curva de calibração apresenta um modelo linear que é descrito através da equação 1

$$y = mx + b \quad (1)$$

Em que:

- y - sinal medido no DAD
- m - declive da curva de calibração
- x - concentração de analito
- b - interseção com o eixo yy

Para que este parâmetro seja aceite, os valores de BIAS ou erro relativo médio obtidos para cada concentração devem estar incluídos entre  $\pm 15\%$  da concentração teórica, exceto para o LLOQ em que a variação pode ser até  $\pm 20\%$  [73].

Sendo o BIAS, ou erro médio relativo, o parâmetro que permite avaliar o erro sistemático em cada concentração, este pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\text{BIAS} = \frac{\text{Concentração calculada} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Para este ensaio foram utilizados seis calibradores do AF com um intervalo de concentrações compreendidas entre 3,12 - 100 µg/mL uniformemente distribuídas (3,12; 6,12; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL). Paralelamente foram estudados *três quality control samples* (QCs), em triplicado (n = 3), numa gama de baixa, média e alta concentração (18,75; 37,5; 75 µg/mL).

Como a curva de calibração tem por base um intervalo amplo de concentrações e a variância entre os diferentes pontos de calibração não demonstra homogeneidade, recorreu-se à utilização de regressão linear ponderada de forma a ultrapassar a perda de exatidão que se observava, especialmente, nos pontos de menores concentrações.

Este modelo permite harmonizar as discrepâncias entre as variâncias de forma simples e efetiva, através da utilização de fatores de ponderação empíricos baseados na variável dependente (y) ou independente (x):  $1/x^{1/2}$ ,  $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/y^{1/2}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$  [74].

Assim, na tentativa de diminuir a influência da variância em cada ponto da reta de calibração de cada analito, foi testado o melhor fator de ponderação para o método em desenvolvimento com base no BIAS, tendo-se optado pelo  $1/x$ .

Utilizando a regressão linear ponderada para  $1/x$ , o método demonstrou uma linearidade entre as concentrações de 3,125 e 100 µg/mL com um  $R^2$  superior a 0,99 e os valores de BIAS para LLOQ inferiores a  $\pm 15\%$ . Na tabela 7 encontram-se os resultados de linearidade.

**Tabela 8** - Dados relativos à linearidade do composto AF.

Analito	Ponderação	Gama de Linearidade (µg mL <sup>-1</sup> )	Linearidade		R <sup>2</sup> *
			Declive*	Interceção*	
AF	$1/x$	100 - 3,125	22,68±4,10	3,133±4,264	0,998±0,001

\*Valores expressos como média±desvio padrão

Relativamente aos limites de deteção (LOD) e quantificação, a FDA considera como definição do limite de deteção a concentração mais baixa do analito que se consegue detetar pelo método bio analítico utilizado com um sinal de pelo menos três vezes superior ao sinal de ruído. A concentração mínima de analito quantificável que apresente um coeficiente de variação (CV) inferior a 15 % e BIAS  $\pm 15\%$  define-se como limite inferior de quantificação (LLOQ) [72]. Para proceder ao estudo deste parâmetro, foram preparadas 6 amostras fortificadas com o analito

de estudo e analisadas por HPLC-DAD. Neste estudo os valores de LOD e LLOQ foram 1,56 e 3,12; respetivamente.

#### 4.5.5 Precisão e exatidão

A exatidão é expressa através dos valores do BIAS que permitem uma aproximação entre as medias dos resultados obtidos com os valores da concentração dos analitos. Estes devem estar compreendidos entre  $\pm 15\%$  do valor nominal, ou  $\pm 20\%$  se for o LLOQ.

A precisão expressa o grau de concordância entre medições individuais de um analito, quando o procedimento de pipetagem é efetuado através de múltiplas alíquotas de um único volume. Este parâmetro é avaliado através do CV. Os valores de CV devem ser inferiores a 15% para todas as concentrações exceto para o LLOQ que deve ser de 20%.

A realização da validação envolveu o estudo da precisão intradia, precisão interdia e ainda a precisão intermedia. A precisão intradia permite avaliar a repetibilidade dos resultados do método sob as mesmas condições, como por exemplo, dia, equipamentos, laboratório e o operador [52]. Para a execução do mesmo, foram efetuadas cinco réplicas de três calibradores do intervalo de linearidade (10; 25; 100  $\mu\text{g/mL}$ ) que foram analisadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Na tabela 9 verifica-se que os valores da exatidão se encontram todos dentro do intervalo de  $\pm 15\%$ , com exceção da concentração mais baixa que teve um valor de BIAS de -19,95 %.

**Tabela 9** - Valores de exatidão e precisão relativos à precisão intradia

Analito	Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV %	BIAS%
AF	10	$1,52 \pm 0,21$	13,15	-19,95
	25	$21,63 \pm 1,64$	7,54	5,33
	100	$96,33 \pm 2,86$	2,97	-0,58

A precisão interdia, ou reprodutibilidade, permite envolver a variação de certas condições previamente definidas, tais como: diferentes dias, analistas e equipamentos [72]. Foram estudadas todas as concentrações relativas aos calibradores, Tabela 9. Os valores das BIAS encontram-se dentro do intervalo de  $\pm 15\%$  para todas as concentrações em estudo. Estando como tal dentro dos parâmetros definidos.

**Tabela 10** - Valores de exatidão e precisão relativos a precisão interdia.

Analito	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV %	BIAS %
AF	3,125	3,60 ± 0,12	5,2	15,6
	6,25	6,88 ± 0,37	5,35	10,16
	12,5	11,99 ± 0,40	3,36	-3,14
	25	24,00 ± 0,29	1,21	-4,004
	50	48,70 ± 0,60	1,22	-2,58
	100	100,65 ± 0,28	0,28	0,66

A precisão intermédia permite avaliar se o método é afetado pelo analista, material utilizado, reagentes ou laboratório [72]. Para tal foram realizadas quinze réplicas de cada QC (18; 37,5; 75) em dias diferentes. Os valores médios das BIAS estão de acordo com o previsto, encontram-se dentro do intervalo de  $\pm 15\%$ . Os valores referentes aos coeficientes de variação, são inferiores a 10 %, estando dentro dos parâmetros anteriormente mencionados.

**Tabela 11** - Valores de exatidão e precisão intermédia.

Analito	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV %	BIAS %
AF	18,75	20,208	8,43	5,76
	37,5	37,281	9,72	-4,32
	75	79,04	5,41	7,13

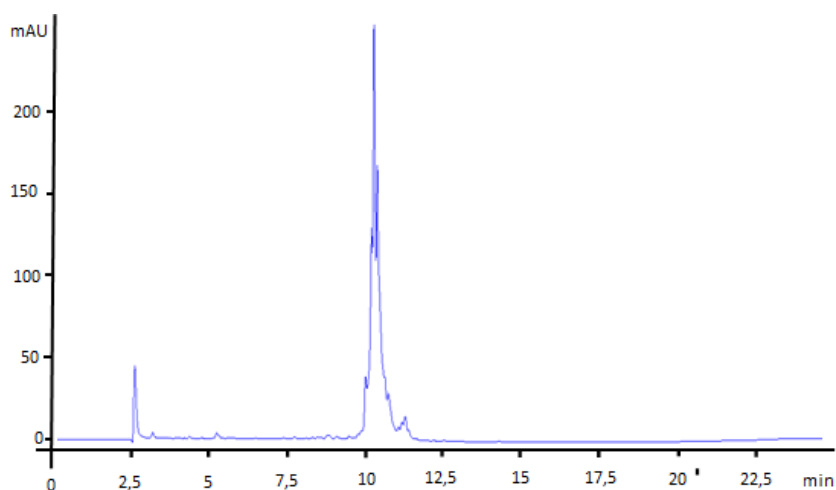


#### 4.5.6. Aplicação do método em amostras reais

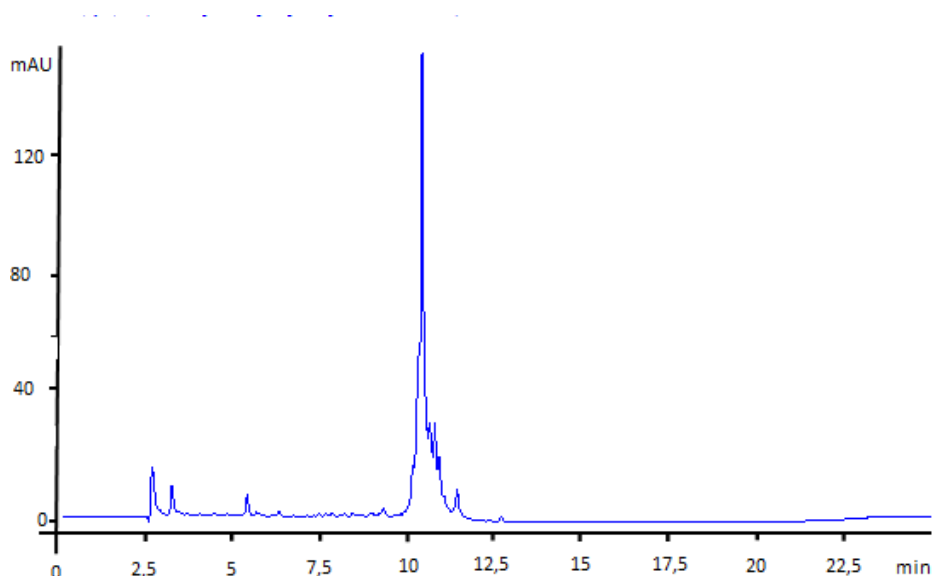
Após a validação e calibração do método, procedeu-se à recolha do material vegetal proveniente da multiplicação *in vitro* e da pré-aclimatização, como descrito na secção 2.6.2. Seguindo-se da extração do composto (AF) através do processo de maceração descrito na secção 2.6.3. Tendo sido realizados duplicados no presente ensaio. Na Tabela 11 regista-se a concentração das amostras *in vitro* e pré- aclimatadas de *Salicornia spp.*, tendo-se obtido uma concentração de AF de  $3,39 \pm 1,26 \mu\text{g/mL}$  e de  $4,17 \pm 3,48 \mu\text{g/mL}$ , respetivamente. A título de exemplo a Figura 24 apresenta o cromatograma relativo a uma amostra de *Salicornia in vitro* e a Figura 25 representa o cromatograma da amostra pré-aclimatada.

**Tabela 12** - Concentração do AF nas amostras *in vitro* e pré- aclimatadas.

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>In vitro</i>	$3,39 \pm 1,26$
Pré- Aclimatada	$4,17 \pm 3,48$



**Figura 34** - Cromatograma do AF presente nas amostras *in vitro* de *Salicornia spp.* Utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor de *diode array* (DAD) modelo 1290 da Agilent Technologies com uma coluna de fase reversa ZORBAX SB-C18, 4,6x150 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies (Soquímica, Lisboa, Portugal)



**Figura 35** - Cromatograma do AF presente nas amostras pré-aclimatadas de *Salicornia* spp.. Utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) acoplada a um detetor de diode array (DAD) modelo 1290 da Agilent Technologies com uma coluna de fase reversa ZORBAX SB-C18, 4,6x150 mm, 1,8  $\mu$ m, Agilent Technologies (Soquímica, Lisboa, Portugal)

Zhu [17], analisou os diferentes compostos presentes na *Salicornia herbacea* recolhida do seu habitat natural. Os autores obtiveram uma concentração de AF de 3,14  $\mu$ g/mL [18]. Por sua vez, Bertin [75], obteve uma concentração de AF de 4,59  $\mu$ g/mL proveniente das amostras de *Salicornia ambigua* recolhidas em habitat natural. Neste trabalho prático as amostras de *Salicornia*, apresentaram uma concentração de  $3,39 \pm 1,26$   $\mu$ g/mL e de  $4,17 \pm 3,48$   $\mu$ g/mL de AF (amostras *in vitro* pré- aclimatadas respetivamente). Na tabela 12 é possível comparar as concentrações obtidas pelos autores com as concentrações da presente dissertação. Verifica-se que não existe grande perda da produção *in vitro* de AF através de técnicas de micropropagação. A diferença entre os valores das amostras do presente trabalho e dos autores pode ser justificada pelo local e fase do ciclo de crescimento que as plantas foram coletadas.

**Tabela 13** - Concentração do AF proveniente de diferentes amostras (quantificação através de HPLC)

Composto	Método de Propagação	Concentração
AF	Habitat Natural	3,14 e 4,59 µg/mL [18, 75]
	Multiplicação <i>in vitro</i>	3,39±1,26 µg/mL
	Multiplicação <i>in vitro</i> com pré - aclimatização	4,17±3,48 µg/mL



## Capítulo 5

---

‘

## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A *Salicornia* é uma planta halófito com inúmeras propriedades benéficas para a saúde e alimentação, existindo por isso enorme interesse económico e científico na multiplicação e preservação da *Salicornia* spp.. Neste sentido diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de *Salicornia* spp. têm vindo a ser estudadas originando novas metodologias de produção e multiplicação *in vitro*.

O objetivo geral da presente dissertação de mestrado consistiu em estabelecer um protocolo completo de micropropagação *in vitro* da *Salicornia* spp., identificando e quantificando o AF presente nas plantas micropropagadas e pré-aclimatadas. Para tal, foram realizados ensaios de desinfeção e estabelecimento utilizando quatro tratamentos diferentes. Destes ensaios concluiu-se que o método mais eficiente de desinfeção foi o método ET4 ( $\text{HgCl}_2$  a 10% durante 3 minutos) com 86,67% dos explantes viáveis e apenas 19.17% descartados. Dos explantes descartados, ou seja, dos 19,17 % descartados 43,75 % foram eliminados por estarem contaminados por bactérias e 56,25% devido a contaminação por fungos. Após a desinfeção e estabelecimento *in vitro* iniciaram-se os ensaios de multiplicação *in vitro*. No presente ensaio foram realizados ciclos através do método de micropropagação convencional, micropropagação convencional - Metatoplin e micropropagação por BIT. Para tal, foram utilizados 20 tratamentos e analisados diferentes parâmetros.

### *Método de micropropagação convencional*

Para a realização do método de micropropagação convencional foram analisados quatro parâmetros: **Comprimento dos explantes** - Concluindo-se que o tratamento MCT1 (MCT1= MS) se destacou notoriamente dos restantes tratamentos; **Número de rebentos** - Meios DMS (MCT14= DMS, 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl a MCT19= DMS, 13.37  $\mu\text{M}$  L BAP + 2.28mg/L ZEA, 256  $\mu\text{M}$  de NaCl) obtiveram um número de rebentos superiores aos restantes tratamentos. **Presença ou ausência de raiz** - Os tratamentos MCT1 (MS) e MCT11 (DMS) obtiveram um maior desenvolvimento do número de raízes. **Robustez** - Classificação de grau 5 para todos os tratamentos.

### *Micropropagação convencional - Meta-topolin*

O ensaio de micropropagação convencional com Meta-topolin teve dois parâmetros em análise: **Comprimento dos explantes** - Comprimento idêntico entre os tratamentos MCMT2 (DMS, 0.031  $\mu\text{M}$  meta-topolin ,513  $\mu\text{M}$  de NaCl), MCMT 3 (DMS, 0.062  $\mu\text{M}$  meta-topolin ,513  $\mu\text{M}$  de NaCl) e MCMT4 (DMS, 0.124  $\mu\text{M}$  meta-topolin, 513  $\mu\text{M}$  de NaCl). **Número de rebentos** - O Tratamento MCMT3 destaca-se dos demais tratamentos.

### ***Método de micropropagação por BIT***

Tendo em conta que até à data da elaboração do presente documento não se encontrou nenhum registo de ensaios de micropropagação por BIT com *Salicornia* spp., foram elaborados usando três tratamentos baseados no tratamento que obteve maior desempenho (face ao número de rebentos e quantidade de NaCl) nos tratamentos do ciclo de micropropagação pelo método convencional. Registando quatro parâmetros: ***Comprimento dos explantes; Número de rebentos; Presença ou ausência de raiz; Robustez.*** O tratamento MBT2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão) promoveu o melhor resultado em todos os parâmetros.

Após os ciclos de micropropagação iniciaram-se os ensaios de pré-aclimatização, para tal, foram realizados oito tratamentos com quatro parâmetros de análise: Comprimento dos explantes; Peso fresco da parte aérea; Peso fresco da raiz; robustez. Os resultados do presente ciclo foram todos bem-sucedidos, não existindo diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Validando o trabalho realizado nos ciclos anteriores e demonstrando a facilidade de adaptação por parte da *Salicornia* spp. na transição *in vitro/ex vitro*.

Com o intuito de se verificar a quantidade de AF existente nas plantas micropropagadas e pré-aclimatadas iniciou-se um processo de extração sucedendo-se da identificação e quantificação do AF. Foi utilizado um sistema HPLC acoplado a um detetor DAD. Obtendo uma concentração de  $3,39 \pm 1,26 \mu\text{g/mL}$  nas amostras *in vitro* e de  $4,17 \pm 3,48 \mu\text{g/mL}$  nas amostras pré-aclimatadas.

Em suma, o tratamento com melhor desempenho para a desinfecção da *Salicornia* spp. foi o tratamento ET4 ( $\text{HgCl}_2$  a 10% durante 3 minutos). Nos ciclos de micropropagação *in vitro* pelo método convencional cada parâmetro obteve um tratamento que promoveu um melhor desempenho em cada parâmetro específico. Do ponto de vista da produção, destaque para o tratamento que apresentou melhores resultados no parâmetro do número de rebentos, tendo sido o tratamento MCT17 (DMS,  $8.87 \mu\text{M}$  BAP +  $5.37 \mu\text{M}$  NAA,  $513 \mu\text{M}$  de NaCl). Na multiplicação *in vitro* de plantas pelo método de BIT's o tratamento que apresentou melhores resultados foi o tratamento MBT2 (DMS, 5 minutos a cada 6 horas de aeração, 1 minuto a cada 6 horas de imersão) tendo sido o melhor tratamento em todos os parâmetros analisados. Na pré-aclimatização *ex vitro* verificou-se que todos os tratamentos foram funcionais, gerando resultados praticamente idênticos. Concluindo assim, que a escolha do tratamento fica ao critério do operador, podendo optar pelo custo económico. As concentrações obtidas de AF no presente trabalho comprovam que existe a possibilidade de as plantas de *Salicornia* spp. não perderem compostos bioativos após a multiplicação *in vitro*.

Como trabalhos futuros podem ser realizadas otimizações nos tempos de ventilação e imersão com o intuito de aumentar a produção de biomassa em BIT's. Podem também ser realizados ensaios com cruzamento de variáveis de crescimento para verificar se existe maior produção de compostos bioativos presentes na *Salicornia* spp..



## Capítulo 6

---



## 6. Referências

1. Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J., & Annapure, U., *Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: its improved extraction and purification*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(17): p. 7644-7648.
2. Joshi, M., A. Mishra, and B. Jha, *NaCl plays a key role for in vitromicropropagation of Salicornia brachiata, an extreme halophyte*. Industrial Crops and Products, 2012. **35**(1): p. 313-316.
3. Horie, T., I. Karahara, and M. Katsuhara, *Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants*. Rice, 2012. **5**(1): p. 11.
4. Glenn, E. P., O'Leary, J. W., Watson, M. C., Thompson, T. L., & Kuehl, R. O., *Salicornia bigelovii Torr.: an oilseed halophyte for seawater irrigation*. Science, 1991. **251**(4997): p. 1065-1067.
5. Roy, S.J., S. Negrão, and M. Tester, *Salt resistant crop plants*. Current Opinion in Biotechnology, 2014. **26**: p. 115-124.
6. Julião, M.R.A., *Avaliação do potencial da Salicornia ramosissima para saladas frescas ou em pó (sal verde)*. 2013.
7. Sharpe, W., D. Evans, and P. Ammirato, *Handbook of plant cell culture. Volume 2. Crop species*. 1984: New York: Macmillan Publishing Co.
8. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
9. Vasil, I.K., *A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops*. Plant Cell Reports, 2008. **27**(9): p. 1423.
10. Griffith, F., *The significance of pneumococcal types*. Epidemiology & Infection, 1928.**27**(2): p. 113-159.
11. Sanford, J.C., *The development of the biolistic process*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2000. **36**(5): p. 303-308.
12. MOREL, G.M., *Producing virus-free Cymbidium*. American Orchid Society Bulletin, 1960.
13. Berthouly, M. and H. Etienne, *Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation, in Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. 2005, Springer. p. 165-195.
14. Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G., *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems*. Plant Cell Reports, 1999. **18**(9): p. 743-748.
15. Macko, T., Brüll, R., Zhu, Y., & Wang, Y., *A review on the development of liquid chromatography systems for polyolefins*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(22): p. 3446-3454.
16. Rakocy, J.E., *Aquaponics-integrating fish and plant culture*. Aquaculture Production Systems, 2012. **1**: p. 343-386.

17. Zhu, T., S. Li, and K.H. Row, *Molecularly imprinted monolithic material for the extraction of three organic acids from Salicornia herbacea L.* Journal of Applied Polymer Science, 2011. **121**(3): p. 1691-1696.
18. Panth, N., Park, S. H., Kim, H., Kim, D. H., & Oak, M. H., *Protective effect of Salicornia europaea extracts on high salt intake-induced vascular dysfunction and hypertension.* International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(7): p. 1176.
19. Troyo-Diéguez, E., Ortega-Rubio, A., Maya, Y., & León, J. L., *The effect of environmental conditions on the growth and development of the oilseed halophyte Salicornia bigelovii Torr. in arid Baja California Sur, Mexico.* Journal of Arid Environments, 1994. **28**(3): p. 207-213.
20. Flowers, T., P. Troke, and A. Yeo, *The mechanism of salt tolerance in halophytes.* Annual Review of Plant Physiology, 1977. **28**(1): p. 89-121.
21. Parida, A.K. and B. Jha, *Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review.* Trees, 2010. **24**(2): p. 199-217.
22. Parida, A.K. and A.B. Das, *Salt tolerance and salinity effects on plants: a review.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005. **60**(3): p. 324-349.
23. Moghaieb, R.E., H. Saneoka, and K. Fujita, *Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, Salicornia europaea and Suaeda maritima.* Plant Science, 2004. **166**(5): p. 1345-1349.
24. Pereira, R.M., *Estudos iniciais sobre o cultivo da halófito Sarcocornia perennis em Santa Catarina.* 2012.
25. Moore Jr, T., G.R. Heath, and R.O. Kowsmann, *Biogenic sediments of the Panama Basin.* The Journal of Geology, 1973. **81**(4): p. 458-472.
26. Pfister, R.W., *Limits to growth of Salicornia bigelovii Torr. at suboptimal salinity.* 1999. The University of Arizona.
27. Graber, A. and R. Junge, *Aquaponic Systems: Nutrient recycling from fish wastewater by vegetable production.* Desalination, 2009. **246**(1-3): p. 147-156.
28. Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y., & Regenstein, J. M., *Marine bioactive compounds and their health benefits: a review.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015. **14**(4): p. 446-465.
29. Singh, A., Jani, K., Kumari, P., & Agarwal, P. K., *Effect of MgCl<sub>2</sub> and double concentration of Murashige and Skoog medium on in vitro plantlet and root cultures generation in halophytic grasswort Salicornia brachiata.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015. **120**(2): p. 563-570.
30. Ventura, Y., Wuddineh, W. A., Shpigel, M., Samocha, T. M., Klim, B. C., Cohen, S., & Sagi, *Effects of day length on flowering and yield production of Salicornia and Sarcocornia species.* Scientia Horticulturae, 2011. **130**(3): p. 510-516.
31. Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S., et al., *Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology.* Plant Physiology and Biochemistry, 2013. **72**: p. 1-20.

32. Dunham, R.M., A.M. Ray, and R.S. Inouye, *Growth, physiology, and chemistry of mycorrhizal and nonmycorrhizal Typha latifolia seedlings*. Wetlands, 2003. **23**(4): p. 890-896.
33. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **79**(5): p. 727-747.
34. Rombouts, F.M. and J.-F. Thibault, *Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp*. Carbohydrate Research, 1986. **154**(1): p. 177-187.
35. Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Woolfrey, B., & Kritchevsky, D., *Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2007. **18**(2): p. 105-112.
36. Swatsitang, P., Tucker, G., Robards, K., & Jardine, D., *Isolation and identification of phenolic compounds in Citrus sinensis*. Analytica Chimica Acta, 2000. **417**(2): p. 231-240.
37. Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W., *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions*. Food Chemistry, 2006. **95**(3): p. 466- 473.
38. Ou, S. and K.C. Kwok, *Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004. **84**(11): p. 1261-1269.
39. Steward, F., P. Ammirato, and M. Mapes, *Growth and development of totipotent cells: Some problems, procedures, and perspectives*. Annals of Botany, 1970. **34**(4): p. 761-787.
40. van Overbeek, J., M.E. Conklin, and A.F. Blakeslee, *Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos*. Science, 1941. **94**(2441): p. 350-351.
41. Gray, D. and C. Benton, *In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (Vitis rotundifolia)*. Plant cell, tissue and organ culture, 1991. **27**: p. 7-14.
42. Schaeffer, W.I., *Usage of vertebrate, invertebrate and plant cell, tissue and organ culture terminology*. In Vitro, 1984. **20**(1): p. 19-24.
43. Luis, Z.G., *Propagação in vitro e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (Byrsonima basiloba Juss., Malpighiaceae)*. 2008.
44. Vieira, L.G.E. and A.K. Kobayashi, *Micropropagação do cafeeiro*. 2002.
45. Hartweck, L. M., Lazzeri, P. A., Cui, D., Collins, G. B., & Williams, E. G., *Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1988. **24**(8): p. 821-828.
46. Jäger, A.K. and J. van Staden, *Somatic embryogenesis in Encephalartos cycadifolius*. Plant Cell Reports, 1996. **15**(6): p. 437-440.
47. Josekutty, P., S. Shah, and G. Prathapasenan, *Direct and indirect organogenesis in Coccinia indica*. Journal of Horticultural Science, 1993. **68**(1): p. 31-35.
48. Nodari, R.O. and M.P. Guerra, *Avaliação de riscos ambientais de plantas*

*transgênicas*. Cadernos de Ciência & Tecnologia, 2001. **18**(1): p. 81-116.

49. Tulecke, W. and G. McGranahan, *Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, Juglans regia L.* Plant Science, 1985. **40**(1): p. 57-63.
50. Dibax, R., Eisfeld, C. D. L., Cuquel, F. L., Koehler, H., & Quoirin, M., *Plant regeneration from cotyledonary explants of Eucalyptus camaldulensis Dehn and histological study of organogenesis in vitro*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010. **53**(2): p. 311-318.
51. FARIA, D.V., *Otimização do protocolo de organogênese in vitro em explantes hipocotiledonares de Urucum (Bixa orellana L.)*. 2014, Universidade Federal de Viçosa.
52. Lee, T., *Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro*. Antiqua, Brazil, 2011.
53. Niedz, R.P. and M.G. Bausher, *Control of in vitro contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2002. **38**(5): p. 468-471.
54. Ammirato, P.V., *Handbook of plant cell culture*. 1984.
55. Aitken-Christie, J. and C. Jones, *Towards automation: Radiata pine shoot hedges in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987. **8**(3): p. 185-196.
56. Teisson, C. and D. Alvard. *A new concept of plant in vitro cultivation in liquid medium: Temporary immersion. Resumen*. in *VIII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. p. S2-2. 1994.
57. Akita, M. and S. Takayama, *Stimulation of potato (Solanum tuberosum L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control*. Plant Cell Reports, 1994. **13**(3-4): p. 184-187.
58. Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P., & Teisson, C., *Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997. **50**(1): p. 33-37.
59. Wetzstein, H.Y. and H.E. Sommer, *Leaf anatomy of tissue-cultured Liquidambar styraciflua (Hamamelidaceae) during acclimatization*. American Journal of Botany, 1982. **69**(10): p. 1579-1586.
60. Alvard, D., F. Cote, and C. Teisson, *Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993. **32**(1): p. 55- 60.
61. Mc Alister, B., Finnie, J., Watt, M. P., & Blakeway, F., *Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA)*, in *Liquid Culture Systems for in vitro plant propagation*. 2005, Springer. p. 425-442.
62. Ng, T.J., *Use of tissue culture for micropropagation of vegetable crops*, in *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. 1986, Springer. p. 259- 270.
63. Rogers, R. and M. Smith, *Consequences of in vitro and ex vitro root initiation for miniature rose production*. Journal of horticultural science, 1992. **67**(4): p. 535-540.

64. Machado, M.P., *Micropropagação e composição química do óleo essencial de Lavandula Angustifolia Miller*. Tese do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 2011.
65. Jordan, A.M., M. Calvo, and J. Segura, *Micropropagation of adult Lavandula dentata plants*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 1998. **73**(1): p. 93-96.
66. Silva, J. P., Costa, M. K. C., de Araújo, M. R. S., Araújo, K. S., da Silva, A. C. M., Dalla Costa, T. P., de Freitas Sia, *Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (bap) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de rosa sp*. Revista Agroecossistemas, 2018. **9**(2): p. 370-380.
67. Fonnesebech, M., *The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from Begonia× cheimanthus petiole segments grown in vitro*. Physiologia Plantarum, 1974. **32**(1): p. 49-54.
68. da Silva, J.A.T., *Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)?* The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 2012. **6**(1): p. 121-124.
69. Lee, T., *Produção industrial de mudas de cana-de-açúcar-uma nova abordagem*. Álcool & Açúcar, 1991. **59**: p. 12-16.
70. Werbrouck, S. P., Strnad, M., Van Onckelen, H. A., & Debergh, P. C., *Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture?* Physiologia Plantarum, 1996. **98**(2): p. 291-297.
71. Ribeiro, J. and D. Bastos, *Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais*. Embrapa Semiárido-Documents (INFOTEC-E), 2008.
72. (FDA), F.a.D.A. *Bioanalytical Method Validation- Guidance for industry*. 2018; Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf>.
73. Agency, E.M. *Guideline on Bioanalytical Method Validation*. 2012.
74. Hill, M.C., *Methods and guidelines for effective model calibration*[electronic resource. 1998.
75. Bertin, R. L., Gonzaga, L. V., Borges, G. D. S. C., Azevedo, M. S., Maltez, H. F., Heller, M., & Fett, *Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in Sarcocornia ambigua (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS*. Food Research International, 2014. **55**: p. 404-411.

# Anexo I

## In vitro establishment for the micropropagation of sea asparagus (*Salicornia* spp.)

FIGUEIREDO, J.M.T.<sup>1</sup>; LAVOURA, L.M.V.<sup>1</sup>; PINTO, R.F.V.<sup>1</sup>; FARINHA, N.<sup>2</sup>; GONÇALVES, J.C.<sup>2</sup>; DEBIASI, C.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade da Beira Interior (UBI), Covilhã – Portugal.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI), Castelo Branco – Portugal.

\*claytondebiasi@mail.com

### INTRODUCTION

Sea asparagus (*Salicornia* spp.) is a halophyte species that are awakening the population interest because is rich in vitamins A and C, iron, iodine, sodium and magnesium, presenting antioxidant and anti-inflammatory properties, replacing the salt on aliment. The aim of this study was to develop an efficient methodology for the *in vitro* establishment of sea asparagus.

### MATERIAL AND METHOD

Apical cuttings with 3 to 4cm longer, collected from mothers plants of *Salicornia* spp., were washed under running water for 30 minutes, followed by an immersion of 30 seconds in an ethanol solution (70%), and then were immersed in a fungicide solution (2g L<sup>-1</sup> of Mancozeb®) for 10 minutes. After that, the cuttings were submitted to asepsis treatment (table 1) and then were washed 5 times with sterile water before the inoculation *in vitro*, according to each treatment of media composition (table 2). The cultures were maintained during 45 days at 25±2°C, 16h of photoperiod with a photosynthetic photon flux density of 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

**Table 1.** Description of applied treatments (asepsis method) for the *in vitro* aseptic establishment of *Salicornia* spp.

Treatment name	NaClO %	HgCl <sub>2</sub> %	Submerged time (minutes)
Na-1	2.5	-	10
Na-2	2.5	-	15
Na-3	1.25	-	15
Hg-1	-	0.10	3
Hg-2	-	0.50	2

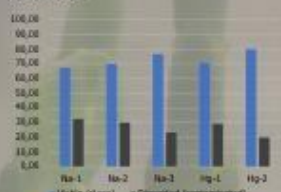


**Figure 5.** General aspect of *in vitro* aseptic establishment of *Salicornia* spp. (A- Mother plant; B- Laboratorial activities; C- Isolation of apical cuttings; D- Aseptic method and; E- *In vitro* inoculation.

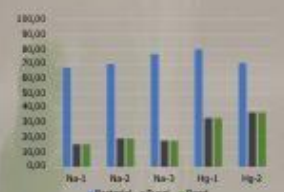
**Table 2.** Description of applied treatments (media composition) for the *in vitro* aseptic establishment of *Salicornia* spp.

Treatment name	Basal Medium	BA (mg/L <sup>-1</sup> )	NAA (mg/L <sup>-1</sup> )	Zincite (mg/L <sup>-1</sup> )	NaCl (g/L)
MS-1	MS	-	-	-	0
MS-2	MS	2.0	-	-	0
MS-3	MS	2.0	-	-	15
MS-4	MS	2.0	-	-	30
MS-5	MS	2.0	1.0	-	0
MS-6	MS	2.0	1.0	-	15
MS-7	MS	2.0	1.0	-	30
MS-8	MS	3.0	-	0.5	0
MS-9	MS	3.0	-	0.5	15
MS-10	MS	3.0	-	0.5	30
DMS-1	DMS	-	-	-	0
DMS-2	DMS	2.0	-	-	0
DMS-3	DMS	2.0	-	-	15
DMS-4	DMS	2.0	-	-	30
DMS-5	DMS	2.0	1.0	-	0
DMS-6	DMS	2.0	1.0	-	15
DMS-7	DMS	2.0	1.0	-	30
DMS-8	DMS	3.0	-	0.5	0
DMS-9	DMS	3.0	-	0.5	15
DMS-10	DMS	3.0	-	0.5	30

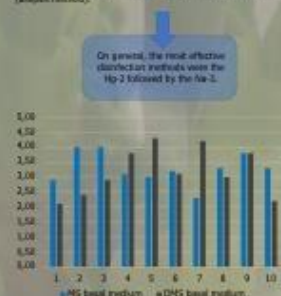
### RESULTS



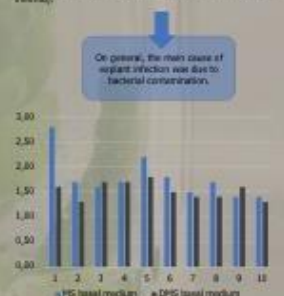
**Figure 2.** Percentage (%) of viable (clear) and discarded (contaminated) explants according to the applied treatments (asepsis method).



**Figure 3.** Percentage (%) of discarded (contaminated or dead) explants according to the applied treatments (asepsis method).



**Figure 4.** The average number of emitted new shoots per explant according to the applied treatments (media composition).



**Figure 5.** The average length (cm) of emitted new shoots according to the applied treatments (media composition).



**Figure 6.** General aspect of *in vitro* growth and development of *Salicornia* spp. (A- Zero days; B- 7 days; C- 14 days; D- 45 days and; E- 60 days (extra).

### CONCLUSION

The best method for the *in vitro* establishment of *Salicornia* spp. is wash the apical cuttings under running water for 30 minutes, followed by an immersion of 30 seconds in an ethanol solution (70%), and then immerse in a fungicide solution (2g L<sup>-1</sup> of Mancozeb®) for 10 minutes. After that, the cuttings must be immerse in a HgCl<sub>2</sub> solution (0.50%) for 2 minutes and then were washed 5 times with sterile water before the *in vitro* inoculation on DMS basal medium supplemented with 2.0mg.L<sup>-1</sup> of BA, 1.0mg.L<sup>-1</sup> of NAA (also is possible add 30g.L<sup>-1</sup> of NaCl) for multiplication and on MS basal medium (free of plant growth regulator) for elongation.

