



POLITÉCNICO DE COIMBRA

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Marta Susana da Silva Clemente

Multiplicação e Estabelecimento *in vitro* e *ex vitro* de *Salicornia ramosissima*

Orientadora: Professora Doutora Maria João Barroca

Co-orientadora: Professora Doutora Aida Moreira da Silva

Coimbra, 2018



POLITÉCNICO DE COIMBRA

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Marta Susana da Silva Clemente

Multiplicação e Estabelecimento *in vitro* e *ex vitro* de *Salicornia ramosissima*

Relatório de estágio profissionalizante apresentado à
Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento
dos requisitos necessários à obtenção do grau de
mestre em Biotecnologia

Orientadora: Professora Doutora Maria João Barroca

Co-orientadora: Professora Doutora Aida Moreira da Silva

Coimbra, 2018

AGRADECIMENTOS

Durante os meses em que decorreu o estágio profissionalizante em Biotecnologia, tive o privilégio de contatar com diversas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha aprendizagem, concretização dos objetivos propostos e para a realização do presente relatório.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora de estágio Professora Doutora Maria João Barroca e à minha co-orientadora Professora Doutora Aida Moreira da Silva, com quem tive o privilégio de trabalhar e aprender, que sempre me apoiaram, incentivaram e disponibilizaram para ajudar na realização deste trabalho, bem como em todas as etapas da minha aprendizagem.

Agradeço também à Unidade I&D de Química-Física Molecular, da Universidade de Coimbra na pessoa da Dra. Ana Margarida Amado por todo o apoio e ajuda prestada na realização dos espetros de ATR-FTIR bem como na sua análise. Agradeço ainda ao Laboratório CICECO da Universidade de Aveiro, na pessoa de Celeste Azevedo, pelo registo dos espetros de FT-Raman.

Quero ainda, agradecer muito especialmente a todos os meus Professores e demais funcionários da Escola Superior Agrária de Coimbra, muito especialmente à Engenheira Neusa Nazaré, Engenheira Sandra Santos, Engenheira Isabel Herder, D. Rosa e D. Lena por todo o apoio prestado, sobretudo durante a realização deste estágio.

Registo também, o meu reconhecimento a todos os familiares e amigos que sempre me apoiaram, especialmente ao meu marido e às minhas filhas.

Por último, mas não menos importante, deixo um agradecimento muito especial a todos os meus colegas de curso e restantes alunos desta instituição.

Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Acordo de Parceria Portugal 2020 - Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO 2020), no âmbito do projeto Centro-01-0145-FEDER-023631 SoSValor: Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal, do projeto Centro-01-0145-FEDER-000007 ReNATURE - Valorização dos Recursos Naturais Endógenos da Região Centro e do projeto POCI-0145-FEDER-029305 IDEAS4life - Novos IngreDiEntes Alimentares de Plantas Marítimas.

A todos o meu muito Obrigado.

RESUMO

A *Salicornia ramosissima* é uma planta halófito obrigatória, autóctone que coloniza ambientes salinos, se dantes era considerada uma erva daninha das salinas, atualmente vai ganhando o seu espaço na cozinha portuguesa sobretudo para a confeção de pratos gourmet, temperos e saladas.

O estudo apresentado é uma contribuição para a valorização da *Salicornia ramosissima* através da utilização de técnicas de propagação da planta.

No estabelecimento *ex vitro* a taxa de germinação foi 82,22 % em perlite, e 88,89 % em substrato orgânico; As plantas germinadas, transplantadas e colocadas em condições idênticas às das plantas domésticas apresentaram, até ao final do ensaio, cor escura e crescimentos máximos de 22,5 cm.

No estabelecimento *in vitro* a taxa média de germinação foi de 91,33 %, conseguiu-se estabelecer e multiplicar ápices e segmentos nodais com uma taxa máxima de multiplicação de 1,75 e 1,29 na primeira e segunda repicagem respetivamente.

As análises espectroscópicas ATR-FTIR de acompanhamento das plantas de salicornia regadas com água doce e água do mar evidenciaram a elevada capacidade de armazenamento de água nas suas células, sobretudo para compensar a acumulação de sais. Detetou-se ainda, a presença de compostos, tais como hidratos de carbono, esterres, compostos fenólicos, ácidos gordos, entre outros.

Palavras Chave: *Salicornia ramosissima* , Estabelecimento *in vitro*, Estabelecimento *ex vitro*, ATR-FTIR, FT-Raman.

ABSTRACT

Salicornia ramosissima is an obligatory halophyte plant, indigenous to colonizing saline environments, if it was considered a salt weed, it is currently gaining its place in Portuguese cuisine, mainly for the confection of gourmet dishes, seasonings and salads.

The present study is a contribution to the valorization of *Salicornia ramosissima* through the use of plant propagation techniques.

In the ex vitro establishment the germination rate was 82.22% in perlite, and 88.89% in organic substrate, the germinated plants transplanted and placed under the same conditions as the domestic plants presented, until the end of the test, dark color and maximum growth 22.5 cm.

In the in vitro establishment the average germination rate was 91.33%; it was possible to establish and multiply apexes and nodal segments with a maximum multiplication rate of 1.75 and 1.29 in the first and second fingerings respectively.

ATR-FTIR spectroscopic analyzes of salicornia plants irrigated with freshwater and seawater evidenced the high capacity of water storage in their cells, mainly to compensate the accumulation of salts. The presence of compounds such as carbohydrates, esters, phenolic compounds, fatty acids, among others were also detected.

Keywords: *Salicornia ramosissima*, in vitro establishment, ex vitro establishment, ATR-FTIR, FT-Raman.

ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATR - Espectroscopia de reflectância total atenuada

B5 - Meio de Cultura de Gamborg *et al*, 1968

CEE - Comunidade Económica Europeia

CFL - Câmara de Fluxo Laminar

FAO - Organização para a Alimentação e a Agricultura (Food and Agriculture Organization)

FTIR - Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformadas de Fourier

IR - Radiação infravermelha

IVA - Imposto sobre o valor acrescentado

KM - meio de cultura de Kao & Michayluk, 1975

Knop - Meio de Cultura de Gautheret, 1959

MS - Meio de cultura de Murashige & Skoog, 1962

MS/2 - Meio de cultura de Murashige & Skoog, 1962, formulação reduzida a metade

PANC - Plantas alimentícias não convencionais

pH - Potencial hidrogeniónico

SMCC - Salinas Municipais do Corredor da Cobra

UTAD - Universidade de Trás os Montes e Alto Douro

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de Símbolos e Abreviaturas	
Índice de Tabelas	
Índice de Figuras	
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Seleção e Valorização de Plantas	2
2.2. Sapais	3
2.3. Plantas Halófitas	4
2.4. Salicórnia	6
2.4.1. Salicornia ramosissima J. Woods.....	7
2.4.1.1. Morfologia e Botânica	8
2.4.1.2. Ecologia e Habitat.....	9
2.4.1.3. Distribuição Geográfica.....	9
2.4.2. Aplicações.....	10
2.4.3. Usos Medicinais.....	10
2.4.4. Alimentação.....	11
2.5. Produção de Plantas	11
2.5.1. Propagação in vitro	12
2.5.1.1. Micropropagação.....	12
2.5.1.2. Meios de Cultura.....	14
2.5.2. Propagação ex vitro	15
2.5.2.1. Propagação por semente.....	15
2.6. Técnicas Espectroscópicas	17
2.6.1. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier	17
2.6.1.1. Espectroscopia de reflectância total atenuada.....	18
2.6.2. Espectroscopia de Raman.....	18
3. Materiais e Métodos	20
3.1. Recolha do Material Vegetal	20
3.2. Estabelecimento ex vitro	21
3.2.1. Plantas.....	21

3.2.2. Sementes	22
3.2.3. Transplante de Plantas Seminais	23
3.3. Estabelecimento <i>in vitro</i>	24
3.3.1. Sementes	24
3.3.2. Estabelecimento de ápices e segmentos nodais	25
3.3.2.1. Primeiro Ensaio	26
3.3.2.2. Segundo Ensaio.....	26
3.3.2.3. Repicagem e Multiplicação	27
3.4. Técnicas Espectroscópicas	27
3.4.1. Espectroscopia de Reflectância Total Atenuada.....	27
3.4.2. FT-Raman	28
4. Resultados e Discussão	29
4.1. Estabelecimento <i>ex vitro</i>	29
4.1.1. Plantas	29
4.1.2. Sementes	30
4.1.3. Transplante de Plantas Seminais	32
4.1.3.1 Estufa.....	32
4.1.3.2 Interior de casa	36
4.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	37
4.2.1. Sementes	37
4.2.2. Estabelecimento de ápices e segmentos nodais	39
4.2.2.1. Primeiro Ensaio	39
4.2.2.2. Segundo Ensaio.....	40
4.2.3. Repicagem e Multiplicação.....	41
4.3. Técnicas Espectroscópicas	43
4.3.1. Espectroscopia ATR-FTIR e FT-Raman.....	44
4.3.1.1. ATR-FTIR de Salicornia Submetida a Diferentes Tipos de Rega e Salicornia Recolhida nas Salinas	44
4.3.1.2. ATR-FTIR de Salicornia Fresca e Liofilizada.....	48
4.3.1.3. FT-Raman de Salicornia da Salina Liofilizada.....	52
5. Conclusão	54
6. Sugestões para Trabalho Futuro	56
6. Bibliografia	57
7. Anexos	i

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonómica da planta halófito <i>Salicornia ramosissima</i> (UTAD, 2018; ALMARGEM, 2018).	7
Tabela 2: Principais meios de cultura (RODRIGUES, 2014).....	15
Tabela 3: Estabelecimento de ápices e segmentos nodais de material vegetal recolhido em setembro de 2017 na SMCC.....	26
Tabela 4: Estabelecimento de ápices e segmentos nodais de material vegetal recolhido em maio de 2018 na SMCC e do ensaio de germinação em substrato orgânico.....	26
Tabela 5: Ensaio de germinação <i>ex vitro</i>	30
Tabela 6: Ensaio de transplante das plantas provenientes do ensaio de germinação, para tabuleiro.	32
Tabela 7: Ensaio de <i>Salicornia ramosissima</i> realizada em estufa e regada com água do mar e água doce.	35
Tabela 8: Ensaio de adaptação a condições de ambiente interior de casa e temperaturas domésticas.....	37
Tabela 9: Ensaio de germinação <i>in vitro</i>	38
Tabela 10: Resultados do ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais (Material vegetal proveniente das SMCC).	39
Tabela 11: Resultados do ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais em meio de cultura MS e Knop, de plantas provenientes das SMCC.....	40
Tabela 12: Resultados do segundo ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais em meio de cultura MS e Knop, de plantas provenientes do ensaio de germinação <i>ex vitro</i>	41
Tabela 13: Ensaio de multiplicação da <i>Salicornia ramosissima</i>	43
Tabela 14: Comparação Raman vs IR, por grupos funcionais (vibrações) e regiões (HORIBA, 2004).....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plantas halófitas, Costa de Lavos.	4
Figura 2: Plantas de Salicornia.	7
Figura 3: Esquema ilustrativo do género <i>Salicornia</i> : a) <i>Salicornia</i> , b) inflorescência, c) semente, d) corte longitudinal da semente, adaptado de (CASTROVIEJO, <i>et al.</i> , 1990).....	8
Figura 4: Mapa com a distribuição da <i>Salicornia ramosissima</i> em Portugal, adaptado de Flora-On (ARAUJO, <i>et al.</i> , 2018).	10
Figura 5: Semente não selecionada de <i>Salicornia ramosissima</i> com casca.	16
Figura 6: Recolha de material vegetal, nas SMCC.	20
Figura 7: Transplante das plantas recolhidas nas SMCC e regadas com água do mar.....	21
Figura 8: Semente de <i>Salicornia ramosissima</i> , escolhida e limpa de casca.	22

Figura 9: Transplante das plantas de <i>Salicornia ramosissima</i> para: a) contentor, b) vasos de 60, 300 e 500 mL.....	23
Figura 10: Ensaio de transplante de plantas recolhidas nas SMCC em Julho de 2017: a) plantas transplantadas, b) 20 dias após o transplante, c) pormenor de uma planta 20 dias após o transplante, d) 30 dias após o transplante.	29
Figura 11: Ensaio de germinação de <i>Salicornia ramosissima</i> em substrato orgânico e em perlite: a) sementeira em substrato orgânico, b) e d) <i>Salicornia ramosissima</i> germinada, c) sementeira em perlite.....	31
Figura 12: Plântulas provenientes do ensaio de germinação: a) plântula germinada em substrato orgânico, b) plântula germinada em perlite.....	33
Figura 13: Ensaio de <i>Salicornia ramosissima</i> regada com água do mar e água doce desde o estabelecimento até as 21 semanas com intervalos de 7 semanas entre cada avaliação: a), b), c) e d) evolução das plantas regadas com água doce, e), f), g) e h) evolução das plantas regadas com água do mar.....	34
Figura 14: Ensaio de <i>Salicornia ramosissima</i> regada com água do mar, evolução das plantas em ambiente doméstico: a) plantas transplantadas, b) 14 semanas após o transplante e c) e d) 21 semanas após o transplante.....	36
Figura 15: Caixa de Petri com semente de <i>Salicornia ramosissima</i> germinadas em meio de cultura MS.	38
Figura 16: <i>Salicornia ramosissima</i> antes e após a repicagem e multiplicação.....	42
Figura 17: Espetros ATR-FTIR (500 a 4000 cm^{-1}) de <i>Salicornia ramosissima</i> de: a) ensaio de germinação regada com água doce, b) ensaio de germinação regada com água do mar durante 1 semana, c) ensaio de germinação regada com água do mar durante dois meses e d) recolhida na salina.....	45
Figura 18: Espetros ATR-FTIR (1500 a 1800 cm^{-1}) de <i>Salicornia ramosissima</i> de: a) ensaio de germinação regada com água doce, b) ensaio de germinação regada com água do mar durante 1 semana, c) ensaio de germinação regada com água do mar durante dois meses, d) recolhida na salina.....	46
Figura 19: Espetros ATR-FTIR (2700 a 3700 cm^{-1}) de <i>Salicornia ramosissima</i> de: a) ensaio de germinação regada com água doce, b) ensaio de germinação regada com água do mar durante 1 semana, c) ensaio de germinação regada com água do mar durante dois meses, d) recolhida na salina.....	47
Figura 20: Espetros ATR-FTIR (500 a 4000 cm^{-1}) de <i>Salicornia ramosissima</i> recolhida na salina: a) fresca e b) liofilizada.....	49
Figura 21: Espetros ATR-FTIR (1500 a 1800 cm^{-1}) de <i>Salicornia ramosissima</i> recolhida na salina: a) fresca e b) liofilizada.....	50
Figura 22: Espetros ATR-FTIR (2700 a 3700 cm^{-1}) de <i>Salicornia ramosissima</i> recolhida na salina: a) fresca e b) liofilizada.....	51
Figura 23 : Comparação entre espetros ART-FTIR (a vermelho) e FT-Raman (preto), da <i>Salicornia ramosissima</i> liofilizada, na região espectral de 500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}	52

1. INTRODUÇÃO

As alterações climáticas, nomeadamente a diminuição da água doce utilizável, conduzem à necessidade de selecionar e valorizar novas plantas para alimentar uma população em rápido crescimento. De acordo com a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) (2017), estima-se que a população mundial atinja os 9,8 mil milhões de pessoas em 2050 e por conseguinte será necessário aumentar a produção de alimentos em 70 %.

Por outro lado, a poluição provocada pelo homem e o uso excessivo de água doce na agricultura conduzem a uma diminuição da quantidade de água potável disponível para muitas populações, sobretudo para as mais desfavorecidas (FAO, 2018). Assim sendo, é urgente encontrar formas de reduzir o consumo de água doce ou encontrar novos meios de obter alimentos com recurso a água salgada, já que esta representa cerca de 97,5 % de toda a água do planeta (REBOUÇAS, 2005).

As plantas halófitas, possuem grandes potencialidades para “revolucionar” a agricultura pois têm a capacidade de completar o seu ciclo de vida em ambientes com elevadas concentrações de sais (YENSEN, 2008), permitindo a obtenção de alimentos em áreas até agora desvalorizadas ou sub-aproveitadas. Uma dessas plantas é a salicórnia, que cresce espontaneamente em zonas estuarinas, sapais e salinas. Esta planta halófita é comestível e apresenta inúmeras vantagens que não se esgotam na possibilidade do seu cultivo em ambientes salinos. A salicórnia contém minerais benéficos para a saúde tais como o cálcio, o potássio e o magnésio, e possui ainda, compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e até antidiabéticas (MAREC, 2016).

Com o presente trabalho pretende-se conhecer a micro e macro propagação da *Salicornia ramosissima* e o seu crescimento em diferentes concentrações de sal, com a finalidade de possibilitar a sua introdução no mercado, como planta condimentar e a sua comercialização em vaso.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SELEÇÃO E VALORIZAÇÃO DE PLANTAS

A seleção de plantas pelas suas características foi um processo que se iniciou com a própria agricultura, aproximadamente há 10.000 anos (BROWN, *et al.*, 2008) e ainda hoje continua. O Homem começou por observar e selecionar na natureza aquelas plantas que pelas suas características lhe eram mais benéficas para a sua sobrevivência. De seguida, por plantação ou sementeira propagou as plantas selecionadas para manter e melhorar as suas características ano após ano. Este processo, denominado de domesticação, é o resultado de um processo de seleção e de adaptação à agricultura das plantas selecionadas (BROWN, *et al.*, 2008; FULLER, 2007; BESPALHOK, GUERRA, & OLIVEIRA, 2006; GUILHERME & RODRIGUES, 2014).

Durante o processo de domesticação ocorrem algumas alterações das características das plantas o que permite o aumento da produtividade, do aumento dos frutos, dos grãos, das fibras, da perda de dormência de sementes, da diminuição ou perda dos mecanismos de dispersão, da maior uniformidade das plantas e da redução de substâncias tóxicas. Estas modificações, são o resultado da atividade, ou silenciamento, de um ou vários genes que afetam uma série de características de determinada planta. Este efeito denomina-se síndrome da domesticação, que no fundo é o conjunto de características que diferem entre as versões selvagens e domesticadas de uma espécie de planta (FULLER, 2007; BROWN, *et al.*, 2008; GUILHERME & RODRIGUES, 2014; BESPALHOK, GUERRA, & OLIVEIRA, 2006). Em 2007, surgiu no Brasil um novo conceito denominado Plantas Alimentícias Não convencionais (PANC), com o Biólogo e Mestre em Botânica Valdely Kinupp, que são plantas designadas “daninhas” ou “inços” devido ao facto de crescerem entre as plantas cultivadas. No entanto, são espécies com grande importância ecológica e económica. Muitas destas espécies, são comestíveis mesmo que atualmente em desuso (ou quase) pela maior parte da população. O mesmo é válido para plantas silvestres, as quais são genericamente chamadas de “mato” ou “plantas do mato” que são recursos genéticos com usos potenciais inexplorados. Este termo foi atravessando fronteiras e hoje, também em Portugal, é um conceito que vai ganhando adeptos. A salicórnica poderá enquadrar-se neste conceito, pois até há pouco tempo, de

acordo com Barroca *et al.* (2017), era considerada uma erva daninha, invasora das salinas. No entanto, atualmente é cada vez mais apreciada em termos gastronómicos. A valorização desta planta passa pelo seu potencial de mercado, nomeadamente, pelo conhecimento das suas propriedades nutricionais e medicinais, da facilidade de cultivo, transporte e conservação (SANTOS, *et al.*, 2015; PINTO, 2014).

Embora as plantas do género *Salicornia* sejam já bastante utilizadas em muitos países do mundo, em Portugal só agora se começa a dar os primeiros passos para a sua plena utilização, sobretudo na culinária, seja como substituta do sal ou na confeção de pratos e saladas (NEVES, 2013; VENTURA, *et al.*, 2011; GAGO, *et al.*, 2011). Recentemente, a salicórnica é considerada um legume e por conseguinte, para efeitos do Código do IVA, a sua comercialização em fresco, refrigerada, seca, desidratada ou congelada, mesmo que previamente cozida, beneficia da taxa reduzida do imposto, por enquadramento nas verbas 1.6.1 e 1.6.2 da lista I anexa ao citado Código. No entanto se for comercializada em pó ou em conserva, aplica-se a taxa normal do IVA, de acordo com o Ofício Circulado n.º 30185, de 2016-12-09 da Autoridade Tributária e Aduaneira.

2.2. SAPAIS

Os sapais são zonas estuarinas, costeiras ou lagunares, onde se acumulam sedimentos transportados pelo vaivém das marés em estuários ou baías. Estes são constituídos, geologicamente, por lamas e partículas finas de areia e colonizadas por vegetação halófila, própria de terrenos salgados, que desempenha um papel fundamental na fixação dos sedimentos (ICNF, 2014; GONÇALVES, 2016).

Os sapais são considerados um dos ecossistemas mais produtivos e por conseguinte, pela sua importância, interesse comunitário e tendo como objetivo principal a manutenção da biodiversidade, estes habitats naturais são protegidos pela diretiva 92/43/CEE e Decreto-Lei 140/99 de 24 de Abril, Anexo B1, republicado pelo Decreto-Lei 49/2005 de 24 de Fevereiro.

2.3. PLANTAS HALÓFITAS

O termo Halófitas deriva das palavras gregas *halo* que quer dizer sal e *phyte* que designa planta. São plantas capazes de completar o seu ciclo de vida em ambientes com elevadas concentrações de sais (YENSEN, 2008) (Figura 1). Estima-se que entre um e dois por cento das espécies de plantas são halófitas (FLOWERS & COLMER, 2008; GAGO, *et al.*, 2011).



Figura 1: Plantas halófitas, Costa de Lavos.

De acordo com Lousã, *et al.* (2007) os sistemas halófitos desenvolveram três tipos de adaptações ao seu habitat:

Fisiológicas

- atraso na germinação e/ou maturação sob condições desfavoráveis;
- estação de crescimento mais curta (anuais);
- cutícula mais espessa para diminuir a transpiração;
- seletividade a iões específicos para compensar desequilíbrios.
 - acumulação de sais nos tecidos (absorção em alto grau de certos iões, como potássio, na presença de elevadas concentrações

de sódio no meio exterior. Exemplos:algas marinhas (*Halobacteria*), *Arthrocnemum*, *Salicornia*, *Sarcocornia*

○ armazenamento de sais em estruturas especiais. Exemplos: *Atriplex halimus*, *Salsola oppositifolia*.

Morfológicas

- diminuição do tamanho da folha para reduzir a transpiração;
- caules e/ou folhas carnudos (acumulam e expelem sais para evitar a toxicidade e compensar diferenças de pressão osmótica com o solo) com presença de parênquima aquífero;
- redução do número de nervuras;
- redução do número de estomas;
- tricomas e glândulas excretoras de sal - *Atriplex spongiosa*, *Limonium*, *Tamarix*;
- raízes muito profundas para captar água em profundidade e/ou sistemas radiculares superficiais de modo a recolher de imediato a água que chega ao solo e a condensação do orvalho e neblinas nas épocas de maior seca;
- presença de microrrizas nas raízes que ajudam a sobreviver as plântulas e posteriormente colonizar as dunas;
- forma prostrada ou pulviniforme para resistir ao vento.

Adaptações Fenológicas

- atraso na floração.

De acordo com Topso (1939) e Braun-Blanquet (1979) cit por (COSTA, 2001) os halófitos são classificados em três grupos:

- Halófitos obrigatórios, aqueles que necessitam de sais, logo precisam de habitar ambientes salinos, como as diversas espécies dos géneros *Salicornia*, *Sarcocornia*, *Arthrocnemum*, *Limonium*, *Suaeda*, *Limonium*, *Atriplex*, *Frankenia*, *Spartina*, *Puccinellia*, etc.;

➤ Halófitos preferenciais, aqueles que preferem sais, logo ambientes salinos como são os *Scirpus maritimus* var. *compactus*, *Juncus maritimus*, *Salsola vermiculata*, *Hordeum marinum*, etc.;

➤ Halófitos de subsistência, aqueles que toleram sais e ambientes salinos como *Phragmites australis*, *Juncus acutus*, *Cotula coronopifolia*, *Beta vulgaris* subsp. *maritima* entre outros.

Na sua grande maioria as plantas são muito sensíveis ao sal. A salinidade da água e do solo afeta negativamente o crescimento e o rendimento de grande parte das plantas cultivadas (GAGO, *et al.*, 2011). As plantas halófitas são capazes de viver em ambientes de grande salinidade, como as zonas costeiras, sapais, salinas e marinhas (BARROCA, *et al.*, 2017; GAGO, *et al.*, 2011).

A cultura de plantas halófitas é uma promissora ajuda na dessalinização dos solos bem como no aumento das áreas atualmente cultivadas, quer seja para a alimentação animal quer seja para a produção de alimentação humana, sobretudo como alimento gourmet (GAGO, *et al.*, 2011).

2.4. SALICÓRNIA

A etimologia da palavra salicórnica, tem a sua origem no termo árabe “salcoran”, e deve o seu nome à sua forma de caules articulados, suculentos e sucessivos terminando como um mamilo saliente chamado “corno de sal”. A origem da palavra também está associada, às palavras latinas *sal* e *cornu*, que quer dizer ramos em forma de corno contendo sal, ou cornos salgados (MAREC, 2016).

A salicórnica (Figura 2) é considerada uma planta halófito obrigatória, porque necessita de sais para se desenvolver, habitando assim em ambientes salinos (Topsa (1939) e Braun-Blanquet (1979) citados por (COSTA, 2001)). Esta planta é também conhecida por espargos do mar (VENTURA, *et al.*, 2011), sal verde ou erva-salada. Antigamente era considerada uma erva daninha que colonizava salinas e, por conseguinte, causava prejuízos ou obrigava a cuidados com a monda. A sua utilização para fins alimentares está largamente difundida entre as populações litorais de França, Inglaterra e Países Baixos, mas também localmente

em Itália, na Eslovénia e na Grécia. Em Portugal não existia a tradição de a utilizar na alimentação, indústria ou como planta medicinal (NEVES, 2013).



Figura 2: Plantas de Salicornia.

Este panorama tem vindo a mudar, e atualmente é requisitada pelos melhores *chefs* para a confeção de pratos *gourmet* e tempero de saladas (BARROCA, *et al.*, 2017; VENTURA, *et al.*, 2011; MAREC, 2016). A salicornia é uma planta anual e caracterizada por uma morfologia simples, uma vez que produz apenas rebentos suculentos aparentemente sem folhas (VENTURA, *et al.*, 2011).

2.4.1. *SALICORNIA RAMOSISSIMA J. WOODS*

A classificação taxonómica da *Salicornia ramosissima* J. Woods apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação taxonómica da planta halófito *Salicornia ramosissima* (UTAD, 2018; ALMARGEM, 2018).

Classificação taxonómica	
Domínio	<i>Eucarya</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Angiospermophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasse	<i>Caryophyllidae</i>
Ordem	<i>Caryophyllales</i>
Família	<i>Chenopodiaceae</i>
Género	<i>salicornia</i>
Espécie	<i>Salicornia ramosissima</i> J. Woods

2.4.1.1. MORFOLOGIA E BOTÂNICA

A *Salicornia ramosissima* é uma planta autóctone, terófito, anual ou bianual, ereta por vezes prostrada de 10 a 40 cm de altura, sem pelos, com raiz delgada, tem cor verde escura, por vezes amarelada ou mesmo em tons vermelho púrpura. O caule é ereto, translúcido, articulado, carnudo, bem ramificado e aparentemente sem folhas. No entanto, tem folhas opostas, soldadas entre si e com o talo formando um artículo carnudo. As flores são quase invisíveis, verdes, com anteras amarelas, e geralmente solitárias ou em grupos de três. Apresenta uma inflorescência (espiga) terminal de 2 a 3,5 cm; 10 a 14 segmentos férteis, cada um dos segmentos férteis com 1 a 3 mm de altura, de lados convexos, raras vezes paralelos, com margem superior escariosa longa (de 0,2 a 0,3 mm). A flor central do topo longitudinal é maior do que as laterais, com a sua base geralmente coberta pela margem escariosa do segmento inferior, as anteras com 0,4 a 0,5 mm e sementes de 1,1 a 1,4 por 0,5 a 0,7 mm produzidas pelas flores centrais do topo. A floração ocorre de maio a novembro (UTAD, 2018; ALMARGEM, 2018; MAREC, 2016; CASTROVIEJO, *et al.*, 1990) (Figura 3).

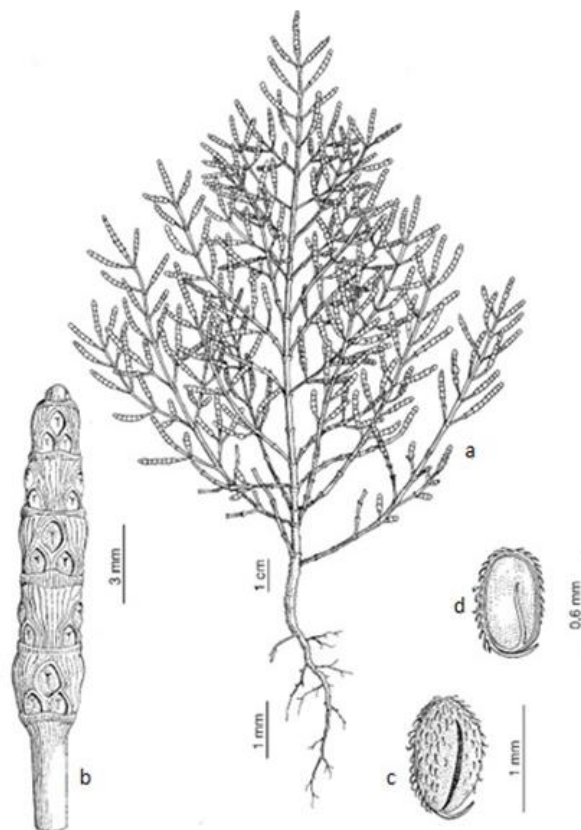


Figura 3: Esquema ilustrativo do género *Salicornia*: a) *Salicornia*, b) inflorescência, c) semente, d) corte longitudinal da semente, adaptado de (CASTROVIEJO, *et al.*, 1990).

2.4.1.2. ECOLOGIA E HABITAT

A salicórnica é uma planta que cresce em meios ricos em sais. A sua capacidade de adaptação está relacionada com a presença de carregadores de água, iões de amónio, entre outros, que desempenham um papel fundamental na proteção contra a desidratação em concentrações elevadas de sal (MAREC, 2016). Esta planta apresenta, seletividade para iões específicos para compensar desequilíbrios e como acumula sais nos tecidos, é considerada uma halófita obrigatória, porque necessita de sais para se desenvolver (Topsa (1939) e Braun-Blanquet (1979) cit por (COSTA, 2001)). Por conseguinte, habita em ambientes salinos como os sapais, salinas, estuários ou nos limites das marés mais altas. Cresce individualmente ou em grupos agarrando-se às rochas, dunas de areia, sedimentos, etc., é resistente ao vaivém das marés e formam frequentemente colónias impressionantes que estabilizam os solos permitindo a fixação dos sedimentos e consolidação dos solos (MAREC, 2016).

2.4.1.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A *Salicornia ramosissima* está amplamente distribuída por todo o litoral costeiro desde o Oeste da Europa, ao Noroeste de África, desenvolve-se preferencialmente em pântanos, sapais salgados ou salinas temporariamente alagadas (MAREC, 2016; CASTROVIEJO, *et al.*, 1990)

Em Portugal encontra-se distribuída por todo o litoral continental (Figura 4), sendo habitual nas áreas estuarinas e sapais (CASTROVIEJO, *et al.*, 1990).

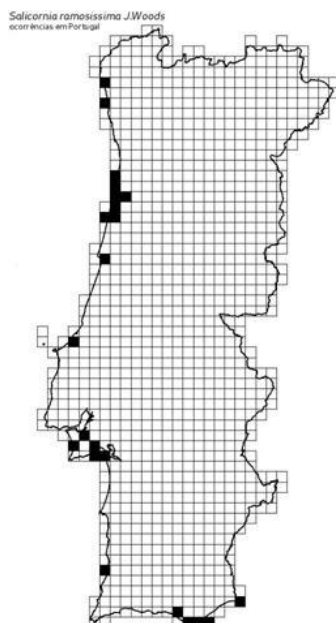


Figura 4: Mapa com a distribuição da *Salicornia ramosissima* em Portugal, adaptado de Flora-On (ARAUJO, et al., 2018).

2.4.2. APLICAÇÕES

A salicórnia é usada há séculos para diversos fins, nomeadamente na alimentação e na produção de sabão e de vidro. Através da sua combustão obtinha-se uma soda em forma de cinza utilizada no fabrico do vidro. Esta substância chamava-se salicor, salicore ou salicorn. No século XIV, em França, dizia-se que as oficinas do vidro se mudavam consoante as áreas de dispersão da planta (MAREC, 2016).

2.4.3. USOS MEDICINAIS

No passado, em França, a salicórnia foi também conhecida como “passe-pierre” porque permitia dissolver os cálculos (pedras). Na medicina tradicional é usada para tratar distúrbios intestinais, pois contém substâncias diuréticas e desintoxicantes, como o iodo, fósforo, cálcio, sílica, zinco, manganês, e ainda vitaminas A, C e D. A salicórnia é ainda reconhecida pela sua eficácia contra doenças renais, hepatite, arteriosclerose e diabetes. Algumas experiências

farmacológicas revelaram que tem atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (MAREC, 2016).

Como é rica em vitamina C, diz-se que foi utilizada pelos marinheiros Portugueses (NEVES, 2013) e Espanhóis durante os descobrimentos como forma de prevenir o aparecimento do escorbuto. Já nos séculos XVII e XVIII se conheciam bem os benefícios desta planta. O Espanhol Don José Quer y Martínez (1695-1764) no Livro "Flora ou História Espanhola das Plantas que Cresce na Espanha" cit por Soler (2010), referia as utilizações da salicórnia, "*A cocção é muito apetecível, promove urina e menstruação, facilita o parto, expele párias e expele humores aquosos do estômago, razão pela qual é usado para hidropisia, cinzas são usadas na fabricação de sabão e para fazer vidro, infundido com água, cura sarna, herpes e outras doenças cutâneas, para estes efeitos as partes ofendidas com a infusão devem ser lavadas ...*".

2.4.4. ALIMENTAÇÃO

As plantas do género *Salicornia* podem ser usadas para os mais diversos fins alimentares, pode ser ingerida crua ou cozinhada, em sopas, saladas, como aperitivo ou a acompanhar pratos de peixe, carne vermelha, branca ou de aves. Quando é apanhada no final do Verão ou no Outono, pode ter uma textura um pouco mais fibrosa e sabor ligeiramente amargo, pelo que é melhor ser cozinhada em água a ferver durante poucos minutos. Esta planta pode ainda ser conservada em vinagre como pickles e usada para realçar o sabor da maionese ou da mostarda (MAREC, 2016; NEVES, 2013).

2.5. PRODUÇÃO DE PLANTAS

A escolha do modo de propagação das plantas é importante, e deve refletir o objetivo do processo de multiplicação. O valor das plantas a multiplicar é o fator determinante na escolha do método de propagação.

A reprodução sexuada promove a diversidade genética, permitindo a seleção de novas combinações genéticas (CAMPBELL, *et al.*, 2008) assim como uma grande produção de sementes e custos mais reduzidos quando comparados com a produção de plantas por macropropagação vegetativa em viveiro, o armazenamento por longos períodos de tempo sem perda da viabilidade em muitas espécies e a facilidade de colonização de habitats associada aos mecanismos naturais de dispersão das sementes (DEMINICIS, *et al.*, 2009).

Pelo contrário, os métodos de propagação vegetativa são úteis quando se pretende manter e multiplicar as características genéticas de um dado genótipo ou de plantas de elite. Por este processo são também propagados híbridos e genótipos estéreis (DANNER, 2008).

Diversos métodos de propagação vegetativa como a estacaria ou a micropropagação têm sido aplicados no melhoramento de varias espécies de plantas, assegurando assim a passagem da variância genética aditiva e não aditiva à descendência. As espécies com maior valor económico são propagadas vegetativamente e são instaladas em plantações clonais. A estacaria e a enxertia são as técnicas de macropropagação vegetativa mais utilizadas, mas outras técnicas são também empregues, como sejam a micropropagação de gomos axilares, rebentos epicórmicos, ápices meristemáticos, etc. Estas técnicas permitem a multiplicação vegetativa de plantas adultas selecionadas e garantem a estabilidade genética (WHITE, ADAMS, & NEALE, 2007; ERICKSSON, EKBERG, & CLAPHAM, 2006).

2.5.1. PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

2.5.1.1. MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação é a multiplicação fiel de um genótipo selecionado através das diversas técnicas de cultura *in vitro*, e está geralmente associada à produção de plantas em larga escala a preços competitivos (ZAVATTIERI, 2002).

A micropropagação é atualmente um método de propagação vegetativa aplicável a uma grande variedade de espécies e é mundialmente utilizado pelos bons resultados que apresta para as mais variadas espécies vegetais bem como pelas aplicações praticas comprovadas por estudos científicos. Esta prática

possibilita a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (CANHOTO, 2010).

O explante deve ser selecionado cuidadosamente, pois este pode determinar o sucesso ou não da micropropagação. Os explantes provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os mais adequados, embora também se possa utilizar material vegetal adulto. Neste caso, estes devem ser colhidos de plantas em crescimento ativo e que não estejam em condições de *stress*. Entre as principais vantagens da sua utilização, estão a possibilidade de se obter várias plantas a partir de um pequeno pedaço da planta mãe, ou seja, a partir de um único explante inicial (CANHOTO, 2010).

A multiplicação das plantas é feita em condições controladas em laboratório e assim pode ser feito independentemente das condições climáticas, possibilitando uma redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie. As plantas obtidas são a “reprodução” fiel da planta mãe, ou seja clones. Estes são livres de doenças, fungos, bactérias, vírus, etc., o que possibilita a sua conservação por longos períodos de tempo bem como a troca de material vegetal sem problemas de sanidade (ERIG & SCHUCH, 2005; CANHOTO, 2010; CABRAL, *et al.*, 2003).

Os principais problemas desta técnica são os custos elevados, pois requer formação específica e bons conhecimentos teórico-práticos, o preço dos meios de cultura e restante material laboratorial, e a instabilidade e qualidade genética das plantas micropropagadas (CANHOTO, 2010).

De acordo com Murashige (1974), cit. por (CANHOTO, 2010; ALLAN, 1981) o conceito de micropropagação ou propagação *in vitro* é apresentado em três fases distintas. Na primeira fase é feita a seleção dos explantes, a sua desinfecção e estabelecimento em meio de cultura em condições de assepsia. Na segunda fase é feita a multiplicação sucessiva dos propágulos, em meio de cultura apropriado para o seu desenvolvimento. Na terceira fase, os clones obtidos são transferidos para um meio de enraizamento e posteriormente transplantados para o substrato ou diretamente para o solo, em condições controladas de atempamento para evitar o *stress* hídrico e térmico.

2.5.1.2. MEIOS DE CULTURA

Um dos fatores mais determinantes para o sucesso na micropropagação é a composição do meio de cultura (CANHOTO, 2010). Assim o meio de cultura é a associação qualitativa e quantitativa de substâncias e nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta em condições artificiais (RODRIGUES, 2014).

Cada espécie de planta ou mesmo cada parte desta tem necessidades nutricionais e hormonais diferentes e por isso não existe um meio específico para cada tipo de planta. Deste modo, são inicialmente testados os meios denominados meios base e depois consoante as necessidades nutricionais ou hormonais detetadas o meio vai sendo otimizado (CANHOTO, 2010).

Existem nos meios de cultura denominados meios base alguns mais simples e outros mais complexos. A solução de Knop (1865) é a mais antiga e considerada uma das mais simples; já a solução MS (Murashige & Skoog, 1962) é considerada das mais complexas e também das mais utilizadas (RODRIGUES, 2014; MALAJOVICH, 2013).

De acordo com Malajovich (2013) os componentes do meio de cultura para células vegetais são:

- Água destilada (95 % do meio);
- Fonte de carbono - a fonte de carbono é necessária porque os explantes não são totalmente autotróficos e a fotossíntese *in vitro* não supre as necessidades das células. A fonte de carbono mais comum é a sacarose
- Substâncias inorgânicas
 - Macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S)
 - Micronutrientes (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I)
- Vitaminas
- Hormonas e reguladores de crescimento
 - Auxinas - promovem o alongamento celular, a formação de calos e de raízes adventícias, inibem a formação de brotos axilares adventícios e, às vezes, a embriogénese em suspensões celulares
 - Citocininas - promovem a divisão celular, regulam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais.

- Outras substâncias, tais como as giberelinas, ácido abscísico, etileno.
- Misturas de substâncias pouco definidas, extrato de levedura, extratos vegetais, hidrolisados de caseína, peptona, triptona, etc.
- Materiais inertes, utilizados como suporte, ágar, agarose, outros polissacarídeos, etc.

Segundo Rodrigues (2014) os principais meios de cultura usados em ensaios de germinação são os descritos da Tabela 2.

Tabela 2: Principais meios de cultura (RODRIGUES, 2014).

Meios de cultura	
Simples	Mais Complexos
Solução de Knop (1865)	White (White, 1943)
Solução de Knudson (1925)	MS (Murashige & Skoog, 1962)
Solução de Hoagland & Arnon (1938)	B5 (Gamborg <i>et a.</i> , 1968)
	KM (Kao & Michayluk, 1975)

2.5.2. PROPAGAÇÃO EX VITRO

2.5.2.1. PROPAGAÇÃO POR SEMENTE

A propagação por semente é normalmente a mais utilizada. A semente (Figura 5) resulta da reprodução sexuada e promove a diversidade genética, através das recombinações resultantes da fecundação (CAMPBELL, *et al.*, 2008).



Figura 5: Semente não selecionada de *Salicornia ramosissima* com casca.

Na sua maioria, as plantas produzem naturalmente sementes viáveis. No entanto, nem sempre isso acontece e mesmo existindo sementes viáveis a sua rápida degradação ou dificuldade de germinação podem potencializar outros métodos de propagação como a propagação *in vitro*, a estacaria, mergulhia, enxertia, etc., (COSTA, 2004; FRANZIN & ROVERSI, 2002).

As vantagens na propagação por semente são a obtenção, normalmente fácil, de uma grande quantidade de sementes, os custos mais reduzidos quando comparados com a produção de plantas por micro ou macro propagação vegetativa, o armazenamento por longos períodos de tempo sem perda da viabilidade em muitas espécies e a facilidade de colonização de habitats associada aos mecanismos naturais de dispersão das sementes (DEMINICIS, *et al.*, (2009).

As principais desvantagens estão relacionadas com a sanidade da semente e estão normalmente associadas aos insetos, fungos, bactérias ou vírus que podem inviabilizar ou reduzir a viabilidade da semente. Um outro fator condicionante é a utilização de produtos químicos como herbicidas, inseticidas, etc., nas plantas mãe ou mesmo nas sementes que podem também eles diminuir a sua viabilidade ou mesmo torná-las inviáveis para germinação (FRANZIN & ROVERSI, 2002; PEREIRA & BIANCHETTI, 1977).

2.6. TÉCNICAS ESPETROSCÓPICAS

2.6.1. *ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER*

No início do século XIX Sir Wilhelm Herschel, propôs a existência de outras formas de radiação diferentes da luz visível. Através de experiências para determinar a quantidade de calor associada a cada uma das cores do espectro visível, observou que a temperatura aumentava à medida que se afastava da região do azul e se aproximava da região do vermelho e se aumentava ainda mais nas zonas abaixo do vermelho. Assim Herschel propôs a existência de uma nova forma de radiação abaixo da região vermelha do espectro, a radiação no infravermelho (IR) a qual na altura chamou de raios caloríficos. Numa nova experiência realizada em março de 1800, este observou que quando se colocava uma amostra na trajetória dessa radiação a temperatura diminuía em alguns pontos, concluindo assim que nesses pontos, a temperatura diminuía porque a amostra absorvia radiação no infravermelho, com esta experiência foram estabelecidas as bases da espectrometria no infravermelho (OLIVEIRA & SILVA, (2014); FTIR, 2016).

Os espectrómetros de absorção de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) baseiam o seu princípio de funcionamento no interferómetro de Michelson, em que o espectrómetro utiliza dois feixes de luz (feixe colimado) que são separados num separador de feixes. Um dos feixes, segue para um espelho fixo e o outro para um espelho móvel, após reflexão os dois feixes encontram-se e sofrem uma interferência depois de terem percorrido distâncias diferentes devido ao percurso do espelho móvel. Esta diferença no caminho percorrido pelos dois feixes é chamado de atraso (δ) e as frequências são registadas nos eixos x y de um gráfico. O gráfico da intensidade da radiação em função do atraso é chamado de interferograma. Com o espectrómetro FTIR é possível obter espectros de infravermelho para amostras em fase gasosa, líquida ou sólida. Normalmente a amostra é colocada entre um par de placas, de material transparente à radiação infravermelha, que posteriormente é colocada na trajetória do(s) feixe(s) de luz. O espectrómetro FTIR têm hoje uma enorme aplicabilidade e são largamente utilizados em todo o mundo sobretudo pela sua velocidade, confiabilidade e facilidade de manuseamento (MEDEIROS, 2009; FTIR, 2016).

2.6.1.1. *ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA*

A espectroscopia de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica utilizada para obter espectros FTIR de variadíssimos tipos de amostras, mas sobretudo de amostras de difícil manuseamento, como fios, filmes, pastas, adesivos ou amostras líquidas. As amostras não precisam de preparação e são colocadas diretamente em contacto com o elemento de reflexão interna, onde a luz incidente é completamente refletida por este elemento depois de interagir com a amostra (MEDEIROS, 2009; FTIR, 2016).

2.6.2. *ESPECTROSCOPIA DE RAMAN*

A espectroscopia de Raman baseia-se no estudo da luz dispersa em todas as direções por um material ao incidir sobre este um feixe de luz monocromática. Uma pequena parte desta luz é dispersa num comprimento de onda, ou frequência, diferente da incidente e específica do material analisado. Este fenómeno foi observado na Índia em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, e por esse motivo, foi chamado de efeito Raman, esta técnica fotónica permite a identificação de materiais orgânicos e inorgânicos ao fornecer informação química e estrutural do objeto (FARIA, AFONSO & EDWARDS, 2002; RODRIGUES & GALZERANI, 2012; ROSANNA, 2005).

A luz ao incidir sobre um objeto, é espalhada por ele, gerando luz com a mesma energia ou de energia diferente da que incidiu sobre este. No primeiro caso, a dispersão da luz é chamado de dispersão elástica e não tem interesse pois não permite analisar as diferenças de energia. Quando a luz gerada tem energia diferente da luz incidente chama-se dispersão inelástica (com frequência diferente da incidente) e permite obter informações sobre a composição química e estrutural do objeto a partir dessa diferença de energia. Essa frequência de vibração permite conhecer como é que os átomos estão ligados entre si e obter informações sobre a geometria molecular, assim como perceber como interagem entre si e com o ambiente (FARIA, AFONSO & EDWARDS, 2002; RODRIGUES & GALZERANI, 2012).

Assim como na espectroscopia FTIR com dispositivo ATR as vantagens da espectroscopia Raman é que é uma técnica de fácil execução, rápida e não destrutiva e que não necessita de qualquer tipo de preparação ou manipulação da amostra a analisar (ROSANNA, 2005; FARIA, AFONSO & EDWARDS, 2002).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. RECOLHA DO MATERIAL VEGETAL

A recolha de material vegetal para estabelecimento decorreu em julho e setembro de 2017 e maio de 2018 nas Salinas Municipais do Corredor da Cobra (SMCC) do Núcleo Museológico do Sal (Figura 6). Após a recolha, o material vegetal foi transportado em malas térmicas, para garantir a viabilidade das plantas. Foi também recolhido solo e água da salina para o estabelecimento *ex vitro*.



Figura 6: Recolha de material vegetal, nas SMCC.

As sementes de salicórnia foram recolhidas em setembro de 2017 e gentilmente cedidas pela Doutora Gilda do Núcleo Museológico do Sal, SMCC.

As experiências *ex vitro* decorreram na localidade do Roxo, concelho de Penacova.

As experiências *in vitro* decorreram nos laboratórios da Escola Superior Agrária de Coimbra.

3.2. ESTABELECIMENTO *EX VITRO*

3.2.1. PLANTAS

Para o estabelecimento *ex vitro* foram utilizadas plantas de pequeno porte, que aparentavam ser mais jovens, com aparente vigor e cor verde característico, por forma a facilitar a sua adaptação ao transplante e a condições edafo-climáticas diferentes do meio em que se encontravam (Figura 7).



Figura 7: Transplante das plantas recolhidas nas SMCC e regadas com água do mar.

O transplante das plantas foi efetuado no próprio dia da recolha, em vasos com capacidade de 500 e 700 mL. Para a transplantação das plantas foi utilizado o solo das salinas e água do mar recolhidos no próprio dia. No total foram transplantadas 10 plantas. Os vasos com as plantas transplantadas foram colocados em tabuleiros com 15 cm de profundidade para garantir a imersão dos vasos. Os vasos foram colocados no exterior com exposição solar durante todo o dia, por forma a simular as condições naturais.

As plantas e o nível de água nos tabuleiros foram verificados diariamente, de modo a garantir que o nível de água nos tabuleiros não variasse, aproximadamente, mais de 3 cm.

3.2.2. SEMENTES

Para o ensaio de germinação das sementes, foram selecionadas aquelas que apresentavam maior uniformidade (Figura 8). No entanto, estas não foram sujeitas a qualquer tipo de desinfecção ou tratamento de pré-germinação. Neste ensaio foram testados dois tipos de substratos diferentes (substrato mineral denominado perlite, lote 70207 e o substrato orgânico - “substrato universal” - da marca Nutrofertil) para verificar qual o mais adequado para a germinação das sementes.



Figura 8: Semente de *Salicornia ramosissima*, escolhida e limpa de casca.

Foram utilizados seis contentores reciclados, de aproximadamente 8 cm de diâmetro e 4,5 cm de altura.

Em três dos contentores colocou-se uma camada de perlite de aproximadamente 3 cm de altura. Nos outros três contentores colocou-se uma camada de substrato orgânico também com 3 cm de altura. Em cada um dos contentores foram colocadas 30 sementes e regou-se com água proveniente de fonte natural. Os contentores foram colocados em estufa e foram regados diariamente até ao final da experiência.

Foram também, semeados dois contentores de maiores dimensões, um com perlite e outro com substrato orgânico, com um número indeterminado de sementes em cada, uma vez que se desconhecia a taxa de germinação, assim

como a viabilidade das plantas daí resultantes. Assim, foi garantido um número elevado de plântulas para serem transplantadas para o estabelecimento *in vitro*.

3.2.3. TRANSPLANTE DE PLANTAS SEMINAIS

Após a germinação das plantas, provenientes dos ensaios de perlite e de substrato orgânico, procedeu-se à transplantação das mesmas para tabuleiro com alvéolos (Ensaio 1), vasos de 60 mL (Ensaio 2) e para vasos de 60 mL, 300 mL e 500 mL (Ensaio 3).

Ensaio 1

- um tabuleiro com alvéolos de 2x2x7 cm (Figura 9a) contendo substrato orgânico já humedecido.

Ensaio 2

- vasos de 60 mL com substrato orgânico humedecido para acompanhamento com rega com água doce e com água do mar e posterior análise no ATR-FTIR.

Ensaio 3

- vasos de 60 mL, 300 mL e 500 mL de capacidade (Figura 9b) com substrato orgânico humedecido para acompanhamento em ambiente doméstico.

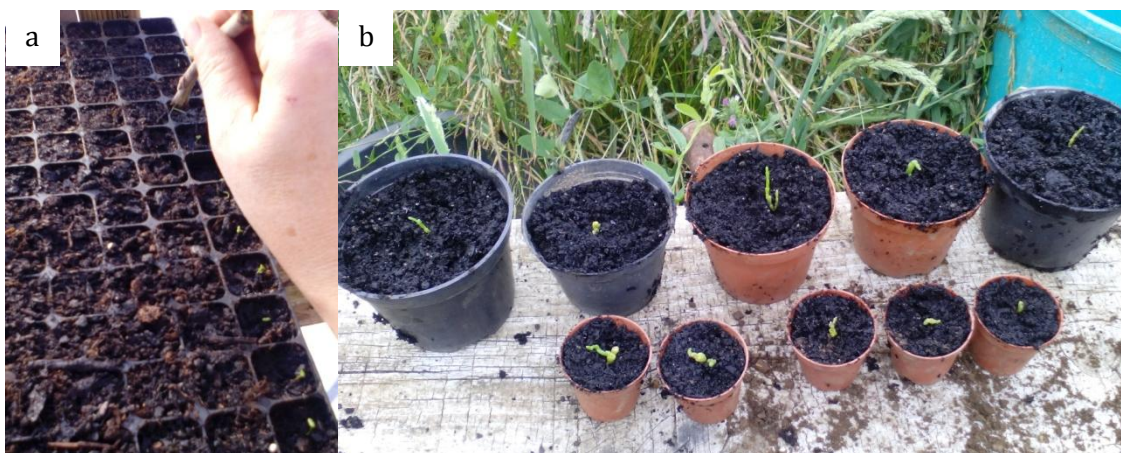


Figura 9: Transplante das plantas de *Salicornia ramosissima* para: a) contentor, b) vasos de 60, 300 e 500 mL.

Retiraram-se as plantas, de aproximadamente 1,5 cm de altura, com ajuda de uma pequena espátula, de forma a não danificar a raiz. Com a mesma espátula abriu-se um buraco no substrato de cada alvéolo e colocou-se a planta, aconchegando-a. Quando todas estavam transplantadas foram regadas, retirando-se o ar, contribuindo para o aconchego da terra junto às raízes.

No ensaio 1 foram transplantadas 40 plantas, 20 provenientes do substrato orgânico e 20 provenientes da perlite para os alvéolos do contentor.

Para o segundo e terceiro ensaios de contentores maiores realizou-se o mesmo procedimento. No total foram transplantadas 26 plantas no segundo e 10 no terceiro, todas elas provenientes da germinação em substrato orgânico, pois verificou-se terem maior viabilidade relativamente às provenientes de substrato mineral (perlite).

3.3. ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

3.3.1. *SEMENTES*

Para o tratamento de desinfeção das sementes utilizou-se o procedimento descrito no protocolo de desinfeção (Anexo I) que é referido na literatura como um dos que apresenta melhores desempenhos de germinação de várias espécies de plantas e segundo o qual se vai aumentando ou diminuindo o tempo de exposição aos agentes de desinfeção consoante o tamanho e rigidez da semente. Neste caso, dado o tamanho reduzido das sementes foi aplicado um tratamento de desinfeção relativamente curto.

O teste de viabilidade das sementes realizou-se *in vitro*, servindo em simultâneo para verificar a sua taxa de germinação.

Na câmara de fluxo laminar foram colocadas 30 sementes de salicórnia em cada uma das cinco caixas de Petri descartável contendo meio de cultura MS (Anexo II).

As cinco caixas de Petri foram colocadas em fitoclima de marca Aralab (Anexo III), a uma temperatura variável de 20 a 25 °C em condições de obscuridade, até à germinação das sementes. Após a germinação e de modo a

simular as condições naturais, as plantas foram sujeitas a um fotoperíodo de 16 horas de luz a 25 °C de temperatura e 8 horas, no escuro, a 20 °C.

3.3.2. ESTABELECIMENTO DE ÁPICES E SEGMENTOS NODAIS

O estabelecimento de ápices e segmentos nodais decorreu em dois períodos distintos (primeiro e segundo ensaio). O primeiro em setembro de 2017 e o segundo em maio de 2018. Ambos foram realizados utilizando plantas recolhidas na SMCC. No segundo ensaio foram também utilizadas plantas seminais provenientes dos ensaios de germinação realizados em estufa e regadas unicamente com água “doce”. Foram recolhidas plantas que apresentavam maior vigor e cor verde, embora as plantas recolhidas em setembro de 2017 já apresentassem uma coloração verde/amarelado.

Após o tratamento de desinfecção anteriormente descrito, em câmara de fluxo laminar, cortaram-se os ramos em pequenos segmentos nodais e ápices com, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento, tendo o cuidado de rejeitar o material vegetal necrosado no processo de desinfecção. De seguida foram colocados em meio de cultura MS e Knop em tubo de ensaio.

Após o estabelecimento colocaram-se os tubos de ensaio com os ápices e os segmentos nodais, no escuro no fitoclima durante aproximadamente uma semana, a 20 – 25 °C. Após este período foram inspecionados, contabilizados e eliminados todos aqueles que apresentavam fungos, bactérias ou necroses. Os que se apresentavam em boas condições, foram medidos e repicados para novo meio de cultura MS, de modo a reduzir a presença de fenóis, e colocados durante dois a três dias às escuras na câmara fitoclima. Posteriormente, foram colocados a meia-luz durante aproximadamente uma semana. Decorrido esse tempo, foram colocados com o fotoperíodo de 16 horas luz a 25 °C e 8 horas em regime de obscuridade a 20 °C, de forma a simular as condições naturais.

3.3.2.1. PRIMEIRO ENSAIO

No primeiro ensaio foram estabelecidos em meio de cultura MS e Knop um total de 16 ápices e 20 segmentos nodais de material vegetal recolhido em Setembro de 2017 na SMCC, como se pode observar na Tabela 3.

Tabela 3: Estabelecimento de ápices e segmentos nodais de material vegetal recolhido em setembro de 2017 na SMCC.

Meio de cultura	Nº de ápices	Nº de segmentos
MS	8	10
Knop	8	10

3.3.2.2. SEGUNDO ENSAIO

No segundo ensaio foram estabelecidos 32 ápices e 40 segmentos nodais em meio MS e Knop de material vegetal proveniente da SMCC, recolhido em maio de 2018 e do ensaio de germinação de substrato orgânico, como mostra a Tabela 4.

As plantas provenientes do ensaio de germinação tinham sido transplantadas para substrato orgânico quando tinham 1,5 cm de acordo com o procedimento anteriormente descrito e foram sempre regadas com água doce.

Tabela 4: Estabelecimento de ápices e segmentos nodais de material vegetal recolhido em maio de 2018 na SMCC e do ensaio de germinação em substrato orgânico.

	Meio de	Nº de ápices	Nº de segmentos
Material vegetal da SMCC	MS	8	10
	Knop	8	10
Material vegetal de ensaio de germinação <i>ex vitro</i>	MS	8	10
	Knop	8	10

3.3.2.3. *REPICAGEM E MULTIPLICAÇÃO*

A repicagem dos explantes sobreviventes ocorreu quatro semanas após o estabelecimento. Nesta data, foi possível multiplicar alguns deles pois apresentavam bons crescimentos.

Em câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada e com o material esterilizado, retirou-se o explante do respetivo tubo de ensaio, com a ajuda de uma pinça comprida, para dentro de uma caixa de Petri. De seguida, cortou-se a base do explante e, com a ajuda de outra pinça comprida, colocou-se dentro de outro tubo de ensaio, com novo meio de cultura MS. Procedeu-se de igual modo para todos os explantes, tendo o cuidado de desinfetar a superfície de trabalho e esterilizar o material usado entre cada utilização.

Após cada repicagem e multiplicação colocaram-se os tubos de ensaio com os explantes num suporte de tubos, dentro da câmara fitoclima, a 20 – 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz, a 25 °C e 8 horas a 20 °C, no escuro, de forma a simular as condições naturais.

3.4. TÉCNICAS ESPETROSCÓPICAS

3.4.1. *ESPETROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA*

Os espectros ATR-FTIR de salicórnia realizaram-se na Unidade I&D de Química-Física Molecular, da Universidade de Coimbra.

O detetor do equipamento ATR-FTIR foi previamente cheio com azoto líquido e iniciou-se o programa “OPUS Spectroscopy Software. De seguida, a prensa foi muito bem limpa com propanol e foi feito o *background* o qual se repetiu após a realização da análise a cada duas amostras à mesma salicórnia e sempre que se mudava de planta. Este procedimento permite a calibração do aparelho e é sempre feito sem qualquer amostra ou resíduos e após a limpeza da prensa.

Para a realização das análises usou-se as partes terminais e viçosas de cada planta e sempre a extremidade apical destas, rejeitando a ponta, por forma a que as amostras coincidissem em termos de localização da planta.

Com a ajuda de um bisturi foram cortados transversalmente pequenos cilindros, com cerca de 2 mm de altura, a partir do último segmento de cada salicórnia. Cada segmento das diferentes plantas foi sempre colocado na prensa do ATR-FTIR na mesma posição.

Os segmentos de plantas analisados correspondiam (i) a plantas recolhidas nas SMCC, (ii) plantas seminais regadas apenas com água doce, (iii) plantas seminais regadas com água do mar. As análises espectroscópicas realizadas às plantas regadas com água do mar, foram efetuadas ao fim de uma semana de rega diária e novamente ao fim de dois meses de rega.

Os espectros de ATR-FTIR foram registados num espectrómetro Bruker Vertex 70 usando um acessório de ATR com reflexão simples em diamante. O aparelho faz uso de um separador de feixe de Ge em substrato de KBr e um detetor Telureto de mercúrio e cádmio arrefecido com azoto líquido. Cada espectro apresentado é uma média de quatro registos independentes, cada um com 128 acumulações.

Os resultados foram analisados através do programa Origin Pro 6.1 (ORIGUINLAB).

3.4.2. *FT-RAMAN*

Para a realização das análises de FT-Raman foi utilizada uma amostra de salicórnia liofilizada, colhida nas SMCC em 2017.

Os espectros de FT-Raman foram obtidos num espectrómetro RFS-100 da Bruker, usando um laser Nd:YAG laser de excitação a 1064 nm. Nos registos foi usada uma potência de laser de 80-100 mW. Cada espectro apresentado é a média de 3 medições independentes cada uma com 150 acumulações.

Os resultados foram analisados usando o programa Origin Pro 6.1 (ORIGUINLAB).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTABELECIMENTO *EX VITRO*

4.1.1. *PLANTAS*

No ensaio de transplantação das salicórnias recolhidas na SMCC (Figura 10a) verificou-se que em apenas 20 dias após o seu transplante a maioria das plantas já não apresentava viabilidade (Figura 10b e 10c). Após 30 dias do início do ensaio todas as plantas tinham morrido (Figura 10d).

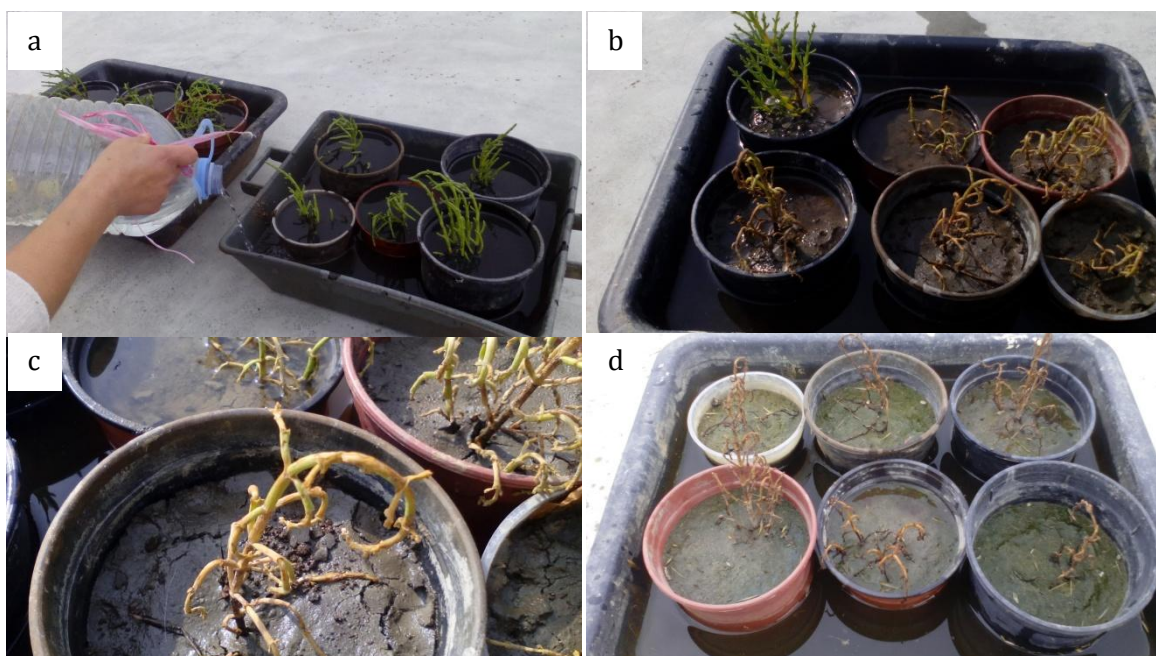


Figura 10: Ensaio de transplante de plantas recolhidas nas SMCC em Julho de 2017: a) plantas transplantadas, b) 20 dias após o transplante, c) pormenor de uma planta 20 dias após o transplante, d) 30 dias após o transplante.

Apesar de se manter mais ou menos constante o nível diário de água nos tabuleiros, o verão de 2017 foi muito quente e com pouca humidade relativa no ar. Este facto, pode ter condicionado negativamente a sobrevivência das plantas, pois estas além de estarem deslocadas do seu habitat natural, estavam também a uma altitude superior, cerca de 500 metros, em relação ao local da recolha.

Outro fator que pode ter influenciado a rápida morte das plantas deve-se ao período de recolha do material vegetal, dado que estas já se encontravam no

período de floração. Esse período pode condicionar a sua viabilidade uma vez que nesta época as plantas investem na produção da semente e não no desenvolvimento do sistema radicular e os nutrientes e produtos foto-sintetizados que são produzidos são mobilizados inicialmente para as flores e posteriormente para a frutificação e semente (BICHO, TORRES, & CRUZ, 2008). Apesar de se ter escolhido as plantas que aparentemente estavam mais atrasadas na floração, pois eram mais pequenas e apresentavam maior vigor em relação às restantes, não foi possível manter as plantas viáveis durante um longo período de tempo.

4.1.2. SEMENTES

O ensaio de germinação *ex vitro* foi realizado em estufa com substrato de perlite (Figura 11a) e substrato orgânico (Figura 11c), com rega manual. Após 13 dias da sementeira obteve-se um elevado número de sementes germinadas (Figuras 11b e 11d) e já existiam plântulas. Após 21 dias, do início do ensaio, verificou-se que já não existiam novas germinações e por isso foi feita a avaliação e contabilização das plantas germinadas, como descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Ensaio de germinação *ex vitro*.

	Perlite			Substrato orgânico		
Nº sementes	30	30	30	30	30	30
Nº sementes germinadas	24	23	27	25	28	27
Média	24,7			26,7		
Taxa de Germinação (%)	80,0	76,7	90,0	83,3	93,3	90,0
Taxa média de Germinação (%)	82,2			88,9		

Na Tabela 5, observa-se que as taxas de germinação para ambos os substratos foi elevada, respetivamente 82,2 % e 88,9 % para o substrato de perlite e para o substrato orgânico. Estas taxas de germinação podem estar relacionadas com o facto de ambos os substratos terem sido regados com água doce, pois de acordo com Silva, Caldeira e Freitas (2006) a baixa salinidade da água favorece a germinação das sementes.

A taxa de germinação foi mais elevada no substrato orgânico do que com o substrato mineral perlite. Apesar da perlite ter boa capacidade de retenção de água, verificou-se que ocorria uma maior desidratação com este substrato. Por outro lado, o reduzido tamanho da semente em relação à granulometria da perlite, pode ter influenciado a disponibilidade da água necessária para a germinação das sementes em perlite. Assim, estes fatores podem condicionar a germinação das sementes no substrato mineral perlite.

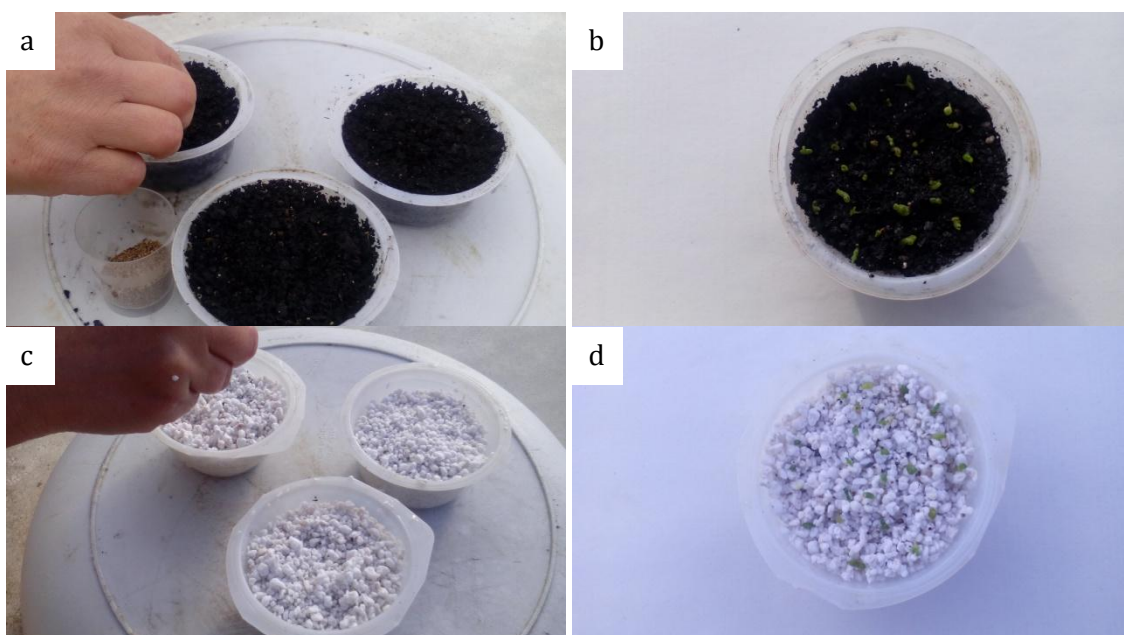


Figura 11: Ensaio de germinação de *Salicornia ramosissima* em substrato orgânico e em perlite: a) sementeira em substrato orgânico, b) e d) *Salicornia ramosissima* germinada, c) sementeira em perlite.

Apesar das condições de germinação serem diferentes das usadas neste estudo, Lopes, *et al.* (2012) observou taxas de germinação para a *Salicornia ramosissima* compreendidas entre 10 e 11 %, consoante o tipo de substrato e o tipo de água usada para a rega (água de esteiro com diferentes diluições com água destilada).

4.1.3. TRANSPLANTE DE PLANTAS SEMINAIS

4.1.3.1 ESTUFA

Nestes ensaios as plantas foram transplantadas para tabuleiros (primeiro ensaio) e contentores (segundo ensaio) com substrato orgânico.

Como se pode verificar na Tabela 6, as plantas transplantadas para o tabuleiro com substrato orgânico tiveram um período de sobrevivência inferior a um mês. No entanto, as plantas provenientes da germinação em substrato orgânico foram as que resistiram durante mais tempo até à morte total de todas as plantas.

Tabela 6: Ensaio de transplante das plantas provenientes do ensaio de germinação, para tabuleiro.

Número de Dias Após Transplante	0	3	6	9	12	15	18	27
Plantas Sobreviventes, Germinadas em Perlite	20	14	9	2	2	0		
% de Mortes	0	30	55	90	90	100		
Plantas Sobreviventes Germinadas em Substrato	20	17	16	12	8	3	2	0
% de Mortes	0	15	20	40	60	85	90	100

No geral, a rápida morte das plantas pode dever-se ao pequeno volume dos alvéolos do tabuleiro, bem como às altas temperaturas durante a realização dos ensaios. Apesar das plantas serem regadas uma vez por dia verificava-se que o substrato se encontrava seco antes de cada rega.

Por outro lado, o facto das plantas provenientes da germinação em perlite terem morrido primeiro do que as provenientes da germinação em substrato pode estar relacionado com a robustez e com a proteção da raiz. As plantas provenientes de substrato orgânico aparentavam maior robustez e as suas raízes apresentavam um “torrão”, ou seja tinham parte do substrato onde germinaram a aconchegar a raiz quando foram transplantadas (Figura 12a). No caso das plantas transplantadas do substrato perlite as suas raízes estavam completamente desprotegidas (Figura 12b).

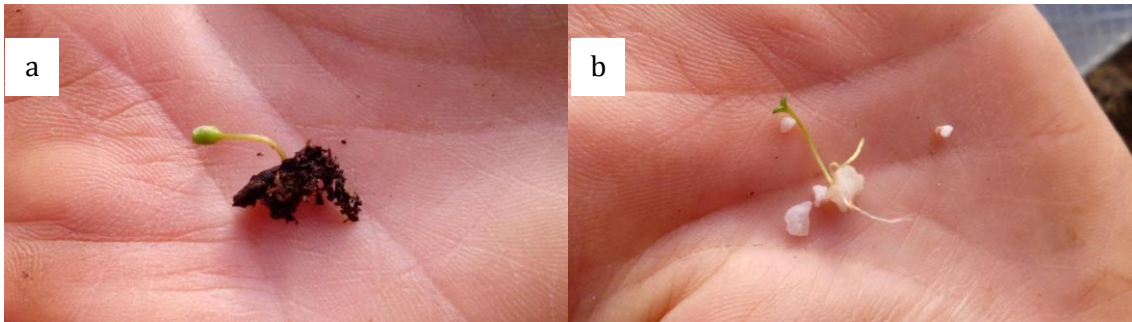


Figura 12: Plântulas provenientes do ensaio de germinação: a) plântula germinada em substrato orgânico, b) plântula germinada em perlite.

O transplante das plantas para os vasos com substrato orgânico ocorreu uma semana após o transplante das plantas para o tabuleiro. Como se observou uma rápida e elevada taxa de mortalidade das plantas provenientes de perlite optou-se por efetuar apenas o transplante de plantas provenientes de substrato orgânico. No segundo ensaio, 13 plantas foram regadas com água doce e 13 regadas com água do mar. O transplante destas plantas seminais teve como principal objetivo avaliar o comportamento das plantas ao tipo de rega. Esta monitorização temporal das plantas foi realizada através de técnicas de espectroscopia ATR-FTIR.

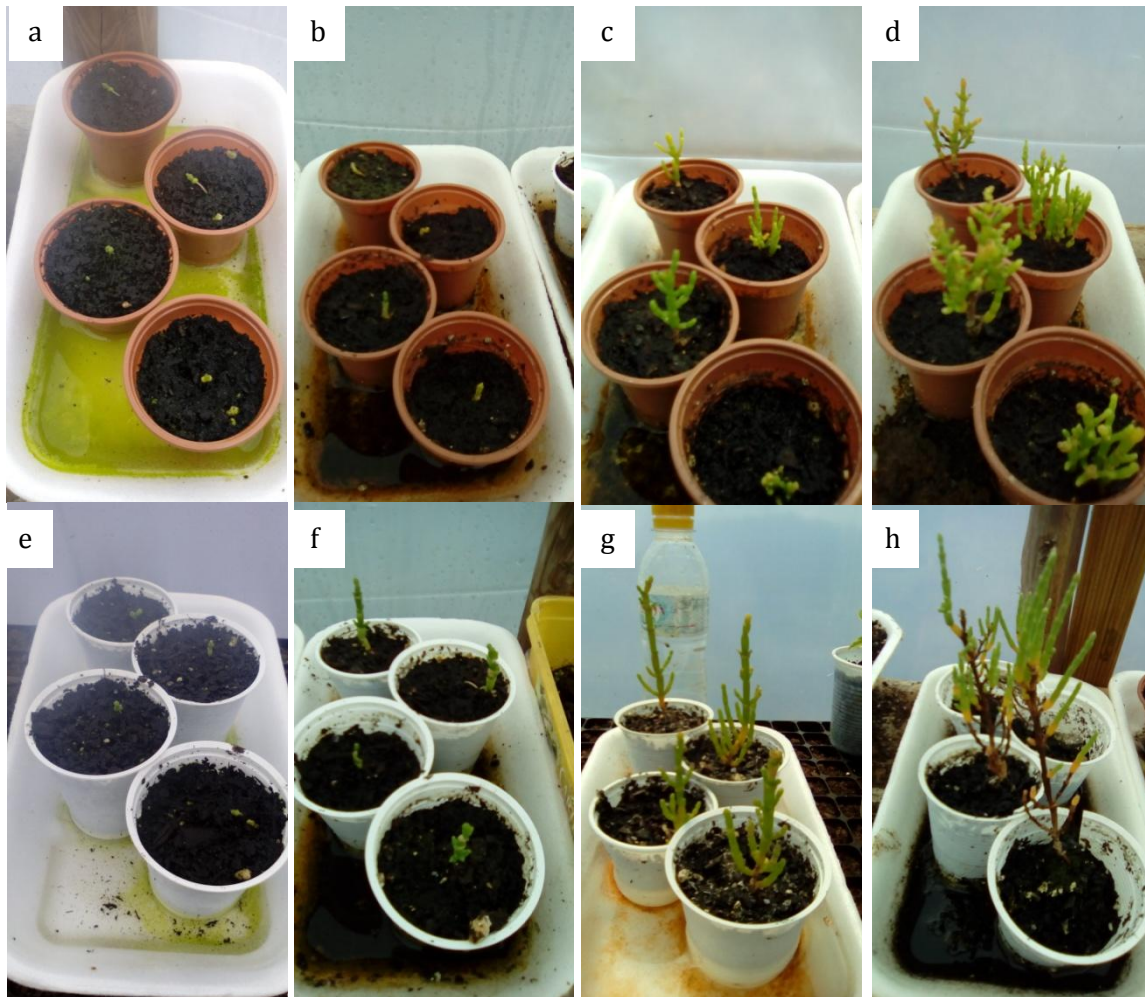


Figura 13: Ensaio de *Salicornia ramosissima* regada com água do mar e água doce desde o estabelecimento até as 21 semanas com intervalos de 7 semanas entre cada avaliação: a), b), c) e d) evolução das plantas regadas com água doce, e), f), g) e h) evolução das plantas regadas com água do mar.

Todas as plantas transplantadas sobreviveram até ao final do ensaio, mas verificaram-se algumas diferenças no seu crescimento. As plantas regadas com água do mar (Figuras 13e, 13f, 13g e 13h) cresceram mais do que as regadas com água doce (Figuras 13^a, 13b, 13c e 13d), como se pode observar na Tabela 7. Apesar das plantas regadas com água doce apresentarem um menor crescimento, verificou-se que estas tiveram uma maior ramificação e os seus entrenós eram mais curtos (Figura 13d).

Tabela 7: Ensaio de *Salicornia ramosissima* realizada em estufa e regada com água do mar e água doce.

<i>Salicornia ramosissima</i>	Altura (cm)					
	Após 7 semanas		Após 14 semanas		Após 21 semanas	
Vasos	Água do mar	Água doce	Água do mar	Água doce	Água do mar	Água doce
1	1,9	1,4	3,8	2,5	5,5	3,5
2	1,4	2	2,6	3,9	4,5	5
3	2,2	2,2	4,4	4,3	6	6
4	2,6	1,9	5,3	3,7	8	5,5
5	2,5	2,7	5,2	5,5	8	8,5
6	2,4	2	5	4	7,5	5,5
7	3,3	1,9	7,2	3,8	10,5	5
8	1,3	2	2,4	3,8	4	5,5
9	2,2	1,2	4,6	2,2	6,5	3
10	2,3	2,3	4,9	4,7	7	7
11	2,6	2,3	5,2	4,6	8	6,5
12	3,2	2,1	7,2	4,7	10	6,5
13	3,9	3,1	8,2	7,1	12,5	10
Média das alturas	2,5	2,1	5,1	4,2	7,5	6,0
Desvio Padrão	0,7	0,5	1,7	1,2	2,4	1,9

No final do ensaio a altura média das plantas regadas com água doce foi de 6,0 cm e a altura máxima foi de 10 cm e as regadas com água do mar a altura média foi de 7,5 cm e a altura máxima foi de 12,5 cm.

O lento crescimento das plantas pode estar relacionado com o facto destas estarem deslocadas do seu habitat natural e estarem dentro de uma estufa com exposição solar durante todo o dia e com temperaturas normalmente elevadas. Após três meses de ensaio, as plantas começaram todas a mudar a coloração para tons mais amarelados.

4.1.3.2 INTERIOR DE CASA

A realização do terceiro ensaio teve como principal objetivo avaliar o crescimento desta planta no interior da casa (cozinha) de modo a analisar o seu potencial de comercialização como planta condimentar viva, plantada em vaso.

Nesta experiência as plantas foram mantidas dentro de casa, (parapeito da janela, voltado a sul e com boa exposição solar), com temperaturas amenas e regadas com água do mar ou com uma solução salina com uma concentração próxima da água do mar (35 g de cloreto de sódio dissolvidos num litro de água).

Todas as plantas sobreviveram até ao final do ensaio em boas condições, como se pode verificar na Figura 14. As plantas apresentaram sempre uma cor verde escura, bons crescimentos e entrenós longos.

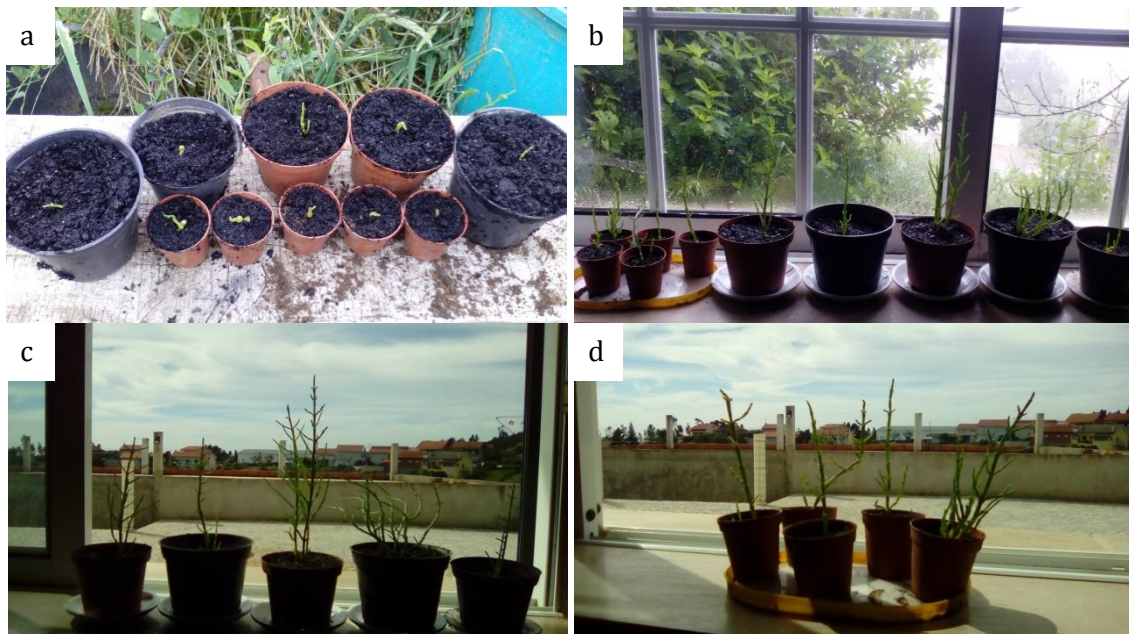


Figura 14: Ensaio de *Salicornia ramosissima* regada com água do mar, evolução das plantas em ambiente doméstico: a) plantas transplantadas, b) 14 semanas após o transplante e c) e d) 21 semanas após o transplante.

Durante o ensaio foram sendo cortados pequenos rebentos dos ramos laterais a algumas plantas de modo a não influenciar os crescimentos em altura da planta e simultaneamente testar o comportamento da planta quando sujeita a cortes (podas) tal como se faz a uma planta condimentar em vaso. Por outro lado,

o tamanho dos vasos de 300 ou 500 mL não pareceu influenciar o desenvolvimento das plantas, já as plantadas em vasos de 60 mL apresentaram menores crescimentos do que as de vasos de maior capacidade.

Como se pode observar na Tabela 8, no final do ensaio as plantas em vasos de 60 mL apresentaram um crescimento médio de 11,4 cm e uma altura máxima de 12,5 cm e as plantas em vasos de maior capacidade (300 e 500 mL) apresentaram um crescimento médio de 15,8 cm e uma altura máxima de 22,5 cm.

Tabela 8: Ensaio de adaptação a condições de ambiente interior de casa e temperaturas domésticas.

<i>Salicornia ramosissima</i>	Altura (cm)					
	Após 7 semanas		Após 14 semanas		Após 21 semanas	
Capacidade vaso (mL)	60	350	60	350	60	350
Vaso 1	3,7	3,7	8,1	8	12,5	12
Vaso 2	3,5	3,9	7,8	8,2	11	13
Vaso 3	3,6	7,1	7,9	14,3	12	22,5
Vaso 4	3,5	5	8	9,9	11,5	15
Vaso 5	3,4	5,3	7,6	10,2	10	16,5
Média das alturas	3,5	5,0	7,9	10,1	11,4	15,8
Desvio Padrão	0,1	1,4	0,2	2,5	1,0	4,1

Comparativamente ao ensaio realizado em estufa, as plantas em ambiente doméstico tiveram um crescimento médio muito superior, apresentando no final do ensaio uma coloração verde escura mais intensa e um aspeto mais jovem.

4.2. ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

4.2.1. SEMENTES

No teste de viabilidade das sementes *in vitro* verificou-se que a grande maioria das sementes germinaram (Figura 15). Este teste serviu também para determinar a taxa de germinação das sementes.



Figura 15: Caixa de Petri com semente de *Salicornia ramosissima* germinadas em meio de cultura MS.

Como se pode verificar na Tabela 9, dos cinco ensaios verificou-se que a taxa média de germinação foi de 91,3 %, sendo que a taxa máxima foi de 96,7 % e a mínima de 86,7 %. Não foi possível encontrar na literatura consultada resultados que demonstrem os valores de taxas de germinações nas condições do ensaio realizado ou para a mesma espécie. No entanto, Lopes, *et al.* (2012), obteve taxas de germinação de 56 %, em testes de germinação da *Salicornia ramosissima*, realizados em papel de filtro e sem tratamento de desinfecção.

Tabela 9: Ensaio de germinação *in vitro*.

Meio de cultura MS					
Nº sementes	30	30	30	30	30
Nº sementes germinadas	28	26	27	29	27
Média das sementes germinadas	27,4				
Taxa de Germinação (%)	93,3	86,7	90,0	96,7	90,0
Desvio Padrão da Média das Sementes germinadas	1,1				
Taxa de Germinação Média (%)	91,3				

A taxa de germinação média superior a 90 % pode dever-se ao facto das sementes serem uniformes e o meio de cultura apresentar uma baixa concentração de sais. De facto, Silva, Caldeira e Freitas (2006) refere que a baixa

concentração de sais no meio de cultura tem uma influência positiva na germinação na generalidade das sementes.

4.2.2. ESTABELECIMENTO DE ÁPICES E SEGMENTOS NODAIS

4.2.2.1. PRIMEIRO ENSAIO

No estabelecimento de ápices e segmentos nodais verificou-se que ao fim de uma semana todos estavam contaminados ou necrosados (Tabela 10). As contaminações e as necroses aconteceram independentemente do meio utilizado sendo a taxa de contaminações mais elevada nos segmentos nodais (65,0 %) e a taxa de necroses foi mais elevada nos ápices (62,5 %).

Tabela 10: Resultados do ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais (Material vegetal proveniente das SMCC).

	Nº de ápices	Nº segmentos nodais
Nº de estabelecimentos	16	20
Contaminações	6	13
Necroses	10	7
Taxa de contaminações (%)	37,5	65,0
Taxa de necroses (%)	62,5	35,0

O facto de todos os segmentos nodais ou ápices terem necrosado ou contaminado pode dever-se ao ensaio ter sido realizado com plantas do campo em época de floração. Tal como foi referido por Bicho, Torres e Cruz (2008), nesta época, as plantas, sobretudo as anuais e bi-anuais, entram em senescência e mobilizam os nutrientes para a produção de flor, fruto e semente. Assim, a utilização dos ápices e segmentos nodais colhidos de plantas nestas condições têm um défice de nutrientes e por conseguinte estão mais debilitados para reagir e crescer no meio de cultura. Deste modo, para a micropropagação vegetal devem utilizar-se preferencialmente tecidos jovens e em crescimento, como fonte dos explantes (CANHOTO, 2010; ANDRADE S. R., 2002).

4.2.2.2. SEGUNDO ENSAIO

No segundo ensaio procedeu-se ao estabelecimento de ápices e segmentos nodais, provenientes de material vegetal colhidas na SMCC e de plantas provenientes do ensaio de germinação *ex vitro* em substrato orgânico e mantidas em estufa sendo regadas com água doce. Os resultados do ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais em meio de cultura MS e Knop, de plantas provenientes da SMCC encontra-se descrito na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados do ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais em meio de cultura MS e Knop, de plantas provenientes das SMCC.

	MS		Knop	
	Nº ápices	Nº seg. nodais	Nº ápices	Nº seg. nodais
Nº de estabelecimentos	8	10	8	10
Contaminações	7	10	8	9
Taxa de sobrevivência (%)	12,5	0	0	10

Como se pode verificar na Tabela 11, no estabelecimento do material vegetal colhido nas SMCC obteve-se uma taxa de sobrevivência de 12,5 % para os ápices em meio de cultura MS e 10 % para os segmentos nodais em meio de cultura Knop. Estas baixas taxas de sobrevivência podem dever-se ao facto das plantas do género *Salicornia* armazenarem sal nas suas células e por conseguinte promover uma maior desidratação do material vegetal. Segundo Canhoto (2010) outro fator que pode condicionar o estabelecimento por micropropagação é a desinfeção do material vegetal. Esta operação representa uma etapa crítica para a sobrevivência dos explantes, pois se a exposição ao tratamento de desinfeção for demasiado prolongada o explante necrosa e se for demasiado curta o explante contamina.

No estabelecimento do material vegetal proveniente do ensaio de germinação *ex vitro* em substrato orgânico (Tabela 12), as taxas de estabelecimento em meio Knop foram 25 % e 0 %, respetivamente, para os ápices e os segmentos nodais.

Para o meio de cultura MS obtiveram-se taxas de estabelecimento de 12,5 % para os ápices e 10 % para os segmentos nodais.

Tabela 12: Resultados do segundo ensaio de estabelecimento de ápices e segmentos nodais em meio de cultura MS e Knop, de plantas provenientes do ensaio de germinação *ex vitro*.

	MS		Knop	
	Nº ápices	Nº seg. nodais	Nº ápices	Nº seg. nodais
Nº de estabelecimentos	8	10	8	10
Contaminações	7	9	6	10
Taxa de sobrevivência (%)	12,5	10	25	0

Para ambos os estabelecimentos observou-se uma maior taxa de sobrevivência nos ensaios em que se utilizou material vegetal do ensaio de germinação do que no que se utilizou material vegetal proveniente da SMCC.

Este resultado pode ser devido ao facto das plantas do ensaio de germinação terem sido regadas exclusivamente com água doce e por serem plantas mais jovens do que as colhidas nas SMCC. O meio de cultura não parece influenciar, de um modo significativo, a sobrevivência dos explantes estabelecidos.

Embora não se tenha obtido taxas de estabelecimento muito altas, conseguiu-se estabelecer com sucesso ápices e segmentos nodais provenientes de ambos os locais. Esta é uma etapa determinante para a manutenção desta planta *in vitro* pois embora exista sempre o risco de necroses e contaminações, a repicagem é sempre um processo mais simples do que o estabelecimento.

4.2.3. REPICAGEM E MULTIPLICAÇÃO

Depois do estabelecimento do material vegetal proveniente das SMCC e do material vegetal proveniente do ensaio de germinação, os explantes sobreviventes estarão, em princípio, livres de fungos e bactérias (Figura 16). Assim, o processo de repicagem serve, sobretudo, para renovar o meio de cultura que vai ficando empobrecido em nutrientes e reduzir a presença de compostos fenólicos. Como referido por Canhoto (2010), os explantes contêm células em grande crescimento

activo, concentram grandes quantidades de fenóis e estes, quando oxidados pelo ar, para além de darem uma cor acastanhada ao explante e ao meio de cultura podem também levar à necrose dos tecidos.

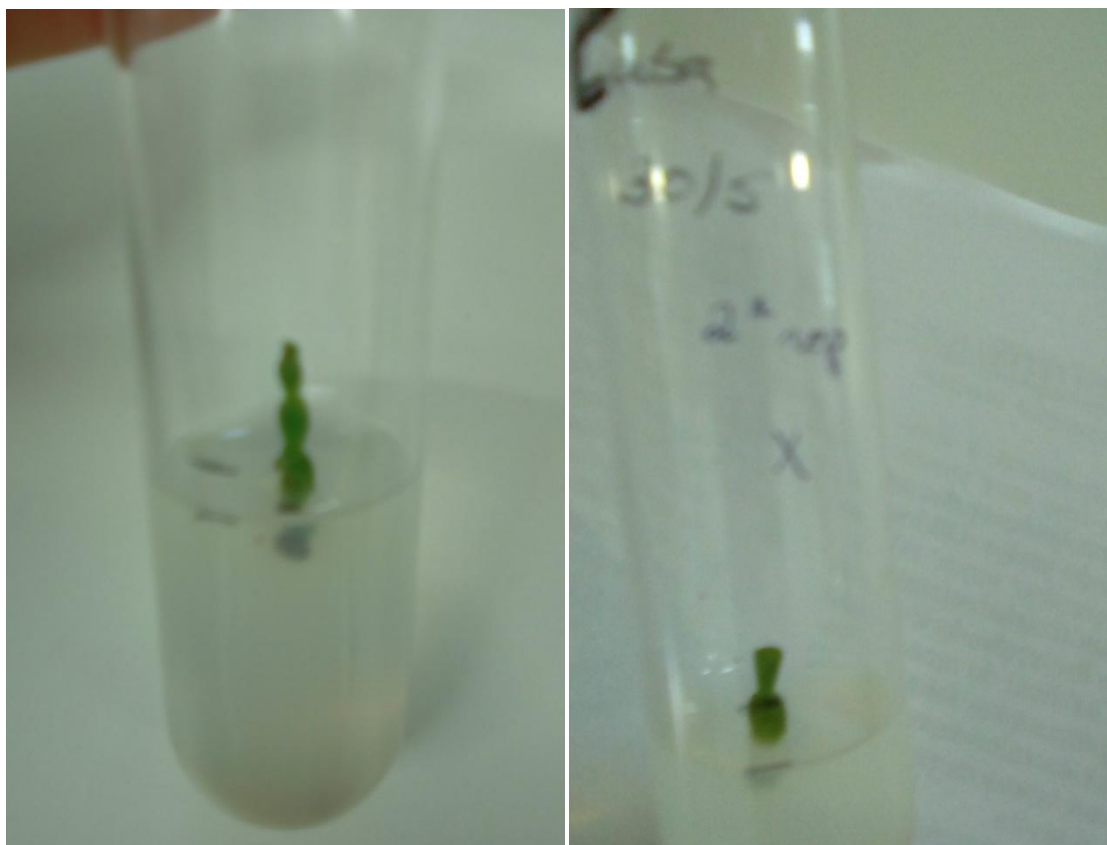


Figura 16: *Salicornia ramosissima* antes e após a repicagem e multiplicação.

A multiplicação dos explantes foi realizada com o objetivo de averiguar a possibilidade de manutenção da salicórnia *in vitro*. Segundo White *et al.* (2010), devido aos elevados custos envolvidos nesta técnica a sua aplicação é mais indicada para plantas seleccionadas e de grande valor económico. No entanto, num futuro próximo, a salicórnia pode ser candidata a programas de seleção e melhoramento genético pelo que é importante perceber qual a facilidade de manutenção *in vitro*.

Tabela 13: Ensaio de multiplicação da *Salicornia ramosissima*.

	Explantos das SMCC	Explantos do Ensaio de Germinação
Nº de Explantes Sobreviventes	2	4
1ª repicagem	2	7
Taxa de Multiplicação 1ª Repicagem	1	1,8
2ª repicagem	1	9
Taxa de Multiplicação 2ª Repicagem	0,5	1,3

Tal como se pode verificar na Tabela 13 foi possível aumentar, globalmente, o número de explantes na primeira e segunda repicagem. Obtiveram-se melhores resultados nos explantes provenientes dos ensaios de germinação, tal como anteriormente referido no ensaio de estabelecimento. Esta observação pode dever-se ao facto dos explantes dos ensaios de germinação terem sido regados com água doce, enquanto os explantes resultantes do material vegetal recolhido nas SMCC conterem sal armazenado nas suas células e, por conseguinte, condicionar a sua multiplicação.

4.3. TÉCNICAS ESPETROSCÓPICAS

Os espectros de FT-Raman contém informações idênticas às de um espectro de absorção no infravermelho (FTIR), apesar da natureza dos fenómenos físicos ser diferente, difusão da luz no caso da espectroscopia FT-Raman e de absorção da luz no caso do FTIR. Como se pode observar na Tabela 14, ambas as técnicas identificam os mesmos grupos funcionais (vibrações) nos mesmos comprimentos de onda, mas as suas intensidades é que poderão ser diferentes (ALLEN, 2013; HORIBA, 2004).

Tabela 14: Comparação Raman vs IR, por grupos funcionais (vibrações) e regiões (HORIBA, 2004).

Functional Group/ Vibration	Region	Raman	InfraRed
Lattice vibrations in crystals, LA modes	10 - 200 cm^{-1}	strong	strong
$\delta(\text{CC})$ aliphatic chains	250 - 400 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{Se-Se})$	290 - 330 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{S-S})$	430 - 550 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{Si-O-Si})$	450 - 550 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{Xmetal-O})$	150-450 cm^{-1}	strong	med-weak
$\nu(\text{C-I})$	480 - 660 cm^{-1}	strong	strong
$\nu(\text{C-Br})$	500 - 700 cm^{-1}	strong	strong
$\nu(\text{C-Cl})$	550 - 800 cm^{-1}	strong	strong
$\nu(\text{C-S})$ aliphatic	630 - 790 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{C-S})$ aromatic	1080 - 1100 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{O-O})$	845 - 900 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C-O-C})$	800 - 970 cm^{-1}	medium	weak
$\nu(\text{CC})$ alicyclic, aliphatic chain vibrations	600 - 1300 cm^{-1}	medium	Medium
$\nu(\text{C=S})$	1000 - 1250 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{CC})$ aromatic ring chain vibrations	*1580, 1600 cm^{-1}	strong	medium
	*1450, 1500 cm^{-1}	medium	medium
	*1000 cm^{-1}	strong/medium	weak
$\delta(\text{CH}_3)$	1380 cm^{-1}	medium	strong
$\delta(\text{CH}_2)$			
$\delta(\text{CH}_3)$ asym	1400 - 1470 cm^{-1}	medium	medium
$\delta(\text{CH}_2)$			
$\delta(\text{CH}_3)$ asym	1400 - 1470 cm^{-1}	medium	medium
$\nu(\text{C-(NO}_2))$	1340 - 1380 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{C-(NO}_2))$ asym	1530 - 1590 cm^{-1}	medium	strong
$\nu(\text{N=N})$ aromatic	1410 - 1440 cm^{-1}	medium	-
$\nu(\text{N=N})$ aliphatic	1550 - 1580 cm^{-1}	medium	-
$\delta(\text{H}_2\text{O})$	~1640 cm^{-1}	weak broad	strong
$\nu(\text{C=N})$	1610 - 1680 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{C=C})$	1500 - 1900 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C=O})$	1680 - 1820 cm^{-1}	medium	strong
$\nu(\text{C}\equiv\text{C})$	2100 - 2250 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$	2220 - 2255 cm^{-1}	medium	strong
$\nu(\text{-S-H})$	2550 - 2600 cm^{-1}	strong	weak
$\nu(\text{C-H})$	2800 - 3000 cm^{-1}	strong	strong
$\nu(=\text{C-H})$	3000 - 3100 cm^{-1}	strong	medium
$\nu(\text{a}(\text{C-H}))$	3300 cm^{-1}	weak	strong
$\nu(\text{N-H})$	3300 - 3500 cm^{-1}	medium	medium
$\nu(\text{O-H})$	3100 - 3650 cm^{-1}	weak	strong

4.3.1. ESPETROSCOPIA ATR-FTIR E FT-RAMAN

4.3.1.1. ATR-FTIR DE SALICORNIA SUBMETIDA A DIFERENTES TIPOS DE REGA E SALICORNIA RECOLHIDA NAS SALINAS

Os espectros ATR-FTIR ilustrados da Figura 18 foram obtidos na região espectral de 500 a 4000 cm^{-1} e dizem respeito a amostras de salicórnica fresca

recolhida na salina (Figura 18d), a amostras de salicórnica fresca submetidas a diferentes tipos de rega (Figura 18a, 18b e 18c).

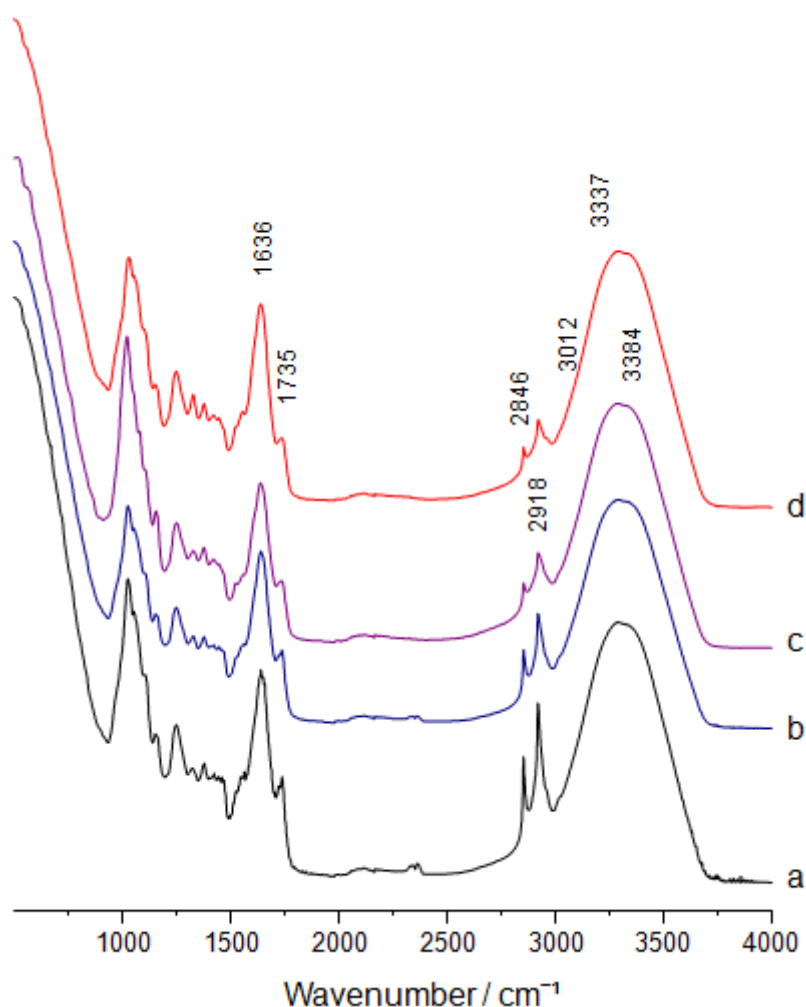


Figura 177: Espectros ATR-FTIR (500 a 4000 cm⁻¹) de *Salicornia ramosissima* de: a) ensaio de germinação regada com água doce, b) ensaio de germinação regada com água do mar durante 1 semana, c) ensaio de germinação regada com água do mar durante dois meses e d) recolhida na salina.

Embora a análise de todo o espectro seja importante, até para identificar a “impressão digital” da *Salicornia ramosissima*, assim como de todos os compostos presentes nesta planta, o objetivo deste estudo é, sobretudo, perceber a interação da água com a acumulação do sal nas células da planta. Assim de acordo com a bibliografia, parecem existir duas regiões (1500 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹ e 2700 cm⁻¹ a 3700 cm⁻¹) que se destacam pela importância dos grupos funcionais que evidenciam, e sobretudo pela presença da água ou das interações desta com outros compostos (sobretudo entre a água e os grupos OH). As Figuras 19 e 20 ilustram, respetivamente a região, 1500 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹ e 2700 cm⁻¹ a 3700 cm⁻¹.

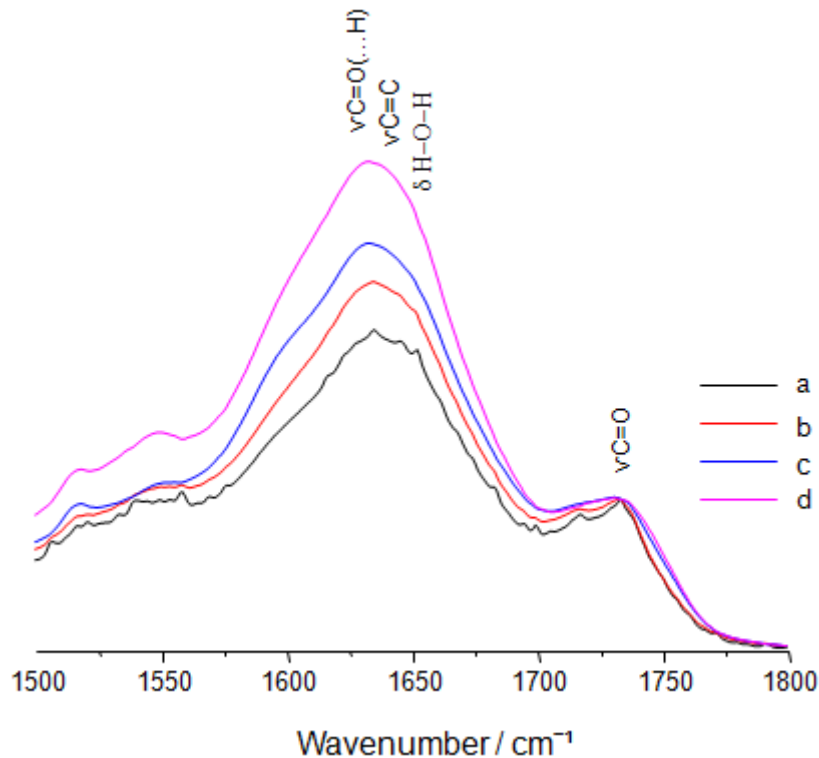


Figura 188: Espectros ATR-FTIR (1500 a 1800 cm⁻¹) de *Salicornia ramosissima* de: a) ensaio de germinação regada com água doce, b) ensaio de germinação regada com água do mar durante 1 semana, c) ensaio de germinação regada com água do mar durante dois meses, d) recolhida na salina.

Como se pode observar na Figura 19 as bandas são relativamente largas e com um máximo de absorvência a 1636 cm⁻¹ e 1735 cm⁻¹. Esta é uma característica espectral atribuída ao modo de alongação C=O (νC=O), característico de ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos, ao modo de deformação H–O–H (δH₂O), muito relacionada com a presença de água, e ao modo de alongação C=C (νC=C), característico de compostos aromáticos (HORIBA, 2004; ALLEN, 2013; DUBIS, DUBIS, & MORZYCKI, 1999).

Assumindo que as diferentes amostras de *Salicornia ramosissima* analisadas não apresentam diferenças no que respeita ao teor de compostos contendo o grupo carbonilo (*i.e.*, assumindo que a intensidade da banda associada à νC=O se mantém) no máximo da absorvência 1735 cm⁻¹ pode ser indicativo do aumento dos compostos aromáticos e ácidos gordos insaturados, mas é devida principalmente ao contributo da δ H₂O que se situa no máximo de absorvência 1636 cm⁻¹ e acaba por mascarar as outras bandas menos intensas. Comparando os espectros a), b), c), e d) da Figura 19, verifica-se um aparente aumento da intensidade da banda da água. Este aumento pode estar relacionado com os

“carregadores de água” que ajudam a planta a compensar o armazenamento de sal nas células e tornam os entrenós da *Salicornia ramosissima* cada vez maiores à medida que aumenta a concentração de sal.

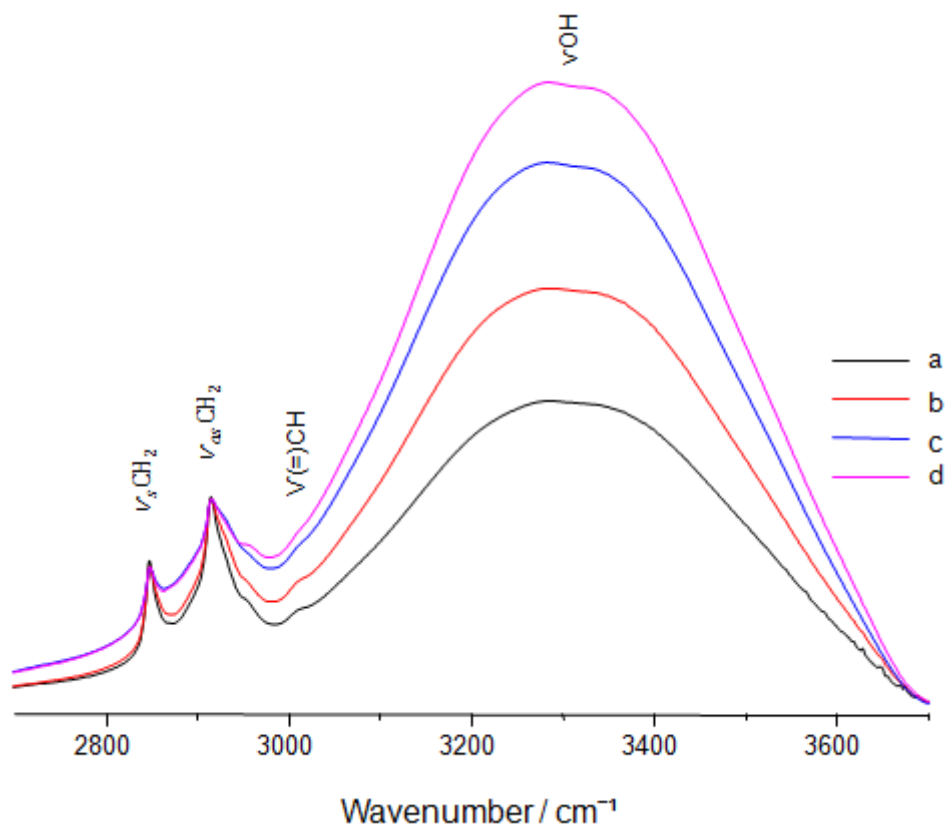


Figura 199: Espectros ATR-FTIR (2700 a 3700 cm^{-1}) de *Salicornia ramosissima* de: a) ensaio de germinação regada com água doce, b) ensaio de germinação regada com água do mar durante 1 semana, c) ensaio de germinação regada com água do mar durante dois meses, d) recolhida na salina.

Na Figura 20 observam-se bandas relativamente largas com um máximo de absorvência a 2846 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} , 3012 cm^{-1} , 3337 cm^{-1} e 3384 cm^{-1} .

Os máximos de absorção espectrais a 2846 cm^{-1} e 2918 cm^{-1} poderão ser atribuídos às elongações simétrica e antissimétrica dos osciladores CH_2 ($\nu_s \text{CH}_2$ e $\nu_{as} \text{CH}_2$, respetivamente), correspondendo aos ácidos gordos presentes nas plantas.

O máximo de absorção espectral a 3012 cm^{-1} pode ser atribuído às elongações C–H de grupos alcenos ($\nu=\text{CH}$) e indicativo da presença de ácidos gordos insaturados.

Os máximos de absorção espectrais a 3337 cm^{-1} e 3384 cm^{-1} podem ser atribuídos ao νOH , que denota a presença de interações de moléculas de água com os hidratos de carbono ou compostos fenólicos, sendo frequentemente denominadas como água que não se encontra livre (disponível) pelas interações moleculares que estabelecem os grupos OH com as moléculas de água (HORIBA, 2004; ALLEN, 2013; DUBIS, DUBIS, & MORZYCKI, 1999).

Assumindo que as diferentes amostras de *Salicornia ramosissima* analisadas não apresentam diferenças no que respeita ao teor de compostos contendo o grupo $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ (*i.e.*, assumindo que a intensidade da banda associada à $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ se mantém) nos máximos da absorvência a 2918 cm^{-1} pode ser indicativo do aumento da água nas plantas. Comparando os espectros a) b) c) e d) da Figura 20, verifica-se um aparente aumento da intensidade das bandas relacionadas com a água associada aos hidratos de carbono e compostos fenólicos. Esta intensidade vai aumentando à medida que aumenta o tempo de rega com água contendo sal e é ainda mais intensa nas plantas recolhidas nas salinas.

4.3.1.2. ATR-FTIR DE SALICORNIA FRESCA E LIOFILIZADA

Na Figura 21 são ilustrados os espectros ATR-FTIR na região espectral de 500 a 4000 cm^{-1} e correspondem a amostras de salicornia recolhida na salina, fresca (Figura 21a) e liofilizada (Figura 21 b).

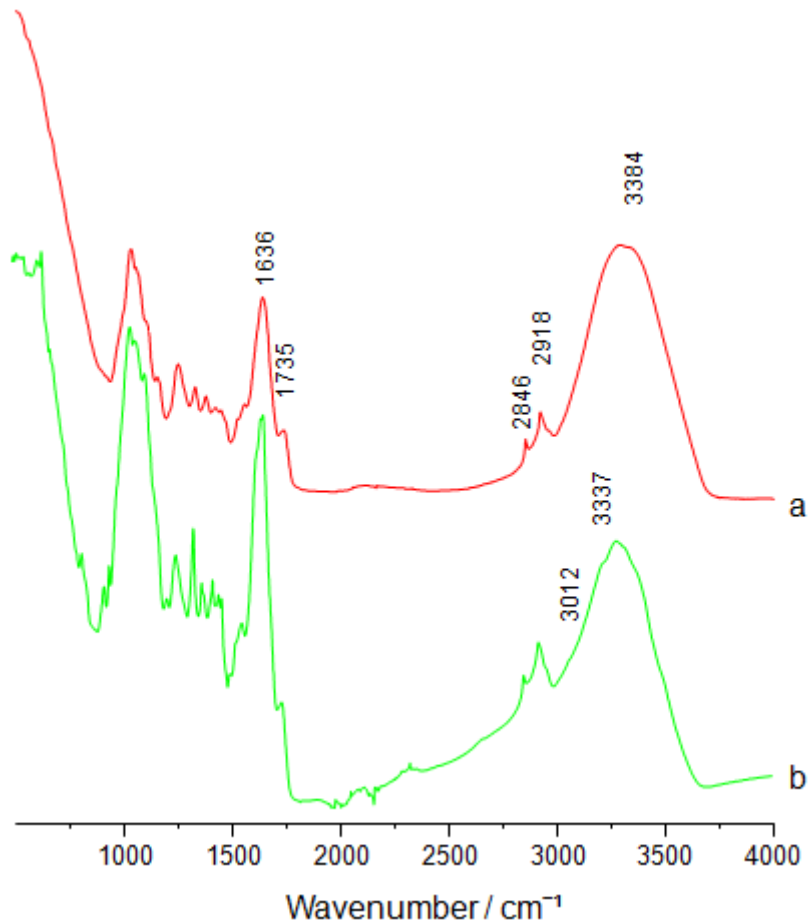


Figura 200: Espectros ATR-FTIR (500 a 4000 cm^{-1}) de *Salicornia ramosissima* recolhida na salina: a) fresca e b) liofilizada.

Através da análise detalhada da banda espectral de 1636 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} (Figura 22) observam-se bandas relativamente largas com um máximo de absorvência a 1636 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} . Esta é uma característica espectral que denota a presença de ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos, compostos aromáticos e de água (HORIBA, 2004; ALLEN, 2013; DUBIS, DUBIS, & MORZYCKI, 1999).

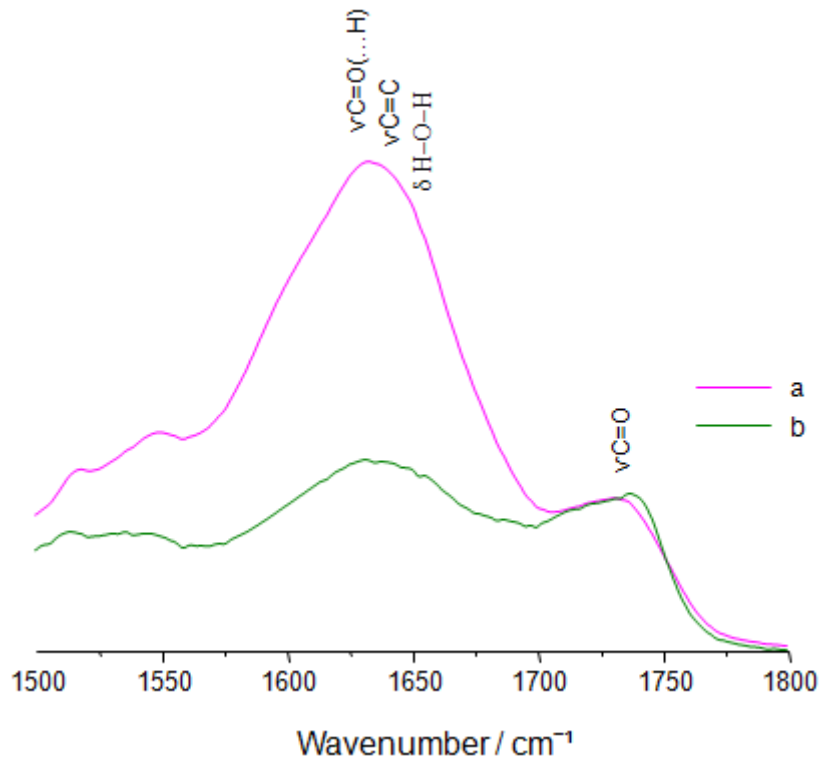


Figura 211: Espetros ATR-FTIR (1500 a 1800 cm^{-1}) de *Salicornia ramosissima* recolhida na salina: a) fresca e b) liofilizada.

Assumindo que a intensidade da banda associada à $\nu\text{C}=\text{O}$ se mantém no máximo da absorvência 1735 cm^{-1} verifica-se que a principal diferença entre os espetros a) e b) da Figura 22 encontra-se na banda associada à água livre. Enquanto no espetro de salicornia fresca Figura 22a a banda associada à água livre é mais intensa e acaba por mascarar as outras bandas, no espetro de salicórnia liofiizada Figura 22b, o teor de água é muito reduzido devido ao processo de liofilização. Deste modo, banda existente será associada aos restantes compostos acima mencionados.

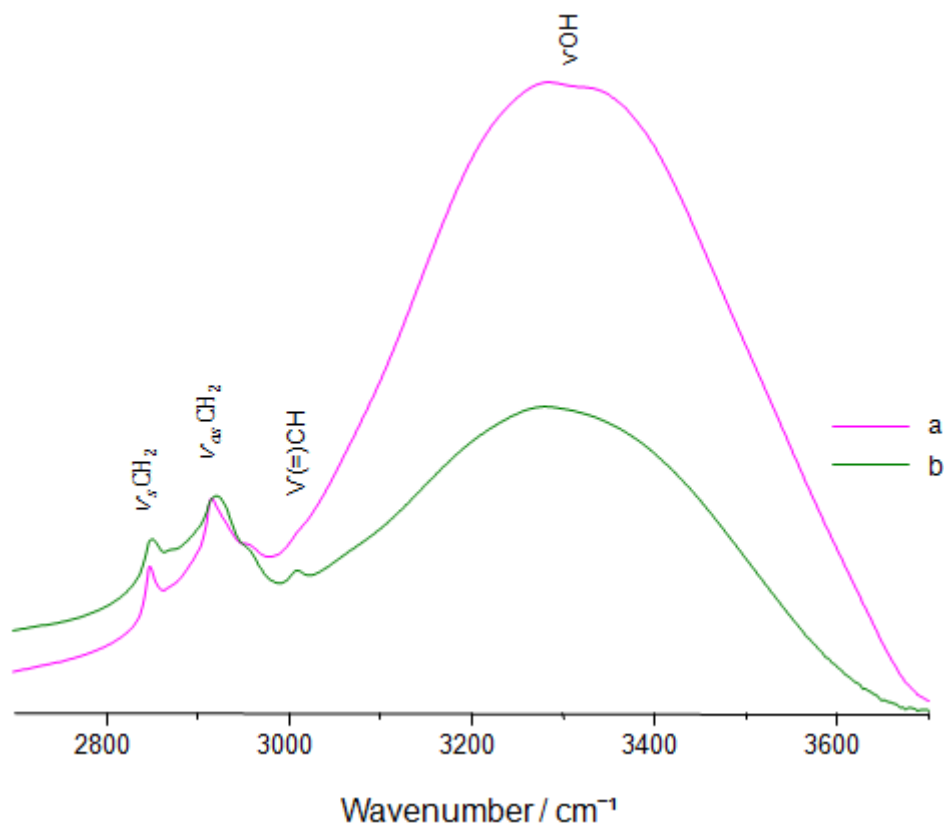


Figura 222: Espectros ATR-FTIR (2700 a 3700 cm^{-1}) de *Salicornia ramosissima* recolhida na salina: a) fresca e b) liofilizada.

Na Figura 23 observam-se bandas relativamente largas com um máximo de absorvência a 2846 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} , 3012 cm^{-1} , 3337 cm^{-1} e 3384 cm^{-1} .

Os máximos de absorção espectrais a 2846 cm^{-1} e 2918 cm^{-1} podem ser indicativos da presença de ácidos gordos nas plantas. Já o máximo de absorção espectral a 3012 cm^{-1} será indicativo da presença de ácidos gordos insaturados.

Os máximos de absorção espectrais a 3337 cm^{-1} e 3384 cm^{-1} denotam a presença de interações de moléculas de água com os hidratos de carbono ou compostos fenólicos (HORIBA, 2004; ALLEN, 2013; DUBIS, DUBIS, & MORZYCKI, 1999).

Assumindo que a intensidade da banda associada à $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ se mantém no máximo da absorvência a 2918 cm^{-1} observa-se uma maior presença de moléculas de água associada aos hidratos de carbono e compostos fenólicos no espectro de salicórnia fresca, Figura 23a.

Na Figura 23b a intensidade da banda relacionada com a água associada aos hidratos de carbono e compostos fenólicos é significativamente menor do que na Figura 23a. Em ambos os casos, esta banda é devida essencialmente ao contributo dos compostos anteriormente mencionados. No entanto, como a água associada a estes compostos é muito difícil de remover, é provável que a salicórnia liofilizada ainda apresente algum teor de água na sua constituição.

4.3.1.3. FT-RAMAN DE SALICORNIA DA SALINA LIOFILIZADA

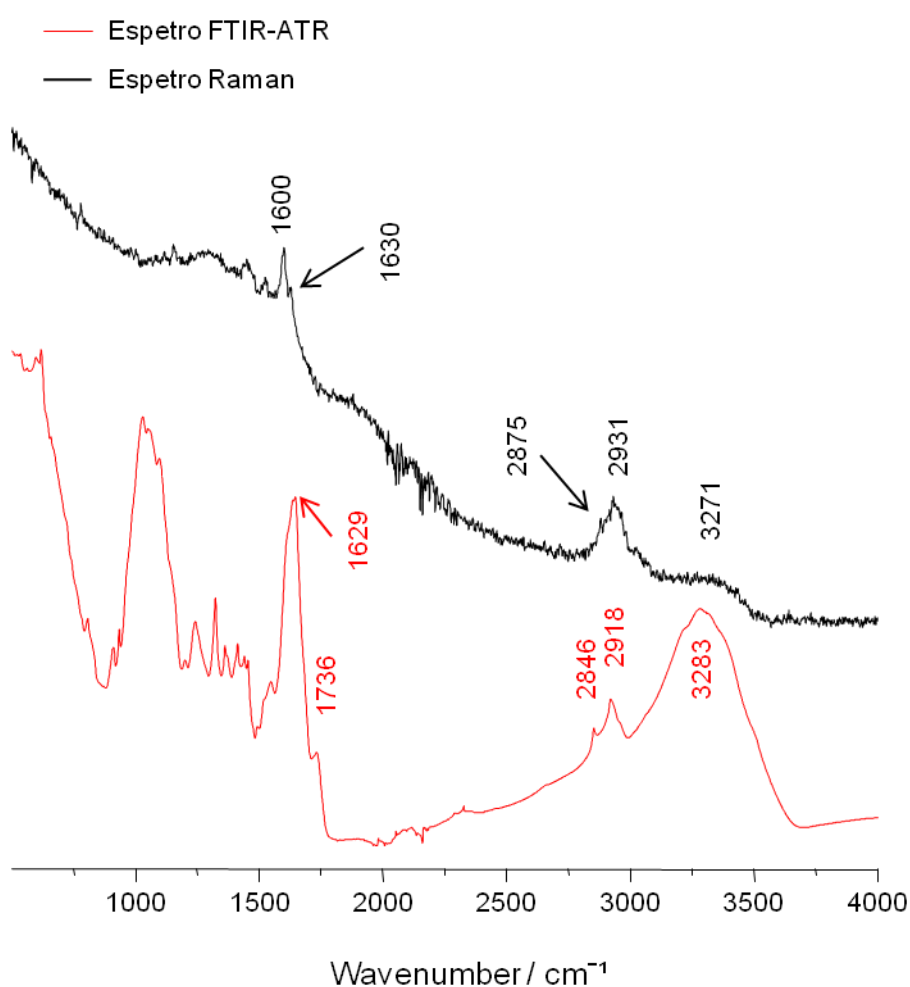


Figura 233 : Comparação entre espectros ART-FTIR (a vermelho) e FT-Raman (preto), da *Salicornia ramosissima* liofilizada, na região espectral de 500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

Como se pode observar na Figura 24 verificam-se bandas relativamente largas com um máximo de absorvência a 1629 cm^{-1} no ATR-FTIR e dois picos a 1600 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} no espectro FT-Raman evidenciando a existência $\nu\text{C=O}$ e a

$\nu\text{C}=\text{C}$ atribuídos à existência de compostos como os ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas e compostos aromáticos, no espectro ATR-FTIR.

É também evidente uma banda com o máximo de absorvência a 1736 cm^{-1} denotando a existência de $\nu\text{C}=\text{O}$, mas aparentemente inexistente no espectro FT-Raman. Como as análises espectroscópicas foram realizadas à *Salicornia ramosissima* liofilizada, não se denota a existência de água, o que realça a presença de outros compostos que na *Salicornia ramosissima* fresca não eram tão evidentes (HORIBA, 2004; ALLEN, 2013; DUBIS, DUBIS, & MORZYCKI, 1999).

Os máximos de absorção no ATR-FTIR que ocorrem a 2846 cm^{-1} e 2918 cm^{-1} e aos picos 2875 cm^{-1} e 2931 cm^{-1} no espectro FT-Raman poderão ser atribuídos à $\nu\text{s CH}_2$ e à $\nu\text{as CH}_2$ dos ácidos gordos constituintes das plantas, tal como se verificou na análise à *Salicornia ramosissima* com os diferentes tipos de rega. Na salicórnia liofilizada a banda $\nu=\text{CH}$ não é visível, sugerindo que os ácidos gordos insaturados desaparecem durante o processo de liofilização.

O máximo de absorção a 3283 cm^{-1} no ATR-FTIR e o pico 3271 cm^{-1} no espectro de FT-Raman podem ser atribuídos ao νOH , dos hidratos de carbono e compostos fenólicos (HORIBA, 2004; ALLEN, 2013; DUBIS, DUBIS, & MORZYCKI, 1999).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho estudou-se a possibilidade de valorização da *Salicornia ramosissima*, nomeadamente através de micro e macro propagação, a sua manutenção *in vivo*, e a rega com água doce e água do mar, que são fatores determinantes na sua comercialização. Foi ainda acompanhada a evolução das plantas propagadas com diferentes tipos de rega, através das técnicas espectroscópicas ATR-FTIR e FT-Raman.

O estabelecimento *ex vitro* de plantas adultas recolhidas nas salinas não apresentou viabilidade, uma vez que as plantas rapidamente morreram. Este facto terá ocorrido pelo stress imposto pela mudança de habitat, ou pelo estado adulto das plantas. Como são plantas perenes, o transplante para vasos poderá ter acelerado o processo de senescência associado à morte celular.

No ensaio *ex vitro* de germinação de sementes obtiveram-se boas taxas de germinação tanto na perlite (82,2 %) como no substrato orgânico (88,9 %). Considerando a germinação e o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas, o substrato orgânico demonstrou ser o mais adequado, pois mesmo para o transplante das plântulas as provenientes do substrato orgânico apresentavam uma melhor aglomeração de substrato (torrão) a envolver a raiz.

No ensaio de transplante das plantas seminais verificou-se que quando estas foram transplantadas para tabuleiro de pequenos alvéolos não sobreviveram, independentemente de serem provenientes de perlite ou substrato orgânico. No entanto, estas adaptaram-se bem a contentores de diferentes tamanhos acima de 60 mL de capacidade, não se tendo registado nenhuma morte até ao final dos ensaios. Nas plantas para acompanhamento da sua evolução por ATR-FTIR, verificou-se que as regadas com água do mar apresentavam entrenós mais longos. Todas as plantas começaram a mudar de coloração, ao mesmo tempo, para tons mais amarelados após três meses do início do ensaio. Esta mudança pode ter sido acelerada pela temperatura elevada e baixa humidade no interior da estufa e com rega apenas uma vez por dia. No ensaio de adaptação das plantas a um ambiente doméstico, estas sobreviveram até ao final do ensaio apresentando um bom desenvolvimento e coloração verde escura. O rápido crescimento de algumas plantas permitiu inclusive, a sua “poda” e a manutenção do seu

crescimento, o que demonstra a boa adaptação a um ambiente doméstico e pode potencializar a sua comercialização em vaso, como planta condimentar.

O ensaio de germinação de sementes *in vitro* permitiu: (i) verificar a viabilidade, sendo comprovado através das sementes germinadas (137 germinadas em 150 sementes estabelecidas); e (ii) determinar a sua taxa de germinação (91,3 %).

No estabelecimento *in vitro* de ápices e segmentos nodais foram realizados dois ensaios: no primeiro, realizado com plantas adultas recolhidas no campo, todos os ápices e segmentos nodais contaminaram ou necrosaram. No segundo ensaio, realizado com material vegetal de plantas seminais jovens e plantas jovens recolhidas no campo, foi possível o estabelecimento de ápices e segmentos nodais e a sua posterior multiplicação. Verificou-se, no entanto, melhores resultados com as plantas provenientes do ensaio de germinação e apenas regadas com água doce, o que comprova a influência negativa do sal no estabelecimento de plantas, mesmo nas plantas bem adaptadas a condições de salinidade elevada.

As análises espectroscópicas ATR-FTIR de acompanhamento das plantas regadas com água doce e água do mar e as análises ATR-FTIR e FT-Raman à *Salicornia ramosissima* liofilizada evidenciaram a elevada capacidade de armazenamento de água nas suas células, sobretudo para compensar a acumulação de sais. Esta capacidade de acumulação estará relacionada com os carregadores iónicos que protegem as células contra a desidratação. Detetou-se ainda, a presença de outros compostos, tais como hidratos de carbono, esterés, compostos fenólicos e ácidos gordos, entre outros.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

As alterações climáticas e o rápido aumento da população mundial aumentam a necessidade de procura por novos solos. As plantas halófitas entre as quais a *Salicornia ramosissima*, podem proporcionar o cultivo em áreas agora incultas, sendo, para isso, necessário a domesticação destas plantas e o desenvolvimento da agricultura em água salgada.

Será também necessária a seleção e o melhoramento genético da *Salicornia ramosissima* de modo a aumentar a sua produção bem como melhorar as suas características.

São ainda essenciais novos estudos e ensaios que permitam melhorar o estabelecimento e multiplicação *in vitro*, assim como determinar qual a melhor concentração de nutrientes para tornar o meio de cultura mais adequado a esta planta.

Além disso, são indispensáveis novos ensaios de adaptação desta planta a ambiente doméstico e determinar qual a concentração ótima de cloreto de sódio na cultura caseira da salicornia para a sua utilização como planta condimentar.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALLAN, P. (1981). PLANT PROPAGATION THROUGH TISSUE CULTURE. South African Avocado Growers' Association Yearbook 1981. 4:22-26.
- ALLEN. (17 de 01 de 2013). *Department os Chemistry*. Obtido em 06 de 07 de 2018, de University of Wisconsin-Madison: <https://www.chem.wisc.edu/deptfiles/OrgLab/handouts/Simplified%20IR%20Correlation%20Chart.pdf>
- ALMARGEM. (2018). *Salicornia ramosissima (J.Woods)*. Obtido em 30 de 05 de 2018, de <http://almargem.org/biodiv/especie/salicornia-ramosissima/>
- ALVES, C. F. (2013). *Melhoramento genético vegetal*. EBAH, disponível em: <http://www.ebah.pt/content/ABAAAwG4AC/melhoramento-genetico-vegetal?part=2>.
- ANDRADE, M. W., LUZ, J. M., LACERDA, A. S., & MELO, P. R. (2000). MICROPROPAGAÇÃO DA AROEIRA (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). Lavras: Ciênc. agrotec., Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan./mar., 2000. Obtido de Ciênc. agrotec., Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan./mar.,.
- ANDRADE, S. R. (2002). *Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais*. Obtido em 06 de 06 de 2018, de Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais, Embrapa, Documentos 58: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/546466/1/doc58.pdf>
- ARAUJO, P. V., CARAPETO, A., NEIVA, J., SCHWARZER, U., LOPES, L., FARIA, R., . . . al., e. (2018). *Salicornia ramosissima J.Woods - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica*. Obtido em 04 de 08 de 2018, de <http://www.flora-on.pt/#wid1026>.
- BARROCA, M., GUINÉ, R., RESSUREIÇÃO, S., SILVA, A., MARQUES, M., & BATISTA DE CARVALHO, L. (Novembro de 2017). Secagem da planta 'Sarcocornia perennis': cinética e impacto nas propriedades físicas e nutricionais. Elvas, Portugal: Livro de resumos do II Congresso das Escolas Superiores Agrárias, pp. 329-330.

BESPALHOK, GUERRA, & OLIVEIRA. (2006). *DOMESTICAÇÃO DAS PLANTAS CULTIVADAS 2*.

Obtido em 30 de 05 de 2018, de <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%202.pdf>

BICHO, J., TORRES, N., & CRUZ, S. (07 de 2008). *Plantas Anuais e Bienais*. Obtido em 06 de

06 de 2018, de *Plantas Anuais e Bienais*: <https://pt.scribd.com/document/13794232/Plantas-Anuais-Bienais>

BRAUN-BLANQUET, J. (1979). *Fitosociologia. Base para el estudio de las comunidades vegetales*. Madrid: H. Blum.

BROWN, T. A., JONES, M. K., POWELL, W., & ALLABY, R. G. (2008). The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends in Ecology and Evolution Vol. 24 No.2*. Elsevier, Cel Press.

CABRAL, G. B., PIRES, M. V., LACERDA, A. L., & CARNEIRO, V. T. (2003). *Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de Brachiaria sp*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CAMPBELL, N. A., REECE, J. B., URRY, L. A., CAIN, M. L., WASSERMAN, S. A., MINORSKY, P. V., & JACKSON, R. B. (2008). *Biology*. USA: Pearson International Edition.

CANHOTO, J. M. (2010). *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Obtido em 27 de 05 de 2018, de Google Livros: https://books.google.pt/books?id=WRnwnvqkiu8C&pg=PA33&lpg=PA33&dq=Bio+google+doc+tecnologia+Vegetal+da+Clonagem+de+Plantas+%C3%A0+Transforma%C3%A7%C3%A3o+Gen%C3%A9tica&source=bl&ots=OTCUD46mMr&sig=DqqAzaQYb4XHU4HS_1vShHbxccI&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwi0yuD0

CASTROVIEJO, S., LAÍNIZ, M., LÓPEZ GONZÁLEZ, G., MONTSERRAT, P., MUÑOZ GARMENDIA, F., PAIVA, J., & VILLAR, L. (31 de 01 de 1990). *Flora Iberica; Plantas Vasculares de la Peninsula Iberica e Islas Baleares*. Madrid: INSTITUTO BIBLIOGRÁFICO HISPÁNICO; PLATANACEAE-PLUMBAGINACEAE (partim); Vol. II;

- REAL JARDÍN BOTÁNICO, CSIC p 465-569. Obtido em 30 de 05 de 2018, de http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/02_052_17_Salicornia.pdf
- CEE. (21 de 05 de 1992). DIRETIVA 92/43/CEE DO CONSELHO relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens. Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias.
- CHAWLA, H. S. (2009). Introduction to plant biotechnology, 3rd ed. Science Publis, disponível em: <https://books.google.pt/books?id=RgQLISN8zT8C&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>.
- COSTA, J. C. (2001). Tipos de vegetação e adaptações das plantas do litoral de Portugal continental. In Albergaria Moreira, M.E., A. Casal Moura, H.M. Granja & F. Noronha (ed.) Homenagem (in honorio) Professor Doutor Soares de Carvalho: 283-299; Braga; Universidade do Minho.
- COSTA, M. (2004). Técnicas de Propagação e Cultivo de Espécies Autóctones. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento rural e das Pescas.
- DANNER, M. (2008). *MÉTODOS DE MELHORAMENTO DE PLANTAS DE PROPAGAÇÃO ASSEXUADA*. Obtido em 30 de 05 de 2018, de <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/Texto%20resumo%20melhoramento%20fruteiras.pdf>
- Decreto-Lei 49/2005. (24 de 02 de 2005). Diário da República.
- DEMNICIS, B. B., VIEIRA, H. D., ARAÚJO, S. A., JARDIM, J., PÁDUA, F., & CHAMBELA NETO, A. (2009). DISPERSÃO NATURAL DE SEMENTES: IMPORTÂNCIA, CLASSIFICAÇÃO E SUA DINÂMICA NAS PASTAGENS TROPICAIS. Brasil: Archivos de zootecnia vol. 58(R).
- DUBIS, E. N., DUBIS, A. T., & MORZYCKI, J. W. (01 de 1999). *Comparative analysis of plant cuticular waxes using HATR FT-IR reflection technique*. Obtido em 06 de 07 de 2018,

- de Elsevier, Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002228609900157X>
- ERICKSSON, G., EKBERG, I., & CLAPHAM, D. (2006). An introduction to forest genetics. Uppsala, Disponível online em :
http://plantbio.vbgs.slu.se/webb/forgen/Forest_Genetics.pdf.
- ERIG, A. C., & SCHUCH, M. W. (2005). Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. Santa Maria: Ciência Rural, v.35, n.4, jul-ago, 2005.
- FAO. (29 de 06 de 2017). *Food and Agriculture Organization (FAO)*. Obtido em 06 de 06 de 2018, de FAO Brasil, Representante da FAO Brasil apresenta cenário da demanda por alimentos: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>
- FAO. (2018). *Food and Agriculture Organization (FAO)*. Obtido em 07 de 06 de 2018, de FAO - Notícias: 2050: A escassez de água em várias partes do mundo ameaça a segurança alimentar e os meios de subsistência: <http://www.fao.org/news/story/pt/item/283456/icode/>
- FARIA, D. L., AFONSO, M. C., & EDWARDS, H. G. (2002). Espectroscopia Raman: Uma Nova Luz no Estudo de Bens Culturais. São Paulo, Brasil: Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia, São Paulo, 12: 249-267.
- FLOWERS, T. J., & COLMER, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. Australia: New Phytologist 179: 945-963.
- FRANZIN, S. M., & ROVERSI, T. (2002). *O que é vigor de sementes?* Obtido em 29 de 05 de 2018, de <http://coral.ufsm.br/sementes/images/vigor.pdf>
- FTIR, R. (2016). *Espetrometria no Infravermelho (FTIR)*. Obtido em 30 de 05 de 2018, de ESPETROMETRIA NO INFRAVERMELHO (FTIR) Ficha técnica do equipamento Shimadzu IR Affinity-1 Spectrometer (espectrômetro com transformada de Fourier - FTIR):
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2716847/mod_resource/content/2/Roteiro_FTIR%202016.pdf

- FULLER, D. Q. (2007). Contrasting Patterns in Crop Domestication and Domestication Rates: Recent Archaeobotanical Insights from the Old World. *Annals of Botany* 100: 903–924, 2007; oxford journals.
- GAGO, C., SOUSA, A. R., JULIAO, M., GRAÇA, M., ANTUNES, D. C., & PANAGOPOULOS, T. (2011). Sustainable use of energy in the storage of halophytes used for food. *INTERNATIONAL JOURNAL of ENERGY and ENVIRONMENT*; Issue 4, Volume 5; p592-599.
- GAUTHERET, R. (1959). *La Culture des Tissus Végétaux, Techniques et Réalisations*. Paris: Masson ed.
- GOMES, F., COSTA, R., RIBEIRO, M. M., & CANHOTO, J. M. (2010). Genetic similarity studies in *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) using microsatellites. 28th International Horticultural Congress, Science and Horticulture for People, ISHS, Lisboa, p. Abst 531.
- GONÇALVES, P. R. (2016). Os sapais em Portugal Continental; Levantamento e evolução das suas envolventes desde 1990 a 2012; Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade de Lisboa; Instituto Superior de Agronomia.
- GUILHERME, S. R., & RODRIGUES, C. S. (2014). *Síndrome da Domesticação das Plantas Cultivadas*. Obtido em 30 de 05 de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/281006047_Sindrome_da_Domesticacao_das_Plantas_Cultivadas?enrichId=rgreq-3d381dc709f9c009513a955727878699-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI4MTAwNjA0NztBUzoyNjMxODE5NTIwOTAxMTJAMTQzOTc1ODg3NTkzMzQ%3D%3D&el=1_x_2&_esc=
- HORIBA, J. Y. (12 de 06 de 2004). *Raman Data and Analysis - Raman Bands, Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring Explained*. Obtido em 07 de 06 de 2018, de <https://pt.scribd.com/document/48346821/Raman-bands>

- ICNF. (2012). *Diretiva Habitats*. Obtido em 05 de 08 de 2018, de ICNF - Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas: <http://www2.icnf.pt/portal/pn/biodiversidade/rn2000/dir-ave-habit/dir-q-sao>
- ICNF. (2014). *Habitats*. Retrieved 2018 йил 23-05 from <http://www2.icnf.pt/portal/ap/r-nat/rnet/habit>
- KINUPE, V. F. (2007). *PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO-CONVENCIONAIS DA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE, RS*. Obtido em 04 de 06 de 2018, de Digital Repository, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS): <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>
- LOUSÃ, M., MONTEIRO, A., SANTO, D. E., SOUSA, E., & COSTA, J. C. (14 de 02 de 2007). DISCIPLINA DE BIOLOGIA; MÓDULO de BOTÂNICA; Manual de Teóricas e Práticas. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA.
- MALAJOVICH, M. A. (2013). *Micropropagação*. Obtido em 29 de 05 de 2018, de <http://www.bteduc.bio.br>
- MAREC, B. (25 de 05 de 2016). *Salicornia Herbacea ou Salicorne; HYDRASALINOL-FICHE-BOTANIQUE-FR-1. PANCRATIUM MARITIMUM ou LYS DE MER*. França: CODIF; technologie Naturelle.
- MEDEIROS, A. R. (2009). *Uso de ATR/FTIR e FTNIR associado a técnicas quimiométricas para quantificação de aditivos em gasolina automotiva*. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Química.
- MOREIRA, P. M., & PEGO, S. (2003). *Pre-breeding evaluation of maize germplasm. The case of a Portuguese open-pollinated variety*", International Symposium on Plant Breeding, In Arnel R. Hallauer International Symposium on Plant Breeding, Mexico City, Me.
- MURASHIGE, T. (1974). *PLANT PROPAGATION THROUGH TISSUE CULTURE*. In: Allan, Peter. "PLANT PROPAGATION THROUGH TISSUE CULTURE." South African Avocado Growers' Association Yearbook 1981. 4:22-26, 1981.

- MURASHIGE, T., & SKOOG, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Biomass With Tobacco Cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- NEVES, R. (2013). A Salicornia. *ECOSAL ATLANTIS; Newsletter nº 12*. Aveiro: ECOSAL ATLANTIS.
- OLIVEIRA, R. A., & SILVA, A. P. (2014). William Herschel, os raios invisíveis e as primeiras ideias sobre radiação infravermelha. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 36; nº4, 4603.
- ORIGUINLAB. (s.d.). OriginLab, Northampton, MA.
- PEREIRA, L. A., & BIANCHETTI, A. (1977). FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE DAS SEMENTES. LONDRINA - PARANÁ: CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - EMBRAPA, BOLETIM TECNICO Nº2.
- PINTO, R. (2014). *A planta que é uma alternativa ao sal: antes era uma praga, agora é uma erva gourmet*. Obtido em 04 de 06 de 2018, de <http://expresso.sapo.pt/iniciativaseprodutos/premio-producao-nacional-2015/2015-05-28-A-planta-que-e-uma-alternativa-ao-sal-antes-era-uma-praga-agora-e-uma-erva-gourmet#gs.qpQFMj8>
- REBOUÇAS, A. C. (13 de 01 de 2005). *Água e desenvolvimento rural*. Obtido em 07 de 06 de 2018, de <http://www.scielo.br/pdf/ea/v15n43/v15n43a24.pdf>
- REGULAMENTO (CE) N.º 834/2007 DO CONSELHO de 28 de Junho de 2007 relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 2092/91. (28 de 06 de 2007). *Regulamento (CE) n.º 834/2007*.
- RODRIGUES, A. D., & GALZERANI, J. C. (2012). Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 4, 4309.
- RODRIGUES, H. V. (2014). *Meios de Cultura: Componentes e tipos de meio*. Retrieved 29 July 2018-05 from

- <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lpv/lpv645/Meios%20de%20cultivo2014.pdf>
- ROSANNA. (2005). *Fundamentos de Espectroscopia Raman, capítulo 1*. Obtido em 04 de 06 de 2018, de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf?sequence=3>
- SANTOS, E. S., PACHECO, J., MARQUES, D., SALAZAR, M., MENDES, S., LOPES, M., . . . CRUZ, A. (2015). *Cultivo sustentável de halófitas – Potencial agrícola, alimentar e industrial*. Obtido em 03 de 06 de 2018, de http://voluntariadoambientalagua.apambiente.pt/FileControl/Site/EncontrosRegComunicacoes/50palestra_olhao_halofitas.pdf
- SILVA, H., CALDEIRA, G., & FREITAS, H. (2006). *Salicornia ramosissima* population dynamics and tolerance of salinity. *The Ecological Society of Japan; Ecol Res* (2007) 22: 125–134.
- SOLER, J. (08 de 06 de 2010). *De La Gastronomía de José Soler; Salicor o Salicornia*. Obtido em 30 de 05 de 2018, de https://www.gastrosoler.com/pagina_nueva_79.htm
- T., A. (09 de 12 de 2016). *ÁREA DE GESTÃO TRIBUTÁRIA-IVA*. Obtido em 07 de 06 de 2018, de Portal das Finanças: http://rpsadvogados.pt/wp-content/uploads/2016/04/Oficio-Circulado_30185_2016.pdf
- TOPSA, E. (1939). A végétation des halophytes du nord de la Roumanie en connexion avec celle du rest du pays. *S.I.G.M.A.70*: 1-2.
- UTAD, J. B. (30 de 05 de 2018). *Jardim Botânico UTAD | Ficha técnica Salicornia ramosissima*. Obtido em 30 de 05 de 2018, de https://jb.utad.pt/especie/Salicornia_ramosissima
- VENTURA, Y., WUDDINEH, W. A., MYRZABAYEVA, M., ALIKULOV, Z., KHOZIN-GOLDBERG, I., SHPIGEL, M., . . . SAGI, M. (2011). Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia*

halophytes as leafy vegetable crops. *Scientia Horticulturae*, 128 (2011) 189-196.
10.1016/j.scienta; Elsevier.

WHITE, T. L., ADAMS, W. T., & NEALE, D. B. (2007). *Forest Genetics*. CAB Internacional
Oxfordshire, Disponivel online em:
[https://books.google.pt/books?id=UHZCeg4BqtkC&pg=PR4&lpg=PR4&dq=Forest
+Genetics.+CAB+Internacional+Oxfordshire&source=bl&ots=7XOSD70850&sig=ff
UeRPSSulWgVNGmx7D6RlcofkU&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjmjID0-L_](https://books.google.pt/books?id=UHZCeg4BqtkC&pg=PR4&lpg=PR4&dq=Forest+Genetics.+CAB+Internacional+Oxfordshire&source=bl&ots=7XOSD70850&sig=ffUeRPSSulWgVNGmx7D6RlcofkU&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjmjID0-L_).

YENSEN, N. P. (2008). HALOPHYTE USES FOR THE TWENTY- FIRST CENTURY; CHAPTER
23. *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*,. USA: Springer Science +
Business Media B.V.

ZAVATTIERI, A. (2002). *BIOTECNOLOGIA VEGETAL I*. Evora: Universidade de Evora.

7. ANEXOS

Anexo I

Protocolo de desinfecção das sementes, ápices e segmentos nodais

As sementes (cerca de 200) e alguns ramos de salicórnica foram sujeitas a tratamento de desinfecção. Para cada ensaio de estabelecimento *in vitro* de sementes, ápices ou segmentos nodais procedeu-se do seguinte modo:

1. Na câmara de fluxo laminar as sementes e os ramos de aproximadamente 4 cm foram colocados dentro de um copo de 100 mL, com água destilada e esterilizada durante 2 minutos; de seguida a água foi rejeitada;
2. Os materiais vegetais foram imersos em solução de álcool a 70^o com uma gota detergente e agitadas durante 1 minuto; de seguida foi rejeitada a solução. De seguida foram lavados em água destilada e esterilizada;
3. Posteriormente foram imersos em solução de lixívia comercial diluída a 40 % com água destilada com uma gota de detergente e agitados durante 2 minutos; de seguida foi rejeitada a solução;
4. De seguida foram lavados 3 vezes com água destilada e esterilizada;
5. Por fim, foram mantidos em água destilada e esterilizada em câmara de fluxo laminar até ao seu estabelecimento.

Durante o protocolo de desinfecção as sementes que flutuavam foram sendo removidas.

Anexo II

Preparação dos meios de cultura

Reagentes e condições dos meios de Cultura

Knop:

Knop: Gautheret, R.J. 1959. *La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations*. Paris, Masson ed. (adaptado).

Knop	
Reagentes	g/L
KNO ₃	0,25
KH ₂ PO ₄	0,25
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
NaFeEDTA	0,04
Sacarose	30
Água	Até perfazer 1 litro
pH	5,5
Agar	7
Esterilização	121 °C 20'

MS/2

MS/2: Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497, (adaptado).

MS/2		
Reagentes	g/L	mL/L
KNO ₃	0,95	
KH ₂ PO ₄	0,085	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,22	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,185	
NH ₄ NO ₃	0,825	
NaFeEDTA	0,04	
Oligo elementos de MS		1
Vit. Fossard C (1974)		20
Ácido ascórbico		1
BAP		0.1
Sacarose	30	
Água	Até perfazer 1 litro	
pH	5,5	
Agar	7	
Esterilização	121 °C 20'	

Preparação dos Meio de Cultura

Prepararam-se 2 litros de meio de cultura MS e 2 litros de meio de cultura Knop de acordo com os reagentes anteriormente referidos. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (marca AUTESTER) durante 20 minutos a 121 °C de temperatura e 1 bar de pressão. Posteriormente os meios de cultura foram distribuídos em câmara de fluxo laminar (marca BIOBASE) para caixas de Petri descartáveis e para tubos de ensaio previamente esterilizados (adição de 9 mL).

Os procedimentos usados para a preparação dos meios de cultura MS e Knop, foram idênticos, apenas diferindo nos reagentes e quantidades utilizadas. Para a preparação de cada um deles procedeu-se do seguinte modo:

Utilizou-se um erlenmeyer de 2 L de capacidade, um magneto e uma placa de aquecimento e agitação.

Cada um dos reagentes foi pesado numa balança digital de marca e modelo "Mettler PC 4000" e foi adicionado para o erlenmeyer com 500 mL de água destilada. De seguida promoveu-se à agitação da mistura, mas sem aquecimento. De seguida, os reagentes em solução líquida foram medidos com uma micropipeta (de marca Orange Scientific) ou com uma proveta, dependendo da quantidade necessária, e adicionados para o erlenmeyer.

Após a completa dissolução dos reagentes, pesou-se a sacarose e adicionou-se à solução em preparação e continuou-se a agitar até dissolução completa. De seguida desligou-se a agitação e com água destilada fez-se o volume de 2 L. Ligou-se de novo a agitação, mediu-se o pH e acertou-se a um valor de 5,5, usando ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Ligou-se a placa de aquecimento, adicionou-se 14 g de Agar e deixou-se na placa até ferver e ficar translúcido.

Para facilitar a posterior distribuição do meio de cultura, este foi dividido em 4 erlenmeyers que foram tapados com "rolhões de algodão", papel de alumínio e por fim papel kraft e atados com um elástico. Foram levados a esterilizar em autoclave e posteriormente distribuídos por placas de Petri e tubos de ensaio em câmara de fluxo laminar.

Anexo III

Equipamento e Material Utilizado

- Câmara de fluxo laminar (marca BIOBASE).

A manipulação das culturas *in vitro* exige condições de assepsia por forma a evitar a contaminação do material vegetal bem como de todo o material utilizado na manipulação das culturas. A Câmara de Fluxo Laminar (CFL) é um local de trabalho que permite a manipulação do material em condições de assepsia, devido ao fluxo de ar constante. O ar passa previamente por três filtros ficando livre de contaminantes.

A câmara de fluxo laminar e o esterilizador devem ser ligados 30 minutos antes do início de qualquer trabalho. No seu interior encontra-se uma placa de corte, um copo com álcool a 70 % (para lavar o material utilizado antes deste ser colocado no esterilizador), várias pinças de diferentes tamanhos, bisturis e um esterilizador de bancada. Todo o material utilizado como o papel, a água destilada e os meios de cultura são previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e a 1 bar de pressão durante 20 minutos. De seguida, o papel é colocado em estufa para secagem. As pinças e os bisturis são esterilizados no esterilizador elétrico de bancada a uma temperatura de 250 a 300 °C e a zona de trabalho na câmara é desinfetada com álcool a 70 % bem como as mãos do manipulador



Câmara de Fluxo Laminar, com esterilizador, placa de corte, pinças e bisturis devidamente esterilizados.

➤ Fitoclima (marca aralab)

De modo a simular as condições naturais para a germinação das sementes o fitoclima foi programado com um fotoperíodo de 16 horas luz a 25 °C de temperatura e 8 h em regime de obscuridade a 20 °C. Apesar do material se encontrar dentro do fitoclima as sementes foram colocadas em regime de obscuridade, recorrendo para isso a caixas ou papel de alumínio.



Fitoclima.

➤ Autoclave (marca AUTESTER)

O processo de esterilização foi realizado a uma temperatura e pressão de funcionamento respetivamente de 121 °C e 1 bar. O tempo de esterilização geral do material e do meio de cultura foi, respetivamente, de 30 e 20 minutos.



Autoclave



Balança digital.



ATR-FTIR e computador com programa " OPUS Spectroscopy Software".

Desinfecção e Esterilização do Equipamento e Material Utilizado

O material e equipamento utilizado em contexto de laboratório foi todo previamente desinfetado e/ou esterilizado. Após a sua utilização, este foi lavado e/ou esterilizado e arrumado para futuras utilizações.