

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA ACTIVIDADE  
ANTIOXIDANTE EM ESPÉCIES DE *Juniperus*:  
ANÁLISE DA PRODUÇÃO SAZONAL E SOB  
CONDIÇÕES DE STRESSE**

**Rui Carlos Soares Pimpão**

*Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia*

**2009**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA ACTIVIDADE  
ANTIOXIDANTE EM ESPÉCIES DE *Juniperus*:  
ANÁLISE DA PRODUÇÃO SAZONAL E SOB  
CONDIÇÕES DE STRESSE**

**Rui Carlos Soares Pimpão**

Dissertação Orientada por:

Prof. Doutora Ana Cristina Figueiredo

Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa

Prof. Doutor Ricardo Boavida Ferreira

Instituto de Tecnologia Química e Biológica – Universidade Nova de  
Lisboa

*Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia*

**2009**

## **Agradecimentos**

Aqui expesso os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ricardo Boavida Ferreira, pela possibilidade de realização do trabalho experimental, mas também por todo o apoio, orientação e aconselhamento.

À Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo, por toda a disponibilidade, orientação e aconselhamento.

À Doutora Claudia Santos e Lucélia Tavares o apoio, disponibilidade, conhecimentos e técnicas transmitidas, bem como as horas dedicadas.

A todos os meus colegas no Instituto de Tecnologia Química e Biológica pelo apoio, amizade e companhia.

## Resumo

Grande importância tem sido atribuída a substâncias com forte actividade antioxidante, assumidas como protectoras contra doenças degenerativas e envelhecimento, causados por espécies reactivas de oxigénio. No sentido de identificar as condições que promovem a acumulação foliar de substâncias fenólicas com actividade antioxidante, utilizaram-se plantas das espécies *Juniperus turbinata* Guss., *Juniperus phoenicea* L. e *Juniperus navicularis* Gand., e das subespécies, *Juniperus oxycedrus oxycedrus* L. e *Juniperus oxycedrus badia* H. Gay.

Para extractos hidroetanólicos destas plantas, determinou-se a variação anual (2008) do conteúdo em compostos fenólicos, por intermédio do método de Folin-Ciocalteu, e de flavonóides, pelo método baseado na complexação com  $AlCl_3$ . Durante o mesmo período, foi também quantificada a actividade antioxidante dos extractos pelo método de ORAC. Detectou-se uma variação do conteúdo em fenóis/flavonóides ao longo do ano, com especial acumulação nos meses de Novembro e Dezembro. Nestes meses, foram registados os valores mais elevados, 113,5 mg GAE  $g^{-1}$  peso seco (ps) para fenóis totais em *J. turbinata*, e 63,3 mg CE  $g^{-1}$  ps para flavonóides em *J. oxycedrus oxycedrus*. Os valores máximos de actividade antioxidante foram registados nos meses de Maio/Junho e Agosto/Setembro, quando *J. oxycedrus badia* atingiu 3307  $\mu$ mol TE  $g^{-1}$  ps.

Sujeitaram-se, também, plantas das taxa *J. phoenicea*, *J. turbinata* e *J. oxycedrus badia*, a stresses de seca, de salinidade elevada, de frio e pulverização com metil-jasmonato, no sentido de verificar o seu efeito na acumulação de compostos fenólicos e na actividade antioxidante dos extractos. Destacaram-se o stresse de salinidade elevada, que induziu um aumento dos compostos fenólicos em *J. oxycedrus badia*, sem contudo aumentar a actividade antioxidante, e a exposição ao metil-jasmonato, que induziu um aumento acentuado dos compostos fenólicos e da actividade antioxidante de extractos de *J. phoenicea*.

De forma a conhecer os ramos da via biossintética dos polifenóis mais activos nas condições de maior acumulação de polifenóis, procedeu-se à quantificação relativa dos transcritos codificantes para algumas enzimas chave na via biossintética dos fenóis, por *Real Time – Polymerase Chain Reaction* (PCR). Constataram-se aumentos relevantes da expressão dos genes codificantes para as enzimas fenilalanina amoníaco liase (PAL), flavanona 3-hidroxilase (F3H), antocianidina sintase (ANS) e antocianidina redutase (ANR) para *J. phoenicea* sujeito à exposição de metil-jasmonato e das enzimas PAL e ANR para *J. oxycedrus badia* sujeito a stresse salino.

Palavras chave: *Juniperus* sp., variação sazonal, fenóis, flavonóides, stress, actividade antioxidante, *Real Time-PCR*

## Abstract

High importance has been given to substances with high antioxidant activity, assumed as protective against reactive oxygen species, which are causers of aging and degenerative diseases. In order to identify which conditions promote foliar accumulation of phenolic compounds with high antioxidant activity, plants belonging to the species *Juniperus turbinata* Guss., *Juniperus phoenicea* L. and *Juniperus navicularis* Gand., and to the subspecies *Juniperus oxycedrus oxycedrus* L. e *Juniperus oxycedrus badia* H. Gay were used.

Using hydroethanolic extracts, the total phenolic and flavonoid annual (2008) variation was determined, with Folin-Ciocalteu method and the method based on  $AlCl_3$  complexation, respectively. During the same period, the extracts antioxidant activity was quantified with the ORAC method.

The variation in phenols/flavonoids contents and in the antioxidant activity along the year were recorded. A higher accumulation of total phenolic compounds and flavonoids was observed in November and December. In these months, *J. turbinata* phenolics content reached 113,5 mg GAE  $g^{-1}$  dry weight (dw), whereas *J. oxycedrus oxycedrus* flavonoid content reached 63,3 mg CE  $g^{-1}$  dw. The highest values of antioxidant activity were registered in May/June and August/September, with *J. oxycedrus badia* reaching the highest value, 3306,6  $\mu$ mol TE  $g^{-1}$  dw.

Plants belonging to the taxa, *J. phoenicea*, *J. turbinata* and *J. oxycedrus badia* were exposed to drought, high salinity, and cold stresses, and elicitation with methyl jasmonate, to determine how these conditions affect phenols accumulation and antioxidant activity in the plant extracts. Of these tests, salinity stress induced an increase in phenolic content of *J. oxycedrus badia*, whereas methyl jasmonate not only increased phenolic content in *J. phoenicea* extract, but also its antioxidant activity.

In order to pinpoint the most active branches of polyphenolic biosynthetic pathway under conditions of higher polyphenol accumulation, the level of transcripts encoding selected major enzymes of phenolic metabolism was assessed by Real Time – Polymerase Chain Reaction (PCR). Significant increases in transcripts were observed for the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), flavanone 3-hydroxylase (F3H), anthocyanidin synthase (ANS) e anthocyanidin reductase (ANR) for *J. phoenicea* exposed to methyl jasmonate, and for the enzymes PAL and ANR for *J. oxycedrus badia* subjected to salt stress.

Key words: *Juniperus* sp., seasonal variation, stress, phenols, flavonoids, antioxidant activity, *Real Time-PCR*

## Conteúdo

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Abreviaturas .....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização Taxonómica.....	1
1.2. Estudos Etnobotânicos .....	1
1.3. Estudos Científicos já Efectuados.....	3
1.4. Caracterização Fitoquímica: Compostos Fenólicos .....	3
1.5. Função dos Compostos Fenólicos nas Plantas .....	6
1.6. Espécies Reactivas de Oxigénio e Actividade Antioxidante dos Polifenóis .....	8
1.7. Objectivo .....	9
2. Métodos.....	11
2.1. Material Biológico .....	11
2.2. Indução dos Stresses nas Plantas de <i>Juniperus</i> .....	11
2.2.1. Stresse de Seca .....	11
2.2.2. Stresse Salino.....	12
2.2.3. Stresse de Frio .....	12
2.2.4. Eliciação com Metiljasmonato .....	12
2.2.5. Determinação do Conteúdo em Clorofilas das Amostras .....	12
2.2.6. Determinação do Rendimento Quântico Efectivo do Fotossistema II no Estado Adaptado à Luz ( $F'v/F'm$ ).....	13
2.3. Extracção de Fitoquímicos de Matrizes Vegetais.....	13
2.4. Determinação do Conteúdo em Fenóis Totais.....	13
2.5. Determinação do Conteúdo em Flavonóides.....	13
2.6. Determinação da Actividade Antioxidante .....	14
2.7. Determinação da Acumulação de Transcritos de Genes Codificante para as Enzimas da Via de Síntese dos Polifenóis por <i>Real Time – PCR</i> .....	15
2.7.1. Extracção de RNA .....	15

2.7.2.	Limpeza das Amostras de RNA com DNase .....	17
2.7.3.	Transcrição Reversa do RNA (RT-PCR).....	17
2.7.4.	Análise de Sequências de mRNA dos Genes Pretendidos e Desenho dos Primers.....	18
2.7.5.	PCR para Amplificação dos Fragmentos Pretendidos .....	18
2.7.6.	Obtenção dos Fragmentos de cDNA dos Genes Pretendidos para Sequenciação.....	18
2.7.6.1.	Clonagem do Produto Amplificado no Vector pCRII .....	18
2.7.6.2.	Transformação de Bactérias com o Plasmídeo .....	19
2.7.6.3.	Seleção das Colónias a Multiplicar e Purificação do Plasmídeo com a Inserção .....	19
2.7.6.4.	Preparação em Pequena Escala de DNA Plasmídico das Colónias Positivas e Recolha dos Plasmídios.....	20
2.7.6.5.	Análise e Seleção do DNA Plasmídico a ser Amplificado para Sequenciação.....	20
2.7.6.6.	Sequenciação e Análise das Sequências.....	20
2.7.6.7.	Desenho de Primers para Real Time - PCR .....	21
2.7.6.8.	Real Time - PCR Quantitativo.....	21
2.8.	Análise Estatística .....	21
3.	Resultados e Discussão .....	22
3.1.	Estudo Anual do Conteúdo em Fenóis, Flavonóides e Determinação da Actividade Antioxidante.....	22
3.1.1.	Determinação do Conteúdo em Fenóis Totais e Flavonóides.....	22
3.1.2.	Determinação da Actividade Antioxidante .....	24
3.2.	Estudo da Variação do Conteúdo Fenólico e da Actividade Antioxidante em Folhas de <i>Juniperus</i> Sujeitas a Stresse .....	27
3.2.1.	Stresse de Seca .....	28
3.2.2.	Stresse Salino.....	31
3.2.3.	Stresse de Frio .....	33
3.2.4.	Stresse de Metiljasmonato.....	35
3.3.	Quantificação da Acumulação de transcritos do Genes que Codificam Algumas Enzimas da Via de Síntese dos Polifenóis em <i>Juniperus</i> Sujeitos a Stresse .....	38
3.3.1.	Obtenção de Sequências Parciais dos Genes da Via de Síntese dos Polifenóis .....	38
3.3.2.	Obtenção das Sequências de mRNA Correspondentes aos Genes Escolhidos .....	39
3.3.3.	Clonagem e Sequenciação dos Fragmentos dos Genes em Estudo .....	40
3.3.4.	Quantificação da Acumulação dos Transcritos dos Genes das Enzimas Seleccionadas por <i>Real Time – PCR</i> .....	41
4.	Conclusão .....	47

5.	Bibliografía .....	49
6.	Anexos.....	54



## Índice de Figuras

- Figura 1 – Esquema representativo da estrutura geral dos flavonóides, caracterizada pela presença de 2 anéis aromáticos (A e B), ligados por uma ponte de 3 átomos de carbono que formam o anel heterocíclico oxigenado (C). (Imagem adaptada de [19]) ..... 4
- Figura 2 – Esquema representativo da via biossintética das classes de flavonóides. As principais enzimas representadas desta via biossintética são: fenilalanina amoníaco liase (PAL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), di-hydroflavonol-4-redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), antocianidina sintase (ANS), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina redutase (LAR). (adaptado de Menezes *et al.* [20] e Winkel-Shirley [21]) ..... 5
- Figura 3 – Quantificação dos fenóis totais ao longo do ano, de extracções hidroetanólicas para os taxa *J. oxycedrus oxycedrus* ■■ e *J. oxycedrus badia* ▲ (A) e *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. navicularis* ● (B), pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico.g<sup>-1</sup> de peso seco. .... 22
- Figura 4 – Quantificação dos flavonóides ao longo do ano, de extracções hidroetanólicas para os taxa *J. oxycedrus oxycedrus* ■■ e *J. oxycedrus badia* ▲ (A) e *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. navicularis* ● (B), pelo método de complexação com AlCl<sub>3</sub> tal como descrito em [51]. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (CE) por g de peso seco. .... 23
- Figura 5 – Quantificação da actividade antioxidante ao longo do ano, de extracções hidroetanólicas para os taxa *J. oxycedrus oxycedrus* ■■ e *J. oxycedrus badia* ▲ (A) e *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. navicularis* ● (B), pelo método ORAC, descrito em [53]. Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de Trolox. g<sup>-1</sup> de peso seco. .... 25
- Figura 6 – Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio de clorofila a/clorofila b (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. oxycedrus badia* ▲ sujeitos a stresse de seca, no tempo indicado em dias. .... 28
- Figura 7 – Variação relativa de fenóis totais (A), de flavonóides (B) e actividade antioxidante (C) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. oxycedrus badia* ▲ sujeitos a stresse de seca durante o tempo indicado em dias. .... 30
- Figura 8 - Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio de clorofila a /clorofila b (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. oxycedrus badia* ▲ sujeitos a stresse salino com 250 mM de NaCl, durante o tempo indicado em dias. .... 31
- Figura 9 – Variação relativa de fenóis totais (A), flavonóides (B) e da actividade antioxidante (C) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. oxycedrus badia* ▲ sujeitos a stresse salino com 250 mM de NaCl durante o tempo indicado em dias. .... 32
- Figura 10 - Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio clorofila a /clorofila b (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. oxycedrus badia* ▲ sujeitos a stresse de frio a 4 °C por 24 h, seguido do tempo de recuperação indicado em dias. .... 34

Figura 11 – Variação relativa de fenóis totais (A), flavonóides (B) e da actividade antioxidante (C) de extractos *J. phoenicea* —◆—, *J. turbinata* —■— e *J. oxycedrus badia* —▲— sujeitos a stresse de frio a 4 °C nas primeiras 24 h, seguido do tempo de recuperação, indicado em dias..... 35

Figura 12 - Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio de clorofila a /clorofila b (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* —◆—, *J. turbinata* —■— e *J. oxycedrus badia* —▲— sujeitos a pulverização de 5 mM metiljasmonato durante o tempo indicado em horas..... 36

Figura 13 – Variação relativa de fenóis totais (A), flavonóides (B) e da actividade antioxidante (C) de extractos *J. phoenicea* —◆—, *J. turbinata* —■— e *J. oxycedrus badia* —▲— sujeitos a pulverização de 5 mM metiljasmonato durante o tempo indicado em horas. .... 37

**Figura 14** - Monitorização da acumulação relativa de mRNA dos genes que codificam as enzimas em estudo da via de síntese dos polifenóis (PAL, F3H, LAR, ANS e ANR), determinada por *Real Time-PCR*, de amostras de *J. phoenicea* pulverizadas com 5 mM metiljasmonato, nos tempos indicados em horas. As marcas \*, \*\*, \*\*\* e ns assinalam as diferenças estatísticas significativas para  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , e não significativo, respectivamente..... 42

Figura 15 – Monitorização da acumulação relativa do mRNA da PAL, determinada por *Real Time - PCR*, de amostras de *J. phoenicea* sujeitos a exposição de 5 mM metiljasmonato (barras) e determinação relativa da actividade antioxidante (—■—) durante o tempo indicado em horas. .... 44

Figura 16 – Monitorização da acumulação relativa do mRNA dos genes que codificam as enzimas em estudo da via de síntese dos polifenóis (PAL, F3H, LAR e ANR), determinada por *Real Time - PCR*, de amostras de *J. oxycedrus badia* sujeitos a stresse salino (250 mM NaCl), nos tempos indicados em dias. As marcas \*, \*\*, \*\*\* e ns assinalam as diferenças estatísticas significativas para  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , e não significativo, respectivamente..... 46

## Índice de Tabelas

**Tabela 1** – Representação e caracterização das espécies de *Juniperus* estudadas no âmbito deste trabalho ..... 2

Tabela 2 – Correlação entre os parâmetros avaliados para os extractos de colheitas mensais de *Juniperus*, evidenciada pelo valor de  $R^2$ . .... 26

Tabela 3 – Sequências dos *Primers forward* e *reverse* usados na amplificação, por *Real Time – PCR*, dos mRNA dos genes em estudo, bem como os *accession number* das sequências de mRNA usadas como molde..... 41

## Abreviaturas

ACT	Actina
ANR	Antocianidina redutase (de <i>anthocyanidin reductase</i> )
ANS	Antocianidina sintase (de <i>anthocyanidin synthase</i> )
ATP	Adenosina trifosfato
Bp	Pares de base
BSA	Albumina de soro bovino
CHI	Chalcona isomerase (de <i>chalcone isomerase</i> )
CHS	Chalcona sintase (de <i>chalcone synthase</i> )
CTAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i>
DFR	Di-hidroflavonol 4-redutase (de <i>dihydroflavomol-4-reductase</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EF1A	Factor de alongamento 1 alfa (de <i>elongation factor 1 alpha</i> )
FADH <sub>2</sub>	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
F3H	Flavanona 3-hidroxilase (de <i>flavanone 3-hydroxylase</i> )
FL	<i>Fluorescein dissodium</i>
FLS	Flavonol sintase (de <i>flavonol synthase</i> )
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
HORAC	<i>Hydroxyl Radical Averting Capacity</i>
HOSC	<i>Hydroxyl Radical Scavenging Capacity</i>
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta performance – acoplada a espectroscopia de massa
<i>J.</i>	<i>Juniperus</i>
LAR	Leucoantocianidina redutase (de <i>leucoanthocyanidin reductase</i> )
LB	<i>Luria-Bertani media</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PAL	Fenilalanina amoníaco liase (de <i>phenylalanine ammonia- lyase</i> )
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PS	Peso seco (de material vegetal)
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio (de <i>reactive oxygen species</i> )
RT-PCR	<i>Reverse transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
Trolox	<i>(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid</i>
UV	Ultravioleta
X-GAL	<i>Bromo-chloro-indolyl-galactopyrenoside</i>

# 1. Introdução

## 1.1. Caracterização Taxonómica

Pertencentes à divisão Coniferophyta, os *Juniperus* integram-se na Família Cupressaceae, onde estão caracterizados mais 19 géneros. Tendo evoluído no início do período Jurássico, as espécies integradas nesta família caracterizam-se por serem plantas geralmente monóicas, com ramos laterais bem desenvolvidos e folhas opostas ou verticiladas escamiformes [1]. O género *Juniperus* abrange um total de 70 espécies e 27 variedades [2]. A maioria das espécies de *Juniperus* encontra-se distribuída pelo território da Laurásia, com excepção do taxa *J. procera*, que cresce ao longo das montanhas no Este de África, até ao hemisfério Sul, e de algumas espécies mediterrânicas como *J. oxycedrus*, *J. phoenicea*, e *J. thurifera*, que também crescem em zonas montanhosas do Norte de África [3].

As espécies e subespécies estudadas neste trabalho: *J. navicularis* Gand., *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L., *J. oxycedrus* subsp. *badia* H. Gay, *J. phoenicea* L.(= *J. phoenicea* subsp. *phoenicea* L.) e *J. turbinata* Guss. (= *J. phoenicea* subsp. *turbinata* Guss.), todas elas nativas de Portugal, encontram-se representadas no Anexo I e a sua caracterização é efectuada na Tabela 1 [4].

## 1.2. Estudos Etnobotânicos

As espécies de *Juniperus* são utilizadas, tradicionalmente, para diversos fins, desde medicinais a culinários e construção de infra-estruturas, entre outros. Na medicina tradicional Turca, os frutos de *Juniperus communis* são usados como diuréticos, estomáticos e antissépticos e são aplicados em tratamentos para o reumatismo, gota, anginas e doenças cardíacas e dermatológicas. A estes frutos, é também atribuído um efeito analgésico [5]. As bagas de *Juniperus communis* são muito usadas em determinadas regiões de Itália como condimento de alimentos ou na preparação de licores como gin, “gineprino” e “grappa” [6]. Esta planta é também usada pelas populações de Manangwa, no Nepal, no tratamento de doenças respiratórias e de doenças associadas ao tracto uro-genital. A espécie *J. squamata* é também usada para curar dores de cabeças, febre da malária e tosse, e *J. indica* em animais para curar feridas e afastar insectos [3]. Na medicina tradicional Jordana, o extracto de *J. phoenicea* é usado no tratamento de doenças como diarreia, gota e na eliminação de parasitas [7]. Em Portugal, frutos de *J. phoenicea* estão descritos como sendo utilizados na preparação de infusões para tratamentos do fígado, próstata, pedra nos rins, constipação, ou reumático, para além de serem utilizados como diurético. Quando engolidos com água são também utilizados para “limpar o sangue” ou no tratamento de “dor de rosca” [8].

**Tabela 1** – Representação e caracterização das espécies de *Juniperus* estudadas no âmbito deste trabalho

<b>Espécie/ Subespécie</b>	<b>Secção</b>	<b>Características morfológicas comuns</b>	<b>Características distintivas</b>	<b>Habitat e Distribuição</b>
<i>J. oxycedrus</i> <i>oxycedrus</i>	<i>Juniperus</i> - folhas aciculares e articuladas na base e gálbulo frequentemente com apenas três escamas seminíferas [4]	Plantas dióicas, com folhas atenuadas ou mucronadas no ápice e com duas franjas estomáticas brancas no feixe [4]	Folhas e gábulos de menores dimensões (8 a 15 x 1 a 1,5 mm e 8 a 10 mm, respectivamente); arbustiva, atingindo 4 m de altura [4]	Habitam regiões xerofíticas, em planícies ou encostas em aberto ou bosques, podendo ir até aos 1000 m de altitude. Em Portugal habitam regiões interiores: Beira Alta, Beira Baixa, Trás-os-Montes; <i>J. oxycedrus oxycedrus</i> também presente no Alto Alentejo e <i>J. oxycedrus badia</i> no Ribatejo [4,9]
<i>J. oxycedrus badia</i>			Folhas e gábulos de maiores dimensões (12 a 20 x 1,2 a 2 mm e 10 a 13 mm, respectivamente); atinge até 15 m de altura [4]	
<i>J. navicularis</i>			Carácter arbustivo, não ultrapassando geralmente os 2 m de altura; copa fastigiada e densa, com folhas de reduzidas dimensões (4 a 12 mm x 1 a 1,5 mm), agudas ou acuminadas, patentes e densas e com duas franjas estomáticas brancas no feixe [4]; o gálbulo atinge geralmente os 7 a 10 mm de diâmetro [4]	Habitam solos arenosos no litoral, em pinhais ou matos perenifólios; Baixo Alentejo, Estremadura e Ribatejo [4,9]
<i>J. phoenicea</i>	<i>Sabina spach</i> - caracterizados por possuírem dimorfismo foliar, com folhas juvenis aciculares e folhas adultas escamiformes e imbrincadas; gálbulo frequentemente com mais de 6 escamas [4]		Possui ramos com o ápice não excedendo muito o comprimento dos ramos laterais [4]; gábulos globosos [9]	Habitam regiões arenosas, como dunas e matos xerofíticos no litoral Centro e Sul do país, com <i>J. phoenicea</i> colonizando também penhascos e zonas rochosas [4,9]
<i>J. turbinata</i>			Possui ramos com ápices muito pronunciados, excedendo os ramos laterais imediatos [4]; gábulos afunilados [9]	

### 1.3. Estudos Científicos já Efectuados

Tendo em conta os variados usos etnobotânicos que são atribuídos às espécies de *Juniperus*, diversos estudos foram já efectuados sobre a sua actividade biológica. Muitos dos trabalhos efectuados sobre as espécies de *Juniperus* visam o estudo dos seus óleos essenciais, como o efectuado por Stassi e colaboradores [10], que verificaram actividade antimicrobiana nos óleos de bagas de *J. oxycedrus*, *J. oxycedrus macrocarpa*, *J. phoenicea* e *J. drupacea*, sendo ao primeiro atribuído a maior actividade. Estudos sobre extractos hidroetanólicos das bagas ou dos ramos foram também já realizados, como a caracterização da componente fenólica de extractos etanólicos/aquosos de bagas de *J. communis*. Estes revelaram uma predominância de compostos pertencentes ao grupo das flavonas [6]. Elmastas e colaboradores [5] demonstraram uma elevada actividade antioxidante em diversos ensaios *in vitro*, actividade essa atribuída aos compostos fenólicos dos extractos aquosos e etanólicos. Extractos de frutos de *J. phoenicea* preparados com solventes polares revelaram, também, elevada actividade antioxidante *in vitro*, correlacionada com o conteúdo em compostos fenólicos dos mesmos extractos [11]. Outras bioactividades foram também verificadas para espécies de *Juniperus*, como a actividade antidiarreica do extracto aquoso de *J. phoenicea* [7], a actividade antimicrobiana de extractos metanólicos de *J. oxycedrus*, apesar de esta não se ter detectado para extractos aquosos [12], ou o efeito hipotensivo (independente do sistema adrenérgico) de extractos metanólicos e diclorometanólicos de *J. oxycedrus* [13].

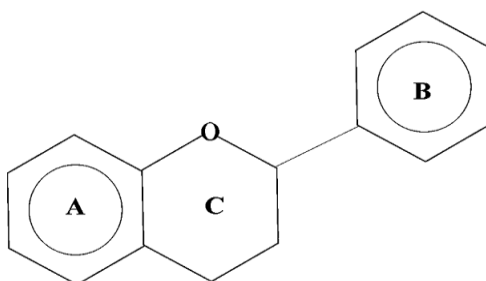
### 1.4. Caracterização Fitoquímica: Compostos Fenólicos

As plantas produzem um grande número de metabolitos secundários que podem ser classificados consoante as suas características estruturais e as suas vias biossintéticas [14]. Os compostos fenólicos são um grupo de metabolitos secundários que se caracterizam pela presença de, pelo menos, um grupo fenólico ou seja, contêm um grupo hidroxilo associado a um anel aromático. São dos metabolitos secundários mais amplamente distribuídos e abundantes nas plantas, sendo que cerca de 2% do carbono fotossintetizado pelas plantas, numa quantidade equivalente a  $10^{15}$  g por ano, é convertido em flavonóides e compostos relacionados [15]. Constituem um grupo extremamente diversificado, tanto ao nível de estruturas químicas como ao nível de funções biológicas. As suas vias metabólicas são particularmente complexas e, em muitos casos, existem múltiplos destinos metabólicos alternativos [16]. Duas vias biossintéticas básicas estão geralmente envolvidas, a via do ácido xiquímico, responsável pela síntese da maioria de polifenóis em plantas, e a via do ácido malónico, de menor expressão em plantas, mas de grande importância em fungos e bactérias [14]. A via do ácido xiquímico tem como precursores biossintéticos o fosfoenolpiruvato proveniente da glicólise e a eritrose-4-fosfato proveniente da via das pentoses-fosfato, e vai dar origem ao ácido xiquímico, composto que dá o nome à via. Posteriormente, o ácido xiquímico, por

fusão com outra molécula de fosfoenolpiruvato, vai dar origem ao ácido corísmico, precursor dos três aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina. A maioria dos compostos fenólicos nas plantas provém da fenilalanina, que numa reacção de desaminação, vai dar origem ao ácido cinâmico. Esta reacção é catalisada pela enzima fenilalanina amoníaco liase (PAL), cuja expressão é fortemente regulada e aumenta consideravelmente em resposta a stresses. Adicionalmente, existem múltiplos genes codificantes para esta enzima, cuja expressão poderá variar consoante o tecido e as condições ambientais em que a planta se encontra. Reacções subsequentes à catalisada pela PAL, vão dar origem aos diversos grupos de compostos fenólicos, quer por adição de novos grupos funcionais, quer por reacções de polimerização [14].

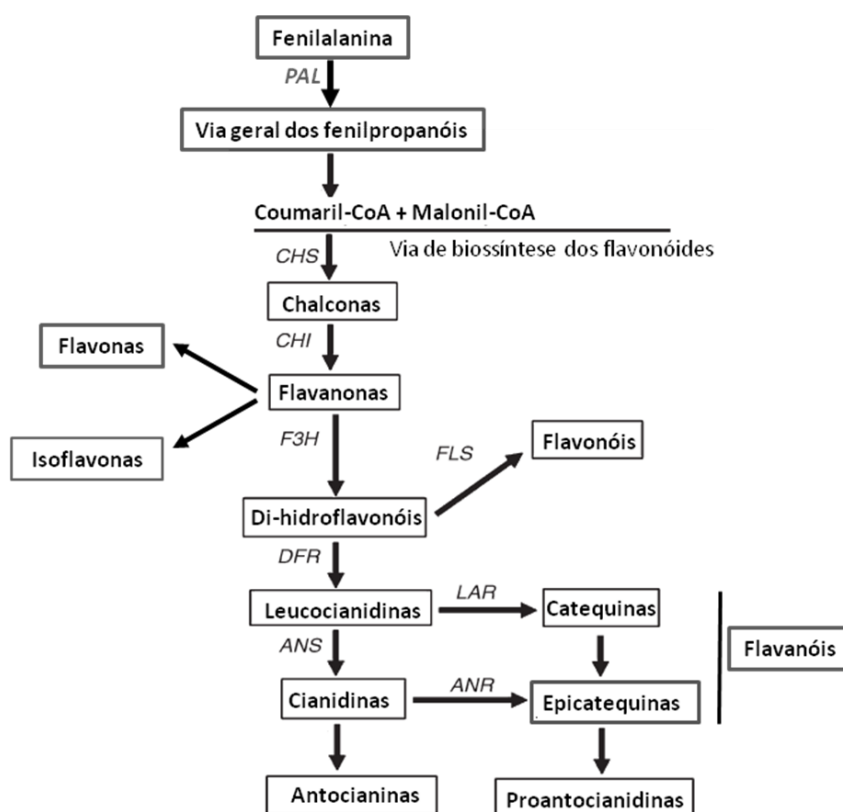
A classificação dos compostos fenólicos nos seus diferentes subgrupos é feita em função do número de anéis fenólicos que possuam e dos elementos estruturais que se ligam a esses anéis e entre eles [17]. Os ácidos fenólicos, composto muito simples, incluem os derivados do ácido cinâmico e os derivados do ácido benzóico. O conteúdo em ácidos hidroxibenzóicos nas plantas é geralmente reduzido, com excepção de alguns frutos, rábano negro e cebolas. O chá e o vinho são também uma importante fonte de ácido gálico, um dos mais importantes compostos deste grupo. Adicionalmente, os ácidos benzóicos são também importantes componentes estruturais de moléculas mais complexas, como os taninos hidrolisáveis. Os ácidos hidroxicinâmicos, bastante mais comuns que os ácidos hidroxibenzóicos, raramente se encontram na forma livre, mas ocorrem frequentemente sob a forma de ésteres glicosilados. Entre os ácidos cinâmicos mais abundantes encontram-se o ácido cafeico, presente em bastantes frutos, o ácido ferúlico, muito abundante em grãos de cereais, e o ácido clorogénico (um éster de ácido cafeico e quínico), presente em alguns frutos e muito abundante no café [17].

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos nas plantas, abrangendo cerca de metade dos 8 mil compostos fenólicos que ocorrem na natureza [18]. A estrutura química geral dos flavonóides encontra-se representada na Figura 1.



**Figura 1** – Esquema representativo da estrutura geral dos flavonóides, caracterizada pela presença de 2 anéis aromáticos (A e B), ligados por uma ponte de 3 átomos de carbono que formam o anel heterocíclico oxigenado (C). (Imagem adaptada de [19])

Consoante as variações no anel heterocíclico, também eles podem ser agrupados em diversas subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas, flavanonóis e antocianidinas (Figura 2). Substituições nos anéis A e B dão origem a diferentes compostos dentro de cada classe. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação [18]. Reacções como a glicosilação tornam os flavonóides mais solúveis em água e permitem o seu armazenamento no vacúolo celular, onde são geralmente encontrados nas plantas.



**Figura 2** – Esquema representativo da via biossintética das classes de flavonóides. As principais enzimas representadas desta via biossintética são: fenilalanina amoníaco liase (PAL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), di-hydroflavonol-4-redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), antocianidina sintase (ANS), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina redutase (LAR). (adaptado de Menezes *et al.* [20] e Winkel-Shirley [21])

Os flavonóis são compostos amplamente distribuídos pelas plantas superiores, onde ocorrem normalmente na forma de glicósidos, em folhas e outras partes aéreas das plantas. Caempferol e quercetina são flavonóis que são geralmente dominantes em frutos de rosáceas, como morangos, framboesas e amoras [16].



As flavanonas encontram-se nos tomates e plantas aromáticas como as mentas, onde estão geralmente presentes em pequenas quantidades [17]. Já em frutos de *Citrus*, como o limão e a laranja, podem ser encontradas em grandes quantidades [16].

As flavonas, exibindo uma menor variedade e abundância, têm como principais representantes glicósidos de luteonina e apigenina, presentes na salsa, aipo e citrinos [16,17].

As isoflavonas, com uma estrutura semelhante à dos estrogénios, possuem propriedades pseudo-hormonais, como a capacidade de se ligarem a receptores de estrogénios, sendo, por isso, classificadas como fitoestrogénios. São encontradas quase exclusivamente em plantas leguminosas como a soja [17].

Os flavanonóis são também conhecidos como di-hidroflavonóis e ocorrem frequentemente associados a taninos na madeira [15].

As unidades monoméricas de flavanóis, mais conhecidas como catequinas, são encontradas em diversos tipos de frutos (encontrando-se em abundância no damasco), vinho tinto, chocolate e chá verde. Catequina e epicatequina são os principais flavanóis nos frutos, enquanto galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina encontram-se predominantemente em certos tecidos de leguminosas e, principalmente, no chá [17]. Ao contrário dos outros flavonóides, estes encontram-se geralmente na forma de aglicona, em vez da forma glicosilada [16]. Quando presentes na forma dimérica, oligomérica ou polimérica, estes compostos são denominados de proantocianidinas ou taninos condensados. Tal como os restantes grupos de taninos (taninos hidrolisáveis e taninos complexos) possuem a capacidade de se ligarem e precipitarem proteínas, como as existentes na saliva [15]. São encontradas em frutos, como uvas, pêsegos, maçãs, pequenas bagas, pêras, kaki, em bebidas, como vinhos, cidra, chá, cerveja, e ainda no chocolate, onde são responsáveis pela sua adstringência [22].

As antocianinas são pigmentos glicosilados que se encontram dissolvidos no vacúolo das células de tecidos epidermais das flores e frutos, onde dão geralmente origem às cores vermelha, rosa, azul ou roxa. Apesar de serem muito instáveis na forma aglicona (antocianidinas), quando glicosiladas são bastante estáveis e resistentes à luz, pH e condições de oxidação [17]. Estas moléculas podem ainda encontrar-se aciladas, quando um ácido orgânico, como o ácido cafeico, ferúlico ou cumárico, se encontra esterificado ao açúcar [15].

### **1.5. Função dos Compostos Fenólicos nas Plantas**

Como organismos imóveis, as plantas necessitaram de produzir um vasto repertório de substâncias com significado adaptativo de forma a sobreviverem nos diferentes nichos ecológicos terrestres. Estas substâncias, genericamente denominadas metabolitos secundários, têm essencialmente funções de defesa (contra herbívoros, micróbios, vírus ou plantas competidoras), de sinalização

(atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes), de protecção da radiação ultravioleta (UV) ou de oxidantes [15].

No seu ambiente natural, as plantas estão expostas à radiação ultravioleta-B (280 a 320 nm) do Sol, a qual afecta negativamente não só o DNA, mas também proteínas e membranas, levando a uma alteração do metabolismo pela produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Com o intuito de se protegerem desta radiação, as plantas sintetizam compostos fenólicos que actuam quer absorvendo a radiação nas camadas epidérmicas dos tecidos, quer regulando o sistema antioxidante nas células ou no próprio organismo [15]. A hipótese da função protectora dos compostos fenólicos contra a radiação UV é suportada pelo aumento do conteúdo em flavonóides em plantas expostas a forte radiação UV [23]. Monici e colaboradores [24] demonstraram que os flavonóides pelargonidina e caempferol actuam como fotoprotectores, sendo que o primeiro actua como dissipador de ROS, enquanto o segundo actua como protector da radiação UV.

Uma função importante dos compostos fenólicos, principalmente atribuída aos flavonóides, é a de actuarem como sinalizadores visuais (pigmentos) em flores para atrair animais polinizadores e em frutos para atrair dispersores de sementes [15].

Diversos compostos fenólicos são produzidos pelas plantas de forma a resistirem a ataques de herbívoros ou agentes patogénicos. A produção destes compostos pode ser constitutiva, mesmo em plantas saudáveis e tem como objectivo proteger as plantas de ataques de uma vasta gama de potenciais atacantes. Pelo contrário, os compostos defensivos induzidos, são produzidos em resposta a um stresse biótico e estão geralmente restringidos ao tecido danificado [15]. Nicholson e seus colaboradores [25,26] demonstraram que quando exposta a um eliciador, como um fungo não patogénico, a planta sorgo (*Sorghum bicolor*) reduz a síntese de antocianinas e aumenta a da fitoalexina 3-desoxiantocianidina, especificamente em redor do tecido eliciado. Defesas induzidas localmente restringem os agentes patogénicos ao local de infecção por um processo chamado resposta hipersensitiva, que causa necrose e morte celular do tecido infectado [15]. As plantas possuem também a capacidade de enviar moléculas voláteis sinalizadoras a partir do local de infecção, que são translocadas para outras partes da planta, ou mesmo para outras plantas, onde vão induzir reacções defensivas. O ácido salicílico foi considerado uma das principais moléculas sinalizadoras endógenas que despoleta o sistema defensivo da planta, num mecanismo designado por resistência sistémica adquirida, que confere uma protecção duradoura contra uma vasta gama de microrganismos [27]. Para além do ácido salicílico, outras moléculas foram também demonstradas como eliciadores da produção de polifenóis, como o jasmonato e o metiljasmonato ou o etileno [28].

Quando sujeitas a stresses ambientais, como elevada intensidade luminosa, temperaturas extremas, seca, salinidade elevada, herbicidas ou deficiências minerais, há uma desregulação entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e o sistema antioxidante, ocorrendo stresse oxidativo [29]. As plantas possuem diferentes propriedades antioxidantes, dependendo do seu conteúdo em moléculas antioxidantes, o que por sua vez é condicionado pelo genótipo da planta e condições ambientais [30]. Foi sugerido que os polifenóis actuem nas plantas como antioxidantes, dissipando os ROS [31]. No entanto, esses resultados têm sido um pouco contraditórios, sendo que por vezes se verifica um aumento do conteúdo de polifenóis, como em *Hypericum brasiliense* em resposta stresse de seca, hipóxia, e temperaturas baixas em simultâneo com elevada luminosidade [32]; já em batata doce (*Ipomoea batatas*), em situações de stresse hídrico, tanto de seca como encharcamento, foi descrita uma redução do conteúdo em polifenóis e da sua actividade antioxidante [30].

#### **1.6. Espécies Reactivas de Oxigénio e Actividade Antioxidante dos Polifenóis**

Se, por um lado, o oxigénio molecular é essencial para a vida aeróbia, funcionando como o último aceitador de electrões na cadeia respiratória e permitindo, assim, a formação de energia na forma de ATP e a reoxidação do NADH e FADH<sub>2</sub>, por outro lado, em situações de stresse, há um desacoplamento do fluxo de electrões que pode conduzir à formação de ROS [31]. Há diversos tipos de ROS, sendo todos eles moléculas ou partes delas com elevada reactividade. Os radicais derivados do oxigénio ou espécies reactivas de oxigénio representam a classe mais importante de radicais geradas nos sistemas vivos [33]. O radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), com uma semi-vida de  $10^{-9}$  s e o radical alcóxido ( $\text{RO}\cdot$ ), com uma semi-vida de alguns s, são os mais reactivos e atacam moléculas muito próximas do seu local de formação. Juntamente com o anião superóxido, lípidos hidroperóxidos e óxido nítrico, menos reactivos, formam a classe dos ROS radicais. A classe dos ROS não-radicaais é constituída pelo oxigénio singleto ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) [31]. Os ROS podem ser gerados exogenamente ou produzidos intracelularmente, a partir de diversas fontes, como mitocôndrias, peroxissomas, lipoxigenases, NADH oxidase, citocromo P450, entre outros [34,35].

Sendo produtos normais do metabolismo celular, por vezes os ROS são produzidos especificamente com determinadas funções biológicas, como a produção de energia, fagocitose, produção de compostos, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular [31]. Se os efeitos benéficos ocorrem quando os ROS são produzidos em concentrações baixas ou moderadas, os efeitos nocivos ocorrem quando há uma sobreprodução destes ou um défice de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Ou seja, o stresse oxidativo resulta de uma alteração do estado de equilíbrio entre reacções pro-oxidantes e antioxidantes nos organismos [33]. Em concentrações elevadas os ROS

podem ser extremamente prejudiciais atacando outras moléculas e causando oxidações em lípidos das membranas celulares, enzimas e proteínas nos tecidos, hidratos de carbono e DNA [31].

O dano oxidativo, no Homem, é considerado uma das principais causas do envelhecimento e um precursor de diversas doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares, cataratas, cancro, diabetes e doenças neurodegenerativas (Alzheimer, doença de Parkinson), entre outras [36-38]. No entanto, o organismo tem vários mecanismos antioxidantes de defesa contra os ROS que incluem enzimas (como catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase, e glutathione peroxidase), moléculas endógenas que podem funcionar como antioxidantes (ácido úrico, glutathione, albumina, proteínas contendo grupos –SH e bilirrubina), algumas vitaminas (ácido L-ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol) e carotenóides [39].

Para além destes mecanismos endógenos, moléculas antioxidantes presentes nos alimentos vegetais podem ajudar a diminuir o dano oxidativo, quer actuando directamente sobre ROS quer estimulando sistemas defensivos endógenos [40]. Os polifenóis têm sido descritos como possuindo elevada actividade antioxidante *in vitro*, por medição da sua capacidade para aprisionar radicais livres e reduzir outros compostos, conseguindo ser mais eficazes que as vitamina C e E [40,41]. Devido à sua estrutura química, os grupos fenólicos dos polifenóis podem aceitar um electrão ou protão e formar radicais fenólicos relativamente estáveis, impedindo as reacções de oxidação em cadeia nos compartimentos celulares [40]. Assim, um consumo elevado de frutos e vegetais, alimentos caracterizados como ricos em substâncias antioxidantes, poderá reduzir os danos causados pelos ROS no organismo [39].

Para além da actividade antioxidante, os polifenóis também demonstraram outras actividades potencialmente benéficas para o homem. Vários estudos animais demonstraram que o consumo de polifenóis limita o desenvolvimento de lesões ateromatosas e pode inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que poderá prevenir doenças cardiovasculares [40,42]. Também já foram documentados efeitos anticarcinogénicos dos polifenóis em animais. Yang e colaboradores demonstraram que quando administrados a ratos, os polifenóis são agentes protectores e reduzem o número e crescimento de tumores induzidos por agentes carcinogénicos ou implantação de células cancerígenas [43]. Também em ratos foram demonstrados efeitos hipoglicémicos de polifenóis administrados oralmente após o consumo de glucose [44].

### **1.7. Objectivo**

Recentemente, tem sido evidenciada uma ligação entre a evolução de diversas doenças Humanas e a produção de espécies reactivas de oxigénio nas células. De igual forma, tem também sido atribuído um papel protector a substâncias com actividades antioxidantes presentes em plantas que podem ser usadas na alimentação, chás ou para a produção de nutracêuticos. Com o intuito de investigar

plantas com uma elevada actividade antioxidante, o Laboratório da Biologia da Doença e do Stresse (ITQB) efectuou uma pesquisa de plantas que continham elevada concentração de compostos fenólicos. Entre as plantas estudadas, destacaram-se diversas espécies do género *Juniperus*.

O trabalho experimental apresentado e desenvolvido nesta dissertação visa o estudo do conteúdo em polifenóis e a sua correlação com a actividade antioxidante das espécies e subespécies de *Juniperus* nativas de Portugal, permitindo determinar qual a altura em que se deverá realizar a colheita de material vegetal para a obtenção de uma maior actividade antioxidante, ou a que stresses se deverão sujeitar as plantas para obter o mesmo efeito.

Assim, resumidamente, os objectivos deste trabalho foram:

- Realizar um estudo da variação anual, com colheitas mensais de cada um dos taxa de *Juniperus* em estudo, visando determinar a sua actividade antioxidante e o conteúdo em fenóis totais e flavonóides presentes em extractos hidroetanólicos.
- Realizar um estudo em que as plantas de *Juniperus* são submetidos a stresses de ordem biótica e abiótica, determinando qual o mais eficiente para induzir um aumento da actividade antioxidante e do conteúdo em polifenóis.
- Determinar a sequência de genes das enzimas da via de síntese dos compostos fenólicos e sintetizar *Primers* não degenerados para a realização de *Real Time – Polymerase Chain Reaction (PCR)*.
- Monitorização da acumulação de transcritos de genes de enzimas seleccionadas da via de biossíntese de fenóis em resposta aos stresses, por intermédio de *Real Time - PCR*.

## 2. Métodos

### 2.1. Material Biológico

Para a realização do estudo da variação anual de polifenóis, plantas de *Juniperus navicularis* Gand. foram recolhidas da zona da Comporta, *Juniperus turbinata* Guss., cujas sementes são provenientes da zona da Arrábida, foram cedidas pelo viveiro Plantas da Arrábida (um projecto envolvendo o INETI e a EDP) e as restantes plantas, *J. phoenicea* L., *J. oxycedrus oxycedrus* L. e *J. oxycedrus badia* H. Gay também foram adquiridas ao viveiro Fondo Forestal Ibérico S.L.. Estas plantas tinham todas uma idade igual ou superior a 5 anos. As plantas foram mantidas ao ar livre, sendo regadas periodicamente, e foram efectuadas colheitas mensais de cada uma, de Janeiro a Dezembro do ano de 2008, sendo posteriormente liofilizadas a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1 mbar, durante 48 h (Edwards - Modulyo), e guardadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Indução dos Stresses nas Plantas de *Juniperus*

Para a realização do estudo sobre a influência dos stresses, as plantas *J. oxycedrus badia*, *J. phoenicea* e *J. turbinata*, com dois anos de idade, foram adquiridas ao viveiro Fondo Forestal Ibérico S.L. e mantidas em vasos de plástico de  $1\text{ dm}^3$ . Os ensaios de stresse foram realizados numa câmara de crescimento (Fitoclima 700 EDTU), sendo definidas como padrão as seguintes condições: temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , humidade de 60%, intensidade luminosa de  $800\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h/8 h (luz/escuro). Todas as plantas, incluindo as controlo e as sujeitas a stresse, com excepção das utilizadas no ensaio de seca, foram regadas periodicamente à capacidade de campo, com cerca de 300 mL de água. Previamente à realização de cada ensaio, as plantas foram colocadas na câmara, em aclimação, por um período de 5 dias, no qual eram regadas frequentemente. Para a realização dos ensaios, stresse e controlos, foi sempre usado um número não inferior a cinco plantas por espécie.

A intensidade de cada stresse e o período de duração foram otimizados por intermédio de medições de fluorescência e determinação do conteúdo de clorofila das folhas, bem como pela avaliação visual das plantas. Os mesmos parâmetros foram utilizados como critério para a realização de colheitas periódicas, ao longo do período experimental.

#### 2.2.1. Stresse de Seca

No ensaio de stresse de seca, as plantas foram mantidas na câmara, em condições padrão, sem serem regadas ao longo do período experimental. O ensaio teve a duração de 20 dias para *J. oxycedrus badia*, 25 dias para *J. turbinata* e 18 dias para *J. phoenicea*, sendo que a duração foi determinada por intermédio da análise fisiológica das plantas. As condições do stress foram definidas

num ensaio preliminar, onde se verificou que a exposição prolongada das plantas a estas condições (cerca de 30 dias), induziu acentuadas modificações fisiológicas, traduzindo-se na morte das plantas.

### **2.2.2. Stresse Salino**

Para a realização do ensaio de stresse salino, as plantas foram regadas à capacidade de campo (cerca de 300 mL) com uma solução aquosa de NaCl a 250 mM. Durante os 15 dias de duração do ensaio, as plantas foram regadas com a solução salina, consoante a necessidade. Para definir a concentração salina a usar, testes preliminares foram efectuados, testando duas concentrações salinas (100 mM e 250 mM), sendo que a concentração superior induziu uma situação de stresse fisiológico mais célere e incisiva.

### **2.2.3. Stresse de Frio**

Para a realização do ensaio de exposição das plantas a um choque de frio, estas foram colocadas na câmara de crescimento a 4 °C durante 24 h, sendo depois colocadas nas condições padrão, por um período de 5 dias. Este ensaio teve por base o estudo efectuado por Oh e colaboradores [45] com plantas jovens de *Lactuca sativa*.

### **2.2.4. Eliciação com Metiljasmonato**

Para a realização da eliciação com metiljasmonato, as plantas foram pulverizadas com uma solução aquosa de metiljasmonato 5 mM em 0,1% (v/v) Tween 20. Neste ensaio foram também utilizadas cinco plantas controlo, de cada taxa, as quais foram pulverizadas com uma solução aquosa de 0,1% (v/v) Tween 20. Estas condições foram definidas em ensaios preliminares realizados anteriormente, baseados em estudos efectuados por Fäldt e colaboradores [46] e Martin e colaboradores [47] em *Picea abies*.

### **2.2.5. Determinação do Conteúdo em Clorofilas das Amostras**

A determinação das clorofilas foi realizada segundo uma adaptação do método de Arnon [48]. As folhas de *Juniperus* foram trituradas num almofariz com adição de azoto líquido para impedir a oxidação. Foi pesada 1 g de cada amostra moída e adicionado 1 mL de solução aquosa de etanol a 80% (v/v). A amostra foi agitada e centrifugada a 13000 g durante 3 min. Foi retirado o sobrenadante e foi medida a absorvência da solução no espectrofotómetro de placas (Biotek Power Wave XS) a 645 nm e 663 nm. A concentração de clorofila de cada amostra, foi determinada com recurso a fórmulas empíricas, adaptadas do método descrito por Mackinney [49].

$$C_a = (12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) / (0,606 \text{ cm} \times \text{massa de amostra})$$

$$C_b = (22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) / (0,606 \text{ cm} \times \text{massa de amostra})$$

$$C_{\text{total}} = (8,02 \times A_{663}) + (20,2 \times A_{645}) / (0,606 \text{ cm} \times \text{massa de amostra})$$

Em que  $C_a$  é o conteúdo em clorofila a,  $C_b$  é o conteúdo em clorofila b e  $C_{total}$  é o conteúdo total de clorofila (clorofila a + clorofila b), expressos em  $\mu\text{g}$  clorofila.  $\text{g}^{-1}$  peso fresco de folhas.

#### **2.2.6. Determinação do Rendimento Quântico Efectivo do Fotossistema II no Estado Adaptado à Luz ( $F'v/F'm$ )**

A determinação deste parâmetro foi efectuada com auxílio de um fluorímetro portátil (Fluorpen FP 100), sendo a medição efectuada nas folhas das plantas à luz e à temperatura de  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.3. Extração de Fitoquímicos de Matrizes Vegetais**

Para a extração dos compostos fitoquímicos do material vegetal foi efectuada uma extração hidroetanólica. Ao material vegetal, previamente liofilizado, adicionou-se uma solução de água-etanol (1:1), numa razão de  $12\text{ mL/g}$  e deixou-se em agitação, no escuro, por  $30\text{ min}$ . De seguida, centrifugou-se o homogenato durante  $30\text{ min}$  a  $2350\text{ g}$  e filtrou-se o sobrenadante, com o auxílio de filtros celulósicos de poro com  $2\text{ }\mu\text{m}$ , guardando-se o extracto obtido a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.4. Determinação do Conteúdo em Fenóis Totais**

O conteúdo em compostos fenólicos totais dos extractos foi determinado segundo o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton [50], tendo como base o uso do reagente com o mesmo nome e de ácido gálico como substância de referência. A  $235\text{ }\mu\text{L}$  de água destilada foram adicionados  $5\text{ }\mu\text{L}$  de amostra e  $15\text{ }\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu e a solução foi agitada. Após  $1\text{ a }8\text{ min}$  de espera, foram adicionados  $45\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (solução saturada) e a solução foi novamente agitada. Incubou-se a placa a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  durante  $30\text{ min}$  e foi medida a absorvência da solução no espectrofotómetro de placas a  $765\text{ nm}$ . O conteúdo em fenóis totais foi padronizado para a concentração de ácido gálico através da determinação de uma recta de calibração para este mesmo composto, e os resultados expressos em  $\text{mg}$  de equivalentes de ácido gálico (GAE).  $\text{g}^{-1}$  de peso seco de material vegetal (ps).

#### **2.5. Determinação do Conteúdo em Flavonóides**

O conteúdo em flavonóides dos extractos foi determinado segundo uma adaptação do método descrito por Michalska [51]. Foram adicionados  $25\text{ }\mu\text{L}$  de amostra a  $125\text{ }\mu\text{L}$  de água destilada e de seguida  $7,5\text{ }\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$  a  $5\%$  (m/v). Incubou-se  $6\text{ min}$  à temperatura ambiente e adicionou-se  $15\text{ }\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a  $10\%$  (m/v). Incubaram-se mais  $5\text{ min}$  à temperatura ambiente e adicionou-se  $100\text{ }\mu\text{L}$   $\text{NaOH } 1\text{ M}$ . Agitou-se e mediu-se a absorvência da solução no espectrofotómetro de placas a  $510\text{ nm}$ . O conteúdo em flavonóides foi padronizado para a concentração de catequina hidratada (98%), também através da determinação de uma recta de calibração, sendo os resultados expressos em  $\text{mg}$  de equivalentes de catequinas (CE).  $\text{g}^{-1}$  ps.



## 2.6. Determinação da Actividade Antioxidante

O estudo da actividade antioxidante dos extractos foi baseado na capacidade dos compostos em solução de capturar espécies reactivas de oxigénio. Há uma elevada diferença de reactividade entre os diferentes ROS e as moléculas biológicas, variando assim também a função que os diferentes ROS têm *in vivo* [31]. O facto de reacções entre diferentes oxidantes e antioxidantes terem diferentes constantes de velocidade, a capacidade antioxidante medida para diferentes ROS também deverá variar [31,52]. Isto sugere a importância de determinar a actividade antioxidante dos extractos para diferentes tipos de ROS. Nesta experiência pretendeu-se assim determinar a actividade antioxidante dos extractos contra os radicais peroxilo e hidroxilo.

- A determinação da capacidade antioxidante para o radical peroxilo foi efectuada através do método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), segundo uma adaptação ao descrito por Huang *et al.* [53]. Este método baseou-se na capacidade protectora dos polifenóis contra a degradação da FL (*fluorescein disodium*) pelo radical peroxilo. A reacção consistiu na adição de 25 µL de extracto ou substância padrão a 150 µL de FL com uma concentração de  $2 \times 10^{-7}$  mM e posteriormente de 25 µL de 153 mM AAPH (*2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride*) (gerador de radicais). Todas as soluções foram preparadas em PBS (*phosphate saline buffer*). Foram efectuadas medições da fluorescência da mistura a cada minuto por um período total de 30 min, com um comprimento de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 528 nm, com o leitor de fluorescência de placas (FLx600™, Biotek). Como substância de referência foi utilizado o ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), com concentrações entre 0 e 50 µM. Os valores finais de actividade antioxidante foram calculados com uma equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área sob a curva obtida, sendo o resultado final expresso em µmol de equivalente de Trolox (TE). g<sup>-1</sup> ps.

- A determinação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxilo foi testada segundo a adaptação a dois métodos, o método HOSC (*Hydroxyl Radical Scavenging Capacity*) e o método HORAC (*Hydroxyl Radical Averting Capacity*).

- O método HOSC, descrito por Wang *et al.* [54] baseou-se na capacidade do extracto em impedir a degradação da FL pelo radical hidroxilo. A reacção consistiu na adição de 20 µL de amostra ou substância de referência a 115 µL de FL, com uma concentração de  $3,3 \times 10^{-6}$  M e preparado com PBS (75 mM). De seguida adicionaram-se 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,199 M) e 41 µL de FeCl<sub>3</sub> (3,43 mM), que iria reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e gerar os radicais hidroxilo. Como substância de referência foi usado o Trolox com concentrações entre 0 e 100 µM. Todas as soluções foram preparadas em PBS, mas também foi testada a dissolução do Trolox em 50 % (v/v) de acetona. Foram efectuadas medições da fluorescência da reacção a cada minuto por um período de 3 h, com um comprimento de onda de

excitação de 485 nm e emissão de 535 nm, sendo utilizado o leitor de fluorescência de placas. Os valores finais de actividade antioxidante foram calculados da mesma forma que o ensaio descrito anteriormente e foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox (TE).  $\text{g}^{-1}$  ps.

- O método HORAC foi efectuado segundo uma adaptação do descrito por Ou e colaboradores [55] e também se baseou na degradação da FL pelo radical hidroxilo, sendo que desta vez a formação do radical seria induzida por cobalto (II) em vez de ferro (III). A reacção consistiu na adição de 10  $\mu\text{L}$  de amostra ou substância de referência a 180  $\mu\text{L}$  de FL ( $2 \times 10^{-7}$  M). Esta solução foi incubada a 37 °C por 10 min e adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,1 M) e 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{CoF}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $1,57 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) dissolvida em PBS e ácido picolínico ( $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Medições da fluorescência foram efectuadas com um comprimento de onda de excitação de 493 nm e de emissão de 515 nm. A substância de referência usada para este ensaio foi o ácido cafeico, com concentrações entre 0 e 600  $\mu\text{M}$ . Os valores de actividade antioxidante foram calculados novamente pela equação de regressão entre a concentração da substância de referência e a área sob a curva, sendo expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de ácido cafeico (CaE).  $\text{g}^{-1}$  ps.

## **2.7. Determinação da Acumulação de Transcritos de Genes Codificante para as Enzimas da Via de Síntese dos Polifenóis por *Real Time* – PCR**

### **2.7.1. Extracção de RNA**

Para a extracção de RNA foram testados três métodos, os quais sofreram adaptações para o material em estudo, no sentido de determinar qual o mais eficiente: o método de Chang *et al.* [56], o método de Kolosova *et al.* [57], e o método de Wang *et al.* [58].

- O método de Chang [56] consistiu na moagem da amostra num almofariz, com o auxílio de azoto líquido, posterior adição à mesma de 2 mL de uma solução de tampão CTAB (contendo 2% (m/v) CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*), 2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 3 M NaCl, 25 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), 100 mM Tris HCl, 2% (m/v) PVP-40 (*polyvinylpyrrolidone*) e 0,4 g/L de espermidina) para cada 100 mg de amostra, seguido de agitação. O homogenato foi colocado no banho a 65 °C, por 30 min, com agitações periódicas, e posteriormente efectuou-se uma extracção com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para remoção das proteínas. Foi realizada uma precipitação do RNA com 1/4 do volume de 10 M LiCl durante a noite e o RNA precipitado foi recolhido por centrifugação (3270 g durante 30 min). Posteriormente, dissolveu-se o RNA total em SSTE (1 M NaCl, 0,5% (m/v) SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA pH 8) pre-aquecido a 37 °C, efectuou-se nova eliminação de proteínas com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e precipitou-se os ácidos nucleicos com etanol (100%) a -20 °C. O precipitado foi novamente recolhido por

centrifugação (3270 *g* durante 30 min) e, depois de seco, foi ressuspenso em água bidestilada esterilizada.

- A extracção de RNA baseada no método de Wang [58] iniciou-se com a adição da amostra moída em azoto líquido ao tampão de extracção arrefecido previamente (20 mL solução.g<sup>-1</sup> material vegetal). O tampão de homogeneização continha 200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1,5% (m/v) dodecilsulfato de lítio, 300 mM LiCl, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1% (m/v) desoxicolato de sódio, 1% (v/v) Tergitol Nonidet P-40, 1 mM ácido aurintricarboxílico, 10 mM ditioneitol, 5 mM tiureia e 2% (m/v) polivinilpolipirrolidona. Homogenizou-se a solução e colocou-se a -80 °C durante 2 h. Após descongelada num banho a 37 °C, a solução foi centrifugada (3270 *g* durante 20 min a 4 °C) e o sobrenadante recolhido, sendo-lhe adicionado 1/30 volumes de NaCH<sub>3</sub>COO (3,3 M) e 1/10 volumes de etanol 100%. A solução foi incubada em gelo por 10 min e após nova centrifugação (3270 *g* durante 20 min a 4 °C) adicionou-se novamente 1/9 volume de NaCH<sub>3</sub>COO (3,3 M) e 1/3 volume de isopropanol 100% ao sobrenadante recolhido. Após novo período de incubação a -20 °C por 2 h e centrifugação (3270 *g* durante 30 min a 4 °C), ressuspenso-se o precipitado obtido em TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 e 1 mM EDTA) e incubou-se em gelo durante meia hora. Após nova centrifugação (3270 *g* durante 30 min a 4 °C), adicionou-se 1/4 de volume de LiCl (10 M) ao sobrenadante e incubou-se a 4 °C durante a noite. De seguida, recuperou-se o precipitado novamente por centrifugação (10000 *g* durante 30 min a 4 °C) e ressuspenso-se em TE, solução à qual se adicionou 1,5 volumes de KCH<sub>3</sub>COO (5 M) e se incubou em gelo durante 3 h. Após nova centrifugação (10000 *g* durante 30 min a 4 °C) e ressuspenso do precipitado em TE, incubou-se em gelo durante 1 h e separou-se o sobrenadante por centrifugação (10000 *g* durante 30 min a 4 °C), ao qual foi novamente adicionado 1/9 do volume de NaCH<sub>3</sub>COO (3,3 M) e 2 volumes de etanol (100%). A solução foi novamente incubada a -20 °C por 2 h e separou-se o precipitado por centrifugação (10000 *g* durante 30 min a 4 °C), sendo lavado com etanol a 70% (v/v) e, depois de seco, ressuspenso em água bidestilada esterilizada.

- A extracção de RNA baseada no método de Kolosova [57], consistiu numa fusão dos dois métodos referidos anteriormente, iniciando-se com a adição da amostra moída em azoto líquido ao tampão de extracção com a mesma composição do ensaio anterior (20 mL solução.g<sup>-1</sup> material vegetal). Após vigorosa agitação, congelou-se a solução a -80 °C durante 1 h e, após descongelada, recuperou-se o sobrenadante por centrifugação (3000 *g* durante 20 min a 4 °C). Adicionou-se 1/30 do volume de NaCH<sub>3</sub>COO e 1/10 do volume de etanol a 100% à solução, sendo colocada em gelo durante 10 min. Recuperou-se o sobrenadante após centrifugação (3000 *g* durante 30 min a 4 °C) e adicionou-se 1/33,3 volumes de NaCH<sub>3</sub>COO e 0,6 volumes de isopropanol, sendo a solução colocada posteriormente a -20 °C durante 2 h. De seguida, recolheu-se o precipitado por centrifugação (3000 *g*

durante 45 min a 4 °C) e ressuspendeu-se em 8 mL de TE e 8 mL de NaCl 5M, sendo a solução colocada em gelo durante 30 min, com agitações periódicas. A solução foi incubada durante 5 min a 65 °C após adição de CTAB 10% e agitação, e foram efectuadas extracções com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para remoção de proteínas. Foi efectuada uma precipitação do RNA, durante a noite a 4 °C, com LiCl (10 M) e o precipitado recolhido por centrifugação (3000 g durante 30 min a 4 °C). Este foi ressuspendido em TE e colocado em gelo durante 1 hora, sendo de seguida adicionado 0,9 volumes de isopropanol e 0,11 volumes de NaCH<sub>3</sub>COO, e colocado a -20 °C durante 1 h. O RNA foi novamente recolhido por centrifugação (14000 g durante 30 min a 4 °C) e, após lavagem com etanol a 70% (v/v) foi ressuspendido em água bidestilada esterilizada.

Depois de obtido, o RNA foi quantificado e a sua pureza determinada, recorrendo a um espectrofotómetro (GeneQuant pro), com determinação das absorvências a 230, 260 e 280 nm. Determinaram-se, também, os rácios  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  e a concentração de RNA pela fórmula [RNA] (µg/mL) =  $A_{260} \times 40$ . Foi também determinada a sua integridade por electroforese em gel de 1% agarose em 1x tampão TAE (Tris-acetato-EDTA), corado com brometo de etídio e visualizado num transiluminador de UV, depois de “corrida” a electroforese. O tamanho molecular dos produtos obtidos foi estimado por comparação com a migração de polinucleótidos padrão, cujo tamanho é conhecido, do marcador molecular GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas) (bandas de 100 a 1000 pares de base (bp)).

### **2.7.2. Limpeza das Amostras de RNA com DNase**

Para a degradação do DNA, foi utilizada uma proporção de 1 µL de DNase (Ambion) para remover 1 µg de DNA, num volume total de reacção de 100 µL (tal como indicado pelo fabricante). Foi adicionado aproximadamente 10 a 20 µL de RNA a 0,1 volumes de turbo DnaseBuffer, numa reacção de volume de 50 µL. A solução foi incubada durante 30 min a 37 °C no termociclador e posteriormente foi adicionado 0,1 volumes de reagente de inactivação. Após incubação à temperatura ambiente durante 2 min com agitação, centrifugou-se a solução durante 5 min a 10000 g, sendo recolhido o sobrenadante.

### **2.7.3. Transcrição Reversa do RNA (RT-PCR)**

Preparou-se uma reacção inicial de 20 µL, adequada para a transcrição de 2 µg de RNA total, onde foi adicionado oligo(dT)<sub>12-18</sub> *primer*, dNTP Mix e RNA (segundo indicação do fabricante). Incubou-se esta solução a 65 °C por 5 min, sendo transferida de imediato para gelo. De seguida, adicionaram-se First-Strand Buffer e *dithiothreitol* (DTT), de forma a que a solução final contenha DTT (0,01 M), oligo(dT) *primer* (25 µg.mL<sup>-1</sup>), dNTP mix (0,05 mM), Tris-HCl (pH 8,3, ajustado à temperatura ambiente, 50 mM), KCl (75 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM) e RNA (2 µg). A mistura foi incubada a 42 °C durante 2 min.

Adicionou-se 200 U de SuperScript II (Invitrogen) e incubou-se a 42 °C durante 50 min. A reacção foi posteriormente inactivada pela incubação a 70 °C durante 15 min.

#### **2.7.4. Análise de Sequências de mRNA dos Genes Pretendidos e Desenho dos Primers**

Efectuou-se uma pesquisa em base de dados, das sequências de mRNA dos genes pretendidos, para diversas plantas, sendo dada especial prioridade a sequências de *Gimnospérmicas*, por intermédio do software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Através do software Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) procedeu-se ao seu alinhamento e análise de homologia, e com o auxílio do software Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/>), previu-se os correspondentes aminoácidos codificados, de forma a observar as regiões conservadas das proteínas traduzidas. Os *Primers* degenerados foram desenhados para as regiões mais conservadas de cada gene de interesse, com o auxílio do software Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), permitindo estimar a formação de dímeros, ganchos e temperatura de ligação. Os *Primers* foram escolhidos de forma que o produto resultante do PCR tivesse um tamanho aproximado entre 200 e 500 bp.

#### **2.7.5. PCR para Amplificação dos Fragmentos Pretendidos**

A reacção de amplificação foi realizada num volume total de 25 µL, contendo 0,1 a 2 µL da reacção de RT-PCR, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 0,01 % (v/v) de Tween 20, 0,625 U *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador (Termocycler 3000 Biometra), programado para uma desnaturação inicial de 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 30 s à temperatura de emparelhamento dos *primers* com posições degeneradas, 1 minuto e 30 s a 72 °C e uma extensão final de 10 min a 72 °C;

Os produtos amplificados foram analisados num gel de 2% (m/v) agarose em 1X TAE, depois de as amostras terem corrido 1 h a 100 V, e visualizados num transiluminador de UV, depois de corados com brometo de etídio. O marcador utilizado foi GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentas). A formação de apenas uma única banda com o tamanho esperado foi tomada como critério de selecção para sequenciação.

#### **2.7.6. Obtenção dos Fragmentos de cDNA dos Genes Pretendidos para Sequenciação**

##### **2.7.6.1. Clonagem do Produto Amplificado no Vector pCRII**

A reacção de ligação entre o vector pCRII e o fragmento de mRNA do gene pretendido, decorreu num volume total de 10 µL, contendo 50 ng do vector pCRII (Invitrogen), 10 a 20 ng de produto PCR não purificado, 2,5 U T4 DNA ligase (Fermentas), 40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 5 mM ATP

(pH 7,8 a 25 °C). Incubou-se a reacção durante a noite a 22 °C e a reacção foi parada por inactivação da enzima, por desnaturação, 15 min a 65 °C, para que a sua actividade não interferisse na transformação.

#### **2.7.6.2. Transformação de Bactérias com o Plasmídeo**

Prepararam-se duas placas de Petri por transformação a efectuar, com meio LB (*Luria-Bertani media*)+agar+50 µg.mL<sup>-1</sup> Kanamicina e 1,75 mg de *Bromo-chloro-indolyl-galactopyrenoside* (X-Gal). Descongelou-se 50 µL de células competentes INVαF' (Invitrogen) em gelo durante 15 min e adicionou-se a mistura da reacção de ligação directamente às bactérias, agitando-se lentamente com a pipeta. Posteriormente, incubaram-se os tubos de Eppendorf em gelo durante 30 min e fez-se um choque térmico durante 30 s a 42 °C, voltando de seguida a colocar os tubos rapidamente em gelo. Adicionou-se 250 µL de meio SOC (2% (m/v) Triptona, 0,5% (m/v) extracto de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glucose) a cada tubo e, em seguida, colocaram-se os tubos no banho durante 1 h a 37 °C com movimento horizontal de 170 rpm. Transferiu-se 2x150 µL de células transformadas para as placas e espalhou-se, à chama. Incubaram-se as placas durante a noite a 37 °C, invertidas e, por fim, selaram-se as placas e transferiram-se para 4 °C durante 2 a 3 h para que as colónias negativas adquirissem a coloração azul, uma vez que iriam sintetizar a enzima β-galactosidase. As colónias cujo plasmídeo contenha uma inserção não iriam produzir esta enzima e apresentar-se-iam brancas.

#### **2.7.6.3. Selecção das Colónias a Multiplicar e Purificação do Plasmídeo com a Inserção**

Para a escolha das colónias transformadas, preparou-se uma placa de Petri com LB+agar+Canamicina e X-Gal, como a anterior, que serviu de placa-mãe. À chama, picaram-se colónias brancas isoladas e bem desenvolvidas (bactérias contendo o vector com o *insert*) com a ponta de uma micropipeta, picou-se numa quadrícula da placa-mãe e em seguida pipetou-se para o interior de um tubo de Eppendorf já com os restantes componentes da reacção de PCR. O meio de reacção de 25 µL continha 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 0,01 % (v/v) de Tween 20, 0,625 U *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 0,5 µM de cada *primer* (T7\_Fwd: 5'CGTAATACGACTCACTATAGG3' e M13\_Rev: 5'AGCGGATAACAATTCACACAGGA3'), 0,2 mM de cada dNTP e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. A reacção de PCR foi incubada num termociclador programado tal como descrito em 2.7.5, mas com 90 s a 72 °C nos 35 ciclos. De seguida incubou-se a placa-mãe 16 h a 37 °C e fez-se uma electroforese dos produtos de PCR em gel de 2% (m/v) de agarose em 1X TAE, sendo o gel visualizado como anteriormente descrito em 2.7.5. Observando o tamanho dos fragmentos amplificados, conseguiu-se averiguar o sucesso da transformação das colónias, por comparação com o tamanho previsto dos mesmos fragmentos.

#### **2.7.6.4. Preparação em Pequena Escala de DNA Plasmídico das Colónias Positivas e Recolha dos Plasmídios**

À chama, prepararam-se tubos para a cultura líquida de bactérias, juntando LB (2 mL por tubo) e canamicina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LB). De seguida, picaram-se as colónias positivas da placa-mãe, cada uma com um palito esterilizado, colocou-se o palito dentro do tubo com meio de cultura anteriormente preparado e colocaram-se os tubos no banho com agitação a 170 rpm, a 37 °C durante 18 h.

Transferiu-se cerca de 1,5 mL de cultura bacteriana de cada tubo, para tubos de Eppendorf e efectuou-se uma extracção do plasmídeo bacteriano através do *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante.

O DNA plasmídico obtido foi posteriormente quantificado por espectrofotometria.

#### **2.7.6.5. Análise e Selecção do DNA Plasmídico a ser Amplificado para Sequenciação**

Fez-se uma amplificação por PCR das sequências de mRNA dos genes em estudo, inseridas no vector, sendo utilizados os *primers* T7\_Fwd e M13\_Rev, e visualizou-se o produto obtido por electroforese, segundo o procedimento anteriormente descrito.

Fez-se a digestão dos produtos de PCR com EcoRI (Fermentas), numa reacção contendo 8  $\mu\text{L}$  de produto PCR, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5 a 25 °C), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM NaCl, 0,002% (v/v) Triton X-100, 0,01  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  albumina de soro bovino (BSA) e 10 U de EcoRI, num volume total de 12  $\mu\text{L}$ , e deixou-se a digerir durante a noite a 37 °C. Os produtos digeridos foram separados por electroforese e visualizados tal como descrito em 2.7.5. A digestão enzimática dos produtos de PCR serviu como indicador adicional de que os fragmentos obtidos eram os correctos, por comparação com a previsão informática, através do software Tair (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>). Para tal, utilizou-se uma sequência conhecida de cDNA do gene de uma espécie evolutivamente próxima dos *Juniperus*.

#### **2.7.6.6. Sequenciação e Análise das Sequências**

A sequenciação dos fragmentos foi realizada pela empresa STAB Vida, com os iniciadores específicos do vector (T7 *forward* e M13 *reverse*). Foram também sequenciadas as 2 cadeias em cada fragmento. As sequências obtidas foram analisadas com recurso ao software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas recorrendo ao software Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). As análises de homologia foram efectuadas recorrendo ao software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Recorreu-se ao software *reverse complement* ([www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)) para obter a sequência complementar invertida, quando necessário.

As sequências identificadas para os produtos transcritos permitiram determinar os correspondentes aminoácidos codificados, recorrendo ao software Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/>).

Estas sequências foram submetidas ao GenBank (no servidor da NCBI) e os correspondentes números de acesso estão indicados na Tabela 3.

#### **2.7.6.7. Desenho de Primers para Real Time - PCR**

Os *primers* para *Real Time - PCR* foram desenhados através das sequências obtidas previamente com o uso do software Beacon Designer™ 7.5 (*Primer Biosoft International*) de forma a obter produtos com um tamanho entre 80 e 200 bp.

#### **2.7.6.8. Real Time - PCR Quantitativo**

Foi efectuada extracção de RNA das amostras de acordo com o método descrito por Chang *et al.* [56], tratamento com DNase tal como descrito em 2.7.2 e a transcrição reversa de 2 µg de RNA em 20 µL de reacção para *J. oxycedrus badia* e 300 ng de RNA em 20 µL de reacção para *J. phoenicea*.

O *Real Time - PCR* foi efectuado por intermédio de um sistema iCycler iQ (Bio-Rad). Cada reacção consistiu em 10 µL de 2x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1 µL de cDNA de amostra diluído 10x, e 0,5 mM de cada *primer* específico do gene, num volume final de 20 µL. Foi utilizado um programa consistindo em: activação inicial da polimerase: 95 °C, 3 min; 35 ciclos a 94 °C, durante 10 s; 60 °C por 20 s; 72 °C por 30 s. A eficiência foi determinada por comparação de valores padrão determinados experimentalmente e com os valores teoricamente esperados por séries de diluições (entre 1 e 1000 vezes) de uma mistura de cDNA das amostras utilizadas. Todas as reacções foram efectuadas em triplicado.

Como controlos internos para normalização foram utilizados os genes EF1A (*elongation factor 1-alpha*), ACT (actina) e GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

### **2.8. Análise Estatística**

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software Sigma Stat para windows versão 3.1. Para testar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostragens foi utilizada *one way analysis of variance* (ANOVA), sendo a significância definida para  $p < 0,05$ . As amostras significativamente diferentes foram submetidas ao teste de Tukey para determinar que grupos eram diferentes entre si. Diferenças significativas foram definidas como valor  $p < 0,05$ , sendo os níveis de significância indicados nas figuras por \*, \*\*, \*\*\* e ns, consoante o valor p obtido. Para testar a normalidade da amostra foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov e para testar a homogeneidade das variâncias foi usado o teste de Levine. As restantes análises estatísticas necessárias para o tratamento de dados, como as regressões, foram realizadas com o software Microsoft Office Excel 2007.



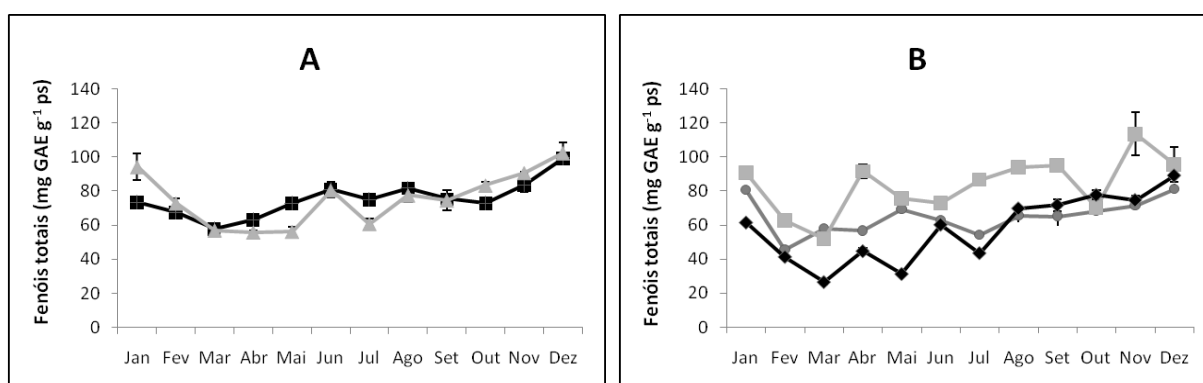
### 3. Resultados e Discussão

De forma a determinar as condições que permitam uma obtenção de elevadas quantidade de compostos fenólicos, flavonóides e actividade antioxidante dos extractos hidroetanólicos de *Juniperus*, estudou-se a variação anual destes parâmetros, sendo efectuadas colheitas mensais de plantas a crescer em vasos, ao ar livre. Sujeitaram-se os *Juniperus* a stresses de carácter biótico e abiótico, no sentido de verificar quais os que iriam conduzir a um aumento dos metabolitos pretendidos e da actividade antioxidante. Para os stresses com aumentos significativos destes parâmetros, foi também determinada a acumulação de transcritos de genes de determinadas enzimas chave na via biossintética dos compostos fenólicos. Este estudo teve como objectivo compreender as alterações na acumulação de transcritos dos genes destas enzimas, responsáveis pela diversificação da estrutura dos compostos fenólicos, em resposta a situações de stresse.

#### 3.1. Estudo Anual do Conteúdo em Fenóis, Flavonóides e Determinação da Actividade Antioxidante

##### 3.1.1. Determinação do Conteúdo em Fenóis Totais e Flavonóides

Os fenóis totais nos extractos hidroetanólicos de folhas de *Juniperus* colhidas ao longo do ano foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Figura 3 A e B).

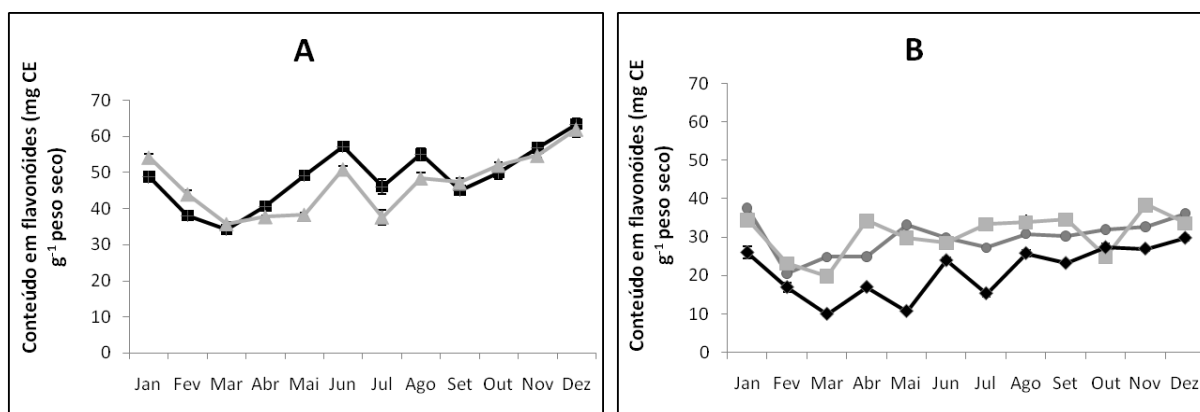


**Figura 3** – Quantificação dos fenóis totais ao longo do ano, de extracções hidroetanólicas para os taxa *J. oxycedrus oxycedrus* ■■ e *J. oxycedrus badia* ▲ (A) e *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. navicularis* ● (B), pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de ácido gálico.g<sup>-1</sup> de peso seco.

Os resultados evidenciam uma alteração do conteúdo em fenóis totais presentes em cada espécie ao longo do ano, havendo uma variabilidade evidente entre os valores dos diferentes taxa para cada mês. No entanto, verificou-se que o conteúdo em fenóis das duas subespécies de *J. oxycedrus* eram semelhantes entre si ao longo de todo o ano, apresentando uma curva muito semelhante. Apesar de

uma elevada proximidade entre o conteúdo em fenóis totais dos cinco taxa estudados, verificou-se que *J. turbinata* atingiu os valores mais elevados (113,5 mg GAE. g<sup>-1</sup> ps), contrastando com *J. phoenicea*, que atingiu os valores mais reduzidos. Foi também para *J. phoenicea* que se verificou uma maior amplitude entre os valores máximos de fenóis totais e os mínimos, na ordem dos 70%. As restantes espécies tiveram variações situadas entre os 40 e os 55%.

Os flavonóides foram quantificados por um método baseado na complexação destes compostos com o AlCl<sub>3</sub>, segundo o método descrito por Michalska e colaboradores [51]. Como substância padrão foi usada a catequina, e os resultados encontram-se representados na Figura 4 A e B.



**Figura 4** – Quantificação dos flavonóides ao longo do ano, de extracções hidroetanólicas para os taxa *J. oxycedrus oxycedrus* ■■ e *J. oxycedrus badia* ▲ (A) e *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. navicularis* ● (B), pelo método de complexação com AlCl<sub>3</sub> tal como descrito em [51]. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (CE) por g de peso seco.

Os resultados demonstram, mais uma vez, uma elevada semelhança nas variações das duas subespécies de *J. oxycedrus* ao longo do ano, atingindo os valores mais elevados (63,3 mg CE. g<sup>-1</sup> ps de *J. oxycedrus oxycedrus* e 62,0 mg CE. g<sup>-1</sup> ps em *J. oxycedrus badia*) contrastando com os de *J. phoenicea*, que voltaram a ser os mais baixos. No entanto, verificou-se uma acentuada disparidade entre os valores de flavonóides das subespécies de *J. oxycedrus*, relativamente aos restantes taxa, que apresentaram valores bastante inferiores.

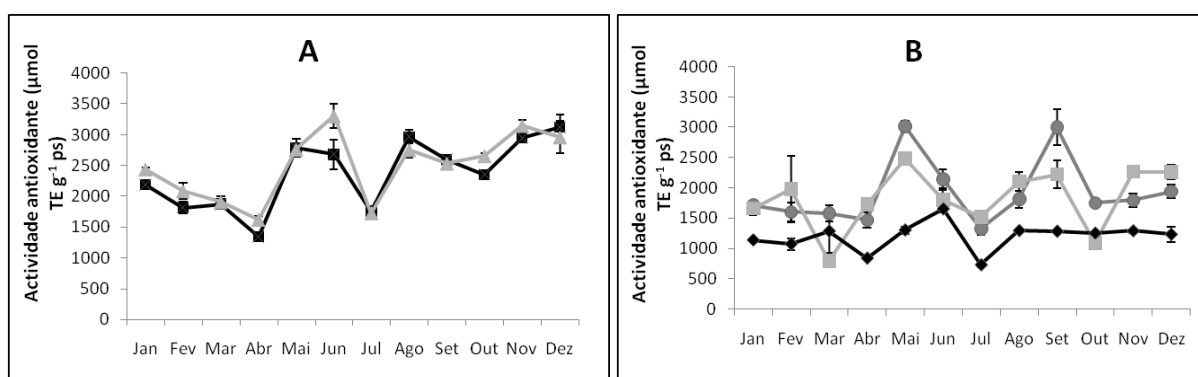
À semelhança dos valores registados para os fenóis totais, os flavonóides traduzem um padrão semelhante nos cinco taxa. Em Janeiro as suas concentrações revelaram-se elevadas e decresceram progressivamente até Março, altura em que se observou um elevado crescimento activo das plantas, e onde na maioria dos taxa estes metabolitos atingiram os valores mais reduzidos. De seguida, foi retomado o aumento do conteúdo em flavonóides, com ligeiras interrupções em alguns meses de Verão, mas voltando a aumentar novamente até Dezembro. Em todos os taxa houve uma variação de cerca de 42 a 48% entre o valor máximo de flavonóides e o valor mínimo, com excepção de *J. phoenicea* e *J. navicularis*, onde a amplitude foi superior, atingindo, respectivamente, 66% e 56%.

Esta variação na quantidade de compostos fenólicos existentes nas plantas ao longo do ano poderá ser explicada pelo carácter transitório que caracteriza alguns metabolitos nas plantas. Enquanto certos compostos são bastante estáveis e os seus níveis permanecem inalterados ao longo da vida das folhas, outros metabolitos podem ser armazenados temporariamente, para serem reactivados e utilizados quando necessário, podendo mesmo ser decompostos ou reciclados enzimaticamente [59]. Os gráficos relativos aos fenóis totais e flavonóides dos taxa de *Juniperus* em estudo, sugerem uma acumulação preferencial destes compostos durante os meses de Inverno e Verão, contrastando com o seu consumo nos meses de Outono, e especialmente, na Primavera. Esta variação sazonal do conteúdo em compostos fenólicos poderá estar relacionada com o metabolismo e armazenamento de carbono, sendo que a quantidade total de carbono na planta é potencialmente transferível entre o metabolismo primário e secundário [59]. Segundo a hipótese do balanço de nutrientes de carbono, as plantas translocam mais carbono para o metabolismo secundário quando há uma acumulação excessiva de carbono para além do que é necessário para o crescimento, como em situações de défice de nutrientes, elevada intensidade luminosa, elevada concentração de CO<sub>2</sub>, entre outras [60]. Esta disponibilidade de carbono para o metabolismo secundário poderá estar relacionada com o clima e a eficiência fotossintética das plantas em cada estação. Tendo Portugal um clima tipicamente mediterrânico, as plantas evoluíram de forma a fazer face aos constrangimentos ambientais de Verão, caracterizados por elevadas temperaturas e baixa disponibilidade de água, e consequentemente menor eficiência fotossintética [61,62]. Por outro lado as baixas temperaturas no Inverno também limitam a taxa fotossintética, confinando os meses de elevada produtividade das plantas às estações de Primavera e Outono [61,62]. Será nestes meses, onde se dará preferencialmente o crescimento de rebentos novos na planta e consequentemente haverá preferencialmente um translocação de carbono para o metabolismo primário, o que poderá explicar o défice de compostos fenólicos nos meses de Fevereiro, Março e Abril, mas também, em menor grau, nos meses de Setembro e Outubro.

### **3.1.2. Determinação da Actividade Antioxidante**

Para determinação da actividade antioxidante, nos cinco taxa de *Juniperus* em estudo, contra o radical peróxido foi utilizado o método ORAC, baseado na degradação da FL pelo radical peróxido, tendo como substância de referência o Trolox. Para determinação da actividade antioxidante contra o radical hidroxilo, dois métodos foram testados. O método HORAC, baseado na capacidade de uma substância em prevenir a formação do radical hidroxilo, induzido a partir da reacção entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Co(II), foi também determinado por degradação da FL, tendo como substância de referência o ácido cafeico; e o método HOSC, também baseado na capacidade degradativa do radical hidroxilo sobre a fluoresceína, sendo agora usado Fe(III) para reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Trolox como substância de

referência. O uso de diferentes métodos na determinação da actividade antioxidante visava compreender as diferenças da actividade antioxidante para diferentes radicais [52]. Contudo, tanto o método HOSC como o HORAC se revelaram imprecisos, demonstrando problemas de reprodutibilidade na determinação da recta de calibração para as substâncias de referência, pelo que se optou pela sua não utilização. Diversas alterações aos métodos foram testadas, como a variação da concentração da FL, ou dos compostos geradores de radicais ( $H_2O_2$ ,  $FeCl_3$  e  $CoF_2$ ), todas elas sem sucesso. Assim, apesar da importância da utilização de diferentes métodos de determinação da actividade antioxidante dos extractos, apenas o método ORAC foi utilizado, sendo os resultados demonstrados na Figura 5.



**Figura 5** – Quantificação da actividade antioxidante ao longo do ano, de extracções hidroetanólicas para os taxa *J. oxycedrus oxycedrus* —■— e *J. oxycedrus badia* —▲— (A) e *J. phoenicea* —◆—, *J. turbinata* —■— e *J. navicularis* —●— (B), pelo método ORAC, descrito em [53]. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox.  $\text{g}^{-1}$  de peso seco.

Tal como observado para os polifenóis e flavonóides, os extractos revelaram uma variação da actividade antioxidante ao longo do ano, evidenciando, de forma acentuada, diferenças entre os meses. A variação entre o valor máximo de actividade antioxidante e o valor mínimo situou-se entre 51 e 56% para a maioria dos taxa, com excepção de *J. turbinata*, com uma variação da ordem de 68%. À semelhança do que ocorreu para os polifenóis, ambas as subespécies de *J. oxycedrus* voltaram a apresentar curvas semelhantes entre si ao longo do ano, bem como os valores mais elevados ( $3307 \text{ mg GAE. g}^{-1} \text{ ps}$  em *J. oxycedrus badia* e  $3121 \text{ mg GAE. g}^{-1} \text{ ps}$  em *J. oxycedrus oxycedrus*) em relação aos restantes taxa, com excepção de *J. navicularis*, que também apresentou valores elevados. Ao contrário do que havia sucedido para os fenóis, em termos de actividade antioxidante, *J. navicularis* situou-se praticamente ao mesmo nível das duas subespécies de *J. oxycedrus*, sugerindo que o seu extracto conteria substâncias com elevada actividade antioxidante. Perante esta aparente descoordenação entre a actividade antioxidante e o conteúdo em polifenóis dos extractos de *J. navicularis*, estabeleceu-se a correlação entre a actividade antioxidante e os

métodos de quantificação de fenóis e flavonóides para cada espécie, ao longo do ano. Como se pode observar na Tabela 2, detectou-se uma correlação elevada entre o conteúdo em fenóis totais e flavonóides, para todos os taxa, sugerido pelo elevado valor do  $R^2$ . No entanto, o mesmo não se verificou entre a actividade antioxidante e o conteúdo em fenóis totais, ou entre a actividade antioxidante e o conteúdo em flavonóides ao longo do ano. Apenas para *J. oxycedrus oxycedrus* e *J. oxycedrus badia* se verificou uma correlação sigificativa, sugerida pelo valor médio do  $R^2$ . As restantes espécies, apresentaram um valor reduzido de  $R^2$ , sugerindo uma correlação muito fraca entre os polifenóis e a actividade antioxidante. Esta fraca correlação, não sendo indicativa de que os polifenóis não possuam actividade antioxidante, sugere a possibilidade de haver diversos compostos fenólicos exibindo capacidades antioxidantes muito diferentes.

**Tabela 2** – Correlação entre os parâmetros avaliados para os extractos de colheitas mensais de *Juniperus*, evidenciada pelo valor de  $R^2$ .

Correlação Taxa	ORAC/Folin	ORAC/Flavonóides	Folin/Flavonóides
<i>J. oxycedrus oxycedrus</i>	$R^2 = 0,635$	$R^2 = 0,685$	$R^2 = 0,8783$
<i>J. oxycedrus badia</i>	$R^2 = 0,431$	$R^2 = 0,5322$	$R^2 = 0,9712$
<i>J. phoenicea</i>	$R^2 = 0,081$	$R^2 = 0,0934$	$R^2 = 0,9338$
<i>J. turbinata</i>	$R^2 = 0,3672$	$R^2 = 0,3809$	$R^2 = 0,9473$
<i>J. navicularis</i>	$R^2 = 0,0915$	$R^2 = 0,1194$	$R^2 = 0,9453$

É bem sabido que os compostos fenólicos não possuem todos a mesma actividade antioxidante, pelo que um aumento de um composto não significa um aumento proporcional da actividade antioxidante [63]. Tendo em conta que está a ser feita uma avaliação de um extracto complexo é preciso também ter em conta os efeitos sinérgicos ou antagonísticos entre os diversos compostos presentes, o que torna não só, a actividade antioxidante dependente da concentração de cada composto, mas também da interacção entre os diferentes compostos, antioxidantes ou não [11]. Por outro lado, apenas está a ser determinada a actividade antioxidante para o radical peróxido, estando a ser excluída a capacidade dos compostos em reduzir outros radicais de oxigénio, ou mesmo a capacidade de quelatar metais [31,64]. No entanto, não é de excluir, também, a possibilidade de existirem outras moléculas nos extractos, que não compostos fenólicos, a afectar a sua actividade antioxidante, como por exemplo a presença de compostos terpénicos ou carotenóides [11,65]. É, assim, necessário um conhecimento mais detalhado da composição do extracto para se efectuar uma avaliação mais individualizada dos componentes que possuem actividade antioxidante.

Ao contrário do que foi observado para os compostos fenólicos, os valores máximos da actividade antioxidante situaram-se nos meses de Maio/Junho e Agosto/Setembro. Estes aumentos nos meses de Verão, poderão estar relacionados com a resposta das plantas a alterações ambientais, como os característicos aumentos de temperatura e luminosidade do Verão Mediterrânico. Nestes meses, devido a uma taxa elevada de assimilação de carbono, bem como às elevadas temperatura e luminosidade do Verão Mediterrânico, que poderão desencadear fenómenos de stresse oxidativo e produção de ROS, poderão ter sido induzida uma síntese preferencial de metabolitos com capacidade antioxidante [66,67]. Já em Julho verificou-se uma redução do conteúdo em compostos fenólicos, mas especialmente da actividade antioxidante. Tendo Julho sido considerado, pelos registos meteorológicos, o mês mais quente do ano de 2008 e a altura em que foram registadas as temperaturas mais elevadas na região de Lisboa [68], as plantas poderão ter entrado em stresse extremo devido às temperaturas elevadas. Um aumento da temperatura para valores acima da temperatura óptima de crescimento pode induzir uma redução do conteúdo em antocianinas em tecidos vegetais, não só devido a uma degradação destas moléculas, mas também devido a uma redução da sua síntese [69]. Por outro lado, uma acentuada produção de radicais livres poderá induzir uma elevada oxidação de moléculas com actividade antioxidante, que poderão perder assim essa mesma actividade. No entanto, estas não são justificações consensuais, já que diversos estudos sugerem o oposto, ou seja, que um aumento da temperatura induz a síntese, nos tecidos, de polifenóis como fenilpropanóides e flavonóides [70,71].

De forma a confirmar o perfil anual da produção dos compostos fenólicos e a excluir variações pontuais em determinados meses, devido a constrangimentos de natureza ambiental, este estudo deveria ser prolongado por um período de tempo maior.

### **3.2. Estudo da Variação do Conteúdo Fenólico e da Actividade Antioxidante em Folhas de *Juniperus* Sujeitas a Stresse**

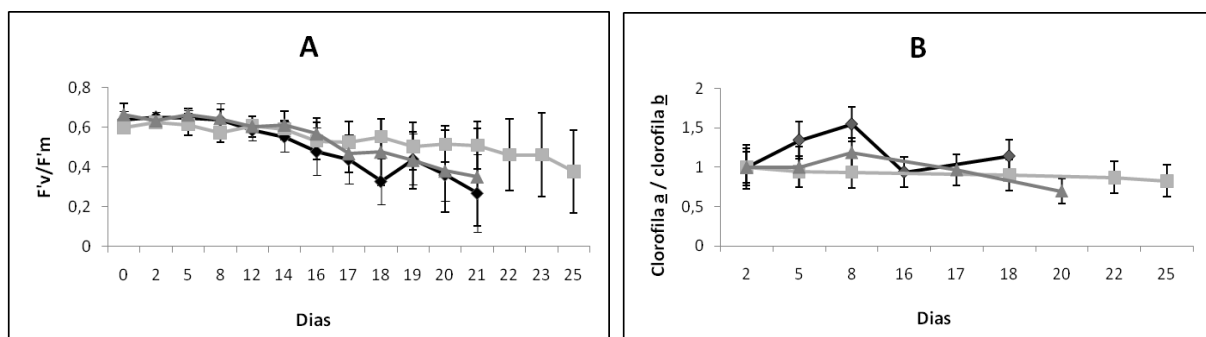
Com o estudo efectuado ao longo do ano verificou-se que há uma alteração do conteúdo em polifenóis e da actividade antioxidante dos extractos das folhas de *Juniperus* nos diversos meses, provavelmente como resposta a variações das condições ambientais. De forma a compreender melhor como reagem os *Juniperus* a situações de stresse, em termos de actividade antioxidante e especialmente, de produção de compostos fenólicos, sujeitaram-se plantas de 2 anos, de três das cinco taxa de *Juniperus*, a diferentes tipos de stresses, bióticos e abióticos. Relativamente a stresses abióticos as plantas foram sujeitas a: um período de seca, a uma elevada concentração salina, ou a um choque de frio (24 h a 4 °C). De forma a simular um stresse biótico, as plantas foram expostas ao composto metiljasmonato, descrito na bibliografia como eliciador [72,73]. Para monitorizar o grau de stresse a que as plantas estariam sujeitas, e por forma a impedir que este fosse extremo e causasse

morte das mesmas, fizeram-se medições do rendimento quântico efectivo do fotossistema (PS) II no estado adaptado à luz ( $F'v/F'm$ ) das folhas e determinou-se o rácio clorofila a/clorofila b, ambos descritos como parâmetros de monitorização de stresse [74,75]. Os taxa escolhidos para este ensaio foram *J. oxycedrus badia*, uma vez que, à semelhança de *J. oxycedrus oxycedrus*, apresentou os valores mais elevados tanto de compostos fenólicos como de actividade antioxidante; *J. phoenicea*, que dos taxa em estudo, é dos que se encontra mais disseminado fora de Portugal, sendo também um dos mais estudados, e logo, apropriado para funcionar como controlo, e por apresentar os valores mais baixos em todos os parâmetros anteriormente determinados; e ainda *J. turbinata*, que do grupo dos taxa característicos de zonas litorais, foi o que apresentou os valores mais elevados de polifenóis, embora com valores de actividade antioxidante intermédios.

Para todos os resultados de seguida apresentados, os valores foram normalizados para o valor das plantas controlo e para o ponto inicial, à excepção da determinação do  $F'v/F'm$ , cujo valor absoluto é facilmente interpretado como presença ou ausência de stresse.

### 3.2.1. Stresse de Seca

Para a realização do stresse de seca, as plantas foram mantidas na câmara de crescimento sem serem regadas, por oposição às plantas controlo, regadas periodicamente. Para *J. oxycedrus badia* este ensaio teve uma duração de 20 dias, para *J. turbinata* de 25 dias e para *J. phoenicea* de 18 dias. Foram efectuadas medições regulares da fluorescência (Figura 6 A) e do conteúdo em clorofilas (Figura 6 B), para monitorizar o estado de stresse das plantas. Os valores do rácio de clorofila a/clorofila b apresentados foram normalizados para um valor médio dos controlos e para o valor inicial. Isto permite comparar simultaneamente a resposta das plantas em stresse relativamente ao ponto inicial e ainda relativamente à resposta das plantas controlo. A variação do rácio de clorofila a/clorofila b foi determinada ao longo do tempo, sendo que o uso do seu valor médio permite a eliminação de erros fortuitos.



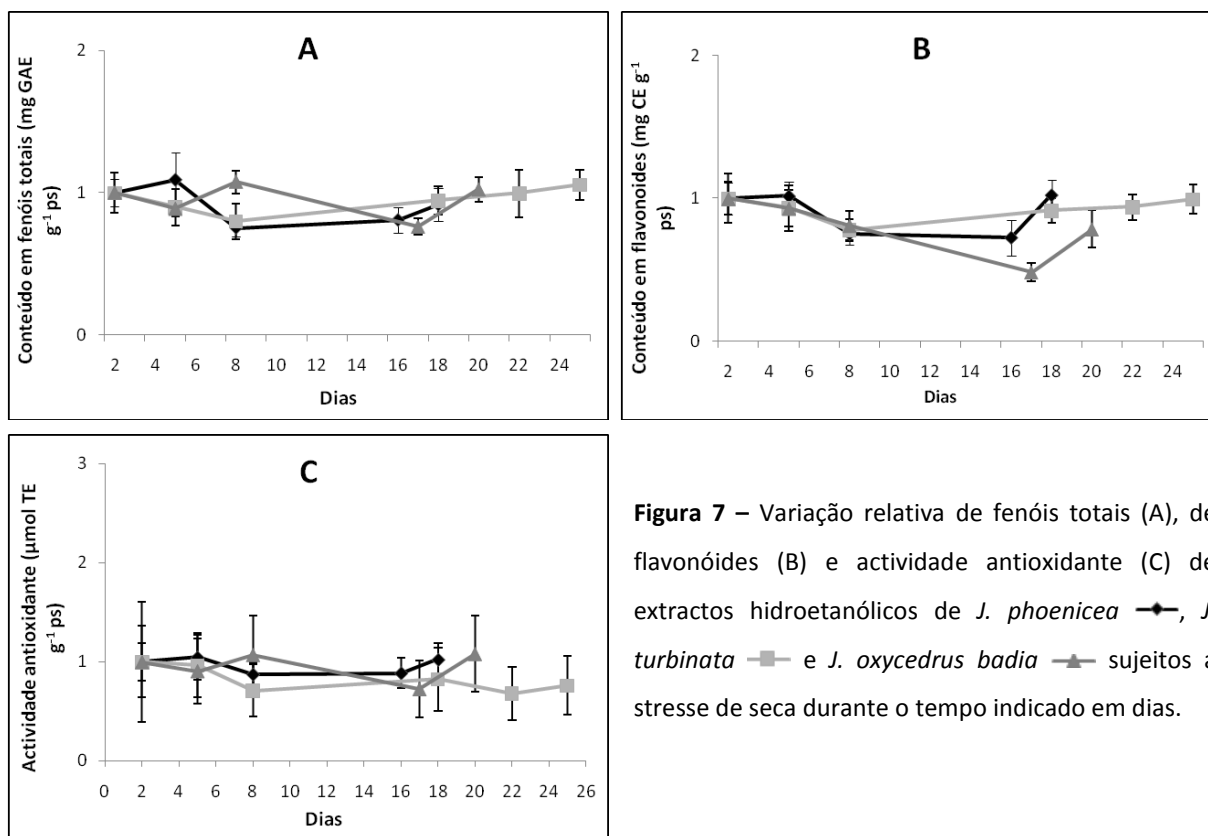
**Figura 6** – Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio de clorofila a/clorofila b (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea*  $\blacklozenge$ , *J. turbinata*  $\blacksquare$  e *J. oxycedrus badia*  $\blacktriangle$  sujeitos a stresse de seca, no tempo indicado em dias.

Para as plantas controlo, relativamente ao valor de  $F'v/F'm$ , não foram registadas alterações significativas, em comparação com o valor inicial, ao longo de todo o período experimental (dados não mostrados). Em relação às plantas sujeitas a stresse, todas as espécies decresceram significativamente o  $F'v/F'm$ , com *J. phoenicea* a ter a redução mais célere, seguida de *J. oxycedrus badia* e com *J. turbinata* a atingir este limiar ao 25º dia de stresse. Uma vez que o  $F'v/F'm$  representa uma medição da eficiência de captura de excitação pelos centros abertos do fotossistema II, esta redução pode ser interpretada como um aumento da dissipação de energia do fotossistema II sob a forma de calor e, conseqüentemente, como uma redução da eficiência de absorção de energia luminosa pelo fotossistema II [74,76]. Este parâmetro foi utilizado como um indicativo de que as plantas se encontravam em situação de stresse efectiva, determinando o momento de finalizar a experiência. Foram também efectuadas determinações regulares do conteúdo em clorofilas, através das quais foi determinado o rácio de clorofila a/clorofila b (Figura 6 B). Este parâmetro permitiu avaliar o efeito do stresse no aparelho fotossintético da planta, sendo que um decréscimo deste valor foi indicativo de uma degradação preferencial da clorofila a, o que pode ser associado à entrada das folhas no estado de senescência [77]. Relativamente à variação do rácio de clorofila a/clorofila b, para a espécie *J. phoenicea*, verificou-se uma manutenção do rácio entre o primeiro e o último ponto, com um aumento de 54% ao 8º dia. Este aumento, acompanhado de uma redução 28% do conteúdo total de clorofilas (dados não mostrados) poderia sugerir que as plantas se encontravam numa situação de perda de pigmentos de clorofila b que foi recuperada progressivamente. No entanto, estas variações não se revelaram estatisticamente relevantes (para valor  $p < 0,05$ ), o que indica que o stresse não terá desencadeado uma situação efectiva de dano no sistema fotoquímico. O mesmo se verificou para os taxa *J. oxycedrus badia* e *J. turbinata*, cujas pequenas variações não se revelaram estatisticamente significativas.

A análise do conteúdo em fenóis totais (Figura 7 A) revelou-se estável ao longo do tempo para todas as espécies, relativamente ao controlo, sendo que as pequenas variações registadas, não foram estatisticamente significativas (para um  $p < 0,05$ ). Uma excepção verificou-se apenas para a amostra referente ao 17º dia de *J. oxycedrus badia*, que revelou um decréscimo estatisticamente significativo de 24%, relativamente ao primeiro dia. Para o conteúdo em flavonóides (Figura 7 B), verificou-se a mesma tendência, uma grande estabilidade ao longo do tempo para todas as espécies, com excepção do 17º dia de *J. oxycedrus badia* que voltou a registar uma redução.

Relativamente à quantificação da actividade antioxidante (Figura 7 C), não se verificou qualquer variação estatisticamente relevante, comparativamente ao primeiro ponto, demonstrando uma grande estabilidade ao longo do período experimental.



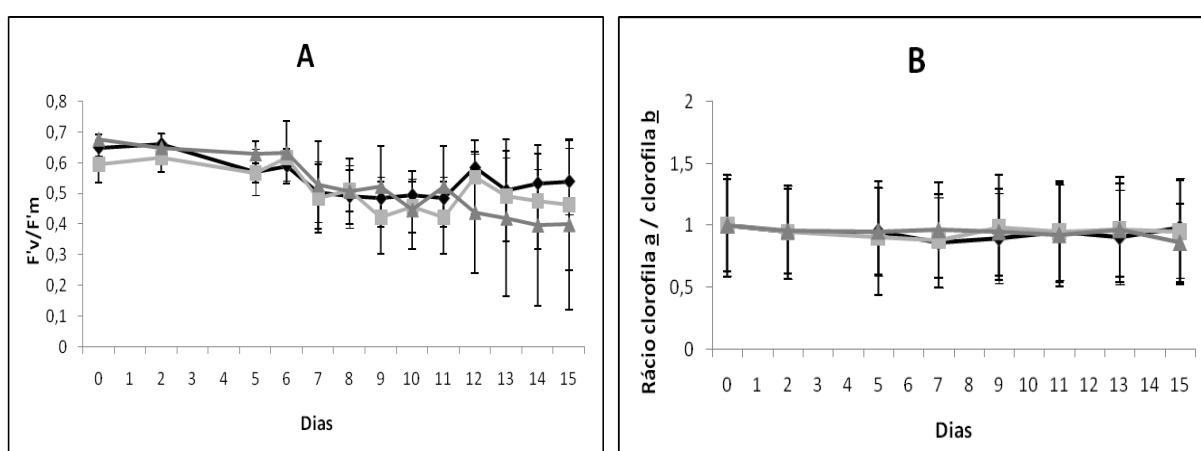


Se o rácio de clorofilas indicou que o stresse não estaria a causar dano no aparelho fotossintético, já o  $F'v/F'm$  sugeriu que o stresse estaria a causar uma redução da eficiência de absorção da energia luminosa. Segundo Nauman e colaboradores, em condições de stresse hídrico, os mecanismos de dissipação de excesso de energia deixam de funcionar eficientemente, provocando alterações nas reacções competitivas de fotoquímica, dissipação de calor e fluorescência [74]. Este processo, ocorrendo nos cloroplastos, pode levar à produção de ROS por incapacidade de dissipação da energia fotoquímica excedentária [78]. Perante esta situação, poderá ser desencadeada a síntese de substâncias antioxidantes, como compostos fenólicos (flavonóides essencialmente), para combater essa produção de ROS [78,79]. Foi também sugerido que, numa situação de stresse hídrico, a produção de metabolitos secundários pode ser favorecida por uma realocação de carbono, como consequência do abrandamento ou paragem do crescimento da planta [32]. No entanto, os resultados apresentados na Figura 7 não revelaram qualquer alteração relevante no conteúdo de compostos fenólicos totais, de flavonóides ou da actividade antioxidante, sugerindo que ou a intensidade do stresse não terá sido suficiente para desencadear estas respostas, ou outros mecanismos de resposta ao stresse de seca terão sido desencadeados. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente, como o publicado por Estiarte e colaboradores [80] que, com plantas de pimenta (*Capsicum annuum*), crescidas sob défice hídrico, verificaram que a falta de água não induziu alterações significativas no conteúdo em fenóis por comparação ao

controlo. Cheruiyot e colaboradores [81] verificaram que em variedades não tolerantes de plantas de chá (*Camellia sinensis*) sob a influência de stresse hídrico, o conteúdo em compostos fenólicos não só não aumentou, como decresceu.

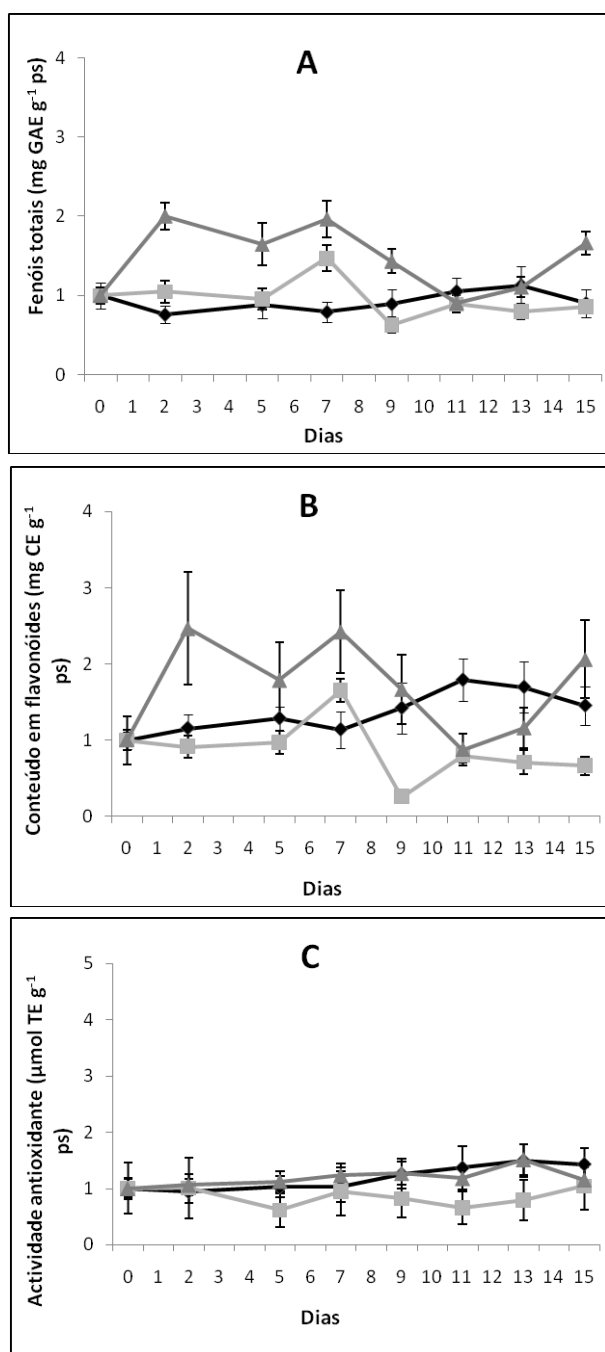
### 3.2.2. Stresse Salino

Para a imposição do stresse salino, as plantas foram regadas com uma solução salina de NaCl (250 mM) e mantidas na câmara de crescimento em condições idênticas ao controlo. Durante os 15 dias de duração do ensaio, o  $F'v/F'm$  manteve-se estável para as plantas controlo (dados não mostrados), mas relativamente às plantas em stresse decresceu acentuadamente nas três espécies, especialmente em *J. oxycedrus badia* (Figura 8 A). É também de realçar a grande variabilidade detectada entre plantas da mesma espécie, sendo que, no mesmo dia, enquanto algumas demonstravam acentuadas reduções, outras permaneciam inalteradas, mesmo nos estados mais avançados do stresse. Isto evidencia uma grande variabilidade na susceptibilidade ao stresse, mesmo entre plantas da mesma espécie, o que se traduz nos elevados valores de desvio padrão (Figura 8 A). Já relativamente ao rácio de clorofila  $a$ /clorofila  $b$  (Figura 8 B), verificou-se uma grande estabilidade deste valor em todas as espécies, ao longo do ensaio, sugerindo que este stresse não terá causado dano ao fotossistema das plantas.



**Figura 8** - Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio de clorofila  $a$  /clorofila  $b$  (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea*  $\blacklozenge$ , *J. turbinata*  $\blacksquare$  e *J. oxycedrus badia*  $\blacktriangle$  sujeitos a stresse salino com 250 mM de NaCl, durante o tempo indicado em dias.

Relativamente ao conteúdo em fenóis totais (Figura 9 A), apesar de não se terem registado alterações estatisticamente significativas em *J. phoenicea*, registou-se um aumento significativo em *J. turbinata* ao 7º dia, seguido de um decréscimo também significativo. Já em *J. oxycedrus badia* verificaram-se aumentos significativos ao 2º, 5º, 7º e 15º dia, sendo o maior valor registado ao 2º dia de ensaio. Relativamente aos flavonóides (Figura 9 B), verificaram-se aumentos do seu conteúdo em



**Figura 9** – Variação relativa de fenóis totais (A), flavonóides (B) e da actividade antioxidante (C) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* ◆, *J. turbinata* ■ e *J. oxycedrus badia* ▲ sujeitos a stresse salino com 250 mM de NaCl durante o tempo indicado em dias.

todas as espécies. Aumentos pontuais estatisticamente relevantes foram observados em *J. phoenicea* ao 11º dia e *J. turbinata* ao 7º dia, mas são seguidos de decréscimos do conteúdo. Os maiores aumentos, registaram-se novamente para *J. oxycedrus badia*, ao segundo dia, na ordem dos 147%, e ao sétimo dia, na ordem dos 142%, relativamente ao ponto inicial.

Relativamente à actividade antioxidante não se verificaram alterações estatisticamente relevantes ao longo de todo o período experimental (Figura 9 C).

Diversos estudos verificaram uma redução da condutância estomática e da fotossíntese durante o stresse salino [74,82,83]. A informação obtida quanto ao  $F'v/F'm$ , à semelhança do stresse hídrico, sugere uma redução da eficiência fotossintética, pela redução da eficiência de captura de excitação pelos centros abertos do fotossistema II [76]. A par desta redução, um aumento da dissipação térmica permite à planta responder à redução da fotossíntese e evitar danos por excesso de energia luminosa [84]. A permanência, sem alterações do rácio clorofila *a*/clorofila *b* nas três espécies de *Juniperus* também sugere uma incapacidade do stresse salino em causar dano nos fotossistemas.

O aumento do conteúdo em compostos fenólicos, especialmente de flavonóides, em *J. turbinata* e especialmente em *J. oxycedrus*

*badia*, por oposição às plantas controlo, sugere que a produção destes compostos pode funcionar como um mecanismo de resposta das plantas ao stresse imposto. Foi proposto que a redução da fotossíntese poderá causar uma sobre-redução do funcionamento da cadeia transportadora de

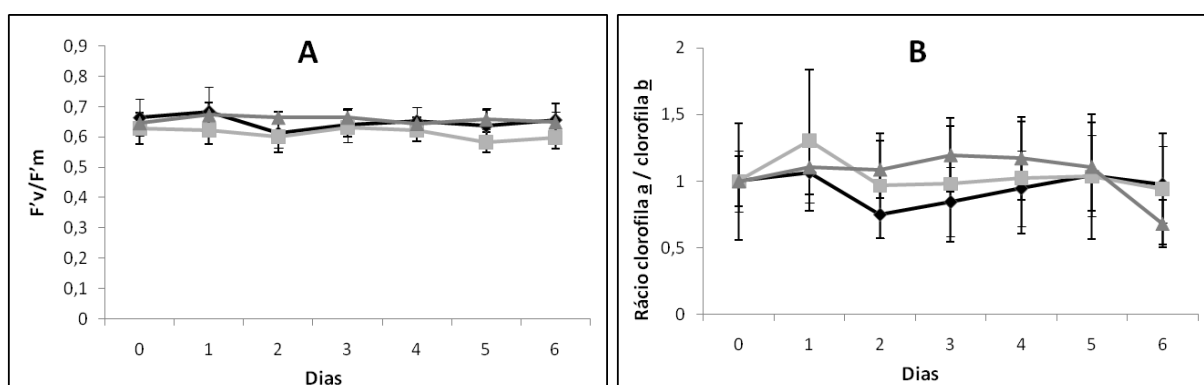
electrões, com a energia fotoquímica a ser redireccionada para um processo que favorece a produção de ROS [85]. Diversos estudos anteriores correlacionaram a sobreprodução de compostos fenólicos, particularmente flavonóides, com um aumento da actividade antioxidante nas plantas, de forma a responderem a um aumento da produção de ROS [82,85,86]. Contudo, neste estudo, o aumento da produção de compostos fenólicos observado nalguns casos, não se traduziu num aumento da capacidade antioxidante dos extractos, que permaneceu inalterada no que respeita à capacidade de captar radicais peróxido. Isto sugere que a resposta ao stresse salino em *Juniperus* poderá passar pela produção de compostos fenólicos, cuja principal função não seja o combate de espécies reactivas de oxigénio, ou pelo menos, não de radicais peróxido. De facto, segundo Beckman [87], dependendo da natureza química e localização nas folhas, os compostos fenólicos poderão exibir uma grande variedade de propriedades fisiológicas.

Ainda assim, diversos dados sugerem que a concentração salina e/ou o período de tempo do ensaio, terão apenas induzido um stresse moderado. A elevada variabilidade dos valores de  $F'v/F'm$  entre as diversas plantas da mesma espécie, sugere que apenas algumas plantas se ressentiram do stresse. Por outro lado, apenas *J. oxycedrus badia* demonstrou um aumento relevante dos compostos fenólicos e, sendo uma espécie de carácter mais continental, tenderá a ser mais sensível ao stresse salino. Pelo contrário, tanto *J. turbinata* como *J. phoenicea*, sendo espécies características de regiões litorais, poderão ser mais tolerantes à salinidade, necessitando de condições mais extremas ou prolongadas para desencadearem uma resposta. Hichem e colaboradores [85], demonstraram em milho (*Zea mays*), que uma exposição a concentrações salinas reduzidas induziu um aumento do conteúdo em polifenóis, mas não da actividade antioxidante; perante concentrações salinas mais elevadas, para além de um aumento superior do conteúdo em polifenóis, também foi induzido um aumento da actividade antioxidante. Isto sugere que para ser desencadeado um aumento da actividade antioxidante a par do aumento do conteúdo em polifenóis talvez fosse necessário usar concentrações salinas ainda mais elevadas.

### **3.2.3. Stresse de Frio**

Para a realização do ensaio de choque de frio, os *Juniperus* foram sujeitos a uma temperatura de 4 °C durante 24 h, sendo posteriormente recolocados em condições semelhantes aos controlos, na câmara de crescimento, por um período de 5 dias. Desta forma, pretendeu-se observar o efeito de um curto período de frio intenso sobre a produção de polifenóis e a actividade antioxidante dos três taxa de *Juniperus* em estudo.

Tanto ao fim do período de 24 h de tratamento de frio, como dos cinco dias seguintes a 30 °C, o valor de  $F'v/F'm$  permaneceu constante, em todos os taxa, tanto para os controlos como para as plantas sujeitas a stresse, indicando uma inalteração da eficiência de absorção de energia luminosa pelos centros de reacção, face ao stresse imposto (Figura 10 A). Um resultado similar foi observado para o rácio clorofila a/clorofila b (Figura 10 B), cujas pequenas alterações observadas não se revelaram estatisticamente relevantes (para  $p < 0,05$ ).

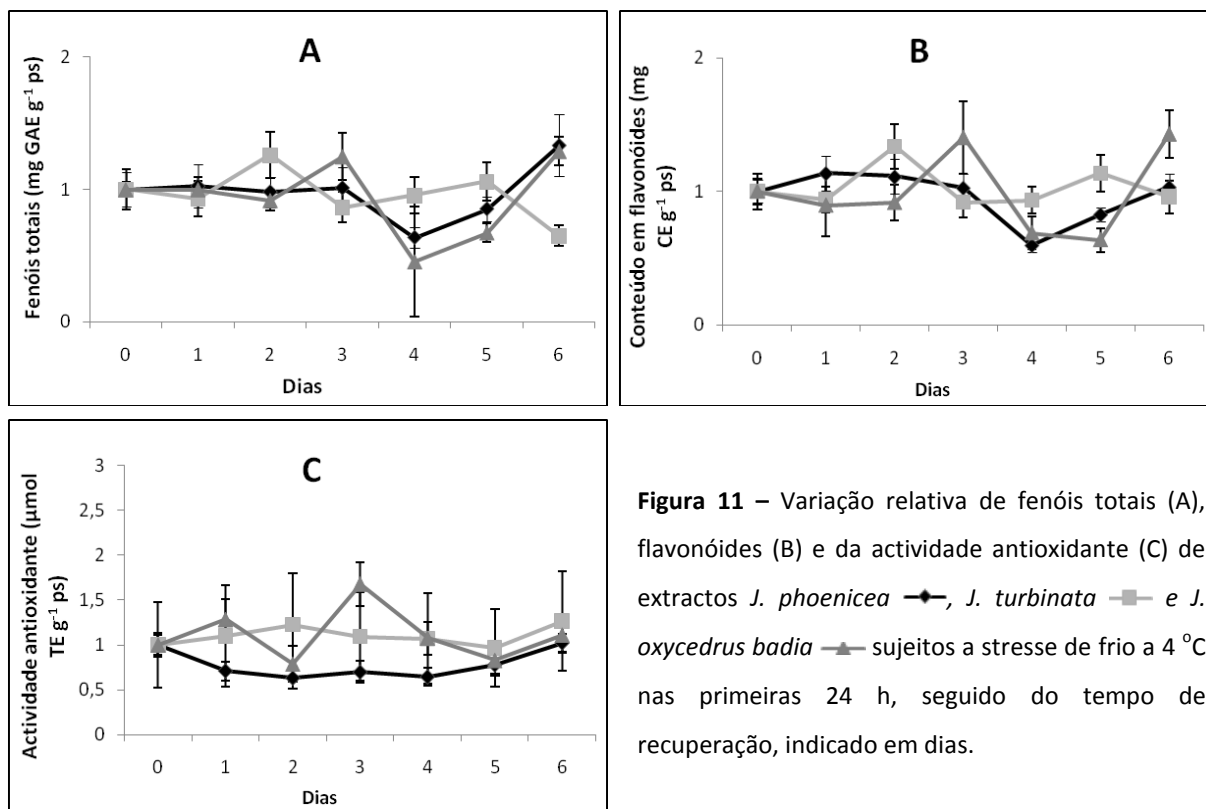


**Figura 10** - Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio clorofila a /clorofila b (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* (●), *J. turbinata* (■) e *J. oxycedrus badia* (▲) sujeitos a stresse de frio a 4 °C por 24 h, seguido do tempo de recuperação indicado em dias.

Relativamente ao conteúdo em fenóis totais (Figura 11 A), também não foram observadas alterações dignas de assinalar em todos os taxa, com excepção de uma ligeira redução pontual em *J. oxycedrus badia*, ao 4º dia de ensaio. Já para o conteúdo em flavonóides (Figura 11 B) também se verificou uma inalteração ao longo do período experimental, à excepção de duas medições pontuais registadas, uma redução no conteúdo de *J. phoenicea* ao 4º dia e um ligeiro aumento do conteúdo de *J. turbinata* ao 2º dia. Na determinação da actividade antioxidante (Figura 11 C), foram apenas observadas ligeiras alterações pontuais, nomeadamente duas reduções em *J. phoenicea*, ao 2º e 4º dias, e uma em *J. oxycedrus badia*, um aumento ao 3º dia, de cerca de 40% relativamente aos valores de actividade inicial.

Constata-se assim, que a exposição a um curto período de frio não induziu uma perturbação efectiva do aparelho fotoquímico nos *Juniperus*, quer ao nível do rendimento quântico efectivo do fotossistema II no estado adaptado à luz, quer no rácio de clorofilas, representativo de danos causados aos fotossistemas. Isto sugere uma resistência elevada dos *Juniperus* ao frio, comparativamente a outras plantas. No pinheiro (*Pinus sylvestris*), foi verificada uma elevada redução do rendimento quântico efectivo do fotossistema II em apenas 9 h de exposição ao frio [88]. Já na videira (*Vitis vinifera*), uma redução do mesmo parâmetro foi observada após exposição a baixas temperaturas nocturnas [89].

A ineficácia em causar uma situação efectiva de stresse nas plantas, traduz-se também numa incapacidade em aumentar o conteúdo em compostos fenólicos. Segundo Olenichenko e colaboradores [90], uma possível função dos polifenóis é actuarem como dissipadores de espécies reactivas de oxigénio produzidas após a redução da eficiência fotossintética, devida ao frio. No entanto, essa resposta é geralmente caracterizada pela exposição a períodos de frio mais longos, factor que poderá ser decisivo. Seria então, pertinente, uma reconstituição deste ensaio prolongando o período de exposição ao frio.



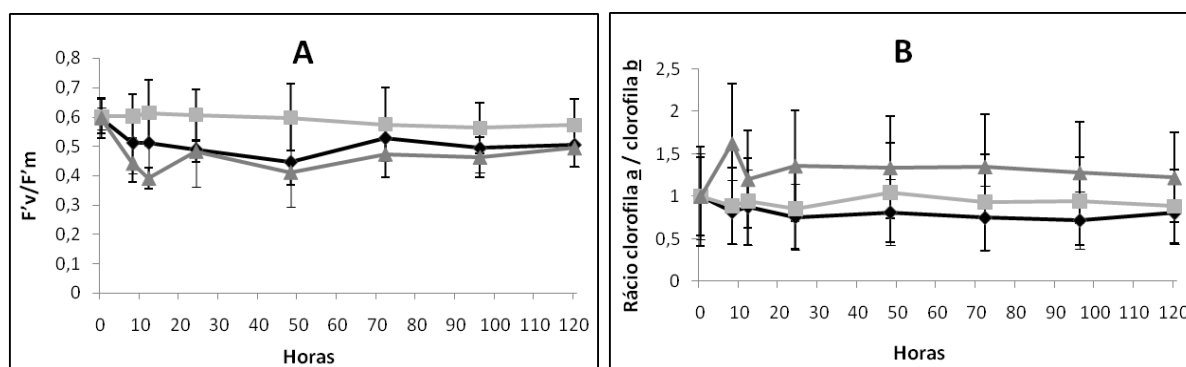
### 3.2.4. Stresse de Metiljasmonato

O presente ensaio baseou-se na administração de metiljasmonato às plantas de *Juniperus*, tendo como base as suas reconhecidas propriedades de substância estimuladora da produção de metabolitos secundários [73]. A resposta das plantas à pulverização com uma solução de metiljasmonato 5 mM e 0,1% (v/v) de Tween 20 é comparada com a das plantas controlo, que também foram pulverizadas apenas com uma solução aquosa de 0,1 % (v/v) de Tween 20. Este ensaio teve a duração de 120 h. Ao nível do rendimento quântico efectivo do fotossistema II no estado adaptado à luz, verificou-se uma acentuada redução ao fim de 8 h em *J. phoenicea* e, especialmente, *J. oxycedrus badia*, após a pulverização com metiljasmonato (Figura 12 A). Por oposição às plantas de *J. turbinata*, que mantiveram constante o valor de  $F'v/F'm$ , tanto *J. oxycedrus*

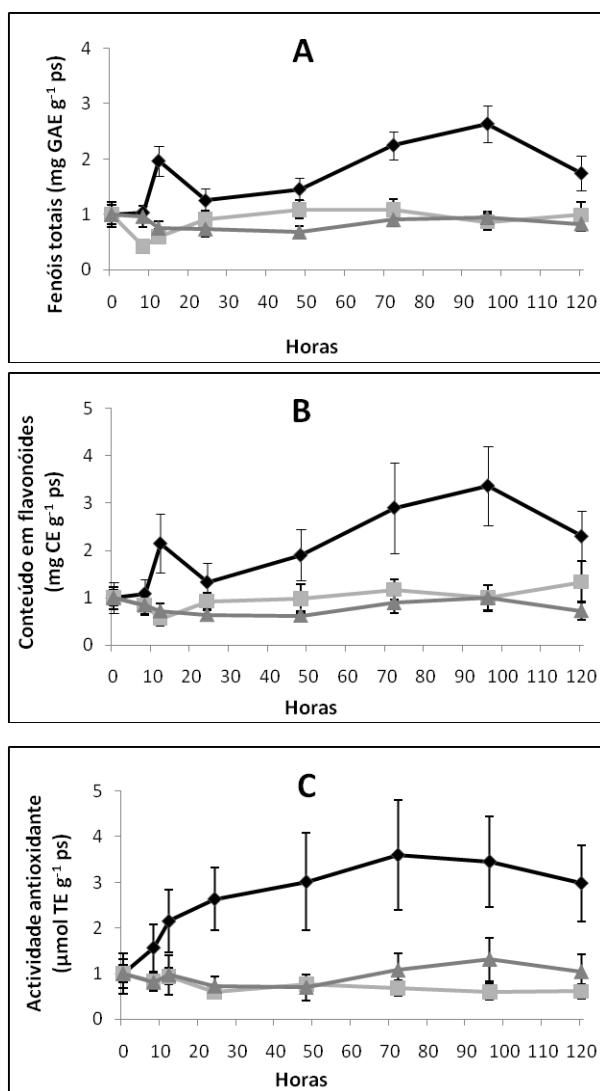
*badia* como *J. phoenicea* mantiveram a redução da eficiência de aquisição de energia luminosa pelo fotossistema II ao longo de todo o período experimental estudado. Relativamente às plantas controlo, estas também mantiveram os valores de fluorescência constantes (dados não mostrados), sugerindo que a redução da capacidade de captação de energia luminosa não seria causada pela solução de Tween 20, usada para dissolver o metiljasmonato.

Ao nível do rácio de clorofilas (Figura 12 B), verificou-se um ligeiro aumento em *J. oxycedrus badia*, às 8 h, que posteriormente volta a decrescer. Em *J. phoenicea* e em *J. turbinata* não se verificaram alterações dignas de registo, apesar de os valores se manterem sempre ligeiramente inferiores aos de *J. oxycedrus badia*. Este ligeiro aumento em *J. oxycedrus badia* será atribuído preferencialmente a uma redução do conteúdo em clorofila *b*, apesar de o conteúdo total de clorofilas ter sofrido uma redução de 61% em relação ao conteúdo inicial (dados não mostrados). Ainda assim, estas variações revelaram-se estatisticamente insignificantes (para  $p < 0,05$ ).

Tanto a clorofila como a fluorescência sugerem um efeito nocivo moderado do metiljasmonato, sentido com maior intensidade em *J. oxycedrus badia*. Diversos estudos anteriores apontam como um efeito comum do metiljasmonato uma perda de clorofilas e carotenóides e, conseqüentemente, uma redução da fotossíntese [91,92]. Esta dupla redução também proporciona as condições necessárias a um aumento do stresse luminoso, traduzido numa redução da eficiência de captura de excitação pelos centros abertos do fotossistema II, observado em *J. phoenicea* e *J. oxycedrus badia* [91].



**Figura 12** - Rendimento quântico efectivo do PS II no estado adaptado à luz (A) e variação relativa do rácio de clorofila *a* /clorofila *b* (B) de extractos hidroetanólicos de *J. phoenicea* —●—, *J. turbinata* —■— e *J. oxycedrus badia* —▲— sujeitos a pulverização de 5 mM metiljasmonato durante o tempo indicado em horas.



**Figura 13** – Variação relativa de fenóis totais (A), flavonóides (B) e da actividade antioxidante (C) de extractos *J. phoenicea* —◆—, *J. turbinata* —■— e *J. oxycedrus badia* —▲— sujeitos a pulverização de 5 mM metiljasmonato durante o tempo indicado em horas.

Em relação aos fenóis totais (Figura 13 A), não se registaram alterações estatisticamente relevantes em *J. oxycedrus badia*, mas verificaram-se aumentos do conteúdo em *J. phoenicea*. Estes aumentos, às 12, 72, 96 e 120 h, tiveram a sua expressão máxima às 96 h, com um aumento de 163% em relação ao valor inicial.

Pelo contrário, *J. turbinata* sofreu uma ligeira redução pontual do conteúdo às 8 h, sendo que posteriormente voltou a retomar os valores iniciais. Também para o conteúdo em flavonóides (Figura 13 B) só se registaram aumentos em *J. phoenicea*, sendo estatisticamente relevantes os registados às 72 e 96 h. Mas uma vez, foi às 96 h que o valor máximo foi registado, representando um aumento de 236% do valor inicial.

Relativamente á actividade antioxidante (Figura 13 C), também só foram observados aumentos em *J. phoenicea*, sendo apenas estatisticamente relevantes, os registados às 72 e 96 h. O maior valor, registado às 72 h, representou um aumento de 269% relativamente ao valor inicial. Apesar do pico da actividade antioxidante ter ocorrido às 72 h, não coincidindo com os registados para os fenóis totais e flavonóides (96 h), verificou-se uma correlação positiva e moderada entre a actividade antioxidante e o conteúdo em compostos fenólicos. Entre a actividade antioxidante e o conteúdo em fenóis totais verificou-se um  $R^2$  de 0,5205 e entre a mesma actividade e os flavonóides um  $R^2$  de 0,7102. O facto de a actividade antioxidante estar mais correlacionada com os flavonóides sugere que estes serão determinantes para a capacidade antioxidante dos extractos. Por outro lado, tal como havia sido demonstrado para o estudo anual, verificou-se uma elevada correlação entre os fenóis totais e o conteúdo em flavonóides (com um  $R^2$  de 0,967).



Assim, verifica-se que o metiljasmonato tem um forte efeito indutor da produção de compostos fenólicos em *J. phoenicea*, sendo que dos ensaios realizados, foi o que maiores aumentos induziu. Este efeito indutor do metiljasmonato foi observado em diversos estudos anteriores. Em *Arabidopsis thaliana* induziu um aumento da produção de antocianinas em células apicais, sugerindo um efeito protector contra excesso de radiação [92]. Kim e colaboradores [72], demonstraram também, para manjeriço (*Ocimum basilicum*), que a exposição das plantas ao metiljasmonato, em concentrações de 0,1 e 0,5 mM, induziu um aumento do conteúdo em fenóis totais e da actividade antioxidante. Para além de induzir a acumulação de fenóis, a concentração de metiljasmonato utilizada neste ensaio teve o adjuvante de induzir um efeito de stresse na planta sem causar grandes danos que poderiam limitar a sua sobrevivência. Estudos em pinheiro (*Pinus radiata*) mostraram um efeito indutor de resistência a doenças sem a existência de fitotoxicidade, por parte do metiljasmonato a 4,5 mM. Para concentrações amplamente superiores foi já detectada a presença de fitotoxicidade [93].

### **3.3. Quantificação da Acumulação de transcritos do Genes que Codificam Algumas Enzimas da Via de Síntese dos Polifenóis em *Juniperus* Sujeitos a Stresse**

Os ensaios apresentados permitiram determinar quais os stresses que induziram um maior aumento da quantidade de compostos fenólicos, de flavonóides e também da actividade antioxidante em três dos taxa de *Juniperus*. Destes, evidenciaram-se a capacidade do stresse salino em induzir um aumento do conteúdo em fenóis totais e flavonóides em *J. oxycedrus badia*, embora sem um aumento correspondente da actividade antioxidante, e a capacidade do metiljasmonato em aumentar não só o conteúdo em fenóis e flavonóides, mas também a actividade antioxidante de *J. phoenicea*. Assim, os pontos mais relevantes destes ensaios, onde foram observados os maiores aumentos, foram escolhidos para uma quantificação da acumulação de transcritos das enzimas envolvidas na via de síntese dos polifenóis, através de *Real Time - PCR*. Relativamente ao stresse salino foram escolhidos o 2º, 5º e 7º dia e relativamente ao metiljasmonato foram escolhidas as 8, 12, 48, 72 e 96 h, para além do ponto inicial em ambos os ensaios.

#### **3.3.1. Obtenção de Sequências Parciais dos Genes da Via de Síntese dos Polifenóis**

Ao longo da via de biossintética dos polifenóis, existem diversas enzimas consideradas chave. Muitas delas são mesmo responsáveis pela diversificação de estrutura dos compostos, sendo passos chave na síntese dos diversos grupos fenólicos. Destas, foram escolhidas as enzimas fenilalanina amoníaco liase (EC 4.3.1.5; PAL), chalcona sintase (EC 2.3.1.74; CHS), di-hidroflavonol 4-redutase (EC 1.1.1.219; DFR), flavanona 3-hidrolase (EC 1.14.11.19; F3H), antocianidina sintase (EC 1.14; ANS), antocianidina redutase (EC 1.3.1.77; ANR), leucoantocianidina redutase (EC 1.17.1.3; LAR) e flavonol sintase (EC

1.14.11.23; FLS) para quantificação da acumulação de transcritos dos seus genes, nas amostras de *Juniperus* sujeitas a stresses. Para além destas enzimas foram também escolhidos como genes de referência os genes codificantes para factor de alongamento 1-alfa (EF1A), a actina (ACT) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12; GAPDH). Uma vez que não se encontram disponíveis em base de dados, as sequências codificantes destas proteínas para os taxa de *Juniperus*, estas foram determinadas, usando ferramentas moleculares, para os taxa escolhidos (*J. phoenicea* e *J. oxycedrus badia*). Sequências de RNA mensageiro (mRNA) dos genes seleccionados anteriormente foram pesquisadas em bases de dados, para outras plantas, sendo dada particular preferência a sequências de coníferas. Com as sequências obtidas para cada gene, procedeu-se ao seu alinhamento múltiplo. As regiões de maior homologia entre as diversas sequências foram escolhidas para a construção de *Primers* com posições degeneradas, partindo do pressuposto que as zonas mais conservadas noutras espécies poderiam ser, também, mais conservadas nas espécies de *Juniperus*.

### **3.3.2. Obtenção das Sequências de mRNA Correspondentes aos Genes Escolhidos**

Para a obtenção das sequências de mRNA dos genes pretendidos foi necessário extrair RNA das duas espécies de *Juniperus* em estudo. Para tal, três métodos de extracção foram testados, os descritos por Kolosova e colaboradores [57], Wang e colaboradores [58] e Chang e colaboradores [56] (*vide* 2.7.1). Destes três métodos, apenas o descrito por Chang permitiu uma extracção de RNA de *Juniperus* com qualidade e de forma eficiente (ver imagens em Anexo II). Os restantes métodos, apesar de permitirem um rendimento elevado na extracção de ácidos nucleicos, induziram uma fonte de degradação do RNA.

Para aferir a integridade do RNA extraído, foi efectuada uma electroforese. Foi determinada a sua concentração por métodos espectrofotométricos, sendo as contaminações com DNA evitadas efectuando um tratamento da amostra com DNase (*vide* 2.7.1 e 2.7.2).

Posteriormente, procedeu-se a uma reacção de transcrição reversa do RNA para obtenção do cDNA de cada amostra, tal como descrito em 2.7.3. Foi efectuada uma reacção de PCR controlo, utilizando *Primers* do gene da ubiquitina, caracterizado como sendo muito conservado em eucariotas [94], para testar a viabilidade do cDNA, bem como possíveis contaminações com DNA.

As sequências codificante do cDNA das enzimas em estudo foram então amplificadas por PCR, utilizando os *Primers* construídos. O tamanho molecular dos fragmentos amplificados foi comparado com o tamanho esperado para os mesmos fragmentos codificantes de cada enzima, obtidos em bases de dados, no sentido de confirmar se o fragmento correcto teria sido amplificado.

### 3.3.3. Clonagem e Sequenciação dos Fragmentos dos Genes em Estudo

Após a obtenção dos fragmentos amplificados de cada gene em estudo de *J. oxycedrus badia* e *J. phoenicea*, procedeu-se ao seu isolamento, promovendo a sua ligação ao vector pCRII, e posterior transformação de bactérias para multiplicação plasmidial (*vide* 2.7.6.1, 2.7.6.2). As colónias bacterianas possuindo o plasmídeo foram seleccionadas por crescimento em meio com antibiótico e se o plasmídeo continha ou não um fragmento clonado foi constatado pela ausência de expressão da proteína  $\beta$ -galactosidase. As colónias contendo o fragmento pretendido foram seleccionadas por amplificação por PCR, sendo determinado o tamanho do fragmento por comparação com um marcador molecular (*vide* 2.7.6.3). Após o crescimento das colónias bacterianas, os plasmídeos contendo as presumíveis sequências dos genes em estudo foram extraídos e, depois de analisado o padrão de clivagem por digestão com a enzima EcoRI, foram sequenciados (*vide* 2.7.6.4, 2.7.6.5 e 2.7.6.6).

Depois de sequenciados, os fragmentos foram analisados com o software NCBI-BLAST para confirmar a sua homologia com as sequências codificantes das mesmas enzimas, já existentes em bases de dados, provenientes de outras plantas. Obtiveram-se, desta forma, as sequências dos mRNA dos genes ACT, ANR, ANS, EF1A, F3H, GADPH, LAR e PAL de *J. oxycedrus badia* e de *J. phoenicea*, sendo posteriormente publicadas em base de dados (Tabela 3)

Das enzimas inicialmente previstas no estudo, não foi possível obter as sequências da FLS, DFR e CHS, por incapacidade de amplificação com os *Primers* previstos. Isto poderá ter ocorrido devido a um reduzido grau de conservação das sequências de mRNA destas enzimas entre os *Juniperus* e as restantes plantas analisadas em bases de dados. O facto de para algumas enzimas em estudo haver poucas sequências disponíveis em bases de dados, e especialmente de plantas filogeneticamente próximas dos *Juniperus*, aumenta a probabilidade de haver nucleótidos diferentes, impedindo assim um correcto emparelhamento dos *Primers* com as sequências-alvo.

De seguida, procedeu-se à construção de *Primers* para *Real Time - PCR* em regiões conservadas de cada uma das sequências enzimáticas descritas (Tabela 3).

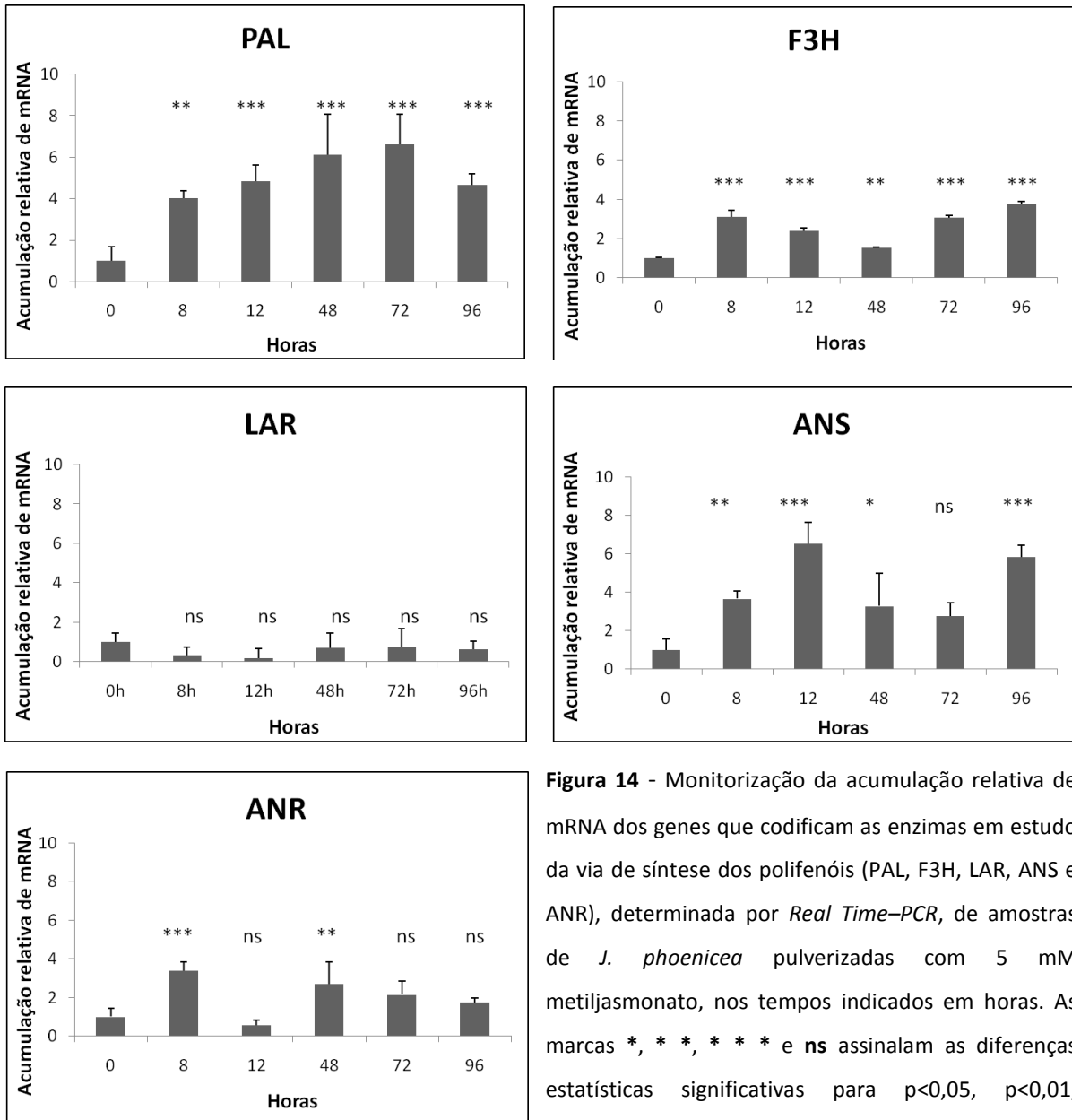
**Tabela 3** – Sequências dos *Primers forward* e *reverse* usados na amplificação, por *Real Time – PCR*, dos mRNA dos genes em estudo, bem como os *accession number* das sequências de mRNA usadas como molde.

Gene	Espécie	Accession Number	Primers
Actina (ACT)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389669	ACT_Fwd: CGGCGATGTATGTTGCTATTC
	<i>J. o badia</i>	GenBank Accession no GQ389670	ACT_Rev: CCAGCGAGATCCAACCTAAG
Antocianidina redutase (ANR)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389671	ANR_Fwd: ACTTGCCCTTAGCCTACTTACAG
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389672	ANR_Rev: AGTTGAGCACTACAAACATCATCC
Antocianidina sintase (ANS)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389673	ANS_Fwd: TCAGTGCTCTCACATTCC
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389674	ANS_Rev: ATCCTTACTTTCTCCTTGTTCC
Factor de alongamento 1A (EF1A)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389677	EF1A_Fwd: CTCTCAGTTGCCACTTCAG
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389678	EF1A_Rev: TTCAGTTGTCAGCCCAGTTG
Flavanona 3-hidrolase (F3H)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389679	F3H_Fwd: GGATTGGAAGCCGACGCGGT
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389680	F3H_Rev: TGGAGGAGCAGAGTGATG
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389681	GAPDH_Fwd: AACTAATTGTCTTGCTCCTTTG
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389682	GAPDH_Rev: CCTTCCAACCTGCCTTGC
Leucoantocianidina redutase (LAR)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389683	LAR_Fwd: CCAGTTGAACCTGCTTTGAG
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389684	LAR_Rev: TGACAGTGCCATCACCATAG
Fenilalanina amoniaco liase (PAL)	<i>J. phoenicea</i>	GenBank Accession no GQ389685	PAL_Fwd: ATGGCTTCTTACCTCTGAG
	<i>J. oxycedrus badia</i>	GenBank Accession no GQ389686	PAL_Rev: TCCACCGCTTGACAAATCC

### 3.3.4. Quantificação da Acumulação dos Transcritos dos Genes das Enzimas Seleccionadas por *Real Time – PCR*

Foram efectuadas extracções do RNA de amostras de *Juniperus* dos dois taxa em estudo para os pontos seleccionados dos stresses salino e metiljasmonato e também para os pontos correspondentes dos ensaios controlo. Os ácidos nucleicos extraídos foram quantificados por métodos espectrofotométricos e foi efectuado um tratamento com DNase para remoção de vestígios de DNA presentes nas amostras. Procedeu-se a um *RT-PCR* do mRNA. Para cada gene foram calculadas as eficiências, sendo usada como amostra uma mistura equivalente de mRNA extraído, para cada espécie, de todos os pontos do ensaio.

Por intermédio de *Real time – PCR*, foi analisada a acumulação de transcritos dos genes de algumas enzimas da via dos polifenóis (ANR, ANS, F3H, LAR e PAL) nas amostras de *J. phoenicea* relativas ao stresse de metiljasmonato (Figura 14). Os resultados foram normalizados para os genes de referência, para a amostra controlo e para o ponto zero.

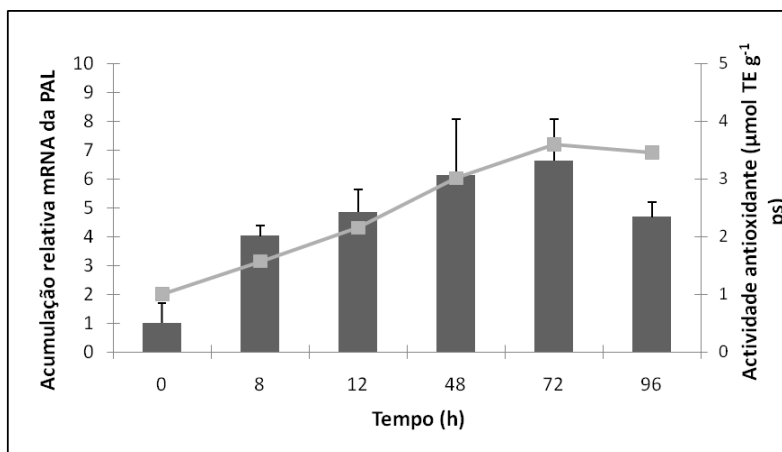


**Figura 14** - Monitorização da acumulação relativa de mRNA dos genes que codificam as enzimas em estudo da via de síntese dos polifenóis (PAL, F3H, LAR, ANS e ANR), determinada por *Real Time-PCR*, de amostras de *J. phoenicea* pulverizadas com 5 mM metiljasmonato, nos tempos indicados em horas. As marcas \*, \*\*, \*\*\* e ns assinalam as diferenças estatísticas significativas para  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , e não significativo, respectivamente.

Relativamente à acumulação de transcritos dos genes que codificam a enzima PAL, verificaram-se sucessivos e significativos aumentos em todos os pontos, sendo a expressão máxima atingida às 72 h, e decrescendo ligeiramente de seguida às 96 h. Sendo uma das principais enzimas da via de síntese dos polifenóis e encontrando-se no início da mesma, o aumento da acumulação de mRNA da PAL, sugere uma indução da produção de compostos fenólicos nos tecidos, em resposta ao metiljasmonato. Estes resultados encontram-se de acordo com os aumentos registados na produção de compostos fenólicos observado anteriormente (*vide* Figura 13 A e B). Outros autores, constataram também, a capacidade do metiljasmonato, actuando como eliciador, em induzir um aumento da acumulação de mRNA e actividade da enzima PAL e da síntese de compostos fenólicos em culturas

em suspensão de raízes de *Panax ginseng* em bio-reactor [95]. No entanto, no presente trabalho verificou-se que o padrão de aumento de acumulação de mRNA da PAL não é totalmente coincidente com o padrão de aumento dos compostos fenólicos, assemelhando-se mais ao padrão de aumento da actividade antioxidante, com aumentos e decréscimos simultâneos, como se observa na Figura 15. Isto sugere uma estreita relação entre os aumentos da expressão da PAL e o aumento da capacidade antioxidante dos extractos de *J. phoenicea*. A importância do aumento da expressão da PAL traduz-se na diversificação da produção de compostos ao longo da via, devido ao facto de ser uma enzima situada no início da via, cujo produto, o ácido transcinâmico, é substrato e precursor comum para a síntese dos diversos compostos fenólicos [96].

Quanto à enzima F3H, registaram-se aumentos estatisticamente significativos em todos os pontos, ao contrário da LAR, em que não se verificaram alterações significantes na acumulação dos transcritos do gene. Apesar de uma baixa amplitude e de não diferirem muito entre si, os aumentos da F3H sugerem uma complexificação dos compostos na via dos polifenóis, no sentido dos flavonóides. A F3H catalisa a conversão de flavanonas em di-hidroflavonóis, sendo fundamental para a biossíntese de flavonóis, flavanóis, proantocianidinas e antocianinas [23]. Estudos anteriores revelaram que mutações nesta enzima impedem a progressão na via e, conseqüentemente, a produção de antocianinas [97]. Uma vez que não foi possível determinar a expressão das enzimas DFR e FLS, não é possível deduzir se foi induzida a produção dos compostos subsequentes, as leucoantocianidinas e os flavonóis, respectivamente. No entanto, aumentos na acumulação de mRNA da ANS e ANR sugerem uma complexificação no sentido da produção de antocianidinas e flavanóis, compostos determinantes para a produção de antocianinas e proantocianidinas [98]. Relativamente à ANR verificaram-se aumentos estatisticamente relevantes da acumulação de transcritos às 8 e às 48 h. A acumulação de mRNA da ANS apresentou um perfil com dois máximos, nomeadamente às 12 e 48 h. A produção de proantocianidinas, compostos predominantes em *Juniperus* (segundo estudos anteriores e dados preliminares de HPLC-MS do laboratório DSB), ocorrerá preferencialmente por intermédio da ANS e, conseqüentemente da ANR, tendo a LAR uma menor influência nesta via [15]. Isto é sugerido não só pelo aumento da acumulação de mRNA da ANS e da ANR, em oposição à manutenção da acumulação de mRNA da LAR, mas também por estudos anteriores, que revelam que a actividade da LAR *in vitro* poderá ser mais reduzida que a da ANR [15]. Um factor que poderá contribuir para isso, será o facto de a LAR poder ser inibida pelo substrato da ANR, antocianidina ou mesmo outros flavonóides [15].



**Figura 15** – Monitorização da acumulação relativa do mRNA da PAL, determinada por *Real Time - PCR*, de amostras de *J. phoenicea* sujeitos a exposição de 5 mM metiljasmonato (barras) e determinação relativa da actividade antioxidante (—■—) durante o tempo indicado em horas.

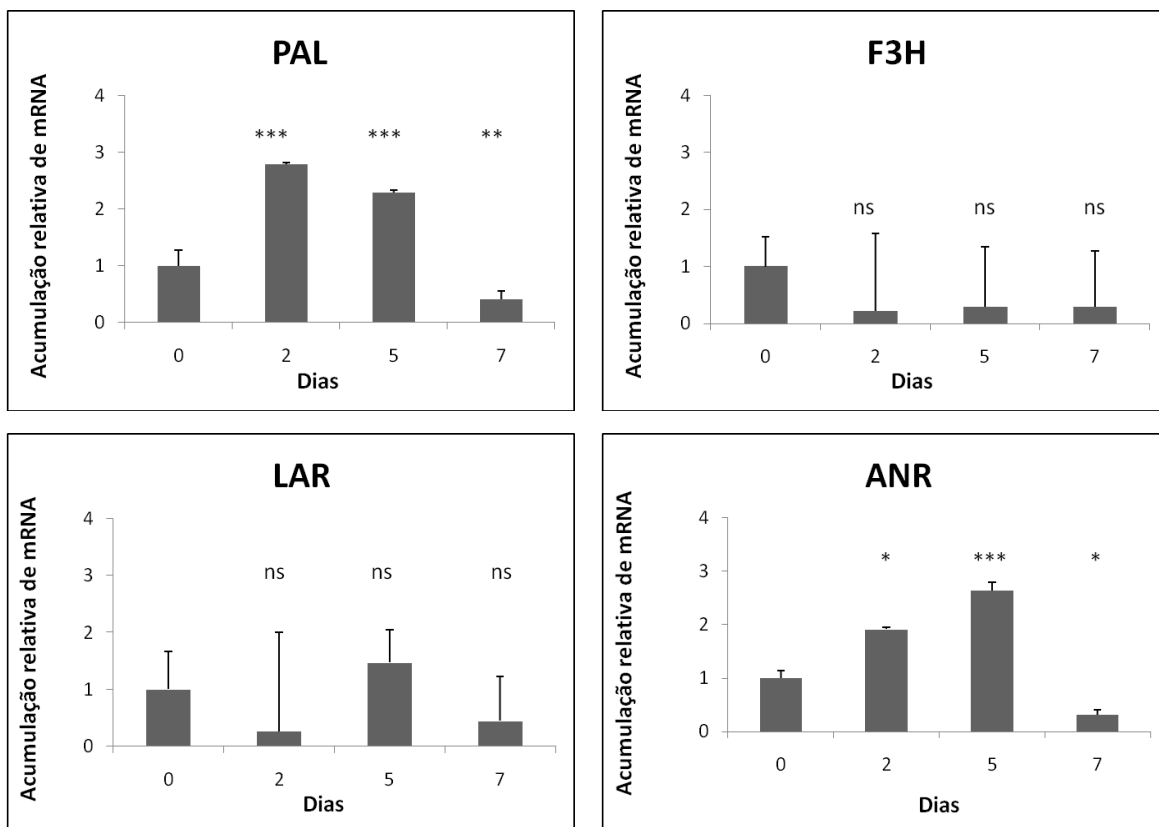
Relativamente ao stresse salino, não foi possível analisar a acumulação de mRNA da enzima ANS, que não deu qualquer sinal positivo para as amostras de *J. oxycedrus badia*. Para este stresse (Figura 16), verificou-se um aumento significativo da acumulação de transcritos do gene da PAL ao 2º e 5º dia, decrescendo acentuadamente de seguida para valores inferiores ao ponto zero. Tanto para a F3H como para a LAR não se verificaram alterações estatisticamente significativas na acumulação relativa dos mRNA correspondentes. À semelhança da PAL, também a ANR revelou aumentos estatisticamente significativos ao 2º e 5º dia, decrescendo acentuadamente ao 7º dia para valores inferiores ao inicial. No entanto, verificou-se que o pico de expressão relativa destas duas enzimas não coincidiu, dando-se no 2º dia para a PAL e ao 5º dia para a ANR. Sendo a PAL uma enzima que actua no início da via síntese dos polifenóis, a sua expressão poderá ser induzida numa primeira fase da resposta ao stresse, em oposição da ANR, que, actuando numa fase posterior da mesma via, estará dependente da actividade da PAL e das enzimas subsequentes, sendo por isso admissível que a indução da transcrição do seu gene seja induzida mais tardiamente.

Os resultados apresentados não permitem estabelecer uma correlação evidente entre a acumulação dos transcritos dos genes e o conteúdo em polifenóis, uma vez que os valores superiores dos fenóis totais e dos flavonóides ocorrem ao 2º e 7º dias (Figura 9 A e B). Essas disparidades são particularmente evidentes ao 7º dia de ensaio, onde se dá um aumento dos compostos fenólicos, mas uma diminuição da expressão dos genes. No entanto, não será de estranhar essas disparidades, uma vez que a transcrição dos genes das enzimas, sua tradução e posteriormente a síntese dos metabolitos pelas enzimas são processos sequenciais e desfasados no tempo.

Ao contrário do que se verificou no ensaio do metiljasmonato, no caso do stresse salino os aumentos na expressão da PAL não se traduzem num aumento da actividade antioxidante, tendo esta

permanecido constante ao longo do ensaio de stresse salino. Em resposta ao stresse verificou-se uma indução da produção de compostos fenólicos. O aumento da expressão enzimática relativa da PAL sugere um aumento da produção de compostos simples, como os ácidos hidroxicinâmicos (cuja presença nos *Juniperus* foi verificada em estudos preliminares com HPLC-MS efectuados pelo laboratório DSB). Estes poderão actuar por si só, contribuindo para o aumento da actividade antioxidante ou ser usados como substrato para a síntese de compostos mais complexos [23,96]. Estudos em alface (*Lactuca sativa*) também constataram aumentos da expressão da PAL face à exposição de plantas a stresses ambientais, como sejam o stresse hídrico e o stresse de frio [45,99]. O aumento da expressão da ANR sugere, mais uma vez, a produção de compostos como flavanóis e, possivelmente, proantocianidinas [15]. No entanto, apesar de outras enzimas da via com possível interesse não poderem ser testadas, a LAR e particularmente a F3H, uma enzima de elevada importância para a complexificação dos compostos fenólicos [98], não aumentaram a acumulação dos transcritos dos seus genes. Isto sugere que ou a sua expressão constitutiva é suficiente para fazer face às necessidades da via, ou que a amplitude do stresse salino não foi suficiente para desencadear um aumento da sua expressão. O facto de os aumentos registados para a PAL e ANR serem inferiores aos registados para o metiljasmonato sugere novamente que o stresse salino imposto não teve amplitude suficiente para gerar uma resposta das plantas ao nível de produção de compostos fenólicos. Por outro lado, é também possível que outros mecanismos, que não a síntese de polifenóis, sejam desencadeados para fazer face ao stresse salino, como o sequestro de sais no vacúolo, ajuste osmótico no citoplasma pela síntese de solutos orgânicos compatíveis, os mecanismos de exclusão, de transporte activo ou de diluição dos sais, ou mesmo a libertação de excesso de sal através de glândulas [100]. Estudos anteriores, como os efectuados por Hichem e colaboradores [85] ou Tattini e colaboradores [86], relataram alterações no conteúdo em polifenóis e actividade antioxidante de plantas de milho (*Zea mays*) e murta (*Myrtus communis*), respectivamente, sujeitas a stresse salino, mas o efeito que este stresse terá na expressão de genes que codificam as enzimas na via dos polifenóis é ainda pouco estudado. Apesar de alguns estudos indicarem que o aumento da síntese de compostos fenólicos em resposta a stresses ambientais é desencadeada a partir de um aumento da expressão dos genes das enzimas responsáveis pela sua produção, outros factores podem também afectar a síntese de polifenóis [79]. Regulação pós-transcricional, apesar de ser um mecanismo ainda pouco estudado relativamente à via dos polifenóis, pode ser relevante, havendo estudos sugerindo *turnover* ou inactivação da PAL por fosforilação [79]. Por outro lado, a actividade de determinadas enzimas pode ser também inibida pelos produtos de outra, ocorrendo assim um fenómeno de repressão metabólica, que permite o controlo do fluxo da via em determinada direcção [15].





**Figura 16** – Monitorização da acumulação relativa do mRNA dos genes que codificam as enzimas em estudo da via de síntese dos polifenóis (PAL, F3H, LAR e ANR), determinada por *Real Time - PCR*, de amostras de *J. oxycedrus badia* sujeitos a stresse salino (250 mM NaCl), nos tempos indicados em dias. As marcas \*, \*\*, \*\*\* e ns assinalam as diferenças estatísticas significativas para  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , e não significativo, respectivamente.

## 4. Conclusão

Com este trabalho, pretendeu-se determinar que condições favorecem a produção de compostos fenólicos e contribuem para um aumento da actividade antioxidante dos extractos hidroetanólicos de cinco taxa de *Juniperus*, nativos de Portugal, *J. navicularis*, *J. phoenicea*, *J. turbinata*, *J. oxycedrus badia* e *J. oxycedrus oxycedrus*.

A análise da variação da produção anual de fenóis totais, de flavonóides e da actividade antioxidante contra o radical peroxilo, em extractos hidroetanólicos de folhas *Juniperus*, demonstrou a ocorrência de uma elevada variação destes parâmetros ao longo dos meses do ano de 2008. De facto, a variação entre o valor máximo e o valor mínimo atingidos revelou-se elevada, ultrapassando mesmo os 50 % em diversas situações.

Os extractos de ambas as subespécies de *J. oxycedrus* exibiram um conteúdo elevado em fenóis totais e em flavonóides (onde se destacaram das restantes espécies), bem como uma elevada actividade antioxidante. Apenas *J. turbinata* atingiu valores superiores de fenóis totais e *J. navicularis* valores semelhantes de actividade antioxidante. *J. phoenicea* destacou-se dos restantes taxa, pelo facto de registar, sistematicamente, os valores mais reduzidos, nos diversos ensaios realizados.

Em termos gerais, os valores mais elevados de fenóis totais e de flavonóides foram atingidos nos meses de Novembro e Dezembro, enquanto os valores mais elevados de actividade antioxidante foram registados nos meses de Maio/Junho e Agosto/Setembro.

Apesar de se ter verificado uma forte correlação entre o conteúdo em fenóis totais e flavonóides em todos os taxa em estudo, o mesmo não se verificou entre conteúdo nestes metabolitos e a actividade antioxidante.

Paralelamente a este estudo, plantas com dois anos de *J. oxycedrus badia*, *J. turbinata* e *J. phoenicea* foram sujeitas a condições de stresse de ordem biótica e abiótica. A exposição das plantas a um stresse de seca induziu uma redução da sua eficiência fotossintética, evidenciada por uma redução do  $F'v/F'm$ , mas não induziu degradação da clorofila das folhas, sugerindo que não terá causado dano no aparelho fotossintético das plantas. Ainda assim, estas condições de stresse revelaram-se ineficazes em aumentar o conteúdo em fenóis totais, flavonóides e actividade antioxidante dos extractos de *Juniperus*. Ineficaz revelou-se também o ensaio de frio, não só em aumentar o conteúdo em fenóis e actividade antioxidante, mas também em induzir uma situação fisiológica de stresse. Relativamente ao ensaio de salinidade elevada, verificou-se que a existência de uma situação de stresse, sem no entanto causar dano no aparelho fotoquímico, induziu em *J. oxycedrus badia* um aumento do conteúdo em fenóis totais e flavonóides, mas não da actividade antioxidante. Já a exposição das plantas ao metiljasmonato causou em *J. phoenicea*, não só uma redução da eficiência

fotossintética, mas também um aumento do conteúdo em fenóis totais, flavonóides e actividade antioxidante dos extractos, sem se verificar degradação do aparelho fotoquímico.

Para os pontos dos ensaios de stresse salino e exposição a metiljasmonato com aumentos mais relevantes, foi realizada uma quantificação da acumulação de transcritos de genes de enzimas seleccionadas da via de biossíntese dos polifenóis, por intermédio de *Real Time - PCR*. Deste modo, verificou-se, para *J. phoenicea*, no ensaio de metiljasmonato, aumentos da acumulação de transcritos dos genes das enzimas F3H, ANS, ANR e PAL, sendo que o padrão desta última se revelou muito semelhante à curva da actividade antioxidante. Para *J. oxycedrus badia*, no stresse salino, foram detectados aumentos da acumulação de transcritos dos genes das enzimas PAL e ANR.

Em continuação deste trabalho, de forma a esclarecer algumas questões pertinentes, seria importante determinar que compostos estão a variar, não só no estudo anual mas também nos ensaios de stresse, e qual a sua concentração, por intermédio de HPLC-MS. Desta forma, poderia ser elucidado quais os compostos preponderantes para o aumento da actividade antioxidante.

Relativamente ao estudo da variação anual, este poderia ser alargado, por um período de tempo superior, de forma a minimizar a influência de acontecimentos climáticos esporádicos, mas que poderão ter tido grande influência na produção de metabolitos e actividade antioxidante.

Para os ensaios de stresse, poderiam ser testadas novas condições, como uma luminosidade elevada, ou concentração superior de CO<sub>2</sub>, ou ainda melhorar algumas das condições aqui testadas, alargando, por exemplo, o período de tempo experimental ou variando o grau de intensidade da exposição aos stresses.

## 5. Bibliografia

1. Lidon FJC, Gomes HP, Abrantes ACS: *Plantas de Portugal - evolução e taxonomia*. Lisboa: Escolar Editora; 2005.
2. Adams RP: **Juniperus of Canada and the United States: taxonomy, key and distribution**. Edited by. Phytologia; 2008:255-314. vol 90.]
3. Bhattarai S, Chaudhary RP, Taylor RSL: **Ethnobotany of wild Junipers (*Juniperus* species) in Manang district, central Nepal**. Edited by. scientific world; 2006:109 - 112. vol 4.]
4. Castroviejo S. LM, López González G., Montserrat P., Muñoz Garmendia F., Paiva J., Villar L.: *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares.*, vol Vol. I. Lycopodiaceae-Papaveraceae. Madrid: Real Jardín Botánico, C.S.I.C.; 1986.
5. Elmastas M, Gulcin I, Beydemir S, Kufrevioglu O, Aboul-Enein H: **A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts**. *ANALYTICAL LETTERS* 2006, **39**:47-65.
6. Innocenti M, Michelozzi M, Giaccherini C, Ieri F, Vincieri F, Mulinacci N: **Flavonoids and biflavonoids in tuscan berries of *Juniperus communis* L.: Detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS**. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* 2007, **55**:6596-6602.
7. Qnais EY, Abdulla FA, Abu Ghalyum YY: **Antiarrheal Effects of *Juniperus phoenicia* L. Leaves Extract in Rats**. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2005, **8**:867 - 871.
8. Rodrigues JA: **Recolha dos "saber fazer" tradicionais das plantas aromáticas e medicinais**. 2006.
9. P. AR: *Junipers of the World: The genus Juniperus*. Vancouver: Trafford Publ.; 2004.
10. Stassi V, Verykokidou E, Loukis A, Harvala C, Philianos S: **The antimicrobial activity of the essential oils of four *Juniperus* species growing wild in Greece**. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL* 1996, **11**:71 - 74.
11. Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M: **The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts**. *Food Chemistry* 2007, **105**:1126-1134.
12. Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M, Adiguzel A: **Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L.** *Journal of Ethnopharmacology* 2003, **85**:231-235.
13. Bello R, Moreno L, Beltran B, PrimoYufero E, Esplugues J: **Effects on arterial blood pressure of methanol and dichloromethanol extracts from *Juniperus oxycedrus* L.** *Phytotherapy Research* 1997, **11**:161-162.
14. Taiz L, Zeiger E: *Plant Physiology*, Third edition. Sunderland, USA: Sinauer Associates Inc.; 2002.
15. Daayf F, Lattanzio V: *Recent Advances in Polyphenol Research*, vol I: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
16. Robards K, Antolovich M: **Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review**. *Analyst* 1997, **122**:11-34.
17. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: **Polyphenols: food sources and bioavailability**. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004, **79**:727-747.
18. Balasundram N, Sundram K, Samman S: **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses**. *Food Chemistry* 2006, **99**:191-203.
19. Ross J, Kasum C: **Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety**. *Annual Review of Nutrition* 2002, **22**:19-34.
20. Menezes B, Young C, Singh G: **Outcomes of joint neurology-urology clinic in the management of urogenital symptoms in patients with chronic neurological conditions**. *Journal of Neurology* 2008, **255**:P808.
21. Winkel-Shirley B: **Biosynthesis of flavonoids and effects of stress**. *Current Opinion in Plant Biology* 2002, **5**:218-223.
22. Santos-Buelga C, Scalbert A: **Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, **80**:1094-1117.

23. Jaakola L, Maatta-Riihinen K, Karenlampi S, Hohtola A: **Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves.** *Planta* 2004, **218**:721-728.
24. Monici M, Baglioni P, Mulinacci N, Baldi A and Vincieri F F: **A research model on flavonoids as photoprotectors: studies on the photochemistry of kaempferol and pelargonidin.** *Acta Horticulturae. (ISHS)* 1994, **381**:340-347.
25. Lo SCC, Nicholson RL: **Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls - Implications for a compensatory role in the defense response.** *Plant Physiology* 1998, **116**:979-989.
26. Wharton PS, Nicholson RL: **Temporal synthesis and radiolabelling of the sorghum 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and the anthocyanin, cyanidin 3-dimalonyl glucoside.** *New Phytologist* 2000, **145**:457-469.
27. Durrant WE, Dong X: **Systemic acquired resistance.** *Annual Review of Phytopathology* 2004, **42**:185-209.
28. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R: **Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites.** *Biotechnology Advances* 2005, **23**:283-333.
29. Ahmad P, Sarwat M, Sharma S: **Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants.** *Journal of Plant Biology* 2008, **51**:167-173.
30. Lin KH, Chao PY, Yang CM, Cheng WC, Lo HF, Chang TR: **The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves.** *Botanical Studies* 2006, **47**:417-426.
31. Pietta PG: **Flavonoids as antioxidants.** *Journal of Natural Products* 2000, **63**:1035-1042.
32. de Abreu I, Mazzafera P: **Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy.** *Plant Physiology and Biochemistry* 2005, **43**:241-248.
33. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, **39**:44-84.
34. Finkel T, Holbrook NJ: **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature* 2000, **408**:239-247.
35. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J: **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004, **266**:37-56.
36. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A: **Biomarkers of oxidative damage in human disease.** *Clinical Chemistry* 2006, **52**:601-623.
37. Markesbery WR: **Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease.** *Free Radical Biology and Medicine* 1997, **23**:134-147.
38. Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S: **Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease.** *Life* 2003, **55**:329-335.
39. Fernandez-Pancho MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC: **Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2008, **48**:649-671.
40. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: **Dietary polyphenols and the prevention of diseases.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005, **45**:287-306.
41. RiceEvans CA, Miller J, Paganga G: **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Trends in Plant Science* 1997, **2**:152-159.
42. Zhu QY, Huang Y, Tsang D, Chen ZY: **Regeneration of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, **47**:2020-2025.
43. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL: **Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.** *Annual Review of Nutrition* 2001, **21**:381-406.
44. Geetha B, Mathew B, Augusti K: **Hypoglycemic effects of leucodelphinidin derivative isolated from *Ficus bengalensis* (Linn).** *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 1994, **38**:220-222.

45. Oh MM, Carey EE, Rajashekar CB: **Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce.** *Plant Physiology and Biochemistry* 2009, **47**:578-583.
46. Faldt J, Martin D, Miller B, Rawat S, Bohlmann J: **Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase.** *Plant Molecular Biology* 2003, **51**:119-133.
47. Martin D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlmann J: **Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems.** *Plant Physiology* 2002, **129**:1003-1018.
48. Arnon D: **Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.** *Plant Physiology* 1949, **24**:1-15.
49. MacKinney G: **Absorption of light by chlorophyll solutions.** *Journal of Biological Chemistry* 1941, **140**:315-322.
50. Singleton VL, Rossi Jr. JA: **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** *American Journal of Enology and Viticulture* 1965, **16**:144-158.
51. Michalska A, Ceglinska A, Zielinski H: **Bioactive compounds in rye flours with different extraction rates.** *European Food Research and Technology* 2007, **225**:545-551.
52. MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML: **Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, **86**:2046-2056.
53. Huang DJ, Ou BX, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL: **High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, **50**:4437-4444.
54. Wang CY, Wang SY, Chen C: **Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, **56**:3587-3592.
55. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer E, Prior R, Huang D: **Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe.** *J Agric Food Chem* 2002, **50**:2772-2777.
56. Chang S, Puryear J, Cairney J: **A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees.** *Plant Molecular Biology Reporter* 1993:113-116.
57. Kolosova N, Miller B, Ralph S, Ellis BE, Douglas C, Ritland K, Bohlmann J: **Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees.** *Biotechniques* 2004, **36**:821-824.
58. Wang SX, Hunter W, Plant A: **Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and white spruce.** *Biotechniques* 2000, **28**:292-+.
59. Haberle KH, Nunn AJ, Reiter IM, Werner H, Heller W, Bahnweg G, Gayler S, Lutz C, Matyssek R: **Variation of defence-related metabolites in the foliage of adult beech and spruce: a conceptual approach to approximating traded-off carbon.** *European Journal of Forest Research* 2009, **128**:99-108.
60. Bryant JP, Chapin FS, Klein DR: **Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory.** *Oikos* 1983, **40**:357-368.
61. Tenhunen JD, Serra AS, Harley PC, Dougherty RL, Reynolds JF: **Factors influencing carbon fixation and water-use by mediterranean sclerophyll shrubs during summer drought.** *Oecologia* 1990, **82**:381-393.
62. Otieno D, Schmidt M, Kurz-Besson C, Do Vale R, Pereira J, Tenhunen J: **Regulation of transpirational water loss in *Quercus suber* trees in a Mediterranean-type ecosystem.** *Tree Physiology* 2007, **27**:1179-1187.
63. Sanjust E, Mocci G, Zucca P, Rescigno A: **Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources.** *Natural Product Research* 2008, **22**:689-708.
64. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M: **Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, **47**:3954-3962.

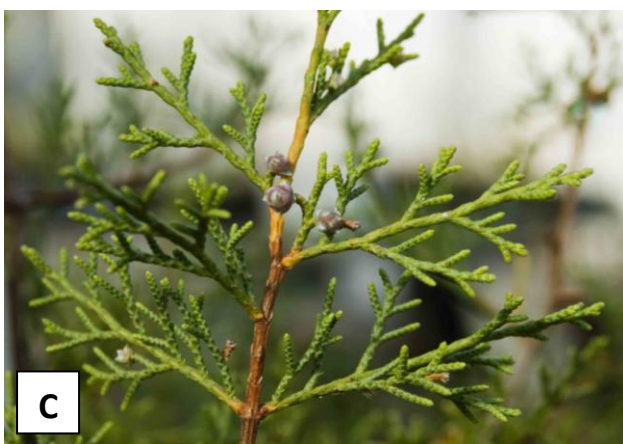
65. Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F: **Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon.** *Food Chemistry* 2007, **105**:572-578.
66. Ward JK, Strain BR: **Elevated CO<sub>2</sub> studies: past, present and future.** *Tree Physiology* 1999, **19**:211-220.
67. Penuelas J, Estiarte M: **Can elevated CO<sub>2</sub> affect secondary metabolism and ecosystem function?** *Trends in Ecology & Evolution* 1998, **13**:20-24.
68. Instituto de Meteorologia IP: **Boletim Climatológico Anual - Ano 2008.** 2008.
69. Shaked-Sachraya L, Weissb D, Reuveni M, Nissim-Levi A, Oren-Shamir M: **Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment.** *Physiologia Plantarum* 2002, **114**:559–565.
70. Wen PF, Chen JY, Wan SB, Kong WF, Zhang P, Wang W, Zhan JC, Pan QH, Huang WD: **Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress.** *Plant Growth Regulation* 2008, **55**:1-10.
71. Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR: **Heat tolerance in plants: An overview.** *Environmental and Experimental Botany* 2007, **61**:199-223.
72. Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC: **Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, **54**:2327-2332.
73. Wang SY, Bowman L, Ding M: **Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells.** *Food Chemistry* 2008, **107**:1261-1269.
74. Naumann JC, Young DR, Anderson JE: **Linking leaf chlorophyll fluorescence properties to physiological responses for detection of salt and drought stress in coastal plant species.** *Physiologia Plantarum* 2007, **131**:422-433.
75. Yaginuma S, Shiraishi T, Ohya H, Igarashi K: **Polyphenol increases in safflower and cucumber seedlings exposed to strong visible light with limited water.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2002, **66**:65-72.
76. Subrahmanyam D, Subash N, Haris A, Sikka AK: **Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought.** *Photosynthetica* 2006, **44**:125-129.
77. Castro KL, Sanchez-Azofeifa GA: **Changes in spectral properties, chlorophyll content and internal mesophyll structure of senescing *Populus balsamifera* and *Populus tremuloides* leaves.** *Sensors* 2008, **8**:51-69.
78. Bartels D, Sunkar R: **Drought and salt tolerance in plants.** *Critical Reviews in Plant Sciences* 2005, **24**:23-58.
79. Dixon R, Paiva N: **Stress-induced phenylpropanoid metabolism.** *Plant Cell* 1995, **7**:1085-1097.
80. Estiarte M, Filella I, Serra J, Peñuelas J: **Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner).** *Oecologia* 1994:387-391.
81. Cheruiyot EK, Mumera LM, Ng'etich WK, Hassanali A, Wachira F: **Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia sinensis* L.).** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007, **71**:2190 - 2197.
82. Remorini D, Melgar JC, Guidi L, Degl'Innocenti E, Castelli S, Traversi ML, Massai R, Tattini M: **Interaction effects of root-zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*.** *Environmental and Experimental Botany* 2009, **65**:210-219.
83. Neocleous D, Vasilakakis M: **Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. 'Autumn Bliss').** *Scientia Horticulturae* 2007, **112**:282-289.
84. Qiu NW, Lu QT, Lu CM: **Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*.** *New Phytologist* 2003, **159**:479-486.

85. Hichem H, Mounir D, Naceur E: **Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages.** *Industrial Crops and Products* 2009, **30**:144-151.
86. Tattini M, Remorini D, Pinelli P, Agati G, Saracini E, Traversi ML, Massai R: **Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*.** *New Phytologist* 2006, **170**:779-794.
87. Beckman CH: **Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2000, **57**:101-110.
88. Krivosheeva A, Tao DL, Ottander C, Wingsle G, Dube SL, Oquist G: **Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine.** *Planta* 1996, **200**:296-305.
89. Bertamini M, Muthuchelian K, Rubinigg M, Zorer R, Velasco R, Nedunchezian N: **Low-night temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) leaves.** *Environmental and Experimental Botany* 2006, **57**:25-31.
90. Olenichenko NA, Ossipov VI, Zagorskina NV: **Effect of cold hardening on the phenolic complex of winter wheat leaves.** *Russian Journal of Plant Physiology* 2006, **53**:495-500.
91. Wierstra I, Kloppstech K: **Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley.** *Plant Physiology* 2000, **124**:833-844.
92. Jung S: **Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems.** *Plant Physiology and Biochemistry* 2004, **42**:225-231.
93. Gould N, Reglinski T, Spiers M, Taylor JT: **Physiological trade-offs associated with methyl jasmonate - induced resistance in *Pinus radiata*.** *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 2008, **38**:677-684.
94. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger D, Niall H, Boyse E: **Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells.** *Proceedings of National Academy of Sciences U S A* 1975, **72**:11-15.
95. Ali MB, Hahn EJ, Paek KY: **Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures.** *Molecules* 2007, **12**:607-621.
96. Xu F, Cai R, Cheng S, Du H, Wang Y, Cheng S: **Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*.** *African Journal of Biotechnology* 2008, **7**:721-729.
97. Schijlen EGWM, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG: **Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants.** *Phytochemistry* 2004:2631-2648.
98. Singh K, Rani A, Kumar S, Sood P, Mahajan M, Yadav SK, Singh B, Ahuja PS: **An early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase, exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*).** *Tree Physiology* 2008, **28**:1349-1356.
99. Oh MM, Trick HN, Rajashekara CB: **Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce.** *Journal of Plant Physiology* 2009, **166**:180-191.
100. Kozłowski: **Responses of woody plants to flooding and salinity.** *Tree Physiology Monograph No. 1* 1997.



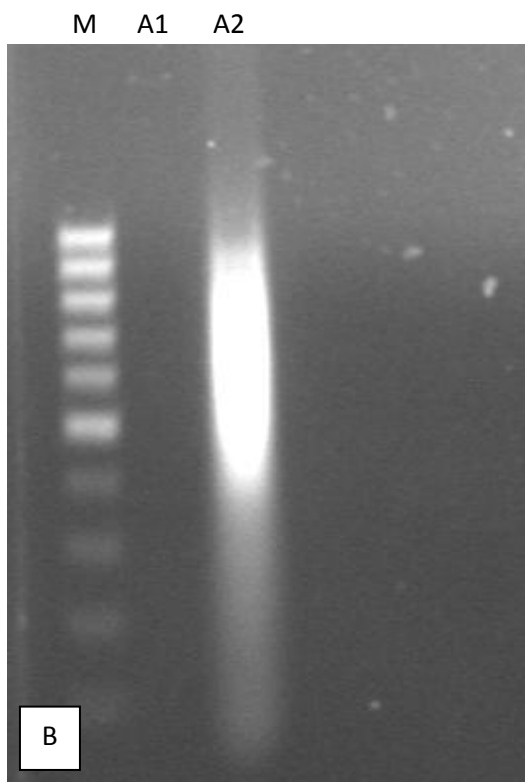
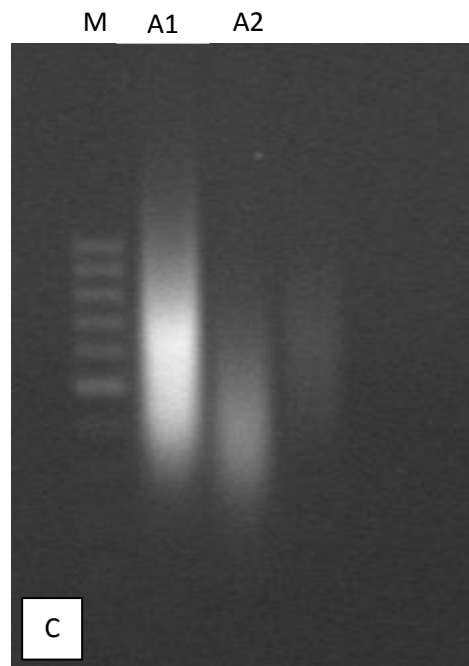
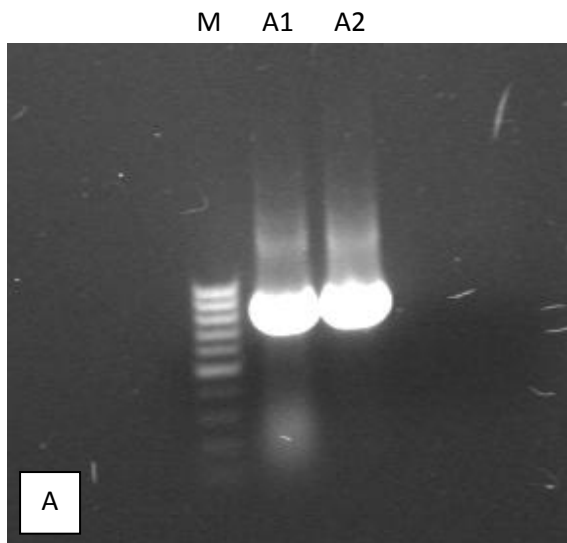
## 6. Anexos

### Anexo I



Fotografias das espécies e subespécies de *Juniperus* usadas neste trabalho para o estudo anual. *J. navicularis* (A), *J. oxycedrus badia* (B), *J. phoenicea* (C), *J. oxycedrus oxycedrus* (D) e *J. turbinata* (E).

## Anexo II



Fotografias de géis de agarose relativos às extracções de RNA, realizadas segundo os métodos Chang *et al.* (A), Wang *et al.* (B), Kolosova *et al.* (C). Em (A), M – marcador molecular, A1 - extracção de *J. turbinata* diluído 1:100 (m/v) e A2 - extracção de *J. turbinata* diluído 2:100 (m/v); em (B), M – marcador molecular, A1 – extracção de *J. oxycedrus badia* e A2 – extracção de *J. phoenicea*; em (C), M – marcador molecular, A1 – extracção de *J. oxycedrus badia*, A2 – extracção de *J. phoenicea*.