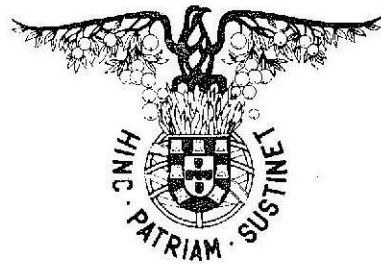


UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

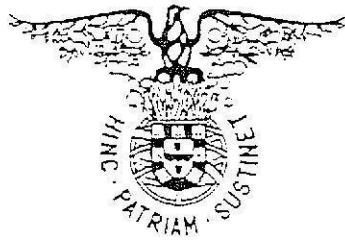


ASPECTOS CULTURAIS
E
PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM ACTIVIDADE BIOLÓGICA
DO
COENTRO (*CORIANDRUM SATIVUM* L.)

FERNANDA DELGADO

LISBOA
1993

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA



ASPECTOS CULTURAIS
E
PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM ACTIVIDADE BIOLÓGICA
DO
COENTRO (*CORIANDRUM SATIVUM* L.)

FERNANDA DELGADO

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre no
CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LISBOA
1993

ÍNDICE

	Pág.
NOTA PRÉVIA	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE QUADROS	
I. INTRODUÇÃO	1
1. ASPECTOS GERAIS	2
2. O COENTRO (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	4
2.1. Características botânicas	4
2.2. Exigências edafo-climáticas	4
2.3. Técnicas culturais	6
2.3.1. Sementeira	6
2.3.2. Mondas e regas	6
2.3.3. Colheita e secagem	7
2.4. Constituintes químicos	7
2.4.1. Raízes	7
2.4.2. Folhas	8
2.4.3. Frutos	8
3. PESTICIDAS CLÁSSICOS E PESTICIDAS BIOLÓGICOS	9
4. ACÇÃO FOTODINÂMICA DA LUZ E COMPOSTOS FOTOACTIVOS	11
4.1. Cumarinas	13
4.2. Cromonas	16

	Pág.
5. SUBSTÂNCIAS FOTOACTIVAS EM COENTRO	18
6. ESTRATÉGIA PARA A PESQUISA DA BIOACTIVIDADE EM PLANTAS	19
7. MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	21
II. MATERIAL E MÉTODOS	
1. CULTURA E SELECÇÃO DE MATERIAL VEGETAL	25
2. COLHEITA DE MATERIAL VEGETAL, PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO	26
2.1. Raízes	26
2.2. Folhas	26
2.3. Frutos	26
3. SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA	31
3.1. Raízes	31
3.2. Folhas	34
3.3. Frutos	34
4. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS COM ACTIVIDADE BIOLÓGICA	34
5. TESTES BIOLÓGICOS	35
5.1. Caracterização sumária dos fungos	37
III . RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1. ENSAIOS DE PRODUÇÃO	40
2. TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO	41
3. FRACCIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E, IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS COM ACÇÃO FUNGICIDA	43
3.1. Raízes	43

	Pág.
3.2. Folhas	47
3.3. Frutos	50
4. TESTES BIOLÓGICOS	52
4.1. Raízes	52
4.2. Folhas	52
4.3. Frutos	52
4.4. Acção da concentração dos compostos isolados	56
4.4.1. Coriandrina	56
4.4.2. Compostos F e B de raízes	57
IV . CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	78
ANEXO I	Gráficos de temperaturas médias mensais (°C), de Janeiro a Julho (1989-1992)
ANEXO II	Gráficos de precipitação mensal (mm), de Janeiro a Julho (1989-1992)
ANEXO III	Soluções reagentes de pulverização para revelação de TLC
ANEXO IV	Meios de cultura de <i>Cladosporium cucumerinum</i> e <i>Fusarium culmorum</i>
ANEXO V	Espectros de massa, UV, ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, correlação H-H e C-H, dos compostos com actividade biológica
ANEXO VI	Quadros dos valores do efeito fototóxico de concentrações crescentes dos compostos C (folhas), G (frutos), F, B, R (raízes), para <i>C.cucumerinum</i> e <i>F. culmorum</i>

NOTA PRÉVIA

O presente trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original, para efeitos da obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal. Foi realizado na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Estação Agronómica Nacional e, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob orientação do Professor Cândido Pinto Ricardo, do Instituto Superior de Agronomia e, apresentado neste mesmo Instituto.

Muitas foram as pessoas que, duma forma ou doutra, me apoiaram. É-me grato salientar, sobretudo, o estímulo que, de todos, recebi. Aqui fica publicamente, o meu reconhecimento.

Desejo salientar a imprescindível orientação metodológica do Prof. Cândido Pinto Ricardo, a importância da sua palavra crítica e perspicaz, bem como a sua amizade.

À Dra. Amélia Pilar Rauter agradeço o estímulo, a aquisição de conhecimentos de técnicas laboratoriais de produtos orgânicos e a preciosa ajuda na identificação dos compostos purificados.

Uma palavra, também, de agradecimento à Eng. Agrónoma Olívia de Matos pelo apoio na elaboração dos testes biológicos e manuseamento de fungos fitófagos.

Não poderia deixar de salientar a colaboração das colegas do Laboratório de Química da Faculdade de Ciências de Lisboa, da técnica de laboratório Isabel Pais da Estação Agronómica Nacional, assim como, do Dr. Albertino Figueiredo da Universidade da Covilhã pela execução de alguns dos espectros de RMN.

Aos meus pais, ao José Pedro, mãe M^ª Helena e pai Diogo, um agradecimento muito especial.

Às amigas Margarida M. e Margarida R. agradeço a disponibilidade e, colaboração na composição final do trabalho escrito.

À Ana Gamas o meu apreço pela realização do desenho do coentro, segundo a técnica de aparo e tinta da china sobre papel vegetal, utilizado neste trabalho como um original.

Finalmente, agradeço à Escola Superior Agrária de Castelo Branco os meios que disponibilizou para a realização e edição deste trabalho.

ABREVIATURAS

Al.	Alemão
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
5-MOP	5-metoxipsoraleno(Bergapteno)
CLP	Cromatografia líquida sob pressão
COSY	Relação do acoplamento entre os hidrogénios
DEPT	Espectro das formas de carbono na molécula
Esp.	Espanhol
fr.	fracções
Fr.	Francês
Ing.	Inglês
It.	Italiano
IV	Infra-vermelho
J	Constante de acoplamento
8-MOP	8-metoxipsoraleno(Xantotoxina)
p.f.	ponto de fusão
PF₂₅₄	Fluorescência a 254 nm.
p.s.	peso seco
PLC	Cromatografia de coluna sólido-líquida sob baixa pressão
ref.	referência
R_f	Posição das substâncias no cromatograma
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TLC	"Thin Layer Chromatography"- Cromatografia de camada fina
UV	Ultra-violeta
VS	Vanilina sulfurada

ASPECTOS CULTURAIS E PROSPECÇÃO DE ACTIVIDADE BIOLÓGICA DO COENTRO (*Coriandrum sativum* L.)

Fernanda Delgado

RESUMO

Quatro anos de cultura do coentro em Castelo Branco permitiram concluir que a data de sementeira que melhor resultou em termos de precocidade e produção de raízes, folhas e frutos, foi a registada em finais de Fevereiro, obtendo-se produções médias por planta de 4g de peso seco de raízes, 9g de peso seco de folhas e 9g de peso seco de frutos.

Simultaneamente, estudou-se a presença nesta espécie de certas substâncias com acção pesticida. Com efeito, actualmente, a utilização crescente de pesticidas coloca graves problemas de natureza ecológica, sendo necessário encontrar meios de protecção alternativos mais seguros que os convencionais.

A pesquisa deste tipo de substâncias de origem vegetal efectuou-se realizando testes sobre a sua acção no crescimento do micélio de fungos imperfeitos. Duas situações foram analisadas: ensaios no escuro ou sob o efeito da radiação luminosa na forma do visível. A segunda situação permitiu identificar compostos cuja acção resulta da activação pela luz (compostos fototóxicos). Assim efectuou-se a separação, selecção e identificação deste novo tipo de compostos tóxicos isolados de raízes, folhas e frutos.

Das folhas obteve-se a isocumarina designada por coriandrina, com uma acção fototóxica apreciável a partir de $0,35\mu\text{g}/\text{mm}^2$, nos testes em placas de sílica-gel de 0,5 mm de espessura.

Das raízes extraíram-se três compostos com actividade biológica em extracto bruto e só dois (F e B), quando purificados, continuaram com actividade fungicida. Em testes realizados em placas de sílica-gel com 0,5mm de espessura o composto F, possuindo um anel aromático com longas cadeias ramificadas e um grupo éster exibiu actividade a níveis de $3\mu\text{g}/\text{mm}^2$ e o composto B não aromático, a níveis de $0,9\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

Dos frutos não foi isolado nenhum composto com actividade fungicida.

A optimização dos resultados obtidos com a coriandrina através de modificações estruturais será, a curto prazo, um aspecto de grande importância para novos fotopesticidas. Estudos estes que poderão também abranger áreas em que se tente evitar a aquisição de resistências por parte dos fungos fitopatogénicos.

Finalmente, a total identificação dos compostos das raízes, impossibilitada pela escassez de tempo efectivo deste trabalho, será um outro aspecto a destacar nesta área.

Palavras chave : *Coriandrum sativum* L.; coentro; *Umbelliferaea*; *Apiaceae*; *Cladosporium cucumerinum*; *Fusarium culmorum*; isocumarina; furanocumarina; fotoactividade; composto fotoactivo.

CROP ASPECTS AND PROSPECT OF CORIANDER (*Coriandrum sativum* L.) BIOLOGICAL ACTIVITY

Fernanda Delgado

ABSTRACT

Growing coriander in Castelo Branco for four years made it possible to draw the conclusion that the sowing date which resulted in best precocity and yield, was by the end of February; the average dry weight obtained per plant was 4g for roots, 9g for leaves and 9g for fruits.

In addition to the yield experiments the presence of substances with pesticidal action in this species was studied. Since the increasing use of pesticides raises serious ecological problems such studies are useful in order to find ways of an alternative protection, safer than the conventional ones.

Tests on preparative TLC were performed to analyse the effect on the growth of fungi of the compounds present in coriander. Plates were incubated either in the dark or under the irradiation of a light source (400 to 700 nm). Light irradiance allowed the identification of constituents which were only active when activated by light (photoactive constituents).

The separation, selection and identification of this new type of isolated constituents from roots, leaves and fruits was accomplished.

From the leaves it was obtained an isocoumarin, named coriandrin, with a considerable photoactive action. In precoated silica gel of 0.5 mm of thickness activity was found when the amount of this compound was in order of $0.35\mu\text{g}/\text{mm}^2$ or higher.

From root extract were obtained three constituents with biological activity but only two of them (compounds F and B) showed photoactivity when purified. In tests accomplished in precoated silica gel with 0.5 mm of thickness the F constituent, having an aromatic ring with long branched chains and an ester group, showed activity at levels of $3\mu\text{g}/\text{mm}^2$. The B constituent a non-aromatic constituents was active at levels of $0.9\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

From the fruits no constituent having a fungicidal activity was isolated.

It is hoped that in the short- term, a relevant aspect for the new photopesticides such as coriandrin will be their structural modifications. in such a way higher pesticidal action might be achieved and in addition these new compounds could be less prone to resistance acquisition by fungi.

Due to lack of time it was not possible to have the complete identification of root constituents, which can be another aspect of future research.

Key words: *Coriandrum sativum* L.; coriander; *Umbelliferaea*; *Apiaceae*; *Cladosporium cucumerinum*; *Fusarium culmorum*; isocoumarin; furocoumarin; photoactivity; photoactive constituent.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
I - INTRODUÇÃO	
1.1 - <i>Coriandrum sativum</i> L. (Aparo e tinta da china sobre papel vegetal)	5
1.2 - Tipos de mecanismos de reacções fotoquímicas	13
1.3 - Esquema da estrutura geral das cumarinas simples	14
1.4. - Esquema geral e constituintes das 6,7-furanocumarinas (WAGNER <i>et al.</i> ,1984)	15
1.5 - Esquema geral e constituintes das 7,8-furanocumarinas (WAGNER <i>et al.</i> ,1984)	15
1.6 - Esquema geral e exemplos das furanocromonas (WAGNER <i>et al.</i> ,1984)	17
1.7 - Processo de obtenção de princípios activos de plantas (HAMBURGER e HOSTETTMAN,1991)	20
II - MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 - Delineamento dos ensaios de campo	25
2.2 - Raízes	27
A. Material vegetal seco (não moído e moído)	
B. Esquema de extracção	
2.3 - Folhas	28
A. Material vegetal seco (não moído e moído)	
B. Esquema de extracção	
2.4 - Frutos	29
A. Material vegetal seco (não moído e moído)	
B. Esquema de extracção	

	Pág.
2.5 - Material vegetal analisado. A - Raízes;B - Frutos;C - Folhas	30
2.6 - Aparato laboratorial de separação por PLC,sob baixa pressão	30
2.7 - Esquema geral de separação e purificação de compostos isolados de raízes	32
2.8 - Esquema geral de separação e purificação de compostos isolados de folhas	33
2.9 -Câmara de fluxo laminar e material para preparação de suspensões de <i>Cladosporium cucumerinum</i>	36
2.10 - Espectro de intensidade luminosa de lâmpada Osram,L18W/10 "day light"	36
 III - RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 - Produções do coentro e duração do ciclo cultural entre 1989 e 1992	42
3.2 - Floração do campo de cultura (Junho de 1990)	42
3.3 - Esquema geral da coriandrina	50
3.4 - Placas PTLC de comparação do extracto bruto de frutos (tolueno-AcOet), exibindo três manchas distintas (1,2,3) e, efeito não fototóxico dos compostos	51
3.5 - Acção tóxica do extracto bruto(E.B.)e das fracções F e E de raízes, sobre <i>C. cucumerinum</i> quer no escuro, quer sob a influência da luz	51
3.6 -Efeito inibitório crescente do extracto de folhas, para <i>C. cucumerinum</i> , sob acção da luz	53
3.7 - Acção tóxica do extracto bruto(A), fracção IV e coriandrina(C) contra <i>C. cucumerinum</i> no escuro ou à luz e contra <i>F. culmorum</i> no escuro e à luz	51
3.8 - Acção tóxica de fracção III e das manchas A e B das folhas para <i>C.cucumerinum</i> e <i>F.culmorum</i> no escuro e à luz	55
3.9 -Comparação do efeito da concentração da coriandrina no crescimento do fungo <i>C.cucumerinum</i> , sob condições de luz e escuro	56

	Pág.
3.10 - Comparação do efeito da concentração da coriandrina no crescimento do fungo <i>F.culmorum</i> , sob condições de luz e escuro	57
3.11 - Comparação do efeito da concentração do composto F no crescimento do fungo <i>C.cucumerinum</i> , sob condições de luz e escuro	58
3.12 - Comparação do efeito da concentração do composto F no crescimento do fungo <i>F.culmorum</i> , sob condições de luz e escuro	58
3.13 -Comparação do efeito da concentração do composto B no crescimento do fungo <i>C.cucumerinum</i> , sob condições de luz e escuro	59
3.14 -Comparação do efeito da concentração do composto B no crescimento do fungo <i>F.culmorum</i> , sob condições de luz e escuro	59
3.15 - Placas comparativas do efeito tóxico de 4 concentrações crescentes dos compostos C(folhas), G(frutos), F(raízes), B(raízes), R(raízes) sobre o fungo <i>C.cucumerinum</i> ; I - no escuro, II - à luz	60
3.16 - Placas comparativas do efeito tóxico de 4 concentrações crescentes dos compostos C(folhas), G(frutos), F(raízes), B(raízes), R(raízes) sobre o fungo <i>F.culmorum</i> ; I - no escuro, II - à luz	61

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
I - INTRODUÇÃO	
I.1 - Tipos de fotoactividade de compostos de origem vegetal	12
I.2 - Fotoinibição de <i>F. culmorum</i> em meio líquido, por compostos naturais e, seus tioderivados (BORGES <i>et al.</i> , 1992)	18
III . RESULTADOS E DISCUSSÃO	
III.1 - Produções do coentro e duração do ciclo cultural entre 1989 e 1992	40
III.2 - Compostos isolados de raízes, com actividade biológica	43
III.3 - Análise visual, olfativa e peso seco, de fracções de PLC das raízes	44
III.4 -Análise visual, olfativa e peso seco de fracções de PLC de folhas	48

I - INTRODUÇÃO

1 - ASPECTOS GERAIS

Estima-se que apenas de 5 a 15% das 250.000 a 500.000 espécies de plantas superiores existentes, tenham sido estudadas em relação às suas propriedades biológicas.

BAJAJ (1989) pôde apurar que ocorrem frequentemente nas plantas superiores compostos naturais, com potencial utilização em novos medicamentos e substâncias com acção pesticida ou alelopática. Porém, o reino vegetal tem registado poucos trabalhos no âmbito das suas potencialidades como reserva de compostos altamente bioactivos.

As constantes pressões ambientais e o aumento da resistência de doenças e pragas aos pesticidas convencionais, foram os pontos de partida para o estudo de novos meios de controlo destes organismos, ecológicamente mais recomendados e aceitáveis.

O aperfeiçoamento na elaboração de defesas químicas por parte das plantas ao longo dos séculos, originou, segundo LEY (1990), um manancial inexplorado de compostos biologicamente activos, que podem ser utilizados como novos agentes de protecção das culturas.

Recentemente têm sido objecto de investigação substâncias deste tipo, cuja acção pesticida decorre da absorção da luz solar, designadas por fotopesticidas .

A particularidade deste tipo de acção, leva-nos a pensar que estes compostos sejam selectivos, eficazes (as reacções fotoquímicas são em geral mais rápidas que as térmicas) e biodegradáveis. Por outro lado, sendo activados apenas na presença da luz, serão inócuos para os microrganismos benéficos do solo não expostos à iluminação solar.

Estudos desta natureza, dada a pouca divulgação entre nós, surgem frequentemente de forma polémica, uma vez que a maior parte das investigações se circunscrevem a estudos a nível laboratorial, nada se podendo inferir sobre os efeitos "in vivo".

Pretendeu-se com este trabalho contribuir, de alguma forma, para o aumento de conhecimentos, apresentando questões e propostas para uma discussão do tema mais pormenorizada, incidindo no estudo exaustivo dos compostos existentes nas várias partes vegetativas de uma espécie cultivada e subespontânea da região mediterrânica, com importância no nosso país pela utilização das suas folhas, em verde, em pratos típicos da cozinha tradicional. A sua utilização não se restringe, porém, à condimentar, considerando-se também a sua importância aos níveis medicinal e aromático. A escolha do coentro (*Coriandrum sativum* L), adveio do facto de terem sido já detectados nas suas folhas e frutos compostos activados pela luz de interesse biológico (CESKA *et al.*, 1988).

De 1988 a 1990, decorreram ensaios, integrados no projecto "Medicinal Aromatic and Spicy Crops", aprovado a nível comunitário para o INIA (Instituto Nacional de Investigação Agrária) no âmbito do programa AGRIMED (Agricultura mediterrânica), em cinco regiões distintas do nosso país, tendo constituído um trabalho pioneiro ao nível de estudos de espécies com interesse condimentar.

O objectivo primordial desse projecto foi o de inferir sobre aspectos de adaptação e fenologia das seguintes espécies: *Coriandrum sativum* L., *Melissa officinalis* L., *Origanum sativum* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus vulgaris* L..

No que diz respeito à região da Beira Interior, os ensaios tiveram lugar em terrenos pertencentes à Escola Superior Agrária de Castelo Branco tendo-se também concluído sobre as técnicas culturais mais adequadas às diferentes espécies.

Posteriormente (1990-1992), continuaram a realizar-se estudos de selecção produtiva em coentro, utilizando-se escalonamentos quinzenais de sementeiras na perspectiva de obtenção de plantas com maior vigor vegetativo, melhor adaptação e melhor produção.

Em simultâneo (1991-1992), usando como material vegetal, raízes, folhas e frutos das culturas dos campos experimentais, fez-se a extracção de compostos com vista a detectar a actividade biológica. Esta foi avaliada em extractos brutos de cada um dos componentes da planta e, subsequentemente, isolados, identificados e quantificados os compostos que se mostraram com actividade biológica e fotobiológica.

O material vegetal utilizado neste trabalho proveio de produções obtidas em Julho para frutos e raízes e, em Março e Abril para as folhas.

2 - O COENTRO

O coentro, espécie identificada por Linneau em 1753 e conhecido por koriander (Al.), cilantro (Esp.), coriandre (Fr.), coriander (Ing.) e coriandolo (It.), obedece segundo FRANCO (1971), à seguinte classificação sistemática:

Família - *UMBELLIFERAE*

Sub-família - *APIOIDEAE*

Sub-tribo - *CORLANDREAE*

Gênero - *Coriandrum* L.

Espécie - *Coriandrum sativum* L.

2.1 - CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

Planta herbácea, anual, originária do Norte de África e Ásia Ocidental, aparece espontânea em vários países mediterrânicos.

Morfologicamente apresenta:

Raiz delgada, cônica, fibrosa e muito ramificada.

Caule erecto, liso, cilíndrico, ramificado na parte superior, ausência de pelos e aroma desagradável em fresco, alcança uma altura de 40 a 60 cm.

Folhas inferiores pecioladas, pinadas, com segmentos ovais em forma de cunha, as superiores finamente divididas em lacínias lineares com aroma característico em verde.

Flores pequenas, brancas a ligeiramente rosadas, as da periferia radiadas (4-8) dispostas em umbelas terminais, corola com cinco pétalas livres, inflectidas no botão, ovário inferior bilocular, óvulo solitário em cada lóculo.

O fruto é um cremocarpo (2-6), globoso duro, amarelado, facilmente divisível na maturação, dimensões que variam entre os 1,5 a 5 mm de diâmetro com aroma e sabor aromáticos.

(FRANCO,1971; QUER,1986) (Fig.1.1.).

2.2 - EXIGÊNCIAS EDAFO-CLIMÁTICAS

Cultura pouco exigente em termos de solos, sendo desfavoráveis apenas os muito ácidos, pesados ou mal drenados (BUSTAMANTE, 1987).

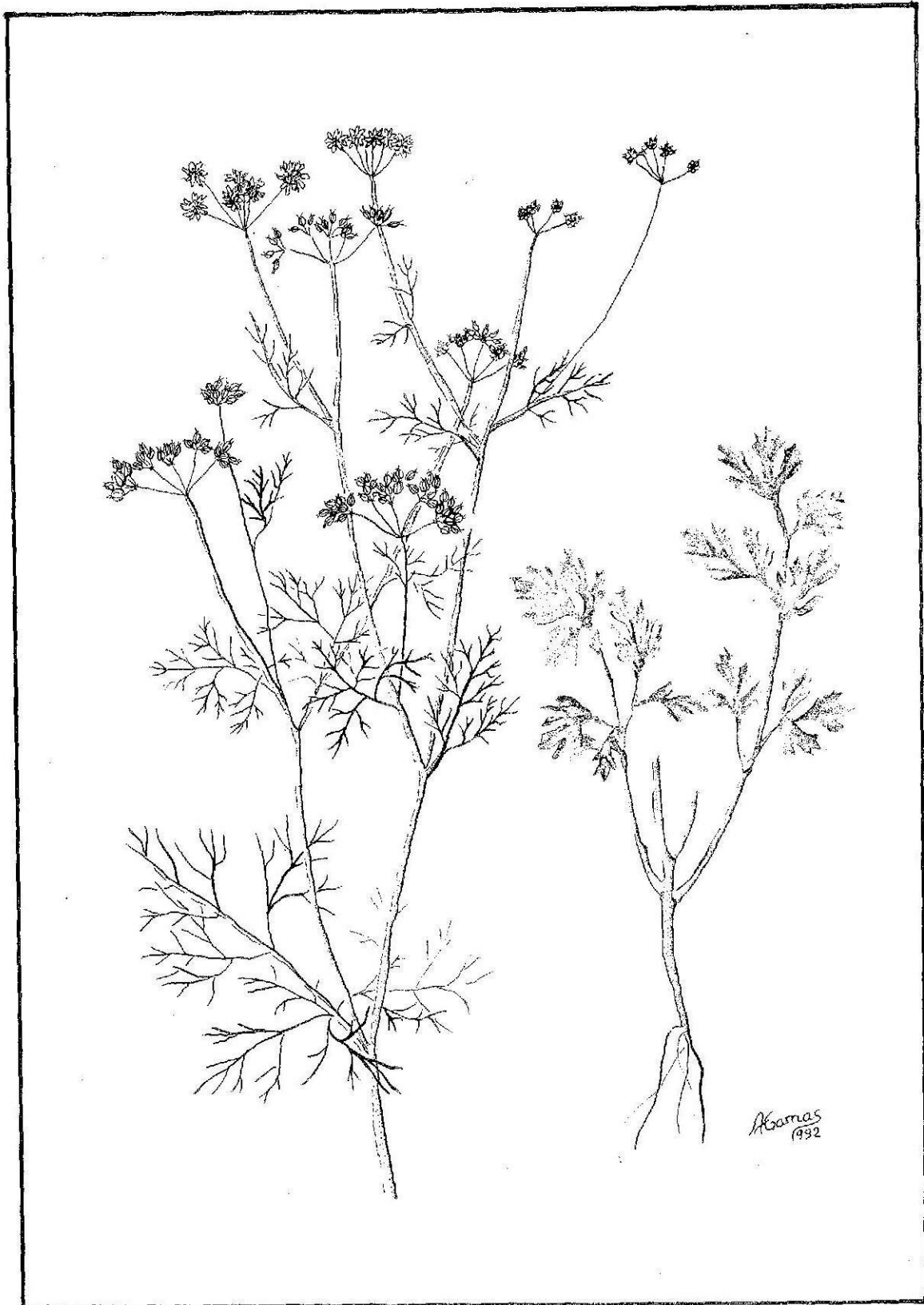


Fig.1.1 - *Coriandrum sativum* L. (Aparo e tinta da china sobre papel vegetal)

Planta sensível à geada (GARDÉ e GARDÉ, 1981); a chuva e o vento podem ter uma acção nefasta se ocorrerem durante o período da colheita, ocasionando a fragmentação e rachamento dos pequenos frutos (FRANCISCO e HERTWING, 1986).

2.3 - TÉCNICAS CULTURAIS

FRANCISCO e HERTWING (1986), referem que não se deve efectuar estrumação no ano da instalação da cultura. Contrariamente, BUSTAMANTE (1981) aconselha esta técnica cultural.

Espécie sensível às deficiências de N, P, K, Ca e Mg. Tem sido usada na Índia como indicadora da deficiência destes nutrientes no solo (SHARMA e AGARWALA, 1986). As fertilizações com fósforo e potássio, originam sementes mais aromáticas (FRANCISCO e HERTWING, 1986). No entanto, com base num estudo de avaliação da resposta do coentro à fertilização mineral, as aplicações de 50:50 e de 50:30 Kg/ha de N : P₂O₅, conduziram na Roménia às melhores produções em solos pardo-avermelhados (ROMAN e STEFEN, 1986).

Segundo MANGAL *et al.* (1986) níveis de salinidade superiores a 2,5 mmhos/cm reduzem a produção e qualidade da semente.

2.3.1 - SEMENTEIRA

A sementeira realiza-se em local definitivo, podendo fazer-se na Primavera ou Outono, caso não haja perigo de geadas.

Segundo GARDÉ e GARDÉ (1981) a distância na linha deverá ser de vinte centímetros e na entre-linha de trinta centímetros. Porém, dos compassos de vinte e dois e meio, trinta e trinta e sete e meio centímetros ensaiados na Índia por SUKHADIA *et al.* (1986) o compasso de trinta centímetros originou a produção (14,17 Kg/ha).

A profundidade de sementeira varia entre os dois centímetros e dois centímetros e meio, colocando as sementes nos sulcos abertos a distâncias de dois a cinco centímetros. Após a germinação devem efectuar-se os desbastes necessários (FRANCISCO e HERTWING, 1986).

A quantidade de semente necessária por ha de terreno também diverge segundo os autores. BUSTAMANTE (1981) refere 4 a 5 Kg, FRANCISCO e HERTWING (1986) aconselham 15 a 25 Kg.

2.3.2 - MONDAS E REGAS

A monda, deve ser sistematicamente realizada, desde a germinação até à floração (FRANCISCO e HERTWING, 1986).

A resposta das plantas à rega varia consoante o estado de desenvolvimento. O conteúdo em massa verde é superior de 15 a 50% em plantas regadas e não regadas. O conteúdo em óleos essenciais também é superior assim como o crescimento (PENKA, 1978). Segundo KASMELMOUS (1984), em ensaios efectuados no Sudão na época de Primavera-Verão, a percentagem total de óleo e proteína decrescem significativamente, se o intervalo de rega ultrapassar os 14 dias.

2.3.3 - COLHEITA E SECAGEM

A colheita de folhas realiza-se quando a planta atinge um mínimo de cinco folhas verdadeiras e antes do início do desenvolvimento da haste floral.

A colheita dos frutos está condicionada pelo seu estado de desenvolvimento. Se demasiado verdes, ficam escuros e pobres em óleos essenciais, ocasionando a sua desvalorização comercial. Se demasiado maduros e secos, possuem uma deiscência natural, originando perdas de produção.

Normalmente, a altura ideal para a colheita ocorre quando 50 a 60% dos frutos nas umbelas mudam da cor verde para amarelo dourado, amarelado ou pardo (FRANCISCO e HERTWING, 1986).

A secagem dos frutos pode ser feita ao sol, à sombra, ou ainda utilizando secadores. Os feixes de inflorescências devem ser suspensos com as umbelas voltadas para baixo, recolhendo-se as sementes em tabuleiro à medida que a secagem se processa (FRANCISCO e HERTWING, 1986; QUER, 1987).

2.4 - CONSTITUINTES QUÍMICOS

2.4.1 - RAÍZES

Poucas são as referências relativamente aos constituintes químicos das raízes de coentro. Porém, alguns compostos foram identificados na sub-tribo *Coreandreae* e no próprio coentro.

CROWDEN *et al.* (1969) resumiram os conhecimentos no âmbito da classificação sistemática com base na composição química da família *Umbeliferae*. Assinalaram como compostos importantes os poliacetilenos encontrados fundamentalmente nas raízes, os quais, apesar de existirem na tribo *Apiaceae*, não foram detectados na sub-tribo *Coriandreae*. O mais importante é o **falcarinol** que se utiliza como referência e que foi encontrado em quantidades apreciáveis na *Daucus carota L. (Dauceae)*.

Furanocumarinas foram também identificadas em raízes, na maior parte das vezes em misturas complexas. Na sub-tribo *Coriandreae*, uma em cada três espécies apresentaram estes compostos, embora não tenham sido identificados no coentro.

Um oligossacarido invulgar, denominado como **umbeliferose**(α -D-galactosido-2^Gsacarose), foi encontrado em raízes frescas do coentro.

2.4.2 - FOLHAS

Segundo GARDÉ e GARDÉ (1981) a finalidade da cultura do coentro no nosso país é quase exclusivamente para a produção de folhas frescas, ricas em vitaminas A, B₁, B₂ e C que se utilizam fundamentalmente na culinária.

CROWDEN *et al.*(1969), na sua análise de flavonóides em umbelíferas, identificam a **quercetina** como o constituinte químico mais representativo em folhas de coentro.

Relativamente ao grupo das cumarinas foram identificadas por CESKA *et al.* (1988), em folhas verdes e secas duas furanocumarinas isoméricas, a **coriandrina** e a **di-hidrocoriandrina**. Mais tarde BABA *et al.*(1991) identificaram mais duas isocumarinas a **coriandrona A** e a **coriandrona B** distintas pelo seu espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C.

2.4.3 - FRUTOS

Da análise de frutos secos foram identificados flavonóides por CROWDEN *et al.* (1969), como o **kaempferol** e, enzimas (**esterase III**). TALPADA *et al.*(1989), para além dos ácidos cafeico e clorogénico, identificaram também taninos em pequena percentagem.

Em pequenas concentrações aparecem substâncias fenólicas como o **ácido p-hidroxibenzóico**, encontrado como um componente importante da *Pimpinella anisum L.* (DIRKS e HERRMAN, 1984).

Foram ainda identificados por CESKA *et al.*(1987), nos limites de detecção duas furanocumarinas o 5-MOP (**5-metoxipsoraleno**) e o 8-MOP (**8-metoxipsoraleno**). Estes autores evidenciaram a presença de mais dois compostos fotoactivos, um deles não identificado e o outro provavelmente a **imperatorina**.

Relativamente á sua constituição em óleos, MIRONOVA *et al.*(1991) indicam que cerca de 13% pertencem aos ácidos gordos e que 0,15 a 1% a óleo essencial (COSTA, 1968 e QUER, 1987).

O óleo essencial é, até agora o componente economicamente mais importante nesta cultura obtendo-se dos frutos moídos por hidrodestilação, com rendimentos de cerca de 95%, sendo utilizado nas indústrias de alimentação, perfumes e licores (BORGES *et al.*, 1990).

O principal constituinte do óleo é o D-linalol num teor de 50-70% (QUER, 1987 e WAGNER *et al.*, 1984), seguido em menores percentagens pelo acetato de geranilo, geraniol, borneol, alcanfor, α -terpineol, óxido de linaeol e nerol. Os hidrocarbonetos (α -pineno, canfeno, sabineno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, para-cimeno, limoneno, γ -terpineno)

encontram-se em percentagens próximas de 20% (BORGES *et al*, 1990; TASHINER e NYKANEN, 1989).

A título complementar refira-se que se obtém por destilação de toda a planta, incluindo os frutos verdes, uma essência possuindo aroma desagradável, de composição química completamente distinta, quase só constituída por aldeídos alifáticos (até 95%), entre os quais se registam o n-decanal, n- α -deceno-1-al, 8-metil-2-noneno-1-al e, ainda o trans- α -trideceno-1-al, cujo odor lembra o dos percevejos. Estes aldeídos podem considerar-se compostos intermediários entre o mirceno, também reconhecido nesta essência e o linalol, característico dos frutos maduros (COSTA, 1968).

O óleo essencial é conhecido por ser alergénico tendo sido removido de diversas gamas de produtos de higiene e cosmética (SCHIEPFELIN, 1973). O linalol é um constituinte volátil capaz de promover dermatites por contacto. Porém, não foram detectadas reacções alérgicas a folhas frescas de coentro. Como foi referido, o óleo essencial é obtido por hidrodestilação. Este processo não permite a obtenção de outros compostos a não ser os que se referiram. Para identificar outros tipos de compostos bioactivos haverá que optar por outros processos de separação (CESKA *et al*, 1988).

Existem referências à utilização de óleos essenciais como insecticidas ou fungicidas. A toxicidade do óleo essencial de coentros foi testada nos Estados Unidos como insecticida por BEERENTRUP e ROBBELEN (1987) em *Callosobruchus maculatus*, *Lasioderma serricorne*, *Sitophilus oryzae* e *Tribolium confusum*. Não exibiu toxicidade para o primeiro, foi pouco tóxico para o segundo e terceiro, e moderadamente tóxico para o último. Quando usado no tratamento superficial de grãos de trigo, em concentrações crescentes de 0,05; 0,1; 0,2%, o óleo revelou-se bom repelente para *S. oryzae*.

3 - PESTICIDAS CLÁSSICOS E PESTICIDAS BIOLÓGICOS

Após a 2ª Guerra Mundial, o domínio durante duas décadas dos pesticidas orgânicos de síntese, tem vindo a decair, principalmente pelos movimentos e programas ecologistas de defesa do meio ambiente. Problemas relacionados com a saúde pública, qualidade da água, preservação de habitats de vida selvagem e outros elementos de caracterização da alta qualidade ambiental têm sido os aspectos mais considerados (FARRELL, 1990).

A diversidade de produtos de síntese produzida por parte das empresas comercializadoras de pesticidas e a exagerada aplicação destes produtos na agricultura, associada à constatação de uma crescente acumulação anual destes produtos ao longo das cadeias alimentares, têm sido os pontos chave para o estudo de tecnologias alternativas de controlo biológico dos agentes patogénicos das culturas (LYONS e ZALOM, 1990).

No vasto campo da química ambiental, os pesticidas clássicos se utilizados racionalmente, poderiam ser classificados como micropoluentes e xenobióticos (KIPS, 1985).

Básicamente os pesticidas participam na biosfera segundo uma diversidade de reacções, tanto de natureza física, fisico-química, química ou bioquímica, acumulando-se com maiores prejuízos na litosfera e hidrosfera (KIPS, 1985).

No solo, após reacções químicas de degradação, os compostos são adsorvidos nas fracções orgânica e mineral dos complexos argilo-húmicos. A adsorção retarda a sua transformação e decomposição química e/ou biológica, podendo ser de tal ordem que os torne indisponíveis a curto prazo, acumulando-se ao longo dos anos e só mais tarde demonstrando a sua acção tóxica (BAILEY *et al.*, 1968).

Muito poucos pesticidas ou os seus metabolitos biológicos penetram no solo em profundidade contaminando os lençóis freáticos. Porém, alguns casos já foram assinalados (HEINICH, 1978).

A água pode ser enriquecida por este tipo de agentes de várias formas. Tratamento directo das águas de superfície através de pesticidas e piscicidas (DUKE, 1977) e drenagem das águas de rega, enriquecidas por escoamentos superficiais em terrenos tratados (EDWARDS, 1973). Porém, a maior contribuição provém das águas das chuvas que arrastam os vapores de pesticidas existentes na atmosfera (KIPS, 1985).

Estudos efectuados no Canadá por MORLEY (1977) indicam, claramente, que os pesticidas actuais apresentam problemas de poluição. O herbicida atrazina e o insecticida diazinão aparecem em concentrações excessivas nas águas de rega analisadas por essa equipa de investigação.

Após o relatório da Academia Nacional da Ciência dos Estados Unidos em 1976, os investigadores têm procurado alternativas a estes produtos (NORMAN, 1976). A imprensa e as revistas de divulgação científica têm-se tornado eco das preocupações da opinião pública, em face do aumento dos resíduos químicos nas cadeias alimentares, já para não falar das resistências desenvolvidas pelas diferentes pragas e doenças aos pesticidas (ANÓNIMO, 1986).

Num futuro muito próximo vão iniciar-se restrições à utilização de pesticidas como resultado destas crescentes preocupações com a preservação do meio ambiente (SILVA, 1980). Todo um conjunto de soluções, de modo a melhorar a resistência das plantas a pragas e doenças, serão viabilizadas, quer através de técnicas de controlo biológico, quer através de técnicas de engenharia genética ou sistemas clássicos de melhoramento (KUC, 1990).

A biodegradabilidade é uma condição que na prática tem de ser levada em consideração, relativamente aos agentes de controlo biológico não tóxicos.

MARCHANT (1987) defende que um pesticida ou fungicida dito biológico, que tenha exercido a sua acção, deve subsequentemente decompôr-se num curto espaço de tempo em moléculas, sem efeitos nocivos para o ambiente.

SILVA (1980), aconselha pesticidas mais específicos, de menor espectro de acção e de menor repercussão ecológica. Em muitos casos o recurso à luta integrada, compromisso entre a luta química, luta biológica e técnicas culturais, tem sido a versão mais racional, levando a adoptar favoravelmente a utilização dos denominados pesticidas biológicos.

Após os anos 70, um considerável interesse tem sido dado ao estudo de plantas capazes de se protegerem contra agentes patogénicos, em resultado da sua capacidade de produzirem substâncias com acção fototóxica e com propriedades insecticidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas (BOUGUERRA, 1990), existindo algumas patentes sobre alguns destes compostos e modos de acção.

As primeiras patentes foram dadas à equipa de Rebeiz, da Universidade de Illinois em Urbana nos Estados Unidos, nos finais de 1986 e iniciaram-se com estudos em herbicidas fotodinâmicos, também designados como herbicidas laser, que têm como base de acção a inibição da síntese de clorofila nas plantas a destruir. Este conjunto de pesticidas têm um denominador comum, um ácido aminado biodegradável (ácido δ -aminolévulinico, ALA) e um conjunto de substâncias denominadas modeladoras da síntese da clorofila (REBEIZ *et al.*, 1988).

Pela mesma equipa foram realizados estudos com compostos fotoactivos testando a sua acção como insecticidas, com efeitos fototóxicos semelhantes, desta vez actuando a nível da biossíntese de hemoglobinas e citocromos, denominados como insecticidas porfirinicos. Tratam-se de compostos biodegradáveis, altamente selectivos e eficazes a baixas concentrações (REBEIZ *et al.* 1988).

A utilização de compostos fototóxicos de plantas tem sido também corrente em actividades antibióticas contra bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*) (WAT *et al.*, 1980), nemátodos e alguns vírus. A actividade antifúngica foi inicialmente testada em *Aspergillus fumigans* e *Mucor hiemalis* (TOWERS e HUDSON, 1987), tendo sido utilizados posteriormente contra fungos fitopatogénicos.

HEITZ (1987) conclui que os próximos passos devem seguir as experiências de Rebeiz e da sua equipa, nas quais as moléculas tóxicas são obtidas a partir de princípios conhecidos da própria bioquímica das plantas visadas.

4-ACÇÃO FOTODINÂMICA DA LUZ E COMPOSTOS FOTOACTIVOS

Segundo HEITZ (1987) referências aos efeitos químicos induzidos pela luz em alcalóides, têm a sua origem no séc. XIX, fruto de ensaios realizados por Marcacci em 1888. Porém, só a partir dos anos 70 estes aspectos foram retomados e, iniciados estudos mais profundos, apesar da expressão "acção fotodinâmica da luz" ter sido utilizado pela primeira vez por Jodlbaner e Von Tappeiner em 1904.

A expressão "acção fotodinâmica" foi definida mais tarde por SPIKES e GLAD (1964) como o efeito destruidor sobre um organismo, célula ou vírus, exercido por substâncias que, por absorção de luz solar ou radiação ultra-violeta (UV) de longo comprimento de onda (320-400 nm), se transformam em estados electrónicos excitados altamente reactivos.

Segundo SPIKES e STRAIGHT (1987) muitas centenas de compostos têm sido examinados pelas suas capacidades de fotorreacção com biomoléculas (funcionando como sensibilizadores). De entre eles destacam-se produtos naturais como porfirinas férricas-livres (coproporfirina, protoporfirinas e uroporfirinas), flavinas (riboflavinas e FMN), clorofilas e um conjunto de produtos secundários como sejam os alcalóides derivados do triptofano, e outros compostos como as β -carbolinas, quinonas, furanocumarinas, furanocromonas, furanoquinolinas, poliacetilenos, tiofenos (TOWERS e CHAMPAGNE, 1987) (Quadro I.1).

Quadro L.1 - TIPOS DE FOTOATIVIDADE DE COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL

Tipo de composto	Origem	Exemplos de compostos fotoativos	Tipode fotoatividade	Referência
Furanocumarinas	<i>Compositae</i> <i>Leguminosae</i> <i>Moraceae</i> <i>Rutaceae</i> <i>Solanaceae</i> <i>Umbelliferae</i>	Angelicina 5-Metoxipsoraleno	Larvicida Antifúngica	Berenbaum Feeny(1981) Johnson (1983)
Furanocromonas	<i>Rutaceae</i> <i>Umbelliferae</i>	Quelina	Antiviral Bactericida Antifúngica	Towers Champagne(1987)
Alcalóides Furanoquinolínicos	<i>Rutaceae</i>	Dictamina	Antifúngica	Towers Champagne(1987)
Quiononas	<i>Hypericaceae</i>	Hipericina	Larvicida Antiviral	Knox <i>et al.</i> (1987) Cassady <i>et al.</i> (1990)
Acetilenos Tiofenos	<i>Asteraceae</i>	1-Fenil-1,3,5-heptatriino α -Tertienilo	Insecticida Larvicida Insecticida	Arnason <i>et al.</i> (1987)

São conhecidas pela sua acção fotodinâmica "in vitro", biomoléculas como alguns ácidos orgânicos, alcoóis, aminas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, algumas bases purinas e pirimidinas, hormonas vegetais, proteínas, aminoácidos, lípidos insaturados, pirróis, esteróis e algumas vitaminas.

Foi-se criando interesse principalmente entre bioquímicos e fotobiólogos, no estudo dos mecanismos que controlam as reacções de fotoxidação de determinados corantes por acção de determinados comprimentos de onda, nos efeitos exercidos sobre as células vivas e os constituintes celulares (HEITZ, 1987).

Um dos potenciais produtos das reacções fotoquímicas é o oxigénio em forma de singlete (1O_2) que, na maioria dos casos é considerado um agente prejudicial para todos os organismos vivos (WASSERMAN e MURRAY, 1979).

KNOX e DODGE(1985) demonstraram que a acção defensiva de muitos produtos secundários em reacções controladas pela luz, envolviam transferência de energia para o oxigénio, transformando-o em formas activadas (1O_2). Nestes casos o oxigénio participaria num mecanismo de defesa contra a toxicidade provocada pelas reacções fotoquímicas.

Quando na fotosensibilização é envolvido o oxigénio, as reacções ocorrem segundo dois mecanismos distintos e designam-se por reacções fotodinâmicas de: **Tipo I** e **Tipo II** (FOOTE, 1987). Resumindo, para ambos os mecanismos, o primeiro passo para que o processo ocorra envolve a absorção da luz na banda do visível ou do UV através de um sensibilizador.

No mecanismo do Tipo I ①, os sensibilizadores excitados convertem o substrato a produtos sob a forma de radicais livres, que, na presença do oxigénio, se convertem em produtos oxidados. No mecanismo Tipo II ②, a excitação dos sensibilizadores origina uma reacção que causa a formação de singletos de oxigénio (1O_2), indo estes, por sua vez, reagir com o substrato, convertendo-o então em produtos oxidados. Nos casos em que o oxigénio não participa ③, a reacção dá-se por transferência electrónica ou de protão entre um sensibilizador excitado e o substrato (Fig.1.2).

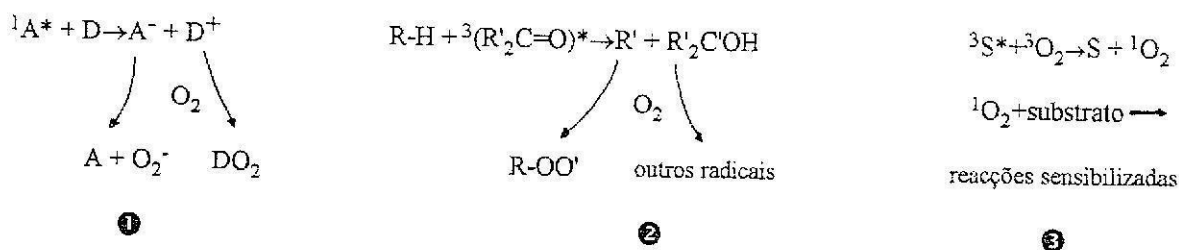


Fig.1.2 - Tipos de mecanismo de reacções fotoquímicas.

Na pesquisa de compostos vegetais fotoactivos a maior parte da investigação tem-se baseado no isolamento e identificação de novos compostos fototóxicos, assim como no estudo geral dos seus mecanismos de acção e no tipo de organismos sensíveis a esta acção (HEITZ, 1987).

Dos compostos com acção fotodinâmica, alguns têm particular importância no reino vegetal, mas far-se-á referência particular, neste trabalho, aos grupos de compostos nos quais se podem integrar as substâncias isoladas do coentro que demonstraram actividade biológica e fotobiológica.

4.1 - CUMARINAS

As cumarinas foram isoladas em 1820 da fava tonca (*Dipteryx odorata* Willd) e daí a sua designação, já que o nome vernáculo desta espécie é "Coumarou".

São compostos naturais que possuem o núcleo 2H-1-Benzopirano (NEILSON, 1971) sendo este o seu princípio activo. Pertencem ao grupo das lactonas insaturadas, relacionado com os ácidos fenólicos. As suas estruturas são muito variáveis, conhecendo-se até ao momento um número total de 800 nos vegetais superiores, havendo, porém, famílias onde ocorrem com maior frequência: *Leguminosae*, *Compositae*, *Moraceae*, *Meliaceae* mas, sobretudo,

nas famílias das *Umbellifereae* e *Rutaceae*, sendo nestas últimas que aparecem as estruturas mais complexas.

Nem todos os tipos de cumarinas apresentam actividade biocida, sendo fundamentalmente o grupo das cumarinas complexas que apresentam reacções de fototoxicidade.

Segundo WAGNER *et al.* (1984) as cumarinas podem ser classificadas em simples e complexas.

a) Cumarinas simples

Muitos dos compostos deste tipo são substituídos com um OH ou OCH₃ nas posições C-6 ou C-7. As substituições em C-5 e C-8 são menos comuns. Correspondem assim a anéis hidroxilados e aos seus ésteres.

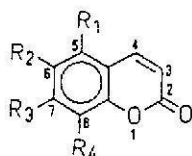


Fig.1.3 - Esquema da estrutura geral das cumarinas simples

b) Cumarinas complexas

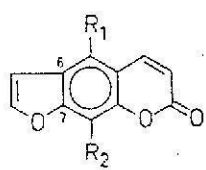
Compostas fundamentalmente pelas furanocumarinas e pelas piranocumarinas.

b₁) Furanocumarinas

Tomando como base a fórmula geral das cumarinas simples o anel furano aparece nas posições C-6 e C-7 no tipo-psoraleno(linear) ou em C-7 e C-8 no tipo-angelicina(angular).

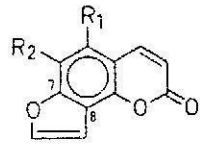
Na Fig.1.4 representa-se a fórmula geral das 6,7-furanocumarinas assim como alguns exemplos de origem vegetal.

Na Fig.1.5 a fórmula geral e exemplos das 7,8-furanocumarinas.



R1	R2	Furanocumarina
H	H	Psoraleno
OCH ₃	H	Bergapteno
H	OCH ₃	Xantotoxina
H	OH	Xantotoxol
OCH ₃	OCH ₃	Isopimpinellina
H	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{OCH}_2-\text{CH}=\text{C} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Imperatorino
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{OCH}_2-\text{CH}=\text{C} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	H	Isoimperatorino
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{C} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	H	Oxipeucedanino
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{OCH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$	H	Oxipeucedanino hidratado

Fig.1.4 - Esquema geral e constituintes das 6,7-furanocumarinas (WAGNER *et al.*, 1984)



R1	R2	Furanocumarina
H	H	Angelicina
OCH ₃	H	Isobergapteno
H	OCH ₃	Esfondinio
OCH ₃	OCH ₃	Pimpinelinio

Fig.1.5 - Esquema geral e constituintes das 7,8-furanocumarinas (WAGNER *et al.*, 1984)

CROWDEN *et al.* (1969) apresenta as furanocumarinas como um grupo que aparece frequentemente em misturas complexas nas umbelíferas, o que conduz a certas dificuldades na sua purificação.

A toxicidade destes compostos resulta do facto de se interporem na dupla cadeia do DNA, nas posições 3,4 ou 4',5' (TOWERS e CHAMPAGNE, 1987), onde, após activação pelas radiações UV, formam duplas ligações covalentes com as bases pirimidínicas (IVIE, 1978).

SONG e TAPLEY (1979) demonstraram tratar-se de um mecanismo **Tipo I**, no qual os radicais de oxigénio se encontram envolvidos. A fotoregeneração de singletos de oxigénio pelas furanocumarinas faz com que sejam potencialmente responsáveis por inactivações enzimáticas e ruptura de membranas (KNOX e DODGE, 1985).

IVIE *et al.* (1986), concluíram que o incremento da fototoxicidade das furanocumarinas angulares, relativamente às furanocumarinas lineares, é devido à hidrólise extremamente lenta dos anéis furano dos derivados furanocumarínicos das primeiras. Estas, apresentam, por este facto, um efeito fotocarcinogénico superior.

Outros tipos de acções das furanocumarinas foram também demonstradas por SONG e TAPLEY (1979), envolvendo, neste caso, lesões celulares por fotoxidação e ligações fotoactivas a proteínas celulares.

Este grupo de compostos é talvez o mais bem documentado e o mais estudado a nível da sua actividade biológica, já que a sua activa interacção luz-matéria viva exerce uma influência essencial nos ciclos biológicos.

As furanocumarinas têm ainda acções importantes independentes da luz, cujos mecanismos não se encontram ainda bem estudados. A sua fotoactividade tem-se revelado como claramente ecológica, tornando-as importantes sob o ponto de vista agrícola, ambiental, médico e da saúde pública.

São compostos envolvidos na produção de fitoalexinas como resposta a infecções por fungos em algumas umbelíferas (*Apiaceae*) (JOHNSON e BRANNON, 1983), e podem tornar fotossensíveis insectos e outros herbívoros (BERENBAUM *et al.*, 1984).

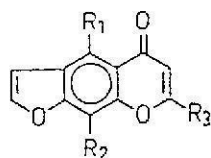
b₂) Piranocumarinas

O anel pirano encontra-se em C-7 e C-8 do sistema cumarínico.

4.2 - CROMONAS

As cromonas são compostos que possuem o núcleo γ -benzopirano, ao contrário do α -benzopirano das cumarinas, sendo por isso um grupo isomérico destas.

São as cromonas complexas que, por possuírem o anel furano, apresentam fotoactividade.



R1	R2	R3	Furanocromonas
OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	Quelina
OH	OCH ₃	CH ₃	Quelinol
OCH ₃	H	CH ₃	Visnagina
OCH ₃	H	CH ₂ OH	Quelol
OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ OH	Amiol

Fig.1.6 - Esquema geral e exemplos das furanocromonas (WAGNER *et al.*, 1984)

Existem ainda outros derivados cumarínicos com importância biocida e fototóxica como sejam os furanocromenos e as furanoquinolinas.

A maioria destes compostos fototóxicos conhecidos apresenta em comum um fragmento molecular semelhante ao núcleo cumarínico.

A observação desta semelhança indica a possibilidade de obtenção de variantes daquela estrutura base, não só optimizadas quanto aos requisitos de um fotopesticida mas também permitindo combater a aquisição de resistências por parte dos parasitas vegetais.

A concepção de derivados de compostos naturais com vista à optimização da fototoxicidade tem vindo a ser efectuada utilizando elementos adquiridos através de estudos fotofísicos e fotoquímicos do "composto-mãe".

Têm assim sido sintetizados derivados de análogos da cumarina modificando grupos funcionais lábeis ($>C=O$, $-OH$, $-COOH$, NH_2) com dois intuitos distintos : i) análogos das cumarinas, furanocumarinas, cromonas, flavonas, etc., foram modificados de modo a deslocar o seu espectro de absorção (340 a 380 nm) para a região do visível, melhorando o seu rendimento de absorção da luz solar (exs.: tioquelina, tiocumarina, 8-metoxitiosoraleno, 7,8-di-hidroxitioflavona); ii) grupos funcionais são modificados com o objectivo de melhorar a fotoreactividade (ex.: resultados preliminares indicam que qualquer modificação química da estrutura molecular que implique uma destabilização da dupla ligação pirrónica 3,4 induz um aumento da fototoxicidade (MAÇANTA, 1992).

No Quadro I.2 apresentam-se os efeitos de fotoinibição registados em *Fusarium culmorum* por alguns compostos naturais e a comparação dessa acção com os seus tioderivados.

Quadro L2- FOTOINIBIÇÃO DE *F.culmorum* EM MEIO LÍQUIDO, POR COMPOSTOS NATURAIS E SEUS TIODERIVADOS.

(-) inactivo; (+) 0-25% de inibição

(++) 25-50% de inibição

(+++) 50-75% de inibição

Famílias de Compostos Naturais	Foto Inibição	Famílias de Tioderivados	Foto Inibição
Cumarinas		Tiocumarinas	
cumarina	-	6-metiltiocumarina	+
4-metil-7-hidroxycumarina	-	7-metoxitiocumarina	+
4-metil-7-metoxycumarina	+	4-hidroxitiocumarina	-
cumarina 153	+	tiocumarina 153	-
Furanocumarinas		Tiofuranocumarinas	
8-metoxipsoraleno	+++	8-metoxitioipsoraleno	+++
		tiopsoraleno	+
		4,5,8-trimetiltioipsoraleno	+++
Cromonas		Tiocromonas	
flavona	-	tioflavona	-
		7,8-di-hidroxitioflavona	+
		α -naftotioflavona	+
		tiocromona	++
		2-feniltiocromona-4-ona	-
		2-feniltiocromona-4-tiona	-
Furanocromonas		Tiofuranocromonas	
quelina	+	tioquelina	+

(Fonte: BORGES *et al.*, 1992)

5 - SUBSTÂNCIAS FOTOACTIVAS EM COENTRO

É na parte aérea, fundamentalmente nas folhas que existem referências a este tipo de compostos (CESKA *et al.*, 1988). Porém, nos frutos também foram referidos alguns compostos fotoactivos mas em quantidades tão ínfimas que só foram detectados por testes biológicos ultrasensíveis e nos limites de detecção (<0,005 ug/g) (CESKA *et al.*, 1987).

Nas folhas foi isolada uma furoisocumarina, a coriandrina e um seu isómero a di-hidrocoriandrina por CESKA *et al.* (1988), sendo os primeiros exemplos de substâncias com anéis 5H-furo(2,3-g)(2)benzopirano a serem identificados em fontes naturais. Estes compostos foram estudados pela primeira vez testando a sua acção na bactéria *Escherichia coli* B_{S-1}(rec⁺, exr⁻, hrc⁻), um mutante deficiente na reparação do seu DNA e extremamente sensível às radiações ultra-violetas e a agentes alquilantes. Fotosensibilização letal e efeitos mutagénicos na *E. coli* indicam uma acção da coriandrina mais activa que a do psoraleno (ASHWOOD-SMITH *et al.*, 1989).

A coriandrina apresentou uma acção superior à di-hidrocoriandrina em todos os testes. Outros testes fotobiológicos pretendendo verificar o efeito de compostos no controlo da psoríase, doença dermatológica, foram levados a cabo por ASHWOOD-SMITH *et al.* (1989), comparando a coriandrina com furanocumarinas psoralénicas (5-MOP e 8-MOP) e a furanocumarina angelicina. Em consequência, a coriandrina registou uma rápida metabolização, em comparação com as outras furanocumarinas, o que provocou uma acção fraca na actividade de fotosensibilização da pele, surpreendendo os investigadores, já que este composto apresenta potencialidades elevadas em outros testes biológicos. Porém, esta acção menos activa tem como contrapartida um efeito carcinogénico menor.

Nas raízes não foram efectuados estudos de fotoactividade, apesar de CESKA *et al.* (1988), referirem a existência de compostos fotoactivos em quantidades superiores às das folhas. Na base desta questão encontra-se o facto de ser difícil efectuar a purificação destas substâncias pela existência de uma mistura de agentes contaminadores.

6 - ESTRATÉGIA PARA A PESQUISA DA BIOACTIVIDADE EM PLANTAS.

Segundo HAMBURGER e HOSTETTMAN(1991) o processo de identificação de um constituinte vegetal activo, principalmente no estado puro, é extremamente longo e lento, requerendo uma colaboração multidisciplinar de agrónomos, botânicos, farmacêuticos e químicos, envolvendo os seguintes passos (Fig.1.7.) :

- Colheita e/ou cultura, identificação botânica e secagem do material vegetal;
- Preparação de extractos e análises cromatográficas preliminares por cromatografia de camada fina (TLC) e cromatografia de alta precisão (HPLC);
- Prospekção biológica nos extractos vegetais;
- Consecutivas separações cromatográficas, em que cada fracção será submetida a testes biológicos preliminares;
- Isolamento dos compostos e testes de pureza;
- Elucidação da estrutura dos compostos através de métodos químicos e físico-químicos;

- Síntese parcial ou total;
- Preparação de compostos derivados/análogos para esclarecimento da relação actividade-estrutura;
- Isolamento em larga escala para testes toxicológicos.

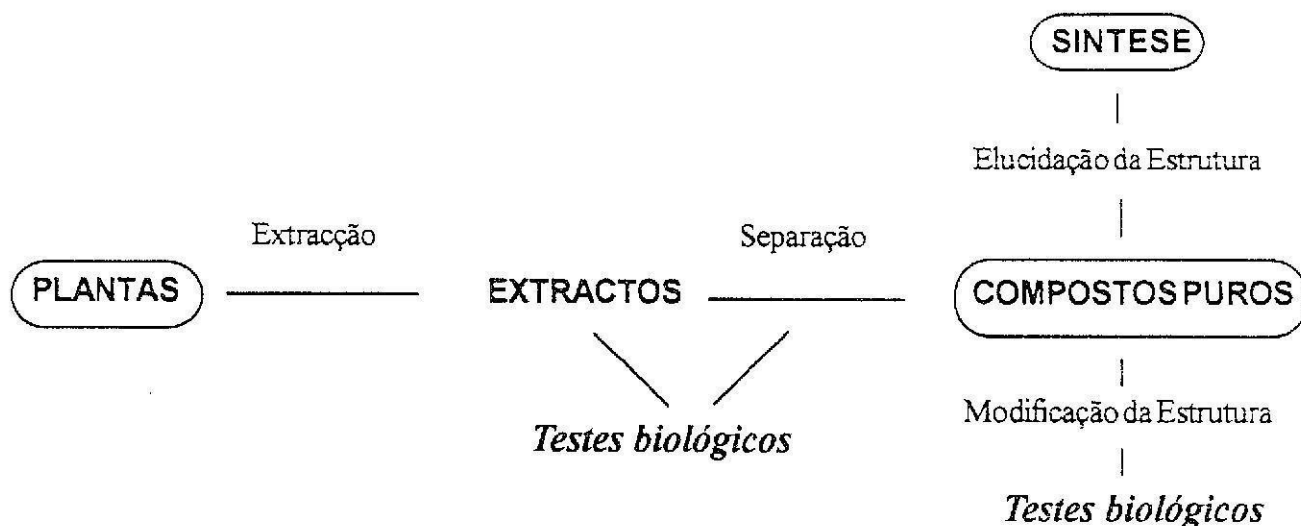


Fig.1.7 - Processo de obtenção de princípios activos de plantas (HAMBURGER e HOSTETTMAN, 1991)

A observação no campo será a técnica mais útil para os programas de prospecção de actividade antimicrobiana e insecticida.

Uma referência especial para as características a exibir pelos testes biológicos que, para além de terem de ser compatíveis com o elevado número de amostras a testar (extractos, fracções de purificação, compostos purificados, etc.), terão também de ser simples, sensíveis, rápidos, reprodutíveis e pouco onerosos. Consoante o fim em vista e o microrganismo a testar, assim se opta por um ou outro tipo de teste, utilizando-o depois em larga escala para rastreios a nível laboratorial ou a nível industrial (HAMBURGER e HOSTETTMAN, 1991).

Na maioria dos testes laboratoriais em que se testa a reacção à luz (UV) com microrganismos, utiliza-se a bactéria *E. coli* Bs-1(rec+, exr-, hrc-).

Para os casos da acção fungicida e para além de métodos de diluição em placa de Petri por medição dos diâmetros de inibição, utilizam-se como mais expeditos e rápidos os métodos de bioautografia directamente em TLC, designados genericamente como testes biológicos de *Cladosporium cucumerinum*. Diversos trabalhos têm sido registados neste âmbito, envolvendo fungos como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Ascochyta fabae*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Alternaria longipes* (BURDEN *et al.*, 1985; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1988; WEINSTEIN *et al.*, 1981).

7 - MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

A identificação de compostos de um extracto vegetal envolve inicialmente um conjunto de processos de separação e purificação dos mesmos, como já foi referido.

Apesar de muitos esforços não existe ainda nenhuma técnica universalmente aceite, como sendo a melhor para a separação de um leque tão variado de substâncias existentes nos extractos vegetais.

O(s) método(s) de separação escolhido(s) deverá(ão) ser tal(is) que os compostos sejam obtidos como se encontram na mistura, recaíndo a escolha no(s) método(s) que melhor resultado der(em) para a separação dos tipos de compostos pretendidos (SHRINER *et al.*, 1980).

Os métodos utilizados são: destilação, sublimação, recristalização e cromatografia.

Para a separação de compostos não voláteis de extractos vegetais, os métodos de cromatografia são os que mais se utilizam nos domínios da química e bioquímica (HOSTETTMANN *et al.*, 1985).

A cromatografia pode ser definida como a ciência da técnica de separação onde se encontra envolvida uma fase móvel (solvente) passando por uma fase estacionária (adsorvente da coluna ou da placa). A separação baseia-se na adsorção selectiva e preferencial de compostos da fase móvel pela fase estacionária (STAHL *et al.*, 1975).

Das técnicas tradicionais de cromatografia destacam-se como as mais frequentes a cromatografia de papel (CP), cromatografia em camada fina analítica (Thin Layer Chromatography-TLC), cromatografia de camada fina preparativa (PTLC), cromatografia em fase gasosa(CG) e cromatografia em fase líquida (CL).

Com a PTLC poderemos separar compostos na escala do miligrama(1 a 300mg) até algumas gramas, surgindo como um método generalizado.

A PTLC em conjugação com a CL é, ainda hoje na maioria das publicações científicas, a associação de métodos mais utilizados para a separação de produtos naturais, em trabalhos laboratoriais.

Segundo HOSTETTMANN *et al* (1985) as técnicas cromatográficas têm sofrido evolução no sentido de reduzir a duração do processo de separação sem interferir com a resolução das mesmas. Isto pelo facto de ocorrerem frequentemente modificações estruturais das substâncias activas extraídas de plantas durante os processos de separação.

Actualmente dois processos adaptados aos métodos cromatográficos clássicos têm tido, particular aceitação. São eles a cromatografia centrífuga de camada fina(TLCC) e a cromatografia líquida sob pressão(CLP).

Os métodos de CLP têm resultado nas suas diferentes facetas em elevadas eficiências de separação, rapidez e resolução.

Na CLP é aplicada uma determinada pressão à coluna de cromatografia, originando as várias modalidades, podendo estas ter pressões de 2 até 100 bar e separar tamanhos de amostra desde gramas ao micrograma. Como o tamanho das colunas varia consoante a quantidade da amostra, podem-se classificar as diferentes técnicas de CLP de acordo com a pressão utilizada para a separação:

- cromatografia de muito baixa pressão(2bar)
- cromatografia de baixa pressão(< 5bar)
- cromatografia de média pressão(5-20bar)
- cromatografia de alta pressão(HPLC>(> 20bar)
- cromatografia de alta precisão(HPLC)(100bar)

Outros métodos de alta eficiência recentemente introduzidos não requerem um suporte sólido, baseando-se nas separações cromatográficas líquido-líquido, sendo a cromatografia em gotejamento sob contra-corrente(CCC) o método mais simples (HOSTETTMAN *et al.*,1986).

Para a identificação de um composto, tarefa muitas vezes morosa e difícil, é necessário recolher o máximo de informações sobre o mesmo, examinando-se inicialmente aspectos puramente físicos(análise visual, olfativa, ponto de fusão e ebulição e características de solubilidade) e posteriormente aspectos estruturais.

Para a identificação a nível estrutural, uma série de dados espectroscópicos podem ser utilizados na obtenção de informações sobre o composto não identificado.

A espectroscopia de infra-vermelho(IV) pode ser interpretada em termos da presença ou ausência de grupos funcionais.

A partir da Ressonância Magnética Nuclear(RMN) poderemos, se a análise for de ^1H obter informação sobre os prótons de uma molécula; se a análise for de ^{13}C qual o número e tipo de carbonos dessa mesma molécula. Através dos espectros COSY, correlação C-H e DEPT poderemos obter informações adicionais sobre os acoplamentos entre os hidrogénios, quais os hidrogénios que se encontram ligados a cada carbono e quais os tipos de átomos de carbono existentes na molécula (primários, secundários, terciários e quaternários).

Pela espectrometria de massa podemos obter o ião molecular, para além dos fragmentos característicos fornecendo-nos assim informações sobre a estrutura molecular do composto.

A espectroscopia de ultra-violeta(UV), resultante de excitações electrónicas, é especialmente importante em estudos de compostos com ligações insaturadas e em compostos com reacções fotoquímicas(SHRINER *et al.*,1980).

Se o composto for cristalino, a análise por cristalografia de raios-X, fornecerá uma ideia mais concreta do mesmo.

Após a interpretação deste conjunto de dados (físicos, químicos e espectroscópicos), poder-se-á sugerir uma estrutura para o composto.

A segunda etapa da identificação de um composto desconhecido é a pesquisa na literatura. As propriedades do composto em estudo podem ser comparadas com compilações existentes de dados publicados sobre todos os compostos estudados. Se se tiver acesso a um banco de dados, instalado em computador, esta pesquisa será realizada com maior rapidez (ALLINGER *et al.*, 1976).

Para um composto novo terá de proceder-se à caracterização e elucidação da sua estrutura. Para confirmar a estrutura postulada dever-se-á proceder à síntese do composto ou à síntese de compostos seus derivados, comparando subsequentemente os dados espectrométricos com os do produto novo.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1 - CULTURA E SELECÇÃO DE MATERIAL VEGETAL

Como já foi referido, através do programa AGRIMED, iniciou-se a cultura de coentro em 1988, na época de Outono-Inverno, através de uma colecção de frutos de diversas casas comerciais portuguesas, assegurando de início o máximo de variabilidade.

A selecção dos frutos de um ensaio para outro efectuou-se no sentido de obter plantas com maior produção e, que não apresentassem sinais de rachamento. Todos estes ensaios de produção foram levados a cabo na Qta. da Sra. de Mércules, em terrenos pertencentes à Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

As sementeiras foram efectuadas nas épocas de Outono-Inverno e Primavera-Verão, sob condições culturais semelhantes. As sementeiras foram realizadas em canteiros casualizados com três repetições na área de cultura, distanciados entre si de 0,7m (Fig.2.1). Utilizou-se o semeador manual para uma sementeira em linhas distanciadas de 20 cm. Na linha e, após monda manual, as plantas apresentavam uma distância de 20cm, possuindo cada linha de 4m, 20 plantas e, cada canteiro 4 linhas.

Não foram efectuadas mondas químicas nem adubações e as regas foram realizadas com uma cadência semanal.

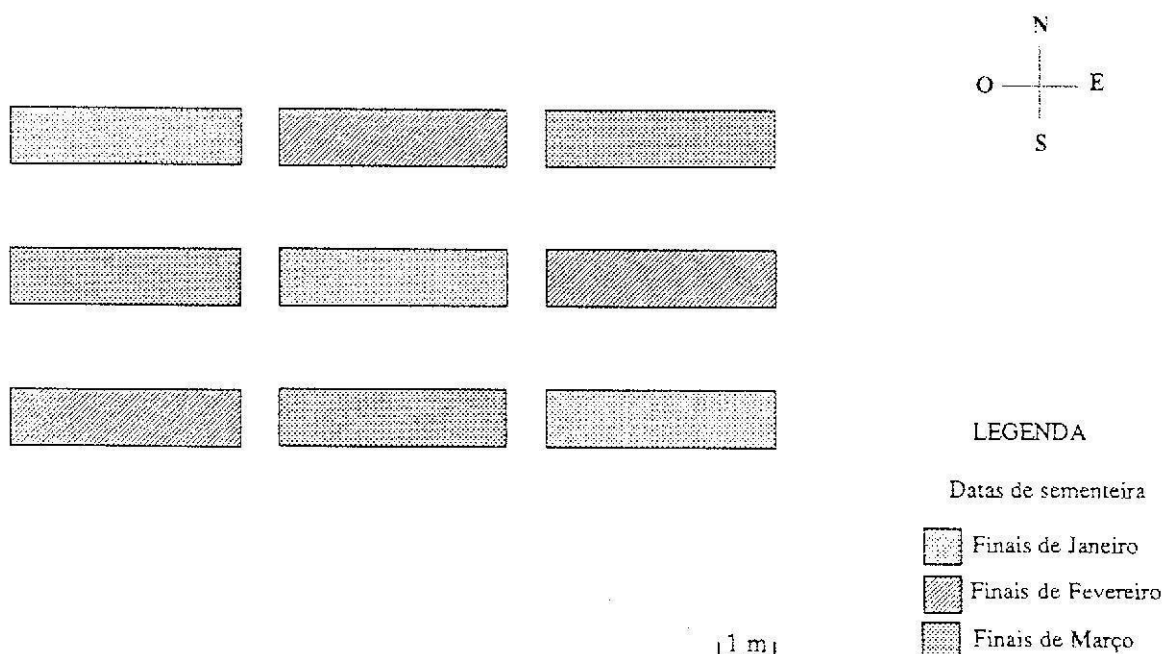


Fig.2.1 - Delineamento dos ensaios de campo.

2- COLHEITA DO MATERIAL VEGETAL, PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO

Recolheram-se raízes, folhas e frutos, de ensaios de selecção que decorreram durante os anos de 1989, 1990, 1991 e 1992, na região de Castelo Branco. As raízes foram recolhidas em Julho, as folhas em Abril e, os frutos em Julho.

O material vegetal foi seco de forma diversa. No caso das folhas e raízes estas foram colocadas em tabuleiros de rede numa sala arejada e escura, a secagem dos frutos efectuou-se com as inflorescências penduradas em molhos e, em posição invertida.

A avaliação da produção da matéria seca das folhas realizou-se anualmente, nas três modalidades e, em todas as parcelas, num total de 90 plantas por modalidade. Para tal, utilizou-se uma estufa de secagem, nas condições de 45°C durante 24 horas. No caso das raízes, a secagem decorreu em estufa de secagem, a 60°C durante 24 horas.

Todo o material vegetal seco foi sujeito a uma moagem, antes de qualquer outro tratamento.

A extracção, foi efectuada sempre, com o intuito de obter cumarinas. Por este facto, seguiram-se metodologias utilizadas por diversos autores nas extracções de plantas da mesma família botânica e, nos mesmos órgãos vegetativos.

Para evitar perdas de actividade, os extractos concentrados foram guardados em frigorífico à temperatura de 5°C.

2.1 - RAÍZES

As raízes de consistência lenhosa possuindo uma raiz principal e um conjunto alargado de raízes secundárias (Fig.2.2.A e Fig.2.5), apresentavam um aroma acentuado depois de secas, semelhante ao das folhas em verde. Procedeu-se à sua moagem (400g), em moinho de lâminas "Wiley" e extracção com acetato de etilo (2 l) durante 24 horas. O filtrado foi concentrado sob vácuo em evaporador rotativo. O método de extracção seguido (Fig.2.2.B) foi o utilizado por CESKA *et al.* (1986) para raízes de cenoura.

2.2 - FOLHAS

Depois de secas (125g), procedeu-se à sua moagem (Fig.2.3.A e Fig.2.5) e extracção com acetato de etilo (0,5 l x 5), durante 24 horas. O filtrado foi concentrado sob vácuo, em evaporador rotativo. O método utilizado (Fig.2.3.B) foi o desenvolvido por CESKA *et al.* (1988).

2.3 - FRUTOS

Amostras de frutos moídos (100g) (Fig.2.4.A e Fig.2.5), foram extraídos com acetato de etilo (0,5 l x 4), durante 20 horas. O filtrado foi concentrado sob vácuo, seguindo o método utilizado por CESKA *et al.* (1987) (Fig. 2.4.B).

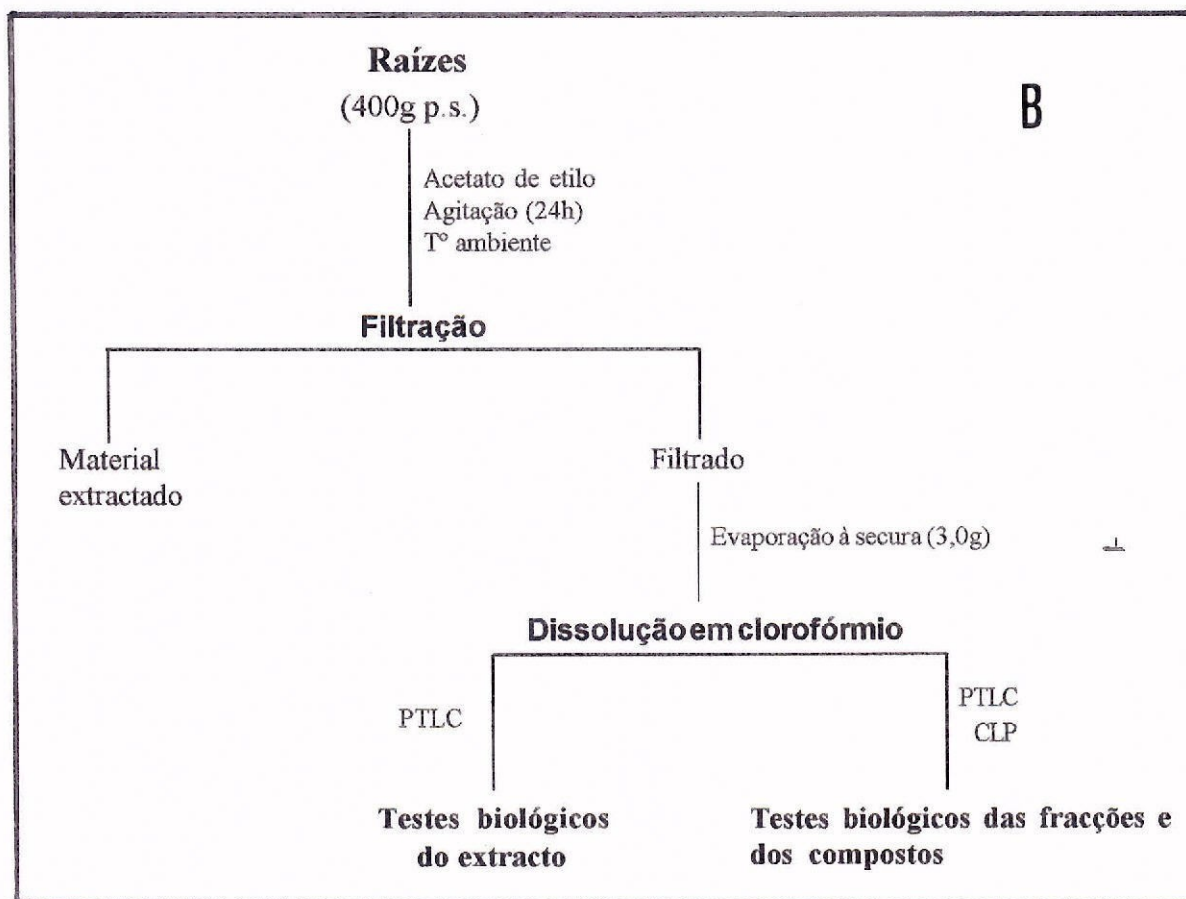


Fig. 2.2 - Raízes

A . Material vegetal (não moído e moído)

B . Esquema de extracção

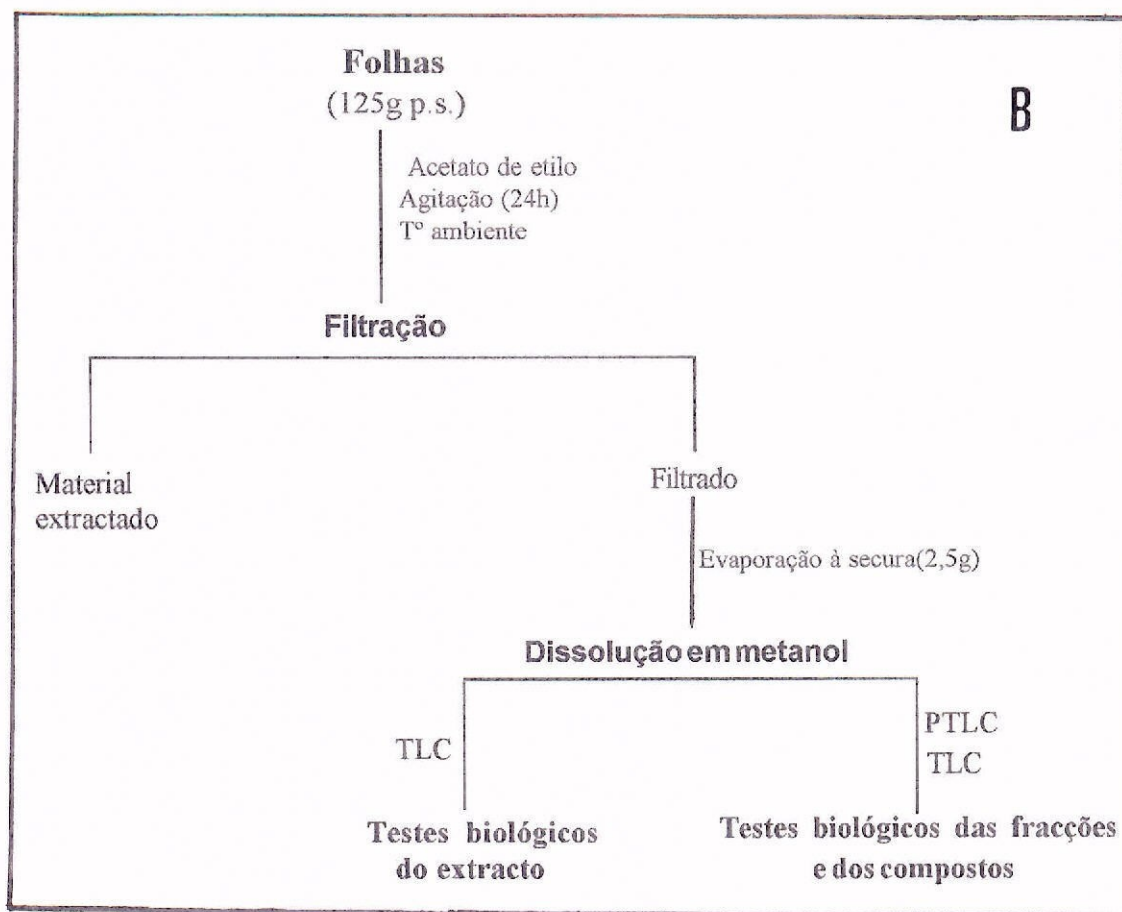


Fig.2.3- Folhas

A . Material vegetal seco (não moído e moído)

B . Esquema de extracção

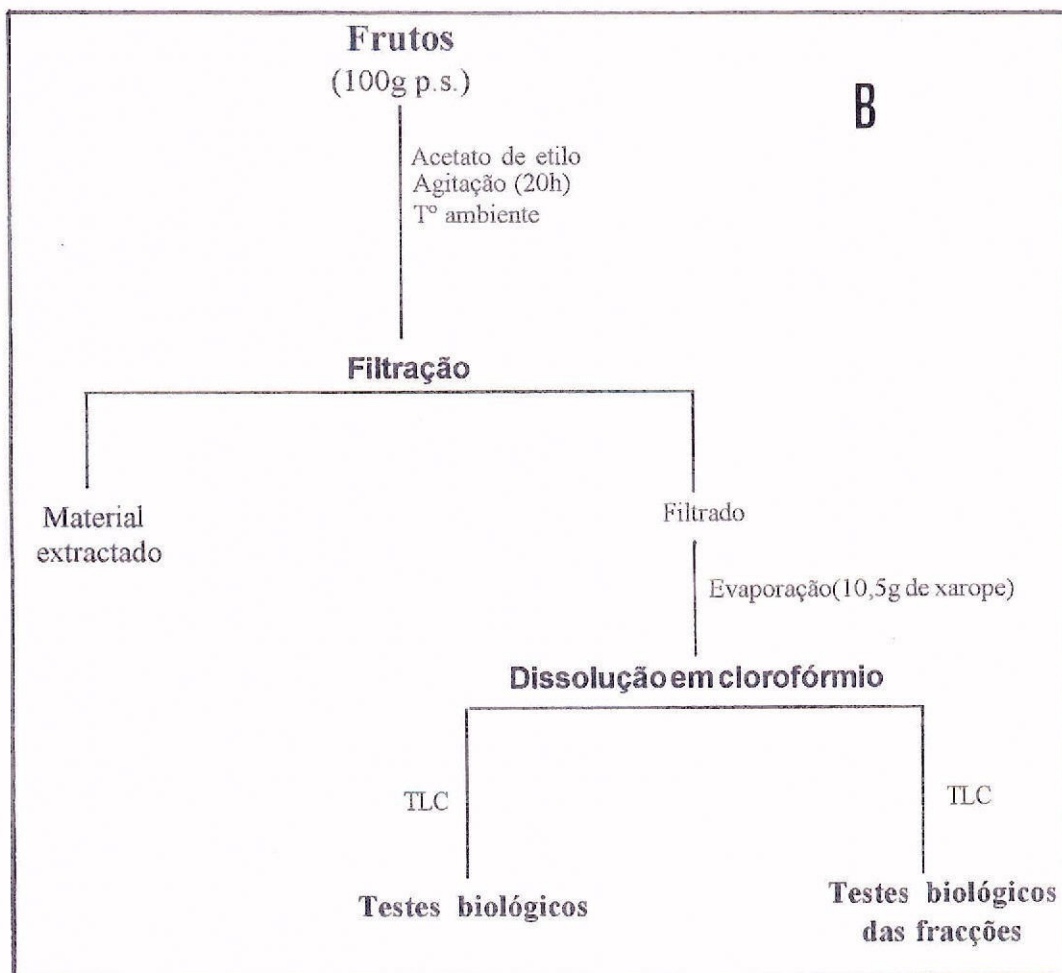


Fig. 2.4 - Frutos

A . Material vegetal seco (não moído e moído)

B . Esquema de extracção

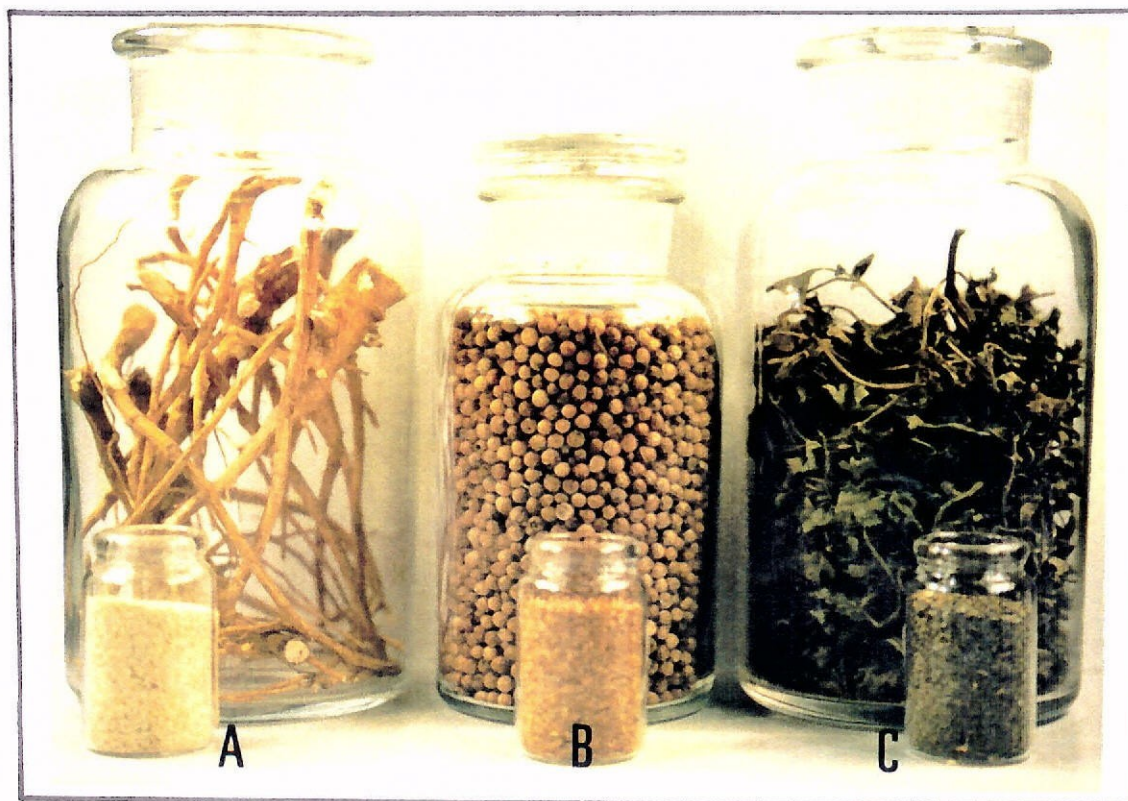


Fig. 2.5 - Material vegetal analisado. A - Raízes; B - Frutos; C - Folhas



Fig. 2.6 - Aparato laboratorial de separação por PLC, sob baixa pressão.

3- SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA

Os constituintes das misturas foram separados por meio de cromatografia líquido-sólido ou de adsorção, em coluna de vidro sob baixa pressão (bomba tipo FMI Lab Pump, Modelo:RP-D, 220 VAC 50/60 Hz) (Fig.2.6).

Nas colunas usou-se como adsorvente a sílica gel fina (ref. 7747, 60PF₂₅₄,MERCK), colocando-se como filtro, na parte superior da coluna uma camada de cerca de 1cm de espessura, de sílica gel grossa (ref. 7734, 60PF₂₅₄,MERCK). O eluente usado variou consoante as misturas a separar.

O controlo da separação foi efectuado por cromatografia de camada fina analítica, em placas de sílica gel (ref. 5554 DC-Alufolien, 60PF₂₅₄) com 2,2 mm de espessura. Os compostos foram detectados com luz ultravioleta (254 e 366 nm) ou, por revelação das placas com uma solução de vanilina/H₂SO₄ (3-5%) e uma solução de hidróxido de potássio em etanol a 5%.

O isolamento final dos compostos fez-se por sucessivas cromatografias da camada fina preparativa em placas de sílica gel (ref.5744, 60PF₂₅₄,MERCK), com 0,5 mm e placas de sílica gel (ref.5717, 60PF₂₅₄,MERCK), com 2 mm.

No caso dos frutos foi realizado unicamente o isolamento de compostos por cromatografia de camada fina preparativa.

3.1 - RAÍZES

Após evaporação do filtrado, dissolveu-se o extracto oleoso (3g) em clorofórmio (CHCl₃) e juntaram-se 9g de sílica fina (ref. 7747), para formar a "cabeça" de uma coluna de CLP de 3cm x 50cm, preenchida com sílica fina (ref. 7747) até 42 cm, contendo um filtro de cerca de 0,5 cm de sílica (ref. 7734).

O eluente utilizado foi a mistura de solventes hexano-pentano-acetato de etilo (AcOEt), nas proporções de 7:7:5 até 7:7:9.

Sob baixa pressão, com um débito de 15 ml min⁻¹ a 1 bar, foram sendo retiradas fracções de 20 ml. Após rastreio inicial de bioactividade no extracto bruto, foram-se juntando fracções com características idênticas em placas de cromatografia analítica e, novamente efectuados os testes biológicos nestas fracções.

Todas as fracções que apresentaram bioactividade foram submetidas, consoante a quantidade, ou a novo fraccionamento em CLP ou ao isolamento de compostos por PTLC. Todas as fracções submetidas a CLP foram eluídas em mistura crescente de hexano-acetona. O esquema geral de separação e purificação encontra-se referido na figura 2.7.

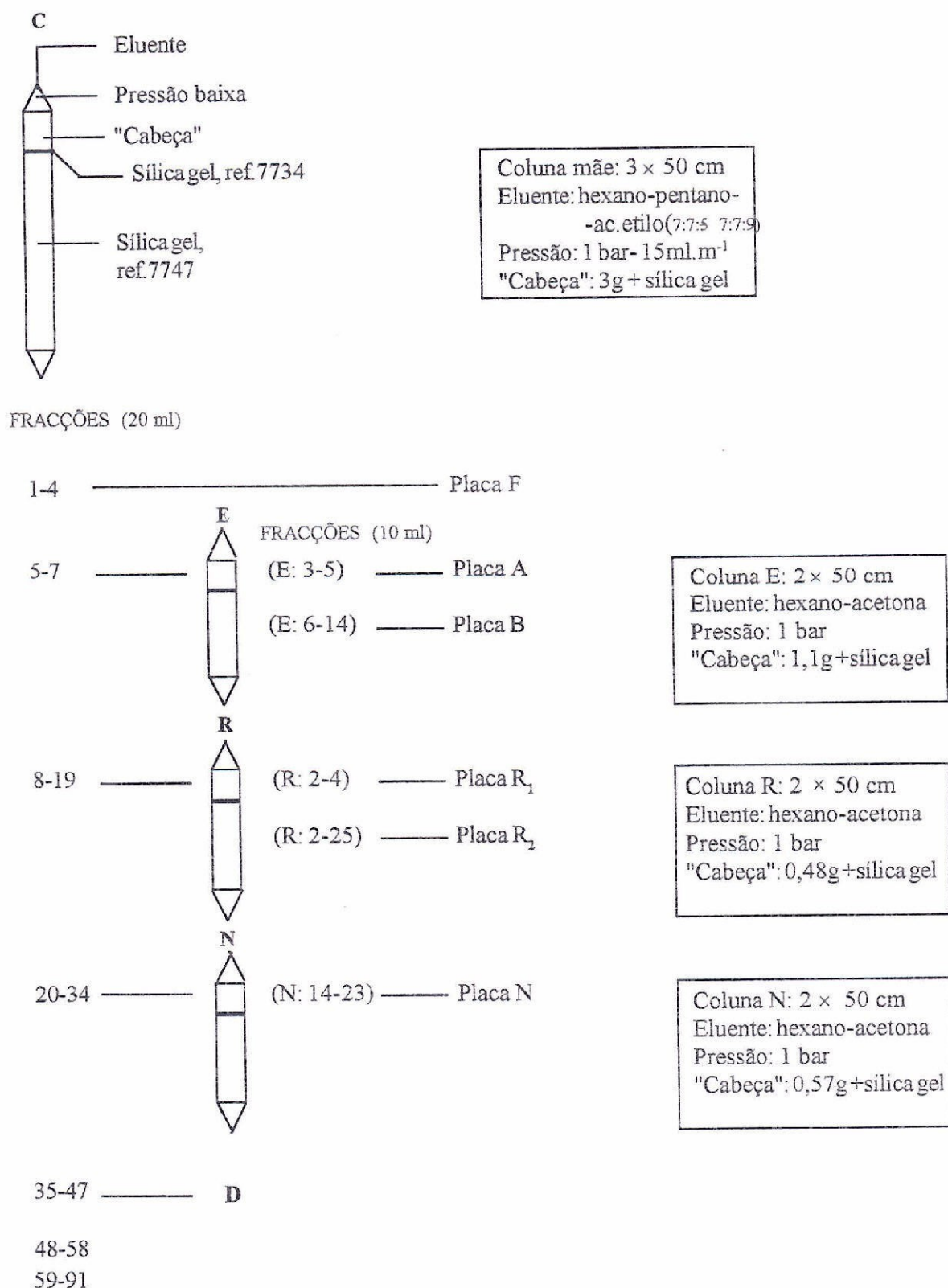


Fig.2.7- Esquema geral de separação e purificação de compostos isolados de raízes

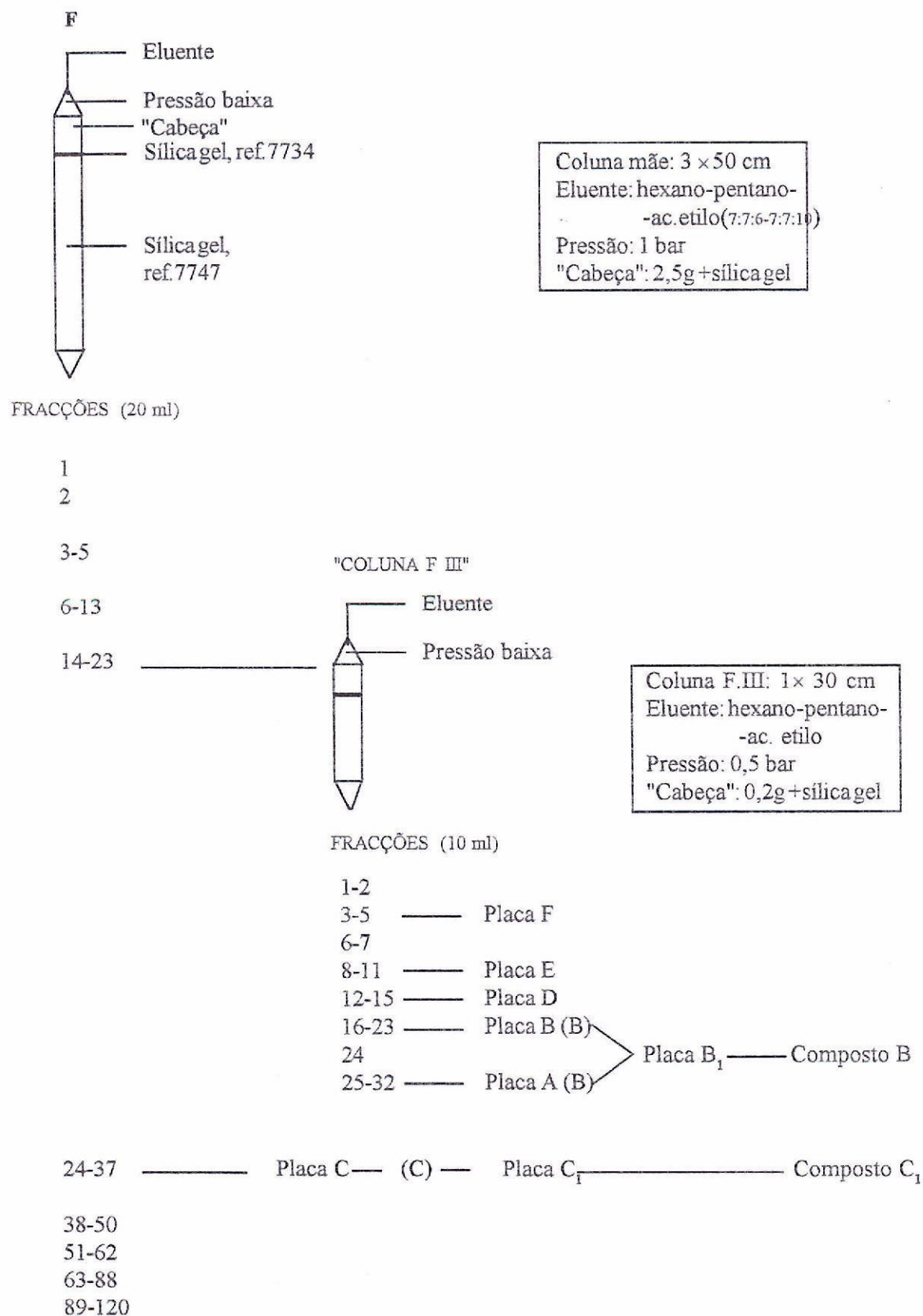


Fig. 2.8 - Esquema geral de separação e purificação de composto isolado de folhas

3.2 - FOLHAS

O extracto verde gomoso (2,5g) foi dissolvido em metanol (CH_3OH) e misturado a 7,5g de sílica (ref. 7747), para formar a cabeça da coluna de CLP de 3cm x 50cm preenchida em cerca de 31,2 cm de sílica (ref. 7747), com um filtro de 1 cm de sílica (ref.7734). O eluente foi a mistura de solventes hexano-pentano-AcOEt nas proporções de 7:7:6 até 7:7:10.

A pressão utilizada foi aproximadamente de 1 bar.

As fracções recolhidas foram de 20 ml e, após rastreio de bioactividade juntaram-se fracções com iguais características em TLC e foram testadas novamente quanto à sua fototoxicidades.

A purificação dos compostos fotoactivos efectuou-se por CLP e PTLC segundo o esquema representado na figura 2.8.

3.3 - FRUTOS

O extracto oleoso (10,5g) foi dissolvido em cloróformio e submetido a PTLC, cujo eluente foi a mistura de AcOEt - hexano (1:7).

Cada placa possuía 6 pontos de aplicação em concentrações crescentes de 12,5 μg . As placas foram submetidas a testes biológicos.

Não se efectuaram separações em CLP, tendo-se obtido a separação de compostos por purificação em PTLC após eluição com a mistura tolueno-AcOEt (93:7).

4-IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS COM ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Em todas as partes vegetativas analisadas, os primeiros passos de identificação basearam-se em observações do aspecto físico do composto (estado, cor, aroma).

Da análise das placas de TLC, registaram-se dados semi-quantitativos e foram também medidos os valores de R_f e definida a coloração das manchas características.

Observações das placas em luz visível, com comprimentos de onda UV-254 nm e UV-365 nm, foi outra característica descrita.

A identificação preliminar das manchas, foi efectuada, por tratamento químico e aquecimento, com duas soluções de pulverização (VS e KOH) (ANEXO III).

a) *Ponto de fusão*

Das constantes físicas foi avaliado o ponto de fusão (p.f.), introduzindo uma pequena porção do composto no estado sólido, num tubo capilar (1 mm ϕ), com cerca de 6 cm de comprimento. Após colocação do tubo na vertical e, da compactação da amostra na extremidade inferior do mesmo, a medição do p.f. foi realizada num aparelho de marca REICHERT-THERMOVAR.

b) *Espectros de massa*

Realizados em espectrómetro de marca JEOL JMS-DX 300, a uma temperatura de 80°C e 70 eV.

c) *Estrutura química*

Foram traçados espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , assim como espectros de COSY, de correlação C-H e DEPT em aparelhos de marca BRUCKER CPX-300 e BAUKER SMX-250.

As amostras sólidas após dissolução em CDCl_3 foram colocadas através de uma pipeta de Pasteur, munida de filtro na sua extremidade, num tubo de vidro, com 5 mm de ϕ externo, para RMN de ^1H e, 10 mm para RMN de ^{13}C .

5 - TESTES BIOLÓGICOS

Para os testes biológicos foram utilizados os fungos imperfeitos: *Cladosporium cucumerinum* ELLIS e ARTHUR e *Fusarium culmorum* W. G. Sm. Sacc.. Ambos os fungos cresceram em meio de PDA (Anexo IV), durante 10 dias para o *Fusarium* e, durante 24 dias para o *Cladosporium*, a 25°C, no escuro.

Suspensões homogéneas em meio líquido (Anexo IV), foram preparadas em câmara de fluxo laminar (Fig. 2.9) por maceração do micélio de cada fungo, seguido de uma filtração através de funil de Buckner munido com redes de nylon (100 μm ϕ), sob vácuo.

A actividade biocida dos extractos, das fracções e dos compostos puros aplicados em placas de PTLC de sílica gel (ref. 5744, 60PF₂₅₄, MERCK) com 0,5 mm de espessura, foi detectada por pulverização homogénea da suspensão do fungo por toda a placa. As placas pulverizadas foram colocadas em câmara húmida, num ambiente com cerca de 25°C de temperatura, umas no escuro e as suas réplicas à luz (MATOS *et al.*, 1992).

Na análise fototóxica foi utilizada uma lâmpada OSRAM, 18W, com radiações correspondentes aos comprimentos de onda de luz do dia (Fig. 2.10). Após 72 horas eram

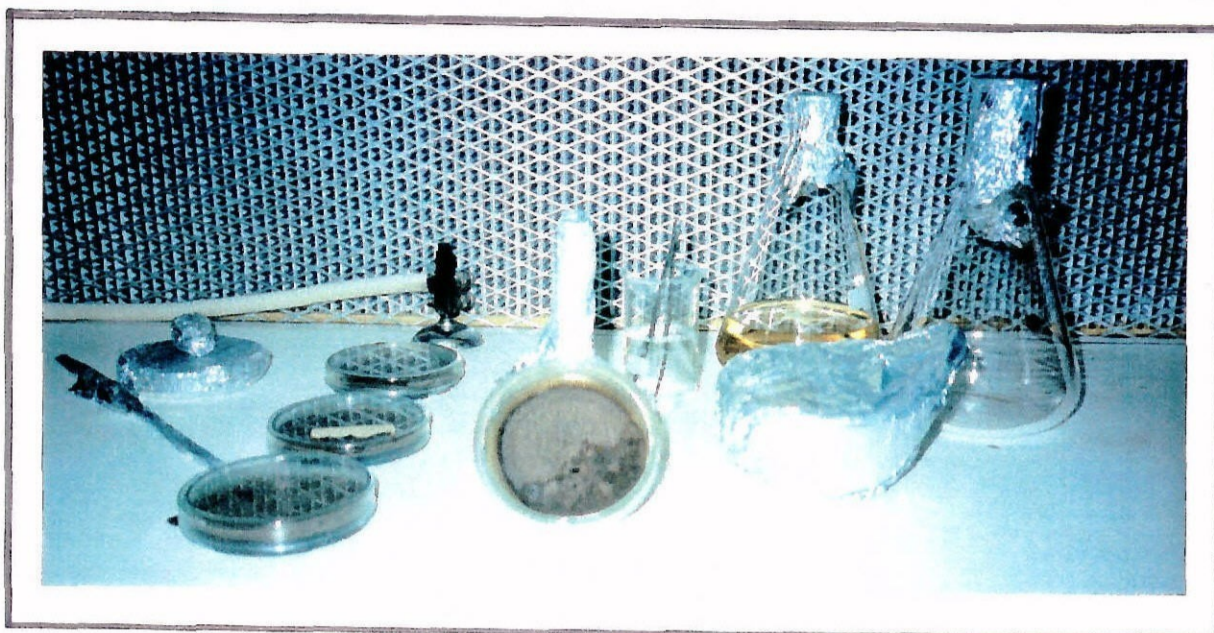


Fig. 2.9 -Câmara de fluxo laminar e material para preparação de suspensões de *C. cucumerinum*.

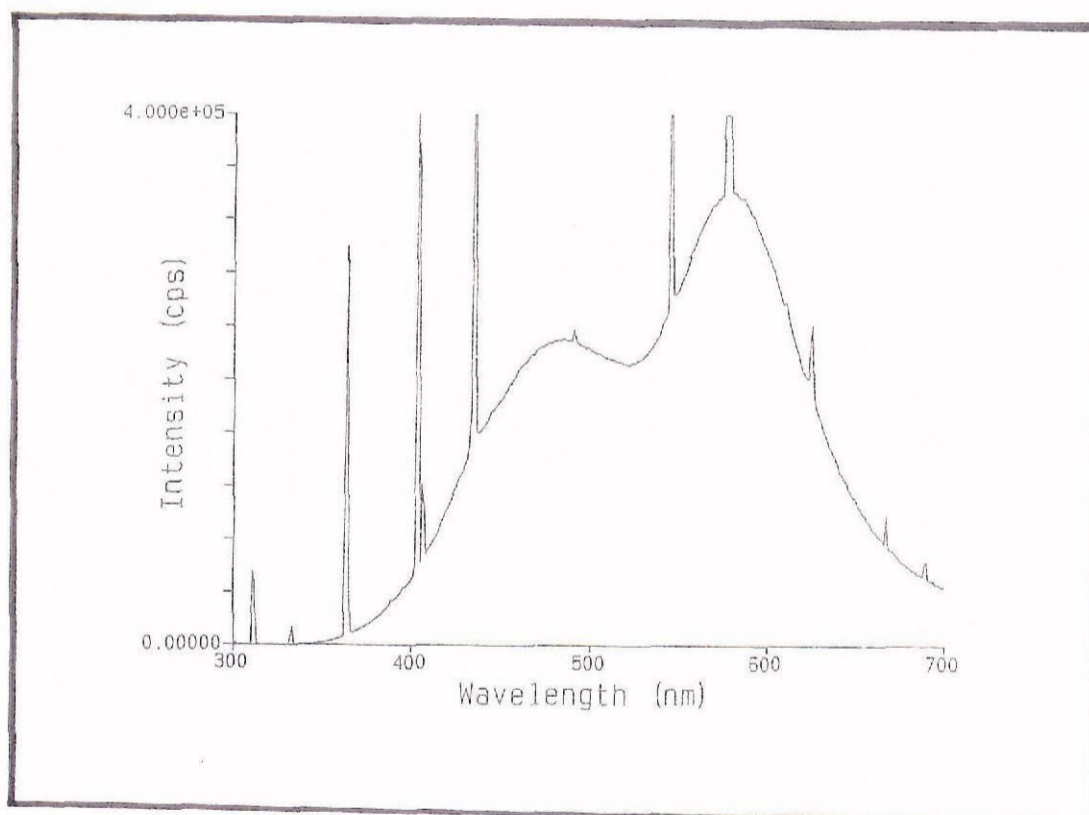


Fig. 2.10 - Espectro de intensidade luminosa de lâmpada Osram, L18W/10 "day light".

avaliados qualitativa e quantitativamente os resultados. O crescimento do fungo era paralizado através da acção conjugada de aquecimento e secagem.

Para os testes biológicos de acção da concentração dos compostos puros sobre o crescimento do micélio dos dois fungos, cada composto diluído apropriadamente, foi aplicado em quatro pontos marcados nas placas de PTLC, em volumes que variaram de 0,5 a 2µl. Nestes pontos de aplicação foi medida a área sobre a placa de sílica-gel bem seca, através da observação em condições de fluorescência e luz visível. Foi determinada a concentração aplicada de cada composto por ponto de aplicação.

Foram pulverizadas as placas com suspensões homogéneas dos fungos, como descrito anteriormente. As placas foram submetidas a condições semelhantes de temperatura (25°C) e humidade relativa (100%), durante 72 horas, umas em condições de luz e as réplicas em condições de escuro.

5.1 - CARACTERIZAÇÃO SUMÁRIA DOS FUNGOS

Cladosporium cucumerinum Ellis e Arthur.

Subdivisão - *DEUTEROMICOTINA*

Família - *DEMATIACEAE*

Género - *Cladosporium* L.

O género *Cladosporium* possui esporos septados, conidióforos dematiáceos com ramificações, conídios poliblasticos com 0-3 septos e braços de conídios em cadeia.

Cladosporium cucumerinum, é um fungo unicamente patogéneo de plantas tendo sido descoberto pela primeira vez em curcubitáceas e que, pelo facto de produzir uma doença designada por "Scab" ou gomose das curcubitáceas (ELLIS e HOLLIDAY, 1972), é também conhecido por *Cladosporium scabies* Cooke (FARR *et al.*, 1989).

Tem como hospedeiros plantas dos géneros: *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Helianthus* (INGOLD, 1961). FARR *et al.*, (1989) indicam que se trata de um fungo que se encontra distribuído pelo Norte da América, Índia Oriental, Sudeste da Ásia e Europa.

É um bom fungo para a pesquisa geral da actividade vegetal anti-fúngica (HOSTETTMANN, 1987), podendo extrapolar-se a acção positiva sobre este fungo, para outros, principalmente, fungos imperfeitos.

Os seus esporos podem ser facilmente pulverizado sobre placas de TLC onde extractos de plantas ou compostos puros tenham sido sujeitos a separação (HOMANS e FUCHS, 1970).

Após três dias de incubação um micélio cinzento de fungo será observado em toda a placa, excepto nas zonas onde as substâncias anti-fúngicas existam (GOTTSTEIN *et al.*, 1984).

Fusarium culmorum (W. G. Smith) Sacc.

Subdivisão - DEUTEROMICOTINA

Família - DEMATIACEAE

Género - *Fusarium* L.

O *Fusarium culmorum* é também conhecido por *Fusarium roseum* f.sp. *cerealis* (Cke.) Snyder e Hansen (COUCH, 1976). Há por vezes confusão de nomes com os fungos *F. lateritium*, *F. sambucinum*, *F. graminearum* e *F. concolor*. É um fungo que provoca manchas crescentes nas folhas, em forma de ovo.

É uma espécie com um crescimento muito rápido, adquirindo uma coloração vermelha intensa, que com a idade se vai tornando acastanhada. Não são produzidos microconídios. Os macroconídios são uniformes em tamanho e forma, geralmente com 3 a 5 septos, com 25-50 x 5-7,5 µm, produzindo fiadas simples, juntas, em braços de complexos conidióforos. Produzem-se clamidósporos de forma oval a globulosos.

Ocorre geralmente no solo e é importante agente patogénico dos cereais (ONIORS *et al.*, 1981 e COUCH, 1976). Tem porém como hospedeiros géneros de plantas muito diversificados como: *Asparagus*, *Beta*, *Carya*, *Chamaedorea*, *Cheirodendron*, *Chrysanthemum*, *Citrullus*, *Colocasia*, *Coronilla*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Dianthus*, *Elaeagnus*, *Eremochloa*, *Fragaria*, *Gardenia*, *Glycine*, *Gossypium*, *Humulus*, *Ipomoea*, *Lens*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Medicago*, *Mentha*, *Metrosideros*, *Phaseolus*, *Phytulacca*, *Picea*, *Pinus*, *Pisum*, *Platanus*, *Poa*, *Prunus*, *Pseudotsuga*, *Phizophora*, *Solanum*, *Striga*, *Trifolium*, *Triticum*, *Tulipa*, *Vicia*, *Zea* (FARR *et al.*, 1989).

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - ENSAIOS DE PRODUÇÃO

As produções de raízes, folhas e frutos foram avaliadas em cada escalonamento anual da cultura como se pode observar no Quadro III.1 e Fig. 3.1.

Quadro III.1 – PRODUÇÕES DO COENTRO E DURAÇÃO DO CICLO CULTURAL ENTRE 1989 E 1992.

ANO	Data de Sementeira	Duração do ciclo Cultural	Produções / Planta		
			g Peso seco raízes	g Peso seco folhas	g Peso seco frutos
1989	a	159	6,3	14,2	12,1
	b	110	3,5	10,1	9,2
	c	101	2,8	8,2	7,5
1990	a	137	4,7	26,8	2,5
	b	115	4,3	23,0	1,9
	c	106	3,2	17,0	0,4
1991	a	130	4,4	8,3	10,1
	b	112	3,8	7,5	7,3
	c	104	3,4	4,3	6,4
1992	a	138	4,5	11,5	14,6
	b	114	4,1	10,1	10,5
	c	107	3,3	7,5	8,7

LEGENDA: Datas de sementeira

a - Finais de Janeiro

b - Finais de Fevereiro

c - Finais de Março

A uma maior duração do ciclo cultural correspondeu, em cada ano, uma maior produção em matéria seca de todos os órgãos da planta (exceptuando-se o ano de 1990).

Notou-se uma proporcionalidade inversa na produção de folhas e frutos, assinalando-se o ano de 1990 como um caso anormal de produção de frutos, podendo o facto de os baixos valores registados estarem associados a baixas pluviosidades a partir de Abril e, elevadas temperaturas, diminuindo a fecundação entomófila e, por conseguinte o número de frutos (Anexos I e II).

Para a maior produção de folhas não se encontra justificação a nível dos factores edafo-climáticos, assinalando-se porém o acréscimo significativo para o ano de 1990 relativamente aos outros anos.

Ciclos mais curtos para os anos de 1989 e 1991, nas datas de sementeira **b** e **c**, estão directamente relacionados com o aumento da temperatura média nos meses de Junho e Julho, reduzindo o período entre a floração, fecundação e maturação dos frutos relativamente aos outros anos (Anexo I).

A fase fenológica de início dos botões florais, fase até à qual se recolheram folhas teve em todos os anos uma diferença da data **a** de sementeira para a data **c** de um período de um mês, iniciando-se no primeiro caso em inícios de Maio e no último nos primeiros quinze dias de Junho (Fig. 3.2).

A fase de frutificação deu-se em todas as datas de sementeira **e**, em todos os anos, de finais de Junho a finais de Julho.

A colheita de infrutescências foi em todos os anos e modalidades, iniciada no mês de Julho, desde o seu início até finais do mesmo consoante o ano decorreu com temperaturas mais elevadas ou amenas e, menores ou maiores precipitações nos meses de Junho e Julho, respectivamente.

As produções obtidas foram em média semelhantes, para frutos e folhas, às referidas por Bustamante (1986), isto é, 10g frutos/planta e 8,7g peso seco de folhas/planta. Já o mesmo não se verificou relativamente às produções obtidas por outros autores. SASTRY *et al.* (1989), obtiveram uma produção de frutos de unicamente 3,3g/planta, na Índia, enquanto que REDDY *et al.* (1989) também na Índia obtiveram produções médias de 12,8g/planta e para SUKHADRA *et al.* (1986) 14,4g/planta.

2 - TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO

Pretende-se neste capítulo referir os rendimentos obtidos em extracto bruto a partir dos diferentes órgãos em análise.

Enquanto que nos frutos se registou um rendimento da ordem dos 10% e nas folhas de 2%, no caso das raízes esse rendimento foi de apenas 0,75%.

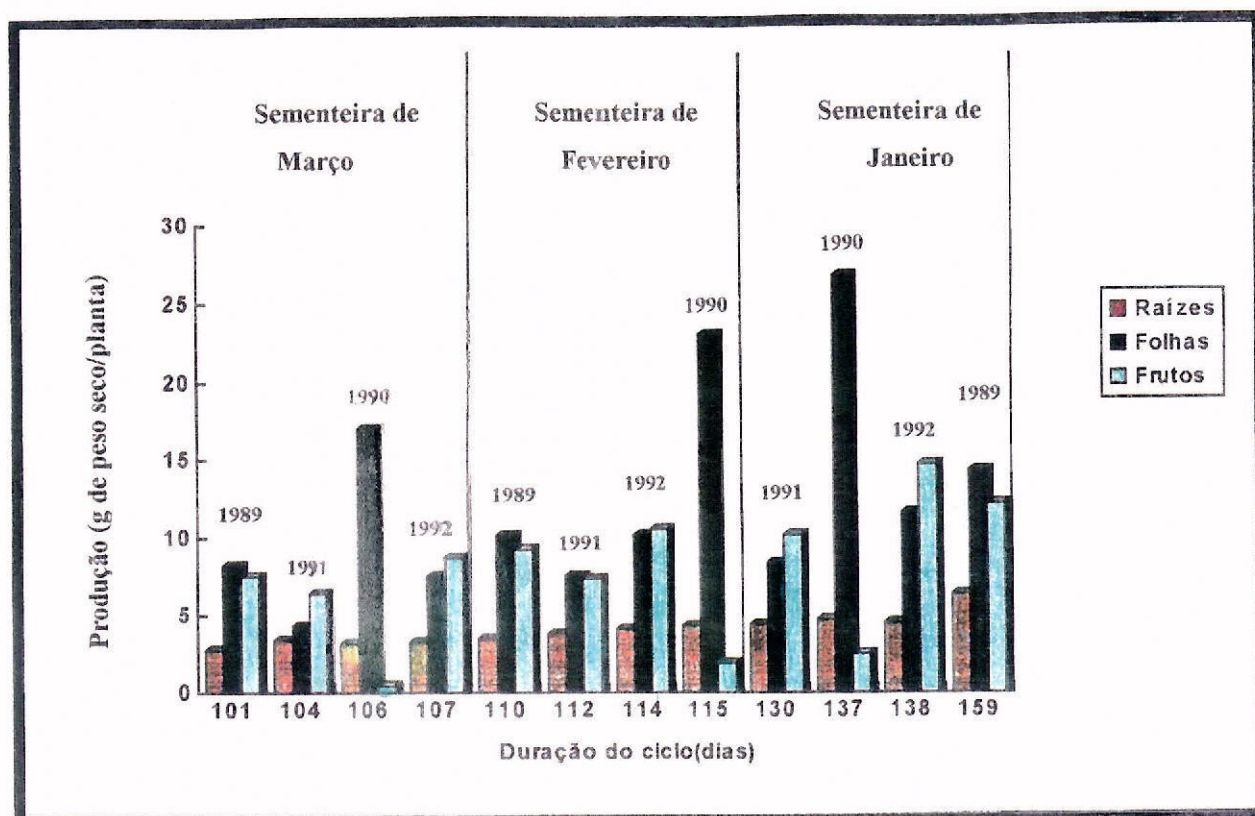


Fig. 3.1 - Produções do coentro e duração do ciclo cultural entre 1989 e 1992.

Nota: Os valores que aparecem no interior do gráfico correspondem aos anos de cultura.



Fig. 3.2 - Floração do campo de cultura (Junho de 1990).

No primeiro e segundo casos os rendimentos seguem o registado na literatura (Ceska *et al.*, 1987; Ceska *et al.*, 1988) enquanto que, no caso das raízes podemos ser levados a suspeitar de um fraco poder extractor das condições desenvolvidas (AcOEt à temperatura ambiente).

3-FRACÇIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS COM ACÇÃO FUNGICIDA

3.1 - RAÍZES

Foi determinado um teor de humidade das raízes de cerca de 40%, tendo-se efectuado as extracções com 400g de peso seco, provenientes de 1Kg de matéria verde.

O extracto bruto obtido foi de cerca de 3g, tendo-se isolado por CLP e PTLC, 15mg de um composto F, 33mg de um composto B e 21mg de um composto R, com actividade biológica(Quadro III.2).

O composto F existe nas raízes na concentração de 15 μ g /g de peso em verde, sendo as concentrações de B e R, respectivamente 33 μ g /g e 21 μ g /g.

Da coluna mãe obteve-se um rendimento de cerca de 74,6%, podendo inferir-se um bom poder extractor da mistura utilizada.

As amostras recolhidas foram agrupadas em fracções com idênticas características visuais, olfativas (Quadro III.3) e cromatográficas, sendo submetidas a testes biológicos.

Quadro III.2 - COMPOSTOS ISOLADOS DE RAÍZES, COM ACTIVIDADE BIOLÓGICA

COMPOSTO	PESO SECO (mg)	PROVENIÊNCIA	FRACÇÕES	PURIFICAÇÃO
F	15	fr. F ₁ de placa F	1-4 coluna-mãe	PTLC
R	21	fr. F ₂ de placa F	1-4 coluna-mãe	PTLC
		fr. A ₁ de placa A	3-5 coluna E	PTLC
		fr. R ₁ de placa R ₁	2-4 coluna R	PTLC
B	33	fr. B ₁ de placa B	6-14 coluna E	PTLC
		fr. R ₂ de placa R ₂	2-25 coluna R	PTLC
		fr. N ₁ de placa N	14-23 coluna N	PTLC

Quadro III.3 - ANÁLISE VISUAL , OLFATIVA E PESO SECO DE FRACÇÕES DE PLC DAS RAÍZES

FRACÇÕES	ASPECTO VISUAL	AROMA	PESO (g)
Fc → 1-4	Xaroposo - oleoso Amarelo dourado	Típico de folhas em verde	0,0318
Ec → 5-7	Xaroposo com grânulos Esverdeado	—	1,107
Rc → 8-19	Viscoso com grânulos Esverdeado	Óleo	0,488
Nc → 20-34	Seco a xaroposo Amarelo dourado	—	0,570
Dc → 35-47	Amarelo	—	0,023
Mc → 48-58	Amarelo muito claro	—	0,015
Gc → 59-91	Incolor	—	0,003

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PURIFICADOS

a) Composto não conhecido — F

a₁) **Propriedades físicas**

Estado: Sólido-oleoso

Cor: Amarelo

Aroma: Aromático

a₂) **TLC**

Adsorvente: Sílica gel ref. 7744 (Merck)

Eluente: Hexano-Acetona (3:1)

R_f: 0,8

Observação nos UV sem tratamento:

254nm — incolor

366nm — castanho

Observação nos UV com pulverização química:

VS — castanho

KOH — amarelo

a3) Identificação por RMN

Valores dos desvios químicos δ (em ppm) dos espectros em CDCl_3 de ^1H -RMN e respectivas constantes de acoplamento J(em Hz) e de ^{13}C -RMN :

^1H -RMN		^{13}C -RMN	
δ		C	δ
7,69(J=5,6)		C-q	132,438
7,55(J=3,3)		C-H	130,882
4,23(J=2,5)		C-H	128,795
3,43		C-H ₂	68,152
2,61		C-H	38,716
1,59		C-H ₂	30,350
1,42		C-H ₂	28,919
1,32		C-H ₂	23,732
0,92		C-H ₂	22,986
		C-H ₃	14,057
		C-H ₃	10,958
		C=O	167,766
		(ester)	

Após as análises por ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, pode avançar-se com a hipótese de se tratar de um composto aromático(1 anel aromático), possuindo cadeias longas ramificadas e um grupo éster.

A quantidade de composto sujeita a análise, não nos permitiu obter os resultados desejados, podendo também a nível da análise de ^{13}C , haver picos dissimulados.

Após a pesquisa dos dados espectroscópicos e por comparação com outros compostos, observam-se certas semelhanças dos espectros de ^{13}C -RMN e de ^1H -RMN com os do ftalato dietílico e com o ftalato bis(2-etil-hexílico), respectivamente (ANEXO III).

b) Composto não conhecido — R**b₁) Propriedades físicas**

Estado: Sólido-oleoso

Cor: Amarelado

Aroma: Não existente

b₂) TLC

Adsorvente: Sílica gel ref. 7744 Merck

Eluente: Hexano-Acetona (3:1)

R_f: 0,54

Observação nos UV sem tratamento:

254nm — rosa escuro

366nm — incolor

Observação nos UV com pulverização química:

VS — rosa vivo

KOH — amarelo

NOTA: Após purificação o composto R, perdeu as suas propriedades fungicidas, levando-nos a abandonar a sua identificação final.

c) Composto não conhecido — B**c₁) Propriedades físicas**

Estado: Sólido

Cor: Branco

Aroma: Não existente

c₂) TLC

Adsorvente: Sílica gel ref. 7744 Merck

Eluente: Hexano-Acetona (3:1)

R_f: 0,25

Observação nos UV sem tratamento:

254nm — azul

366nm — fluorescente

Observação nos UV com pulverização química:

VS — rosa

KOH — fluorescente

c₃) Observações por RMN:

Os espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN encontram-se no Anexo VI, podendo verificar-se que pela quantidade reduzida do composto sujeita a análise, não foram possíveis extrapolações dos resultados de identificação.

3.2 - FOLHAS

O teor de humidade das folhas, sob as condições edafo-climáticas de Castelo Branco, foi de cerca de 75%, tendo-se efectuado as extracções com 125g de peso seco provenientes de 500g de matéria verde.

O extracto bruto obtido foi de (cerca de 2,5g) foi fraccionado por CLP e agrupadas as fracções com idênticas características visuais e olfativas (Quadro III.4). Utilizando as fracções 16-37 e recorrendo à purificação por PTLC isolou-se 26,5mg de um composto C, identificado como sendo uma isocumarina.

Através das técnicas de CLP e PTLC o teor que se obteve deste composto na matéria verde foi de 53µg/g.

CESKA *et al.* (1988), através de HPLC e da mistura de eluentes hexano-éter etílico, obtiveram concentrações de 42µg/g em folhas e BABA *et al.* (1991) através de CL com a mistura de hexano-AcOet 106µg/g de peso verde.

Da coluna-mãe obteve-se um rendimento de cerca de 87%, podendo considerar-se a mistura escolhida com um elevado poder extractor.

Quadro III.4 - ANÁLISE VISUAL , OLFATIVA E PESO SECO DE FRACÇÕES DE PLC DE FOLHAS.

FRACÇÕES	ASPECTO VISUAL	AROMA	PESO (g)
I → 3-5	Verde escuro	Intenso, Desagradável	0,582
II → 6-13	Verde muito escuro	Muito intenso, Desagradável	0,920
III → 14-23	Verde acastanhado	Desagradável	0,270
IV → 24-37	Amarelo	—	0,068
V → 38-50	Amarelado	—	0,092
VI → 51-62	Amarelo claro	—	0,173
VII → 63-88	Amarelo muito claro	—	0,050
VIII → 89-120	Incolor	—	0,023

CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO

a) Composto não conhecido — C

a₁) **Propriedades físicas**

Estado: Sólido

Cor: Branco

Aroma: Não existente

a₂) **TLC**

Adsorvente: Silica gel ref. 7747 (Merck)

Eluente: Hexano-Pentano-Aceto (7:7:6)

R_f: 0,6 [Hexano-AcOEt (1:1)] ; 0,8 [AcOet] ; 0,88 [Hexano- Pentano-AcOEt (7:7:6)]

Observação nos UV sem tratamento:

254nm — rosa

366nm — fluorescente azulado

Observação nos UV com pulverização química:

VS - —

KOH - intensificação da fluorescência

a₃) Constantes físicas

p.f.: 152-153°

a₄) Absorção no UV

286,3nm; 299,2nm; 343,7nm

a₅) Identificação estrutural

Os fragmentos característicos (m/z) do espectro de massa e valores dos desvios químicos δ (em ppm) e das constantes de acoplamento J(em Hz) do espectro $^1\text{H-RMN}$ em CDCl_3 apresentam-se seguidamente:

m/z	$^1\text{H-RMN}$	
230 M^+	H-4	δ 6,14(s)
215	H-5	δ 7,02(s)
201	H-2'	δ 7,53(d; $J_{2,3}=1,98\text{Hz}$)
187	H-3'	δ 6,98(d; $J_{2,3}=1,98\text{Hz}$)
159	CH_3 -3	δ 2,17(s)
129	OCH_3 -8	δ 4,15(s)
116		
115		
101		
87		

O composto exibiu um pico m/z com o valor de 230, sugerindo uma fórmula molecular de $C_{13}H_{10}O_4$. Pelo seu espectro de 1H -RMN e, por comparação com o obtido por CESKA *et al.* (1988), salienta-se a presença de um grupo metoxilo (4,15 ppm), um grupo metilo ligado por uma dupla ligação a um protão olefínico [2,17(3H) e 6,14 ppm(1H)], três protões aromáticos [7,53; 7,02; 6,98 ppm], (H-2' e H-3' apresentam uma constante de acoplamento de 1,98 Hz) e um anel benzofurano, no qual o anel furano não se encontra substituído mas sim adjacente a um protão simples (acoplado através de um oxigénio ao um H-2' do anel furano).

No trabalho publicado por CESKA *et al.* (1988), a δ 7,05 observa-se um dubleto com uma constante de acoplamento de 0,8 Hz, não tendo sido detectado no nosso composto, talvez pela diferença de resolução dos aparelhos.

O composto C foi caracterizado como sendo a **coriandrina** e, a sua identificação efectuada por comparação com os resultados obtidos por CESKA *et al.* (1988), aquando do seu isolamento e identificação (ANEXO IV).

Na figura 3.3, é apresentada a estrutura da coriandrina ou **4-metoxi-7-metil-5H-furo [2,3-g] benzopirano-5-ona**.

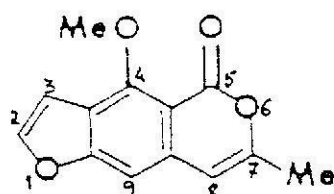


Fig. 3.3 - Esquema geral da coriandrina.

3.3 - FRUTOS

Após eluição do extracto bruto em PTLC foram detectadas três manchas perfeitamente distintas as quais, após teste biológico, não exibiram acção tóxica ou fototóxica nas condições desenvolvidas. Registou-se porém um acréscimo de micélio do fungo *C. cucumerinum* nas regiões correspondentes à mancha maioritária, designada por G (Fig.3.4).

Foi efectuada o teste de análise de terpenos em PTLC, como indicado por WAGNER *et al.*, (1984), para óleos essenciais de frutos de coentro.

Apesar da análise cromatográfica não ter sido só efectuada nos componentes do óleo essencial, o cromatograma apresentou a predominância, nas condições do eluente ser o tolueno-AcOet (93:7) e pulverização com VS (Fig. 3.4), de três manchas distintas com R_f , respectivamente de 1 (0,73), 2 (0,42) e 3 (0,33), sendo detectadas como manchas azul-acinzentadas.

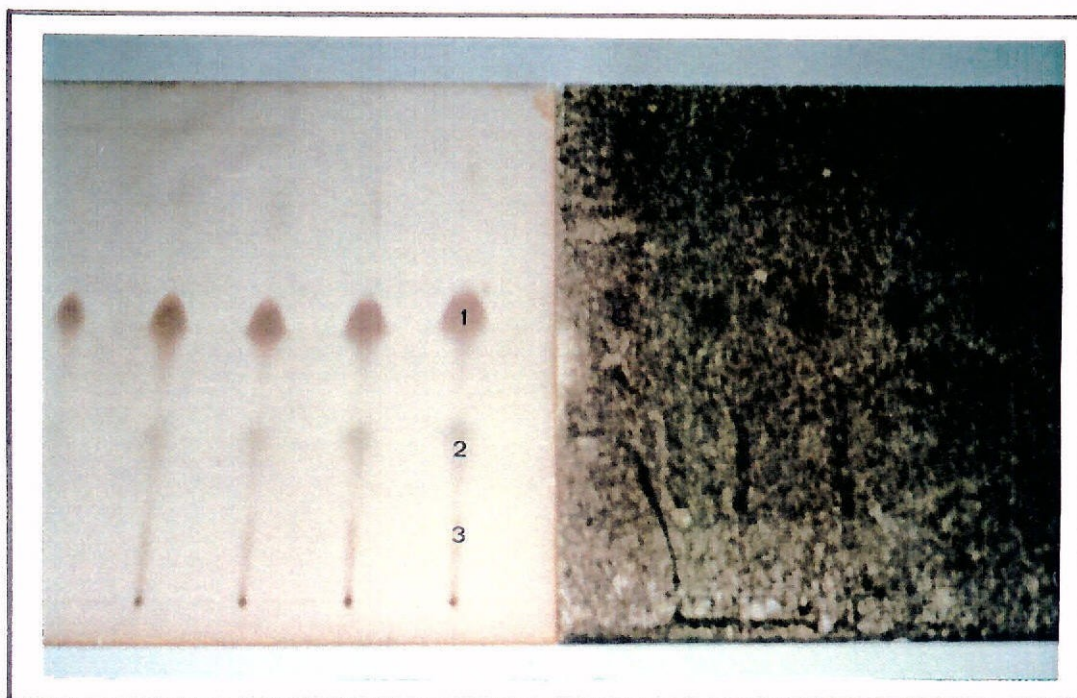


Fig. 3.4 - Placas PTLC de comparação de extracto bruto de frutos (tolueno-AcOet), exibindo três manchas distintas (1,2,3) e, efeito não fototóxico dos compostos . A mancha 1 corresponde ao composto referido no texto como G.

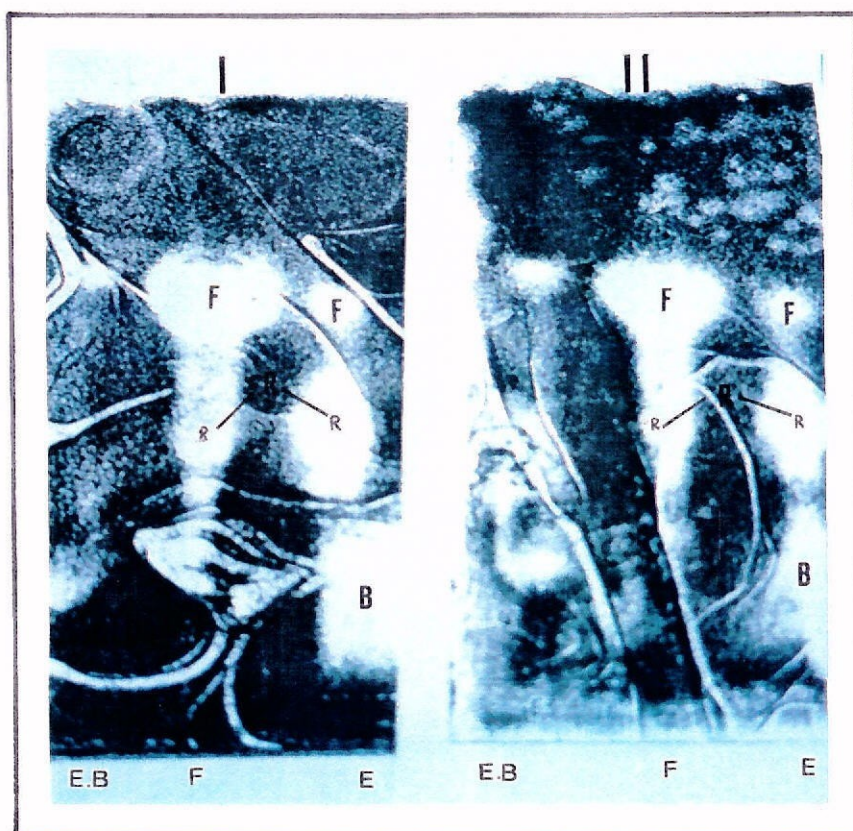


Fig. 3.5 - Acção fototóxica do extracto bruto (E.B.) e de fracções F e E de raízes, sobre *C. cucumerinum* quer no escuro (I), quer sob influência da luz (II). (encontram-se assinalados na figura os compostos isolados e designados por F, R e B)

A valores de *R_f* próximos destes WAGNER *et al.*, (1984), identificaram os seguintes compostos: acetato de geranilo (*R_f* 0,7), citral (*R_f* 0,42) e linalol (*R_f* 0,35). Portanto, poderemos ser levados a admitir que as manchas 1,2,3 correspondem a estas substâncias. Todavia, só com estudos subsequentes poderemos esclarecer o assunto.

4 - TESTES BIOLÓGICOS

Os dados apresentados resultaram da repetição em triplicado de todos os ensaios realizados nas mesmas condições (Temperatura=25°C, Humidade Relativa=100%, Tempo=72h).

4.1 - RAÍZES

Pode verificar-se na figura 3.6 a existência de três manchas distintas de inibição de *C. cucumerinum*, em fracções de PTLC, designadas por F e E, assim como a sua menor acção quando em extracto bruto.

4.2 - FOLHAS

Num primeiro conjunto de experiências, o extracto bruto de folhas foi separado por PTLC, com vista a detectar os eventuais constituintes com acção fototóxica. Usaram-se concentrações crescentes de 1 a 6 µg e executaram-se testes de crescimento do micélio de *C. cucumerinum* por pulverização de suspensões do mesmo nas placas de PTLC, sempre em condições de iluminação utilizando uma fonte luminosa com as características ilustradas na figura 2.10.

Foi notória a existência de efeitos inibitórios em 2 a 3 bandas todavia, só para quantidades de extracto bruto a partir de 4µg (Fig.3.5).

Posteriormente e, em testes biológicos efectuados ao longo da purificação do composto C (fracções III e IV de PLC), já anteriormente identificado (cap.3.2) como sendo a coriandrina, verificou-se fotoinibição, tanto contra o fungo *C. cucumerinum* como para *F. culmorum*. O efeito foi mais visível para o caso do fungo *C. cucumerinum* já que o fungo *F. culmorum* quando exposto à luz, apresenta uma visível despigmentação, sendo os resultados mais difíceis de observar.

Apresentam-se nas figuras 3.7. e 3.8., os resultados obtidos no escuro ou sob o efeito da luz nas várias etapas da purificação.

4.3 - FRUTOS

O extracto bruto não apresentou acção fungicida, não se tendo procedido à identificação dos componentes maioritários (Fig.3.4).

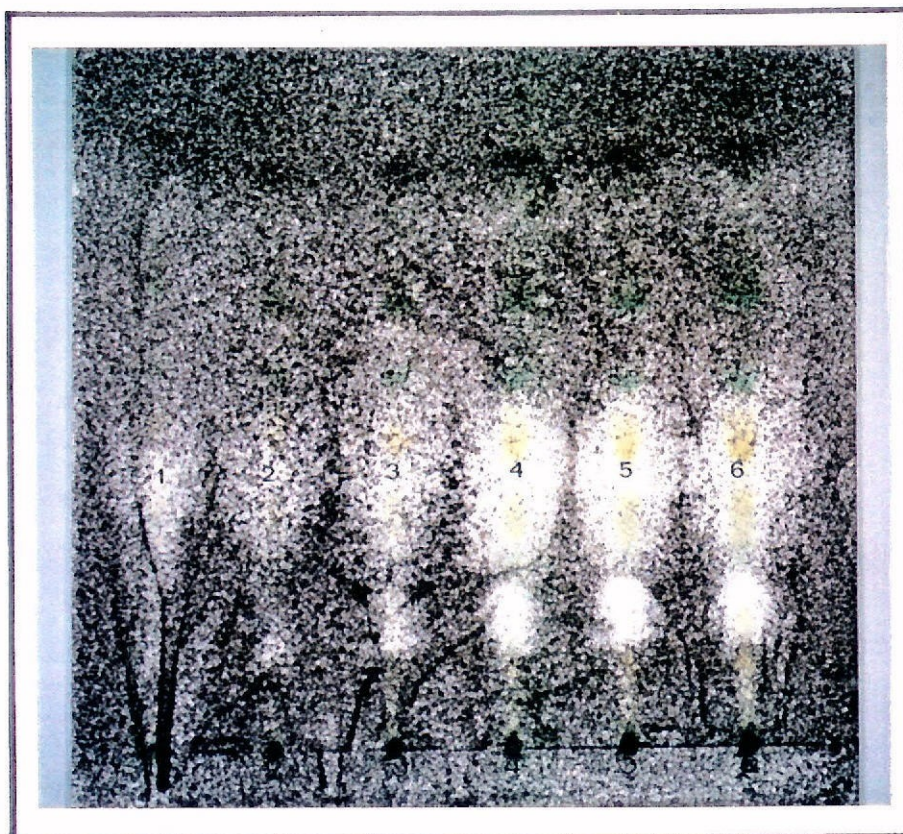


Fig.3.6 – Efeito inibitório crescente do extracto de folhas para *C. cucumerinum*, sob acção da luz. Os teores de extracto utilizados variaram de 1 a 6 ug, como se indica pelos respectivos números.

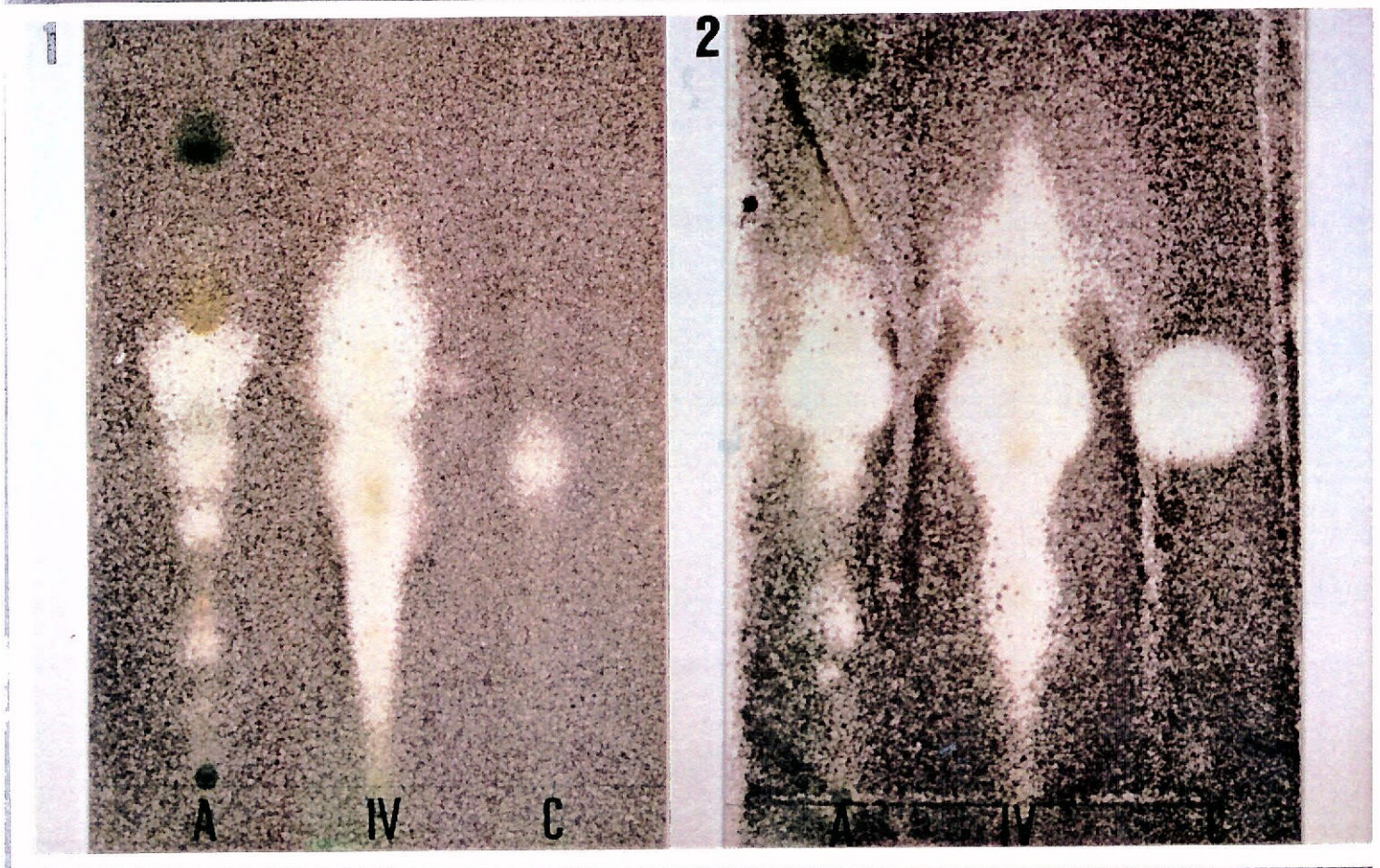
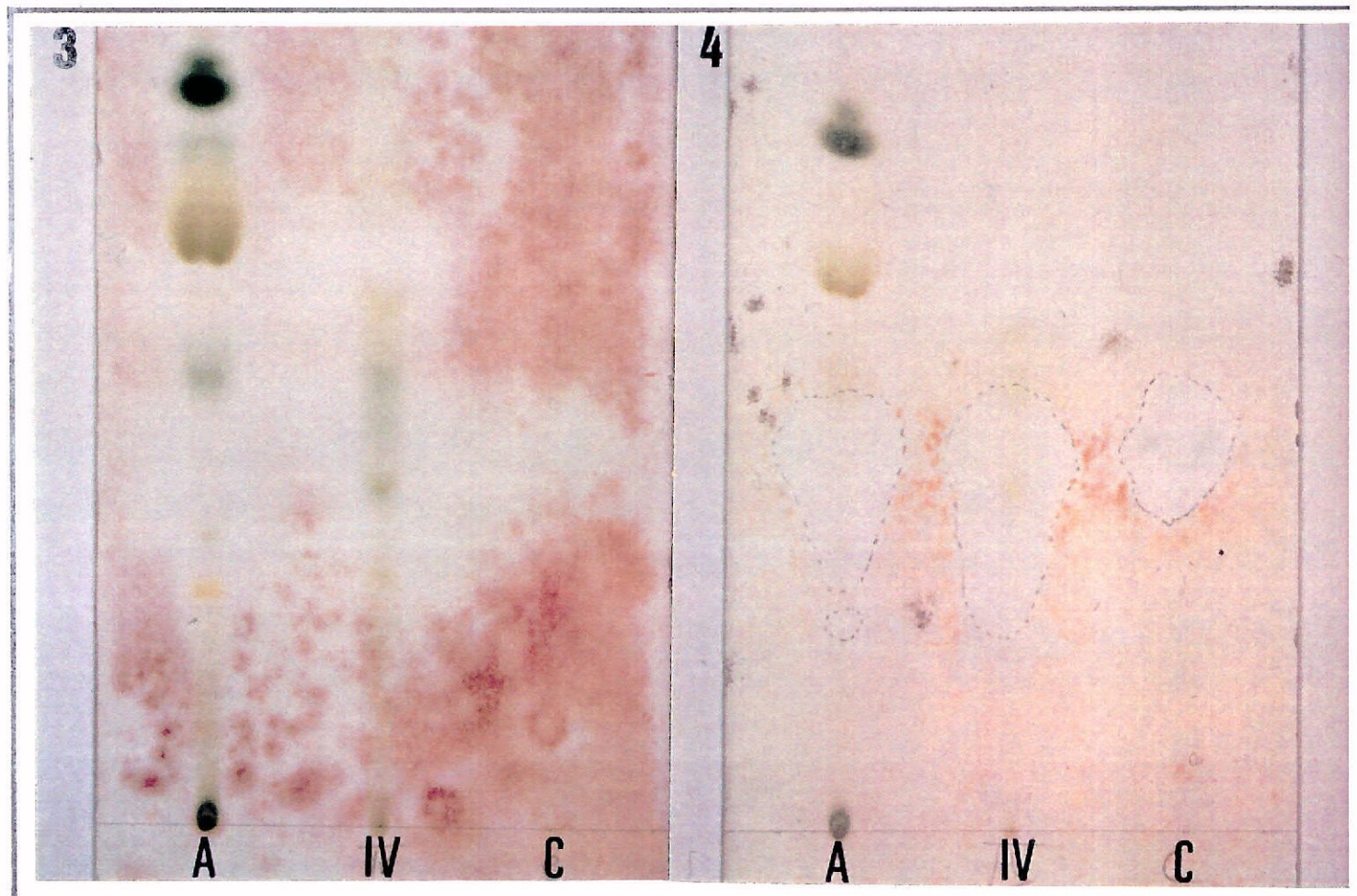


Fig. 3.7 - Acção tóxica do extracto bruto(A), da fracção IV e da coriandrina (C) contra *C. cucumerinum* , no escuro(1) ou à luz(2) e contra *F. culmorum* no escuro(3) e à luz(4).



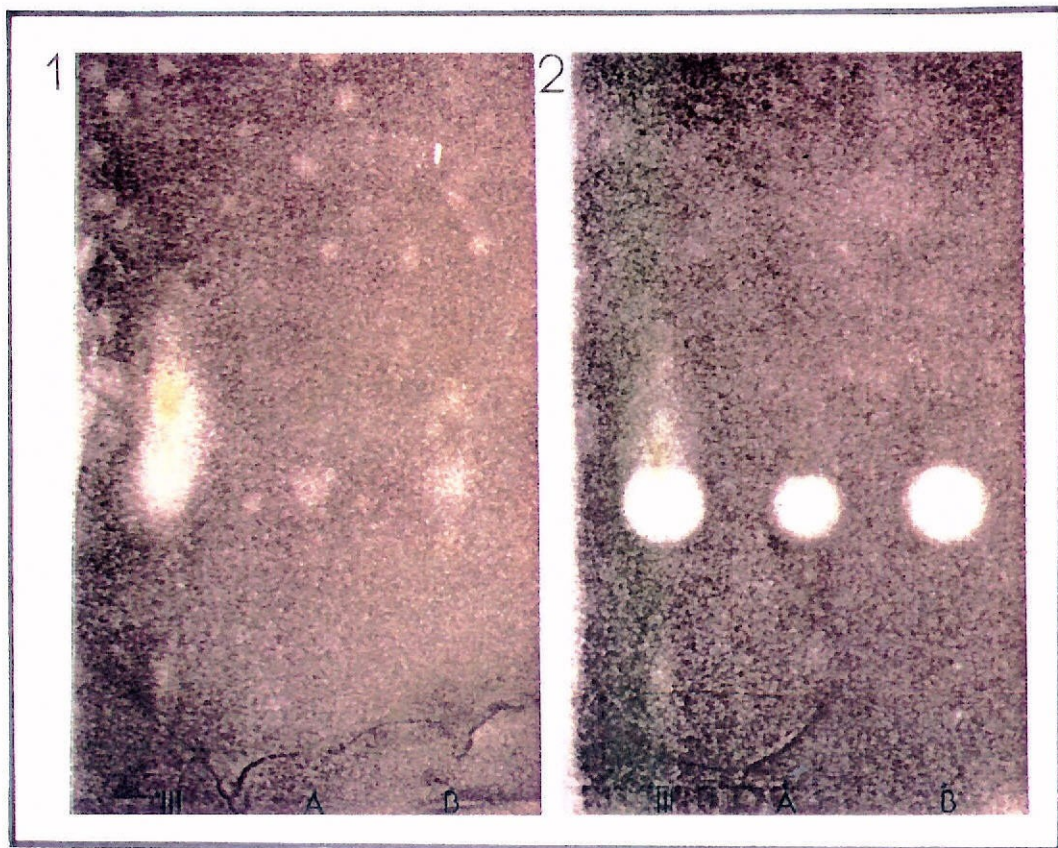
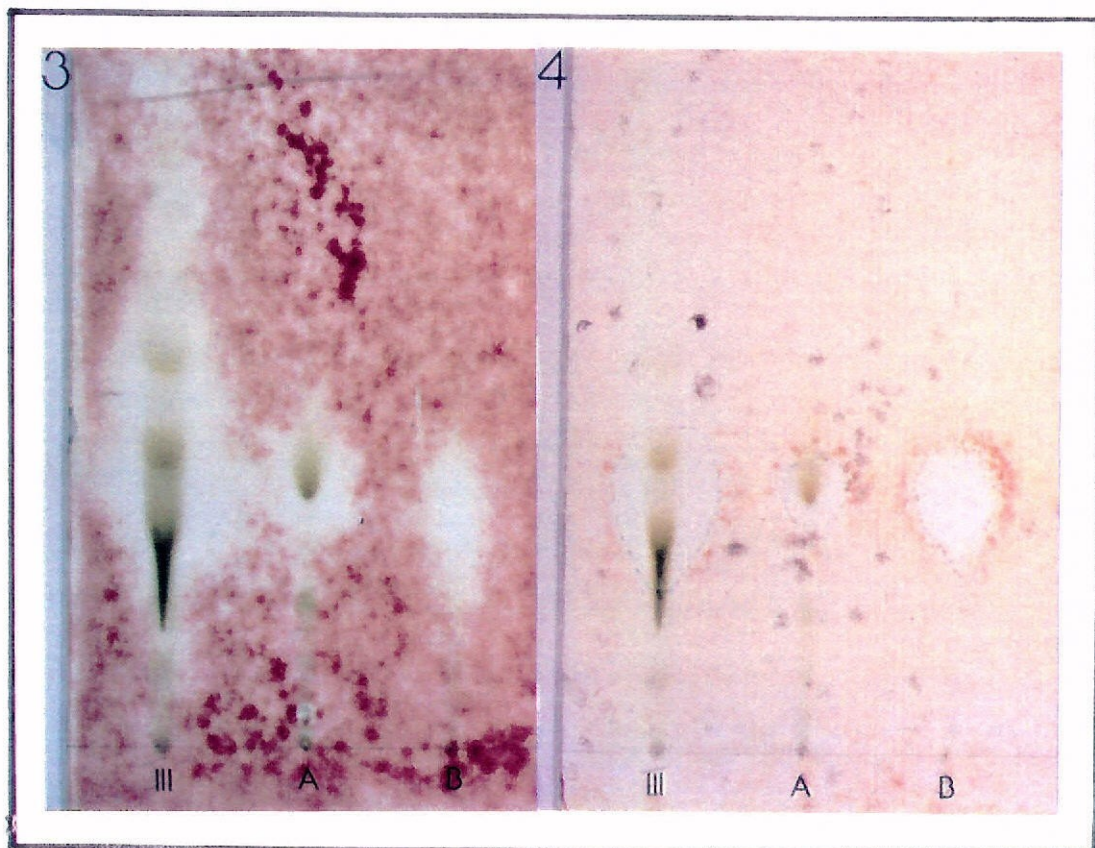


Fig. 3.8 - Acção tóxica da fracção III e das manchas A e B das folhas contra *C. cucumerinum* no escuro(1) , ou à luz(2) e contra *F. culmorum* no escuro(3) e à luz(4).



4.4 - ACCÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Estes estudos foram sempre efectuados em placas de PTLC, após aplicação dos compostos puros em determinados pontos que resultaram em manchas de reduzidas dimensões.

Para este conjunto de resultados e para análise da área da mancha aplicada, não foi levado em linha de conta o efeito da difusão que eventualmente se verificava em cada mancha, quando se submetiam as placas de PTLC à pulverização com a suspensão líquida do micélio do fungo.

A difusão verificada dependia em cada caso do tipo de composto e da sua concentração. É possível que o valor desta difusão se possa avaliar pelos diâmetros de inibição observados nas placas sujeitas à acção da luz.

Os valores dos diâmetros de inibição são o resultado de uma média de três medidas, em diferentes direcções.

4.4.1 - Coriandrina

Efectuaram-se os ensaios comparando a acção da luz e do escuro em distintas doses da coriandrina por mancha aplicada e da sua actividade sobre *C. cucumerinum* e *F. culmorum* (Anexo VI, quadro A-1).

Para o fungo *C. cucumerinum* o efeito foi mais visível, observando-se diferenças do tamanho das manchas de inibição da ordem de 1 cm de \varnothing da luz para o escuro. A concentração mínima de inibição por área da mancha aplicada foi de $0,35\mu\text{g}/\text{mm}^2$ no caso de condições de luz e de $0,37\mu\text{g}/\text{mm}^2$, em condições de escuro (Figs. 3.9 e 3.15).

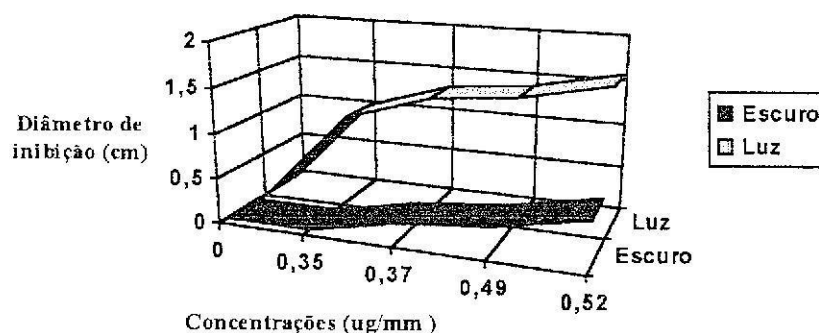


Fig. 3.9 - Comparação do efeito da concentração da coriandrina no crescimento do fungo *C. cucumerinum*, sob condições de luz e escuro (ver Anexo VI, quadro A-1).

A inibição não foi tão marcante em *F.culmorum*, apesar de se terem observado diferenças no tamanho das manchas de inibição da ordem dos 0,1 a 0,5cm (Figs. 3.10 e 3.16).

A área de inibição foi sempre superior em condições de luz relativamente às condições de escuro.

À partida estes resultados são difíceis de interpretar. No entanto, pode admitir-se que ao pulverizar a placa com o fungo em meio líquido, houve uma certa difusão do composto activo que se encontrava aplicado na placa. Portanto, a verdadeira dimensão da mancha onde o produto activo se encontra não será rigorosamente a correspondente ao momento da aplicação mas aquela que atinge após a difusão verificada pelo humedecimento da placa através da suspensão do fungo. Se assim for, o produto activo existirá numa concentração menor numa pequena auréola em torno da área inicial de aplicação. Pode suceder que a concentração do produto activo assim atingida nessa auréola seja suficiente para exhibir uma acção fototóxica, mas insuficiente para inibir o fungo no escuro.

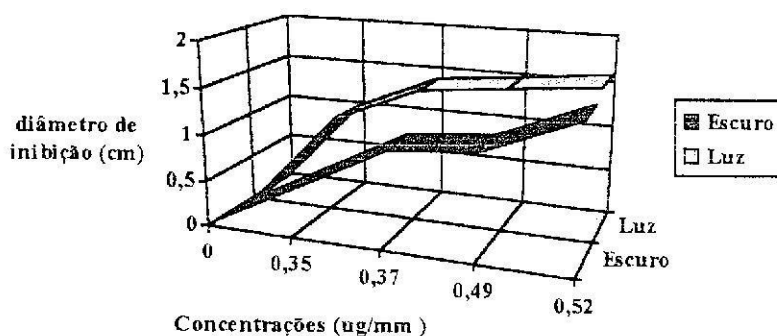


Fig.3.10 - Comparação do efeito da concentração da coriandrina no crescimento do fungo *F.culmorum*, sob condições de luz e do escuro (ver Anexo VI, quadro A-1).

4.4.2 - Compostos F e B de raízes

A acção inibitória de F, induzida pela luz, não é tão visível como para a coriandrina das folhas.

Para o fungo *C.cucumerinum* o efeito da concentração exhibe diferenças até valores de $4\mu\text{g}/\text{mm}^2$, tanto em condições de escuro como de luz. A fototoxicidade só se verifica até concentrações de $3,8\mu\text{g}/\text{mm}^2$, uma vez que a partir daí não se registam diferenças do diâmetro de inibição. O diâmetro de inibição verificado oscilou entre 0,3 e 0,7cm (Anexo VI, quadro A-2) ;(Figs. 3.11 e 3.15).

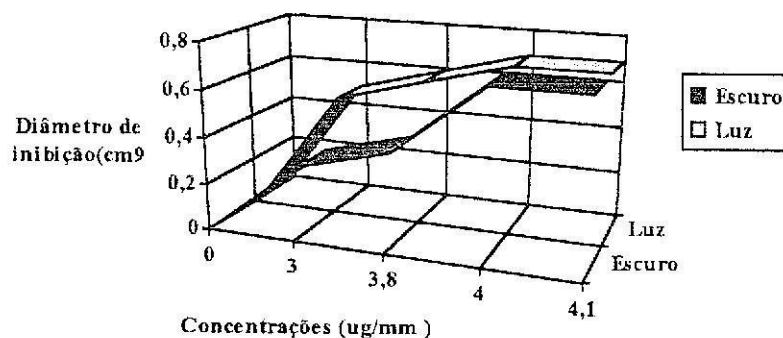


Fig.3.11 - Comparação do efeito da concentração do composto F no crescimento do fungo *C. cucumerinum*, sob condições de luz e escuro (ver Anexo VI, quadro A-2).

Para *F. culmorum* o efeito na inibição regista-se logo com concentrações de $3\mu\text{g}/\text{mm}^2$, com diferenças no diâmetro de inibição de 0,4 a 1,5 cm. O efeito da luz só se verifica até valores de $3,8\mu\text{g}/\text{mm}^2$ (Anexo VI, quadro A-2); (Figs. 3.12 e 3.16).

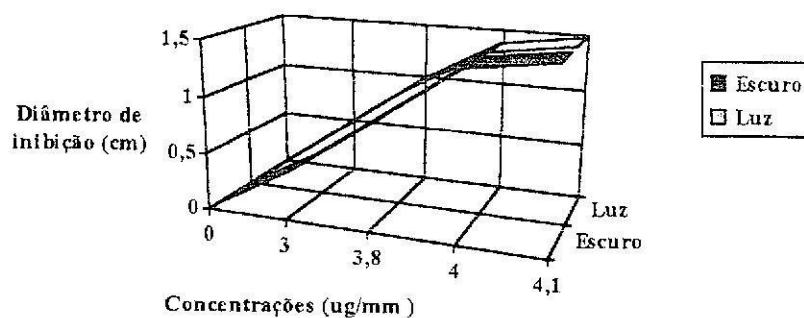


Fig.3.12 - Comparação do efeito da concentração de F no crescimento do fungo *F. culmorum*, sob condições de luz e do escuro (ver Anexo VI, quadro A-2).

Embora hajam pequenas diferenças (0,1cm) no diâmetro registado à luz relativamente às condições de escuro, o aumento da concentração para $4\mu\text{g}/\text{mm}^2$ não é acompanhada por um aumento do diâmetro de fotoinibição, podendo querer significar que a estes níveis de concentração o composto deixa de ser fotoactivo.

Estes resultados não nos permitem concluir se o composto é ou não um composto fototóxico, podendo no entanto afirmar que se trata de um composto fungicida.

No caso do composto **B**, a concentração mínima para a fotoinibição registou-se para *C.cucumerinum* a $0,8\mu\text{g}/\text{mm}^2$, e para *F. culmorum* a $0,9\mu\text{g}/\text{mm}^2$. (Anexo VI, quadro A-3); (Figs.3.13, 3.14, 3.15 e 3.16).

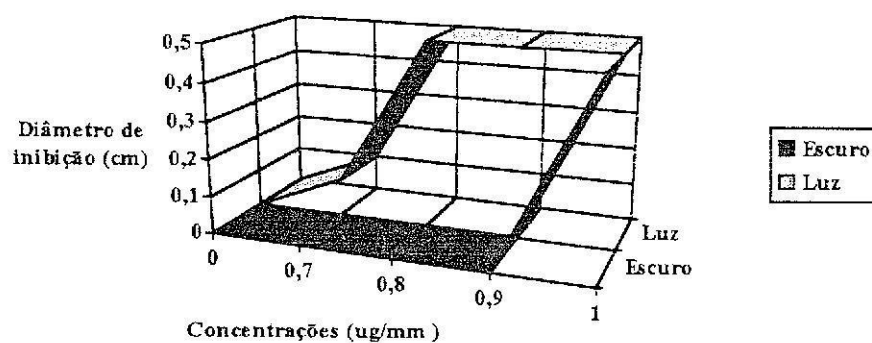


Fig.3.13 - Comparação do efeito da concentração do composto **B**, no crescimento do fungo *C.cucumerinum*, sob condições de luz e escuro (ver Anexo VI, quadro A-3).

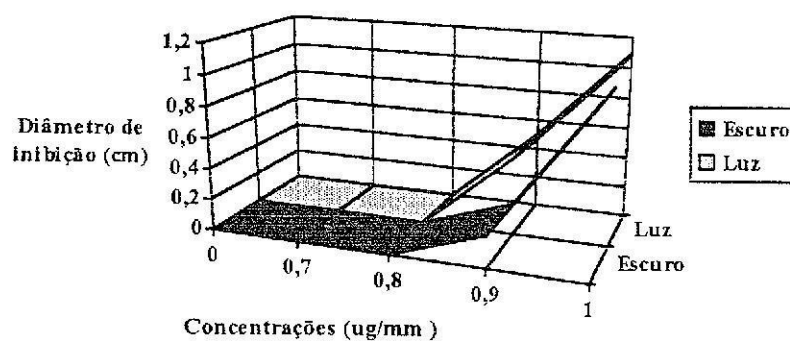


Fig.3.14 - Comparação do efeito da concentração do composto **B** no crescimento do fungo *F.culmorum*, sob condições de luz e do escuro (ver Anexo VI, quadro A-3).

Embora pareça haver um certo efeito fototóxico, já que o composto a partir de determinadas concentrações passa a ser activado pela luz, a partir de $1\mu\text{g}/\text{mm}^2$ esse efeito deixa de ser tão visível, passando o composto a comportar-se unicamente como fungicida qualquer que seja a situação ensaiada.

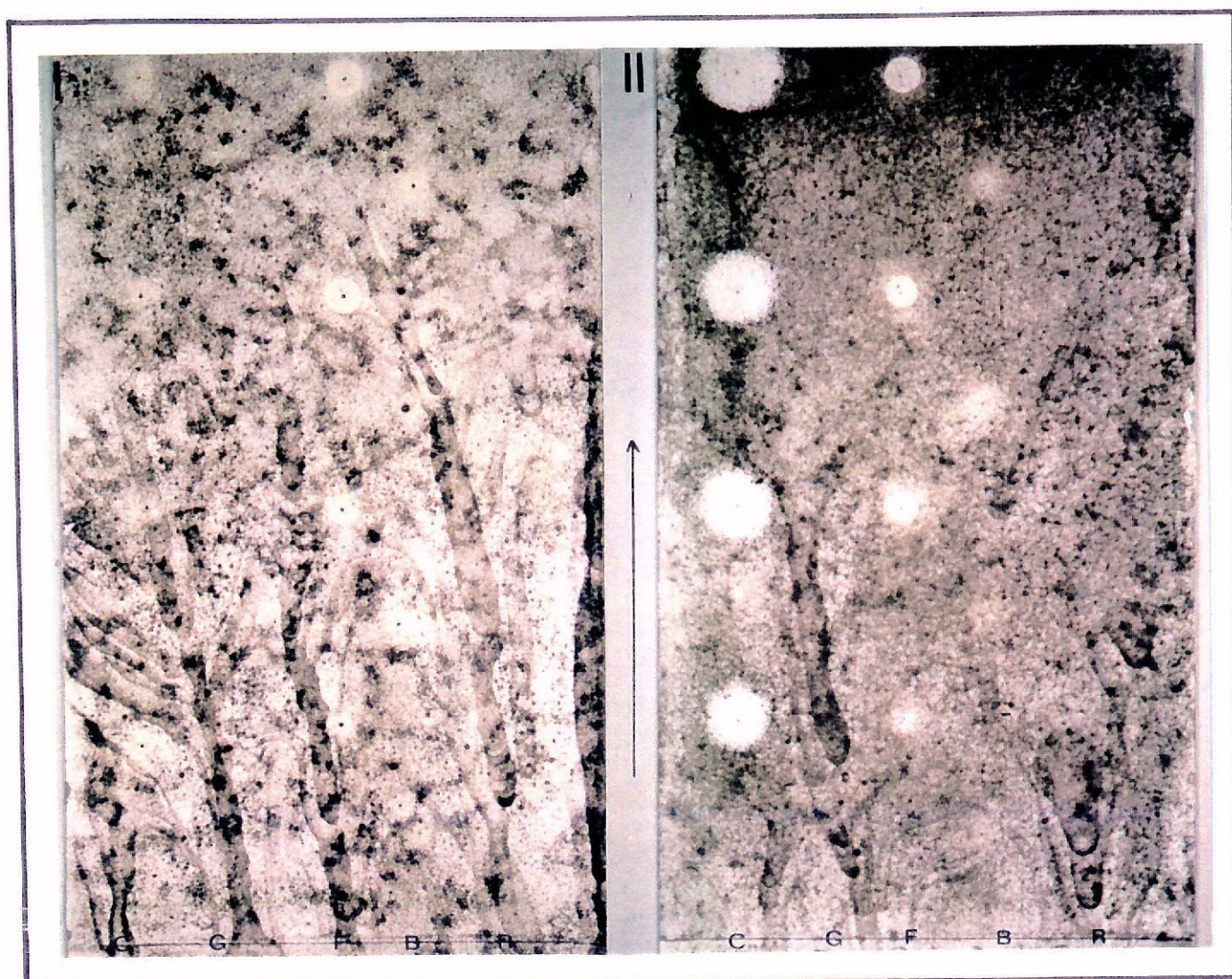


Fig.3.15 - Placas comparativas do efeito tóxico de 4 concentrações crescentes (da base para o topo) dos compostos C(folhas), G(frutos), F(raízes), B(raízes), R(raízes) sobre o fungo *C.cucumerinum*; I - no escuro, II - à luz.
As concentrações dos 3 compostos que exibiram efeito inibitório (C,F e B), encontram-se referidas nos quadros A-1, A-2 e A-3 do ANEXO VI.

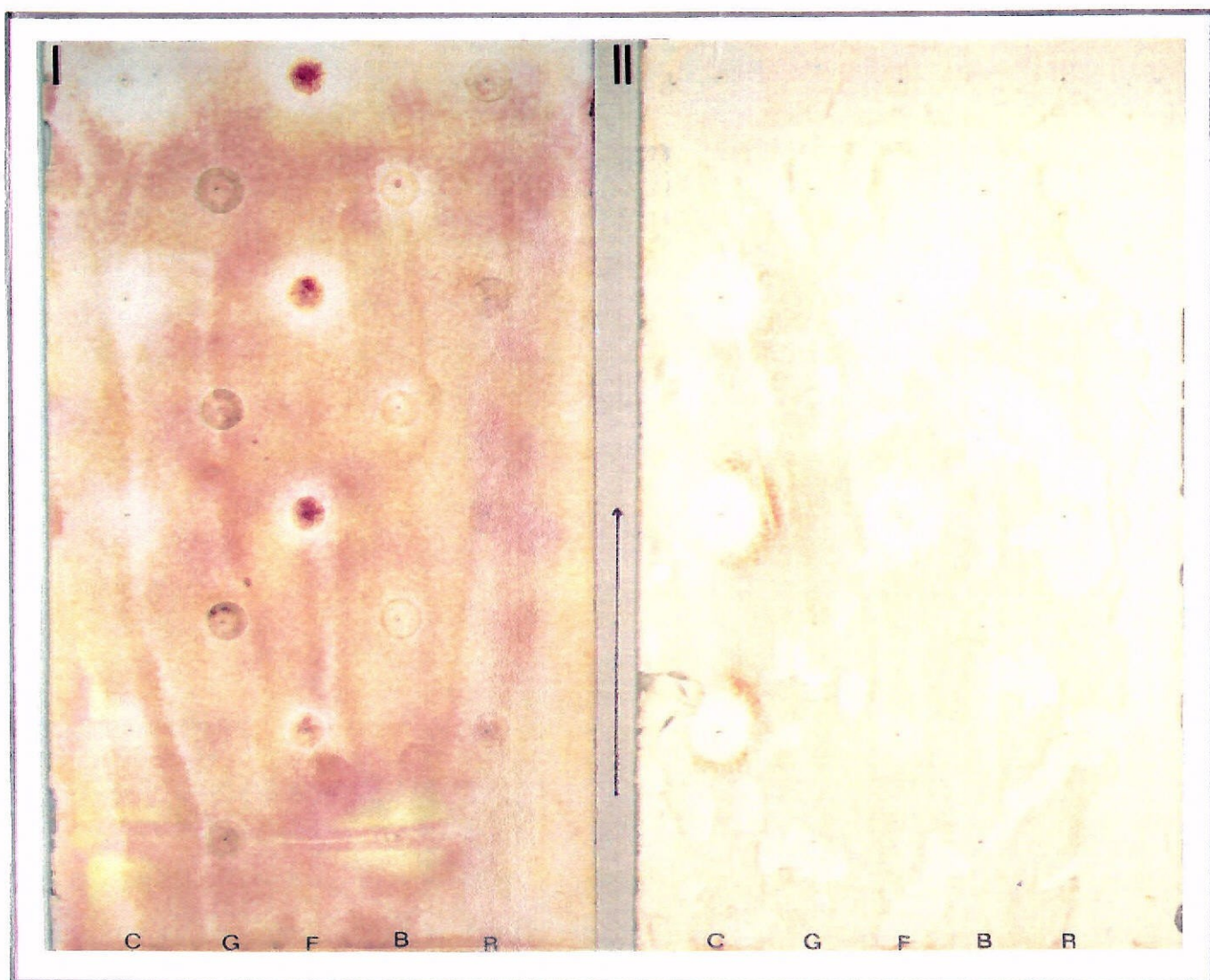


Fig.3.16 - Placas comparativas do efeito tóxico de 4 concentrações crescentes (da base para o topo) dos compostos **C**(folhas), **G**(frutos), **F**(raízes), **B**(raízes), **R**(raízes) sobre o fungo *F.culmorum*; **I**- no escuro, **II**- à luz.

As concentrações dos 3 compostos que mostraram efeito inibitório (**C**,**F** e **B**), encontram-se referidas nos quadros A-1, A-2 e A-3 do ANEXO VI.

IV - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de adaptação da cultura do coentro, conclui-se que a sementeira que melhor resultou, em termos de precocidade e produção, foi a que se realizou em finais de Fevereiro. A partir desta data a cultura exibiu uma fácil adaptação às condições edafo-climáticas de Castelo Branco, possuindo um ciclo curto (4 meses), o que, para além de ser de sementeira directa e pouco exigente em operações culturais, a torna uma cultura de interesse para ser integrada em rotações horticolas.

Ao fim de quatro anos de cultura, as médias de produção, obtidas por planta, foram, em peso seco, de 4g para raízes e de 9g tanto para folhas como para frutos.

Relativamente à extracção de princípios activos das várias partes da planta, apenas no caso das raízes, a utilização do AcOEt à temperatura ambiente nos diversos ensaios laboratoriais, não se mostrou como o solvente ideal, já que o rendimento da mesma ficou pelos 0,75%. Para as folhas e para os frutos os rendimentos foram respectivamente de 2% e 10%.

No que diz respeito à separação e purificação, os métodos de PLC e PTLC mostraram-se rápidos e eficientes, registando-se o facto de que uma coluna-mãe de 3 x 50cm demorava 5 horas para separar amostras de 2 a 3g de peso seco.

Separados diversos compostos, foram analisados e utilizados para testes de fototoxicidade apenas aqueles que, em testes biológicos preliminares, exibiam efeito fungicida.

Das folhas foi isolada uma isocumarina, 4-metoxi-7-metil-5H-furo[2,3-g]benzopirano-5-ona, designada por coriandrina.

Outras manchas fotoactivas foram encontradas nas placas de PTLC, mas em quantidades tão pequenas que não permitiram a sua identificação.

A quantidade de coriandrina estimada por pesagem foi de 53µg/g de matéria verde. Foi detectada a presença deste composto também em raízes mas a sua purificação foi impraticável pelo facto de existirem sempre substâncias que exerceram interferência.

Das raízes extraíram-se dois compostos com actividade biológica, designados por F e B. A sua purificação mostrou-se difícil pelo facto de existirem agentes contaminantes que dificultavam a separação das manchas puras. Os teores obtidos para F e B foram respectivamente, de 15 μ g/g e 33 μ g/g de matéria verde, quantidades que não permitiram a realização de todas as etapas para a sua total identificação.

Porém, por comparação com espectros disponíveis para substâncias puras, verificou-se que o composto F, que possuía um anel aromático com longas cadeias ramificadas e um grupo éster, se assemelhava a compostos do grupo dos ftalatos.

O extracto oleoso dos frutos não apresentou qualquer tipo de fotoactividade nos testes preliminares, não tendo sido, por esta razão, isolados os compostos maioritários. Porém, por pesquisa de terpenos pôde constatar-se a presença do acetato de geranilo como maioritário quando se utilizou este tipo de extracção, verificando-se que, em testes biológicos, havia um acréscimo do micélio de *C. cucumerinum* na mancha correspondente a esse composto.

Quanto ao tipo de testes biológicos efectuados, estes mostraram-se sensíveis, rápidos e eficientes para os compostos isolados, em especial para as furanocumarinas. O rastreio com um maior número de fungos fitopatogénicos será uma outra etapa a considerar, permitindo assim avaliar a importância destas substâncias no controlo de uma maior diversidade de agentes patogénicos.

Pode-se, contudo, afirmar que o fungo *C. cucumerinum* apresenta, para este tipo de testes, maior facilidade de manuseamento, permitindo, na maioria dos casos, uma melhor visualização dos resultados. O fungo *F. culmorum* evidenciou, no caso dos testes com a coriandrina, ser mais sensível a menores concentrações da mesma e à acção da luz.

Em testes realizados em placas de sílica-gel com 0,5mm de espessura, as concentrações mínimas de fotoinibição foram, de 0,35 μ g/mm² de mancha para a coriandrina, de 3 μ g/mm² para o composto F e de 0,9 μ g/mm² para o composto B.

Através destes estudos, verifica-se que para além do consumo das folhas do coentro em fresco, como condimento de muitos pratos da cozinha tradicional portuguesa, principalmente da alentejana e algarvia, poderão vir a ter utilização industrial. Os constituintes que possuem pelas suas características e propriedades podem ser utilizados como pesticidas fotobiológicos, mais vantajosos que muitos dos pesticidas sintéticos convencionais. O seu interesse residiria no facto de serem activados pela luz, mas,

simultaneamente, perderem a sua toxicidade ao fim de algum tempo em consequência de a própria luz os vir a degradar. Esta característica poderá ser de grande importância ecológica.

Muitas referências são conhecidas acerca de outros fotossensibilizadores naturais e dos seus efeitos em sistemas biológicos "in vitro". A sua utilização "in vivo" encontra-se ainda em fase de investigação, principalmente para o caso de produtos com acção pesticida. Para o caso das furanocumarinas não se conseguiu ainda esclarecer qual o seu verdadeiro papel no sistema fisiológico das plantas que as produzem.

Para além das furanocumarinas, os poliacetilenos e tiofenos, sendo tóxicos para numerosos organismos em pequenas quantidades e exibindo potencialidades como insecticidas, fungicidas, piscicidas e moluscicidas, poderão ser utilizados em substituição da maioria dos outros compostos que exibem características menos interessantes.

Como já foi referido, substâncias da família dos poliacetilenos encontram-se com frequência nas raízes de certas umbelíferas, podendo, em futuros trabalhos efectuar-se a pesquisa para este tipo de compostos, procedendo a extracções mais eficientes que as testadas, aumentando os resultados desta operação e, por conseguinte, os teores dos diferentes constituintes extraídos.

Estas propriedades fototóxicas têm sido também exploradas noutros campos, principalmente na medicina humana, sendo o 8-metoxipsoraleno um exemplo já largamente utilizado no tratamento da psoríase e outras afecções cutâneas. A coriandrina foi também testada contra a psoríase em trabalhos realizados por ASHWOOD-SMITH *et al.* (1989), verificando-se a sua vantagem relativamente a outras furanocumarinas em consequência de possuir um menor efeito carcinogénico. Portanto, este poderá ser outro campo em que este composto se venha a mostrar como um agente de controlo valioso.

A diversidade de compostos fotoactivos isolados de plantas, fungos e bactérias leva-nos a admitir que são frequentes na natureza. Porém é muito provável que mais de uma centena destes constituintes se encontrem por identificar. Muito trabalho terá ainda de ser realizado, de modo a conhecer melhor estes compostos e os seus mecanismos de acção, uma vez que estudos sobre a sua importância, em termos ecológicos, se encontram também em fase inicial de investigação.

A finalizar este trabalho, parece de interesse salientar o desenvolvimento de determinadas áreas para trabalhos futuros, designadamente:

1. Desenvolvimento de ensaios de produção, em que, através de um escalonamento anual das sementeiras, estas se conseguissem relacionar com maiores teores e maior diversidade de compostos de interesse, nomeadamente compostos fotoactivos;
2. Determinação, através de estudos de selecção e melhoramento, das linhas de plantas que sintetizem maior concentração da substância fotossensibilizadora, podendo, a acção desta ser avaliada pela resistência a um vasto leque de agentes patogénicos;
3. Determinação, através de estudos toxicológicos, do mecanismo de susceptibilidade e resistência do agente patogénico ao metabolito fototóxico;
4. Desenvolvimento de testes biológicos de aplicação directa dos compostos sobre plantas indicadoras e estudos da respectiva susceptibilidade ao agente patogénico;
5. Optimização dos requisitos de um fotopesticida, melhorando a sua acção de forma a evitar a aquisição de resistências por parte dos agentes patogénicos;
6. Investigação dos mecanismos de fototoxicidade dos compostos seleccionados, de modo a identificar os parâmetros fundamentais da sua actividade fototóxica e do seu impacte ambiental;
7. Síntese de novos compostos, derivados de outros de origem vegetal que tenham revelado insuficiência de acção nos testes de toxicidade;
8. Optimização das reacções de fototoxicidade através da modificação da estrutura base destes compostos, não só por deslocação do espectro de absorção para a região do visível, mas também, por destabilização de determinadas ligações químicas que induzam ao aumento destas reacções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A. E STEVENS, C. L. (1976) *Organic Chemistry*. Worth Publisher Inc. Nova Iorque.
- ANÓNIMO (1986) *Pesticide resistance strategies and tactics for management*. National Academy Press. Washington.
- ANÓNIMO (1991) *PEAK (I)*. Hans Toeffler Hewlett-Packard Company. Califórnia.
- ARNASON, J.T.; PHILOGÉNE, B.J.R.; MORAND, P.; SCALANO, J.C.; WERSTINK, N. e LAM, J. (1987) Thiophenes and Acetylenes: Phototoxic agents to herbivorous and blood-feeding insects. Em *Light activated pesticides*. J.R.Heitz e K.R.Downum, pp. 255-264. ACS Symposium 339. Califórnia.
- ASHWOOD-SMITH, M. J.; POULTON, G.A.; CESKA, O.; LIU, M. e FURNISS, E. (1983) An ultrasensitive bioassay for the detection of furocoumarins and other photosensitizing molecules. *Photochemistry and Photobiology* **38** (1): 113-118.
- ASHWOOD-SMITH, M. J.; WARRINGTON, P. J.; JENKINS, M.; CESKA, O. e ROMANTUK, P. J. (1989) Photobiological properties of a novel, naturally occurring furoisocoumarin, coriandrin. *Photochemistry and Photobiology* **50** (6): 745-751.
- BABA, K.; XIAO, Y.; TANIGUCHI, M. ; OHISHI, H. e KOZAWA, M. (1991) Isocoumarins from *Coriandrum sativum*. *Phytochemistry* **30** (12): 4123-4146.
- BAILEY, G. W.; WHITE, J. L. e ROTHBERG, T. (1968) *Soil Sci. Am. Proc.* **32**: 222 (cit. em Kips, 1985).

- BAJAJ, Y. P. S. (1989) *Biotechnology in Agricultural and forestry medicinal and aromatic plants I*. Springer-Verlag, Berlin.
- BEERENTRUP, H. M. Z. e ROBBELEN, G. (1987) *Calendula and Coriandrum*- New potential oil crops for industrial uses. (CAB abstracts, 1988)
- BERENBAUM, M.R. e FEENY, P. (1981) Toxicity of angular furanocoumarins to Swallowtail Butterflies: Escalation in a coevolutionary arms race? *Science* **212** (22): 927-929.
- BERENBAUM, M. R.; ZANGERI, A. R. e NITAO, J. K. (1984) Furanocoumarins in seeds of wild and cultivated parsnip. *Phytochemistry* **23** (8): 1809-1810.
- BORGES, A. E. L.; CARY, F. M.; DELGADO, F.; NETO, F. e NEVES, R. (1989). Produção de plantas medicinais para obtenção de óleos essenciais e com fins condimentares. Estudo de variedades e técnicas culturais. *I Jornadas Ibéricas de Plantas Mediciniais Aromáticas e Óleos Essenciais*. Madrid.
- BORGES, A. E.; DELGADO, F.; NETO, F.; NEVES, R.; CARY, F. e CARVALHO, T. (1990). Contribuição para o estudo de algumas plantas aromáticas em Portugal. I- Adaptação ecológica, fenológica e produção. *I Congresso Ibérico de Ciências Horticolas*. Lisboa.
- BORGES, M. L. (1992) Comunicação pessoal.
- BORGES, M. L.; MELO, J. S.; MAÇANITA, A. L.; MATOS, O.; PAIS, I.; BECKER, R.S. (1992) Fototoxicidade de tioderivados de compostos naturais. *13º Encontro da Sociedade Portuguesa de Química*. I.S.T. Lisboa.
- BORGES, P.; PINO, J. e ROSADO, A. (1990) The isolation of volatile oil from coriander fruit by steam distillation. *Die Nahrung* **34** (9): 831-834.
- BOUGUERRA, M. L. (1990) Pesticides phototoxiques: des armes lumineuse contre les nuisibles. *Recherche* **271** (21): 93-94.
- BROWN, A. W. A. (1978) *Ecology of pesticides*. John Wiley. New York.

- BURDEN, R. S.; ROWELL, P. M.; BAILEY, J. A.; LOEFFLER, R.S.T., KEMP, M. S. E BROWN, C. A. (1985) Debneyol, a fungicidal sesquiterpene from TNV infected *Nicotiana debreyi*. *Phytochemistry* **24** (10): 2191-2194.
- BUSTAMANTE, F. M. L. (1987) *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo e procesado*. Mundi Prensa. Madrid.
- CASSADY, J. M.; BAIRD, W. M. e CHANG C.J. (1990) *J.Nat. Prod.* **53**:23 (cit. HAMBURGERE HOSTETTMAN, 1991)
- CESKA, O.; CHAUDHARY, S. K.; WARRINGTON, P. J. e ASHWOOD-SMITH, M. J. (1986) Furocoumarins in the cultivated carrot (*Daucus carota*). *Phytochemistry* **25** (1): 81-83.
- CESKA, O.; CHAUDHARY, S. K.; WARRINGTON, P. J. e ASHWOOD-SMITH, M. J.. (1987) Photoactive furocoumarins in fruits of some umbellifers. *Phytochemistry* **26** (1): 165-169.
- CESKA, O.; CHAUDHARY, S. K.; WARRINGTON, P. J. E ASHWOOD-SMITH, M. J.; BUSHNELL, G. W. e POULTON, G. A. (1988) Coriandrin, a novel highly photoactive compound isolated from *Coriandrum sativum*. *Phytochemistry* **27** (7): 2083-2087.
- COSTA, A. F. (1968) *Farmacognosia*. Fundação Calouste Gulbenkian 2ª ed. Lisboa.
- COSTA, A. F. (1975) *Elementos da flora aromática. Laboratório de farmacognosia no estudo dos óleos essenciais de Portugal e Angola*. Junta de Investigações Científicas do Ultramar . Lisboa.
- COUCH, H. B. (1976) *Diseases of turfgrasses*. Robert E. Krieger Publishing Company. Flórida.
- CROSBY, D. G. (1970) Em *Pesticides in the soil, ecology, degradation and movement*: Symp. Proc. Michigan State University, East Lausing. (cit. KIPS, 1985)

- CROWDEN, R. K.; HARBORNE, J. B. e HEYWOOD, V. H. (1969) Chemosystematics of the *umbelliferae*- a general survey. *Phytochemistry* **8**: 1963-1984.
- DIRKS, U. e HERRMANN, K. (1984) 4-(β -D-Glucopyranosyloxy) Benzoic acid, a characteristic phenolic constituent of the *apiaceae*. *Phytochemistry* **23** (8): 1811-1812.
- DUKE, T. W. (1977) Em *Pesticides in aquatic environments*. M. A. Q. Khan. Plenum Press. New York.
- EDWARDS, G. A. (1973) *Persistent pesticides in the environment*. CR. C. Press, 2^a ed.. Cleveland, Ohio.
- EL-BALLAL, A. S. I. e EL-NASR, T. H. (1987) Selection for earliness and phytotherapeutic value in coriander. I. Breeding System. *Acta Horticulturae* **208**: 179-188.
- FARR, D. F.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P. e ROSSMAN, A. Y. (1989) *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- FARRELL, K. R. (1990) Agricultural pest control alternative. *California Agriculture* **44** (4): 2.
- FOOTE, C. S. (1987) Type I and Type II mechanisms of photodynamic action. Em *Light activated pesticides*. J. R. Heitz e K. R. Downum, pp. 22-38. ACS Symposium 339. Califórnia.
- FRANCISCO, I. e HERTWING, V. (1986) *Plantas aromáticas e medicinais*. Icone. S. Paulo.
- FRANCO, J. A. (1971) *Nova flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol. I, II. Ed do autor. Lisboa.
- GARDÉ, A. e GARDÉ, N. (1981) *Culturas horticolas*. Clássica, 5^ªed. Lisboa.

- GOTTSTEIN, D.; GROSS, D.; LEHMANN, H (1984) Microbioassay with *Cladosporium cucumerinum* Ell.&Arth. for the detection of fungitoxic compounds on Thin Layer Plates. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz* 20 (2):111-116. (R.P.P, 1985)
- HAMBURGER, M. e HOSTETTMANN, K. (1991) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30 (12): 3864-3874.
- HASKELL, P. T. (1985) *Pesticides Application: Principles and practices*. Clarendon Press. Oxford.
- HEINISCH, E. (1978) *Biogeochemische Kreisläufe. Persistenter Organischer Verbindungen*. (cit. KIPS, 1985)
- HEITZ, J. R. (1987) Development of photoactivated compounds as pesticides. Em *Light-Activated Pesticides*. ACS Symposium. Califórnia.
- HOMANS, A. L. e FUCHS, A. (1970) *A Journal Chromatography* 51: 327 (cit. HOSTETTMAN E LEA, 1987).
- HOSTETTMAN, M.; MARSON, A. e HOSTETTMAN, K. (1985) Les méthodes de séparation par chromatographie: applications aux produits naturels. Actas da conferência *Les Entretiens du Carla*. Tome VI.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMAN, M.; MARSON, A. (1986) *Preparative Chromatography Techniques. Applications in natural product isolation*. Springer Verlag. New York.
- HOSTETTMANN, K. e LEA, P. J. (1987) *Biologically Active Natural Products*. Clarendon Press, pag.67. Oxford.
- INGOLD, C. T. (1961) *The biology of fungi*. Hutchinson Educational Lda. Londres.
- IVIE, G. W. (1978) *Effects of poisonous plants on livestock*. Keeler, R., Van Kampen, K., James, I, pp 475-485. Academic New York. (cit. HEITZ, 1987)

- IVIE, G. W.; BULL, D. L.; BEIR, R. C. e PRYOR, N. W. (1986) *J. Chem. Ecol.* 12:869-882 (cit. HEITZ, 1987)
- IUPAC (1979) *Nomenclature of Organic Chemistry*. Pergamon Press. Section b, pp.53-72. Londres.
- JOHNSON, C. e BRANNON, D. R. (1983) Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry* 22: 2595.
- KASHMELMOUS, A.E. (1984) Effect of irrigation intervals on yield and quality of coriander (*Coriandrum sativum*). *Acta Horticulturae* 143: 347-351.
- KSCHEFFELIN & CO. (1973) *Always hypo-allergenic cosmetic product formulary*. 8th Edn Pharmaceutical Laboratories Division (cit. CESKA *et al.*, 1988).
- KIPS, R. H. (1985) Environmental aspects. Em *Pesticides Application: Principles and Practice*. P. T. Haskell, pp. 190-200. Oxford.
- KNOX, J. P. e DODGE, A. D. (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24 (5): 889-896.
- KNOX, J. P.; SAMUELS, R.I. e DODGE, A. D. (1987) Photodynamic action of hypericin. Em *Light activated pesticides*. J. R. Heitz e K. R. Downum, pp. 265-270. ACS Symposium 339. Califórnia.
- KUC, J. (1990) Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. Em *Bioactive compounds from plants*. John Wiley & Sons, pp. 213-228. Ciba foundation symposium 154. Singapura.
- LEY, S. V. (1990) Synthesis of antifeedants for insects: novel behaviour-modifying chemicals from plants. Em *Bioactive compounds from plants*. John Wiley & Sons, pp. 88-98. Ciba foundation symposium 154. Singapura.
- LYONS, J. M. e ZALOM, F. G. (1990) Progress report: Vice President's task force on pest control alternative. *California Agriculture* 44 (4): 11-12.

- MAÇANITA, A. L. V. A. (1992) Comunicação pessoal.
- MANGAL, J. L.; VADAVA, A. e SINGH, G. P. (1986) Effect of different levels of soil salinity on germination, growth, yield and quality of coriander and fennel. *South Indian Horticulture* 34 (1): 26-31 (. CAB abstracts, 1987).
- MARANGA, G. (1986) *Plantas aromáticas na alimentação*. Ed. Nobel. São Paulo.
- MARCHANT, Y. (1987) Photodecomposition of naturally occurring biocides. Em *Light activated pesticides*. J. R. Heitz e K. R. Downum, pp. 168-174. ACS Symposium 339. Califórnia.
- MATOS, O.; DELGADO, F.; CARVALHO, I. e RICARDO, C. P. (1992) Inhibitory action of plant extracts on the growth of fungi affecting plants and food. *Biotec-92*. Santiago de Compostela. (em publicação).
- MIRONOVA, A. N.; FILLIPPOVA, G. I.; FEDINA, N. I.; VOLKOVA, Z. D.; KOZLOVA, V. L.; ALYMOVA, T. B.; GORSHKOVA, E. I. e BYKOVA, S. F. (1991) Chemical and biological properties of coriander fatty oil. *Voprosy Pitaniya* 0 (1): 59-62 (BA on CD, 1991).
- MORLEY, H. V. (1977) Em *Pesticides in aquatic environments*. Ed. M. A. Q. Khan. Plenum Press. New York.
- MURRAY, R. P. H. (1989) Coumarins. *Natural Product Report* 6: 591-624.
- MURRAY, R. P. H.; MENDEZ, J. e BROWN, S. A. (1982) *The natural coumarins*. Ed. Wiley. New York.
- NEILSON, B. E. (1971) *Biology and chemistry of the Umbelliferae*. Ed. Heywood, Academic Press p.325. London.
- NORMAN, C. (1976) *Nature* 259: 440 (cit. BOUGUERRA, 1990)
- ONIONS, A. H. S. ; ALLSOPP, D. e EGGING, H. O. W. (1981) *Smith's introduction to industrial mycology*. Edward Arnold (Publishers) Lda. Londres.

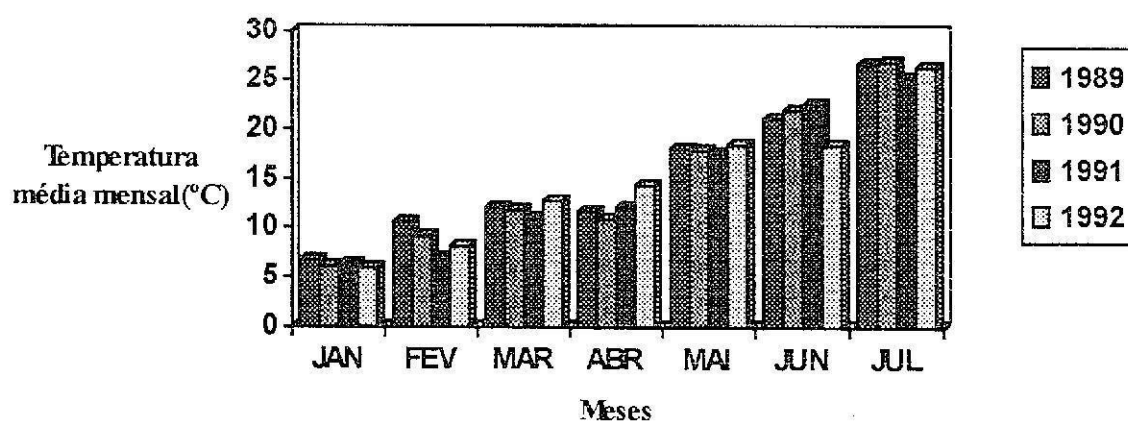
- PENKA, M. (1978) Influence of irrigation on the contents of effective substances in officinal plants. *Acta Horticulturae* 73: 181-198. (CAB abstracts, 1979).
- QUER, P. F. (1987) *Plantas medicinales. El Dióscorides renovado*. Ed. Labor, Barcelona.
- REBEIZ, C. A.; MONTAZER-ZOUHOOR, A.; MAYASICH, J. M.; TRIPATHY, B. C.; WU, S. M. e REBEIZ, C. C. (1988) *Photodynamic herbicides and chlorophyll biosynthesis modulators*. L. A. P, pp 295-298. Urbana.
- REDDY, P. U.; RAO, T. S. R.; RAO, S. B. S. N. e REDDY, A. N. (1989) Genetic variability in coriander. *Indian Cocoa, Arecanut and Spices Journal* 12 (3): 90-92. CAB abstracts, 1990).
- RISEBROUGH, R. W.; HUGGET, R. J.; GRIFFIN, J. J. e GOLDBERG, E. D. (1968) Science 159: 1233 (cit. KIPS, 1985)
- ROMAN, G. V. e STEFAN, V. (1986) Studies on the effect of mineral fertilizers on coriander grown on reddish brown soils (CAB abstracts, 1987).
- SASTRY, E. V. D.; SINGH, D.; SHARMA, K. C.; SHARMA, R.K. (1989) Stability analysis in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 49 (2) : 151-153. (CAB abstracts, 1990).
- SCHIEFFELIN & CO.(1983) *Always Hypo-allergenic cosmetics product formulary*. 8 th. Edn. Pharmaceutical Laboratories Division. New York.
- SHARMA, C. P. e AGARWALA, S. C. (1986) Coriander. A spice sensitive to deficiencies of N, P, K, Ca and Mg. *Geophytology* 16 (1): 138-141 (Horticultural Abstracts, 1987).
- SHRINER, R. L.; FUSON, R. C.; CURTIN, D. Y. e MORRILL, T. C. (1980) *The systematic identification of organic compounds*. John Wiley & Sons, 6th. ed. Singapura.
- SILVA, A. A. (1980) Os Pesticidas na Agricultura. *Suplemento do Jornal do Fundação "Beira Interior" I série, 3.*

- SONG, P. S. e TAPLEY, K. J. (1979) Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochemistry and Photobiology* 29: 1177-1197.
- SPIKES, J. D. e GLAD, B. W. (1964) Photodynamic action. *Photochemistry and Photobiology* 3: 471-487.
- SPIKES, J. D. e STRAIGHT, R. C. (1987) Biochemistry of photodynamic action. Em *Light activated pesticides*. J. R. Heitz e K. R. Downum, pp. 98-108.. ACS Symposium 339. Califórnia.
- STAHL, E.; DUMONT, E; JORK, H.; KRAUS, L. J.; ROZUMEK, K.E. e SCHORN, P. J. (1975) *Analyse chromatographique et microscopique des drogues. Manuel pratique pour les pharmacopées europeénes*. Société PIC, S.A. Genève.
- STILL, W. C.; KAHN, M. e MITRA, A. (1978) Rapid chromatography. *J. Org. Chem.* 43: 2923-2925.
- SUKHADIA, H. L.; SINHA, M. P.; MALAVIA, D.D.; KANERIA, B.B. e PATELA, J. C. (1986) Response of coriander to planting patterns and seed rates. *Indian Journal of Agronomy* 31 (3): 296-297. (. CAB abstracts, 1987).
- TALPADA, P. M.; DESAI, H. B.; PATEL, Z. N. e SHUKLA, P.C. (1989) Tannin content in some agro-industrial by products of Gujarat. *Indian Journal of Animal Nutrition* 6 (2): 181-182 (. CAB abstracts, 1990).
- TASHINEN, J. e NYKANEN, L. (1989) *Acta Chem. Scan.* B29, 425: 1075. (cit. Anónimo, 1991).
- TOMÁS- BARBERÁN, F. A.; MSONTHI, J. D. e HOSTETTMAN, K. (1988) Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry* 27 (3): 753-755.
- TOWERS, G. H. N. e CHAMPAGNE, D. E. (1987) *Fungicidal activity of naturally occurring photosensitizers in light-activated pesticides*. ACS symposium. Califórnia.

- TOWERS, G. H. N. e HUDSON, J. B. (1987) Potentially useful antimicrobial and antiviral phototoxins from plants. *Photochemistry Photobiology* **46** (1): 61-66.
- WAGNER, H.; BLADT, S. e ZGAINSKI, E. M. (1984) *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. Spring Verlag. Berlin.
- WASSERMAN, H.H. e MURRAY, R. W. (1979) *Singlet oxygen*. Academic Press. Nova Iorque.
- WAT, C. K.; MACRAE, W. D.; YAMAMOTO, E.; TOWERS, G. H. N. e LAM, J. (1980) Phototoxic effects of naturally occurring polyacetylenes and α -terthienyl on human erythrocytes. *Photochemistry Photobiology* **32**: 167-172.
- WEINSTEIN, L. I.; HAHN, M. G. e ALBERSHEIM, P. (1981) Host-Pathogen interactions. XVIII Isolation and biological activity of glycinol, a pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. *Plant Fisiology* **68**: 358-363.

ANEXOS

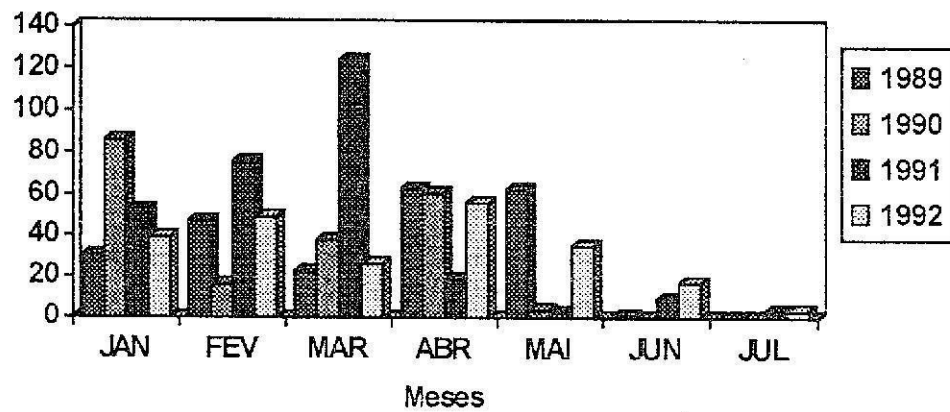
ANEXO I



	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1989	6,12	9,14	11,78	10,8	17,83	21,84	26,8
1990	6,69	10,5	12,02	11,58	17,98	21,03	26,61
1991	6,26	6,96	10,97	12,04	17,51	22,4	25,22
1992	5,9	8,1	12,7	14,3	18,4	18,3	26,3

Temperaturas médias mensais (°C) no período de Janeiro a Julho, dos anos de 1989, 1990, 1991, 1992
 (Dados registados no posto meteorológico da Escola Superior Agrária de Castelo Branco)

ANEXO II



	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1989	30,2	46,8	22,6	62,7	62,4	1,1	0,0
1990	85,8	16,2	37,7	60,5	3,6	0,0	0,0
1991	52,6	75,4	123,7	18,7	2,3	9,1	3,0
1992	39,2	48,7	26,4	55,9	34,9	17,0	3,4

Precipitações (mm) no período de Janeiro a Julho, dos anos de 1989, 1990, 1991, 1992
 (Dados registados no posto meteorológico da Escola Superior Agrária de Castelo Branco)

ANEXO III

MEIOS DE CULTURA PARA FUNGOS

1 - PDA (DIFCO)

	g / l
Potato Dextrose Agar.....	39,0
(pH final 5,6)	

2 - Meio líquido de crescimento

	% / l
Glucose.....	5,0
KH ₂ PO ₄	0,7
KNO ₃	0,4
Na ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄	0,1
NaCl.....	0,1
(pH final 5,6)	

Em todos os meios nutritivos, foi utilizada a água destilada e desionizada como solvente. O pH final dos meios de cultura, foi ajustado com ácido clorídrico 0,1 M.

As esterilizações foram realizadas em autoclave, a uma pressão de 1 Kg/cm², à temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

ANEXO IV

SOLUÇÕES DE REVELAÇÃO DE PLACAS DE TLC

1. Solução VANILINA-ÁCIDO SULFÚRICO (VS)

SOL.I - 5% de ácido sulfúrico etanolado

SOL.II - 1% de vanilina etanolada

A placa é pulverizada com cerca de 10 ml desta mistura de soluções. Leva-se a uma temperatura de 110°C de 5-10 minutos. Observa-se na gama do visível.

Detecta: componentes de óleos essenciais(terpenos, fenóis, derivados do fenilpropano etc.

2. Solução de HIDRÓXIDO de POTÁSSIO

5% ou 10% de hidróxido de potássio em etanol (**reacção de Boenträger**)

A placa é pulverizada com 10 ml. desta solução. Observa-se na gama do visível ou em UV-365nm, com ou sem aquecimento.

Detecta: antraquinonas(vermelhas), antronas(amarelo,UV-365 nm.), cumarinas(azul,UV-365nm.)

ANEXO V

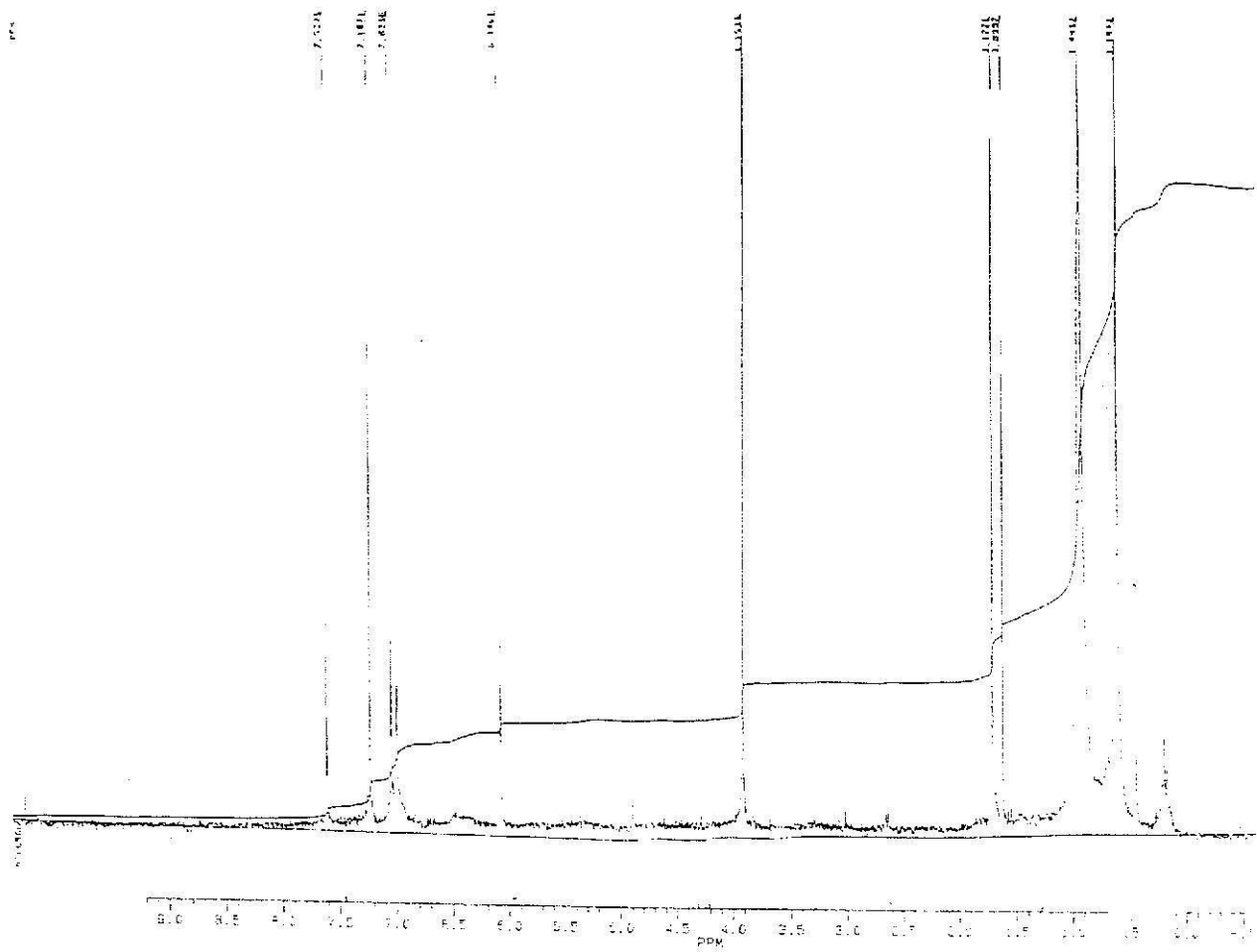
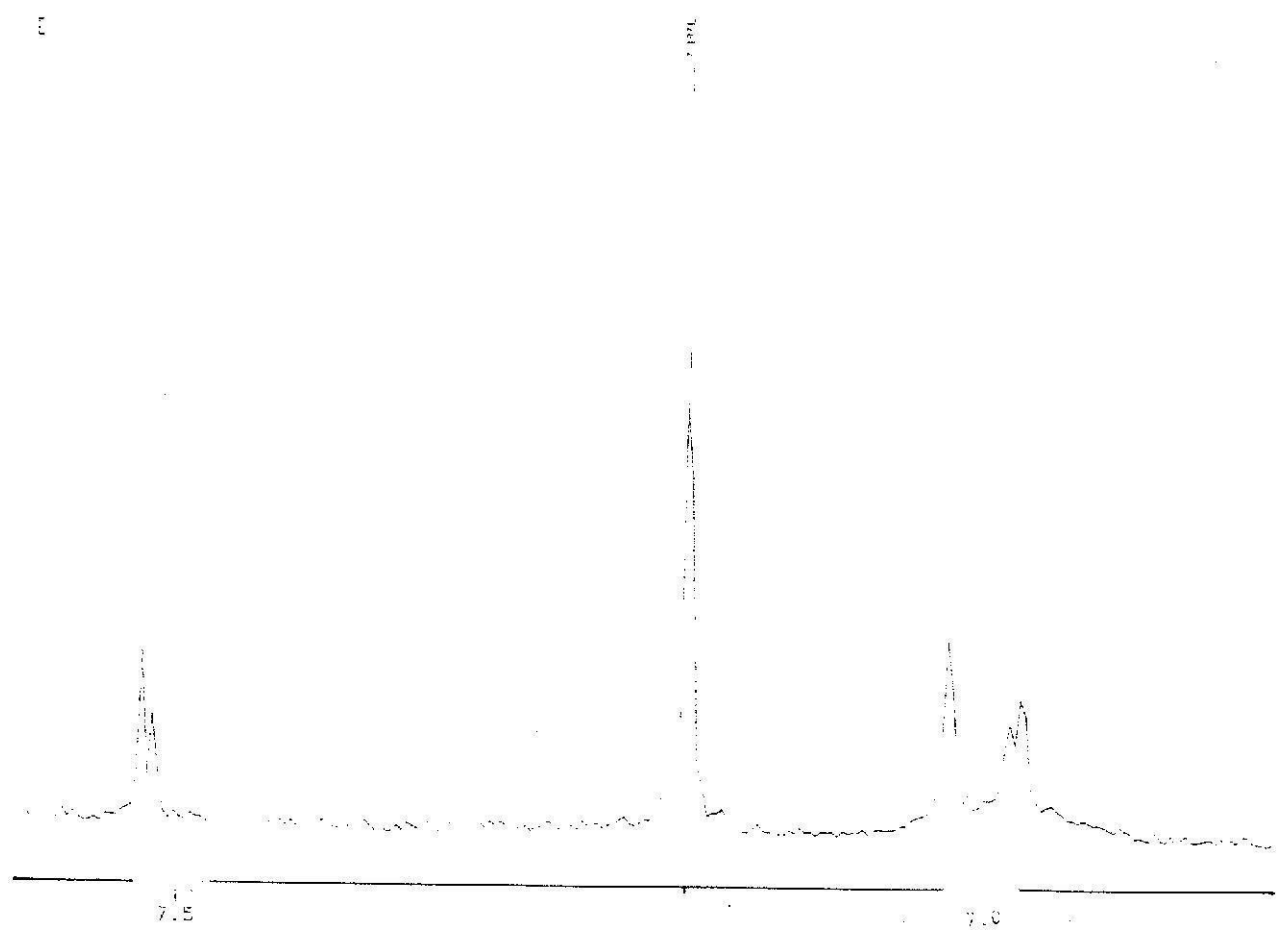


FIG. 10 - Espectro ^1H -RMN da coriandrina em CDCl_3 , a 300Hz e ^1H -RMN expandido entre 6,5 e 7,6 ppm



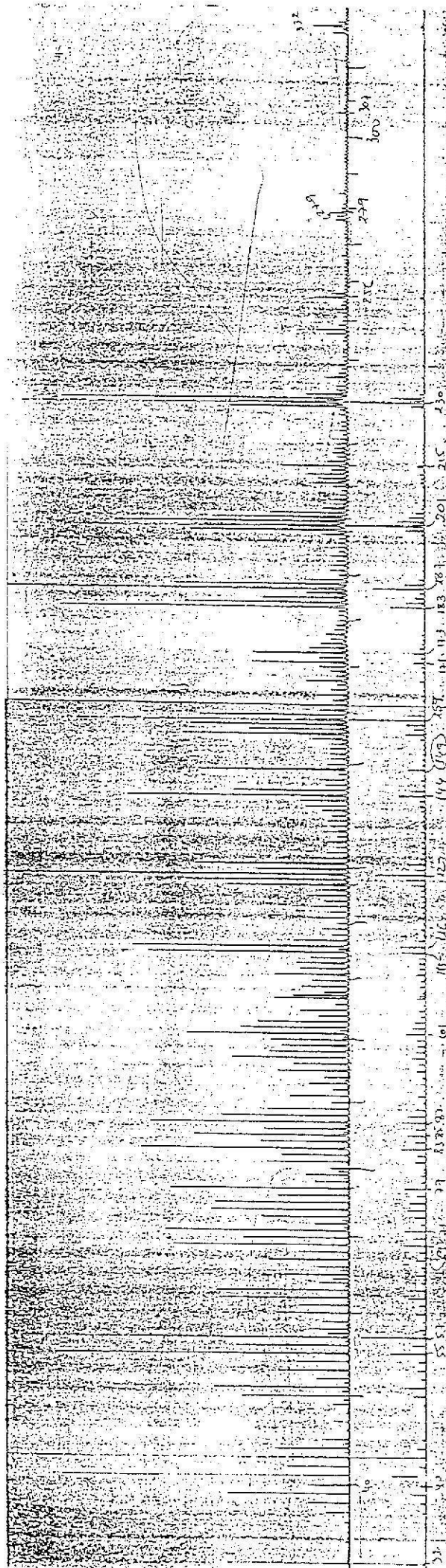


FIG. 11 - Espectro de massa da coriandrina a 70 eV e 80° de temperatura.

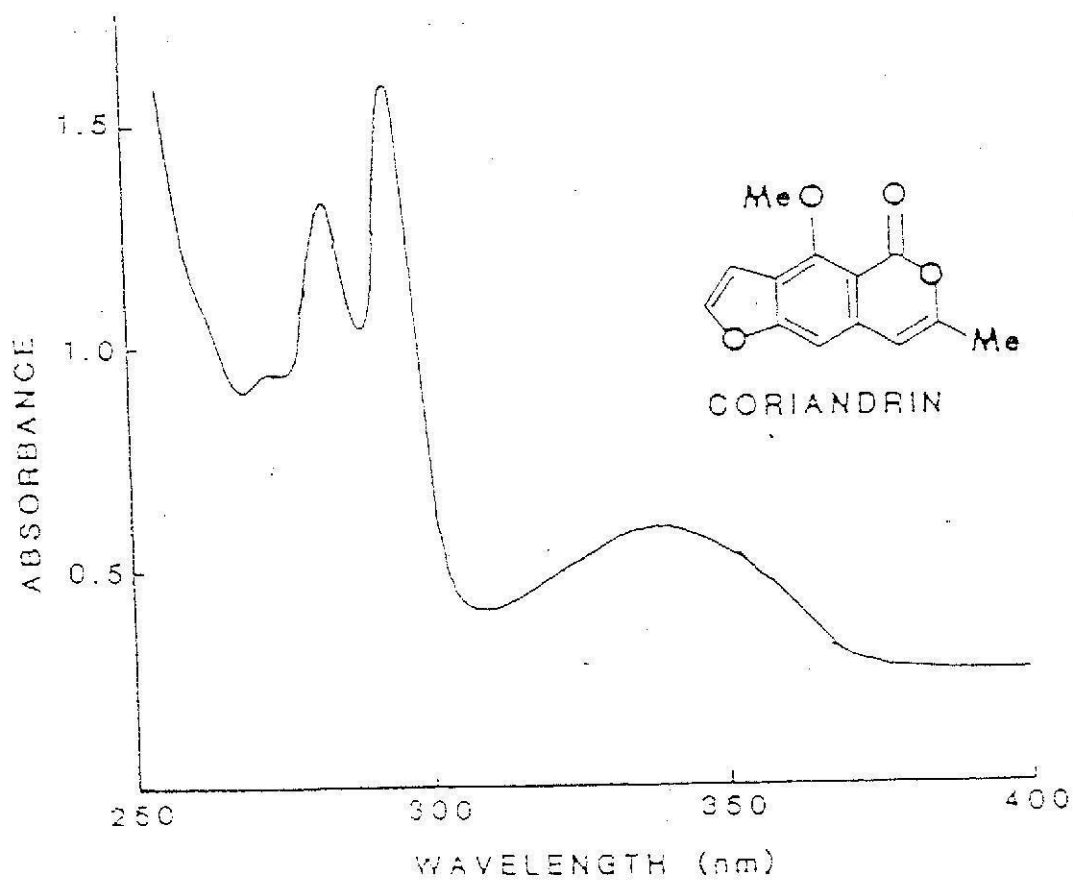


FIG. 12 - Espectro de UV da coriandrina dissolvida em etanol a 95%

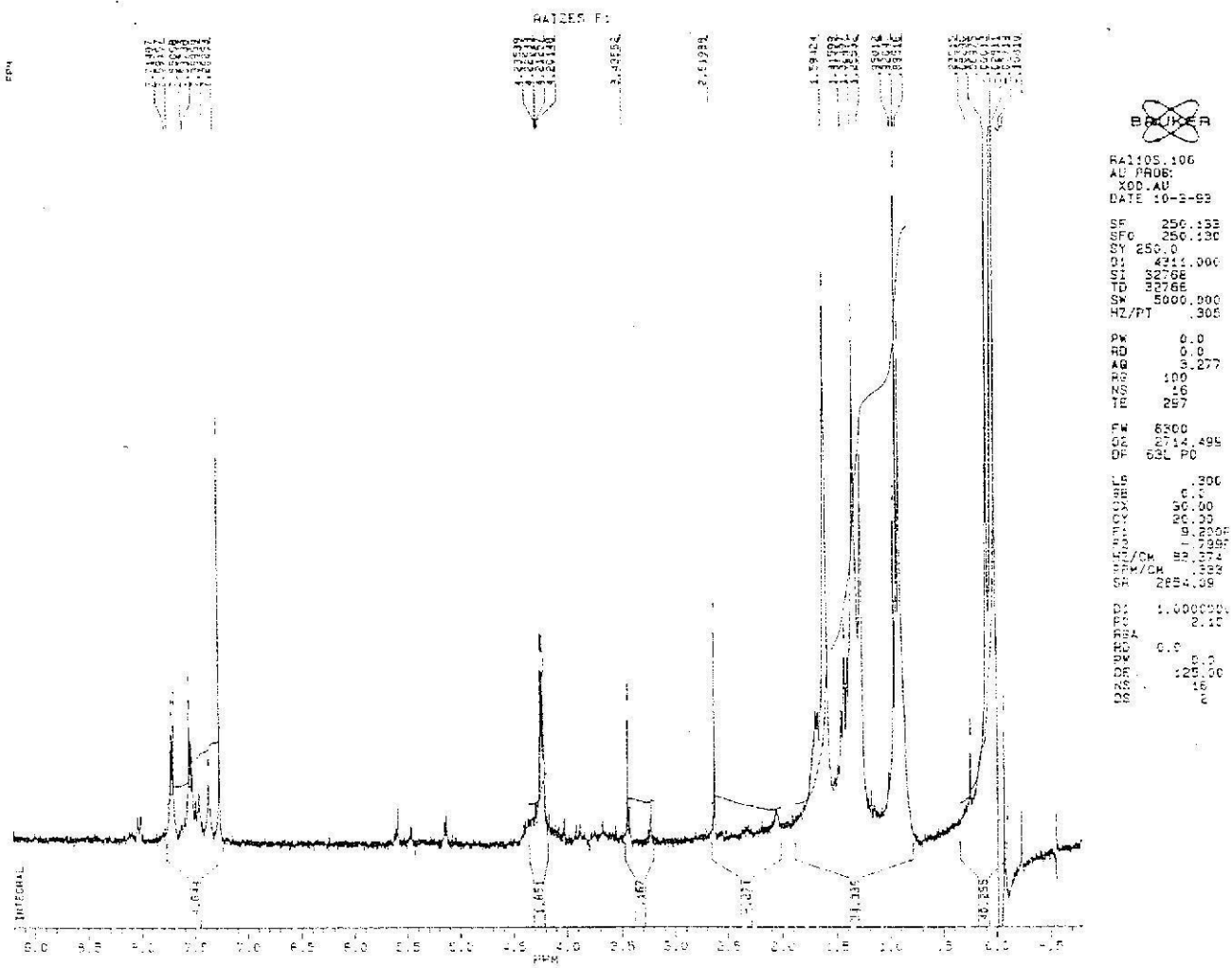


FIG. 13 - Espectro ^1H -RMN do composto F em CDCl_3 , a 250 Hz

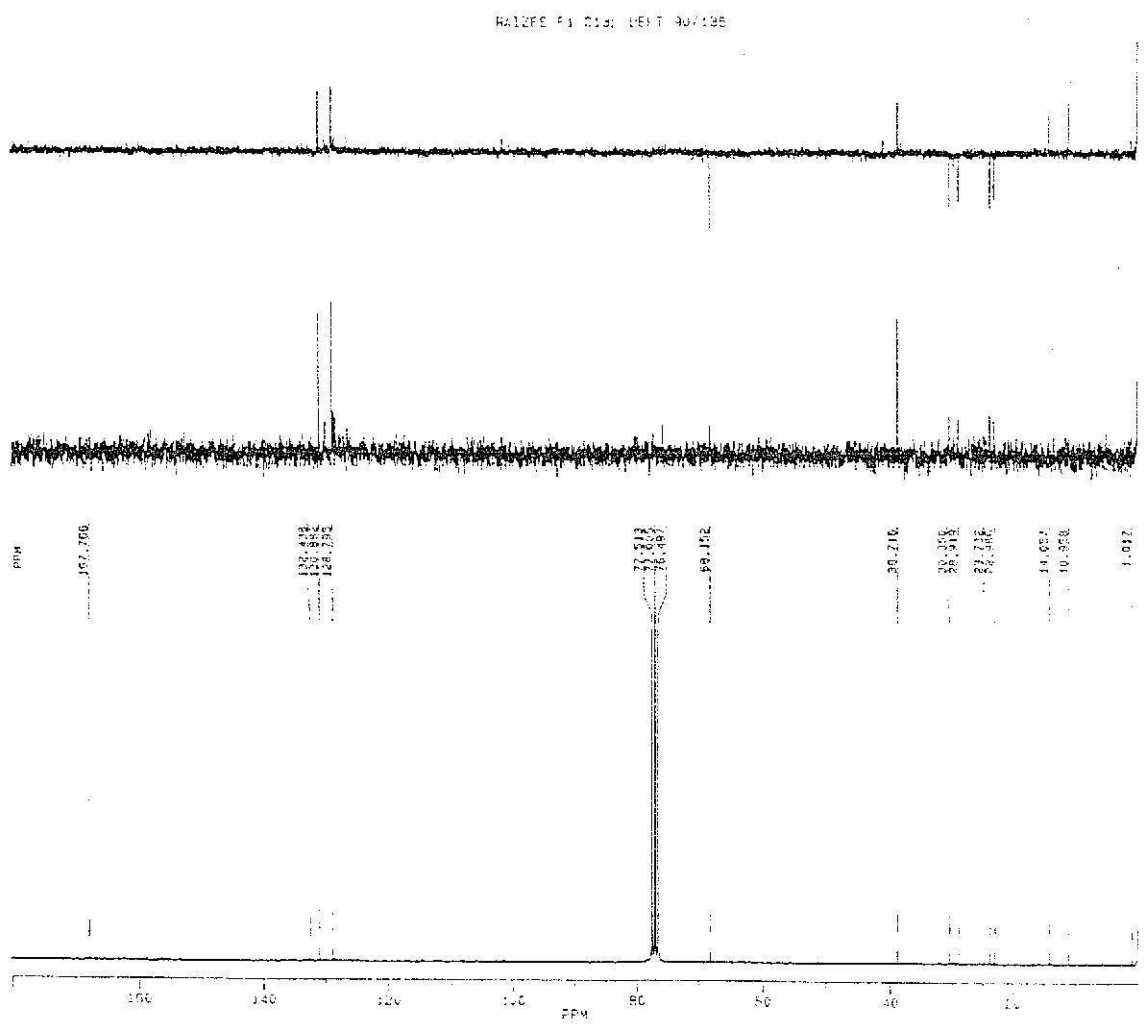


FIG. i4 - Espectro ^{13}C -RMN e DEPT do composto F, em CDCl_3 , a 250 Hz

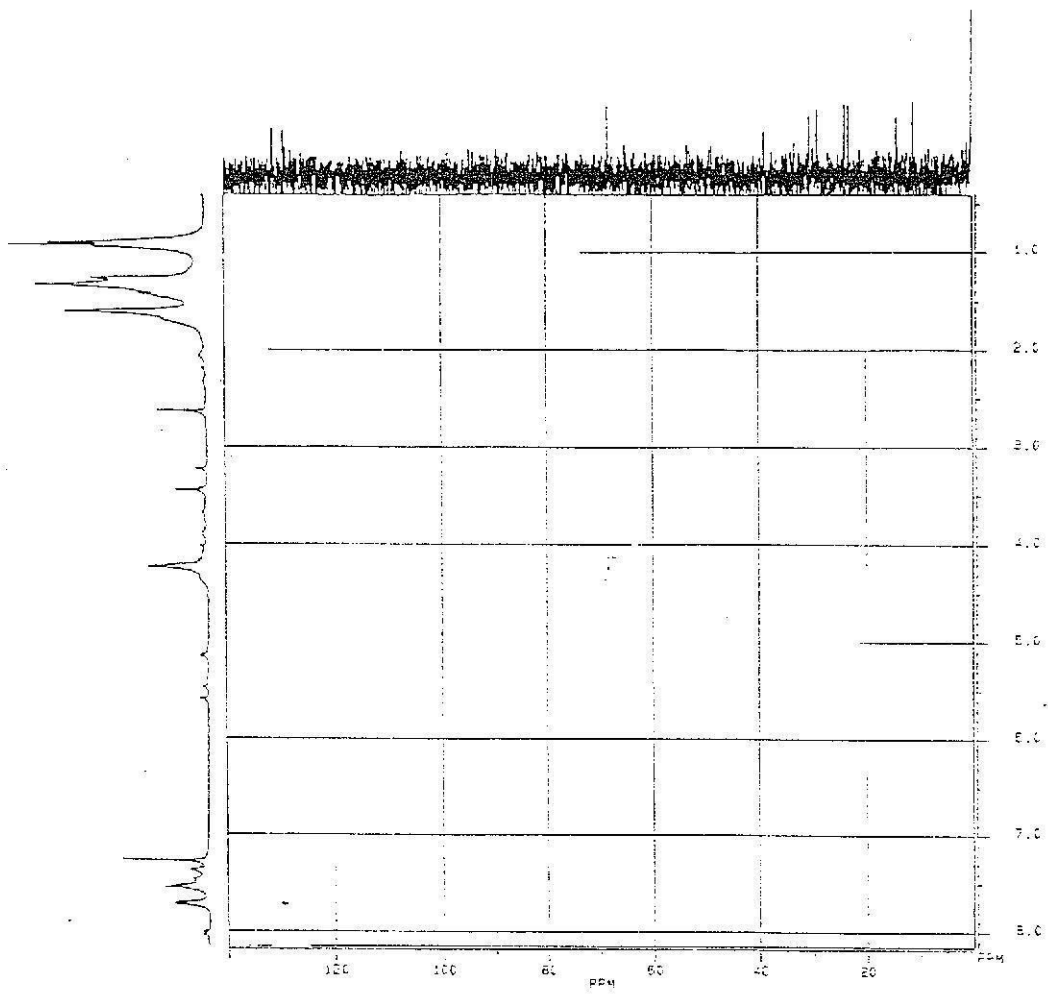
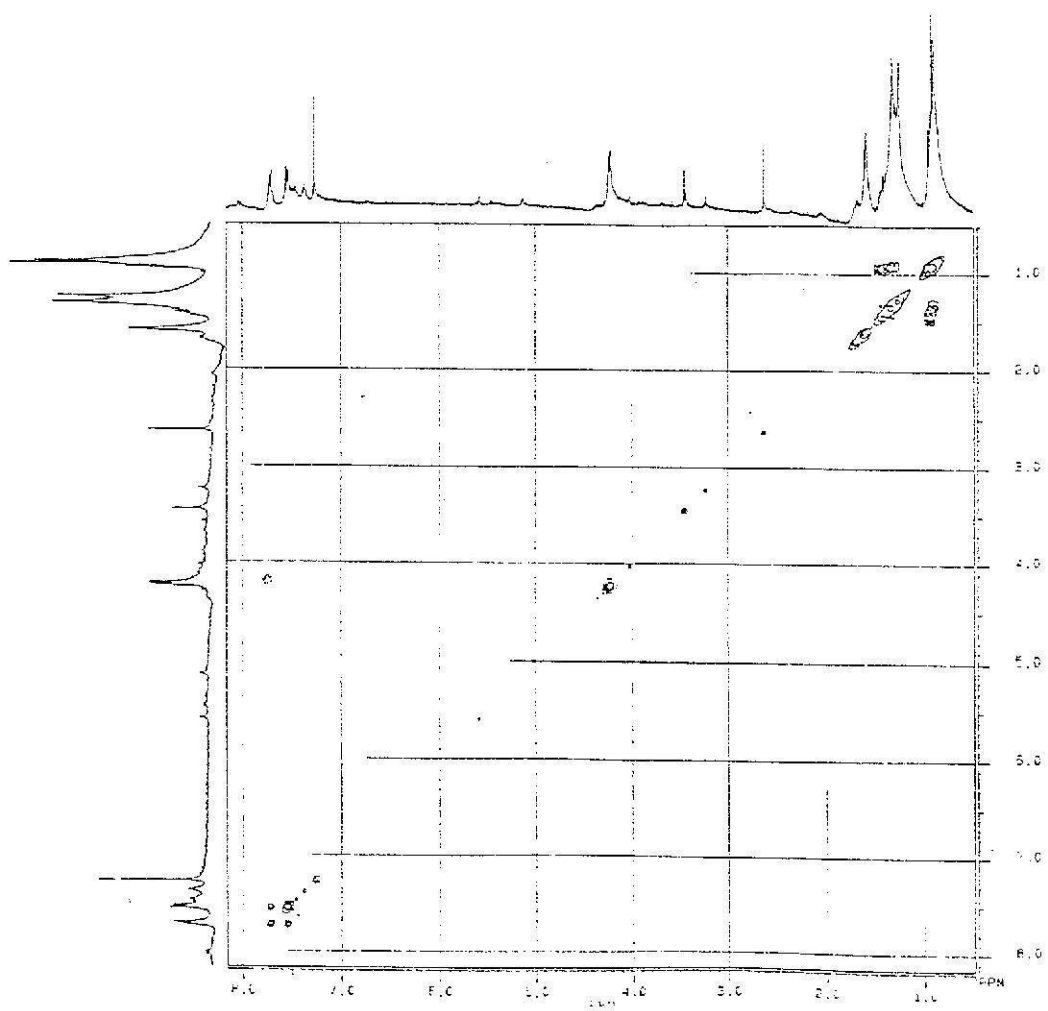


FIG. 15 - Correlação H-C e C-C do composto F, a 250 Hz



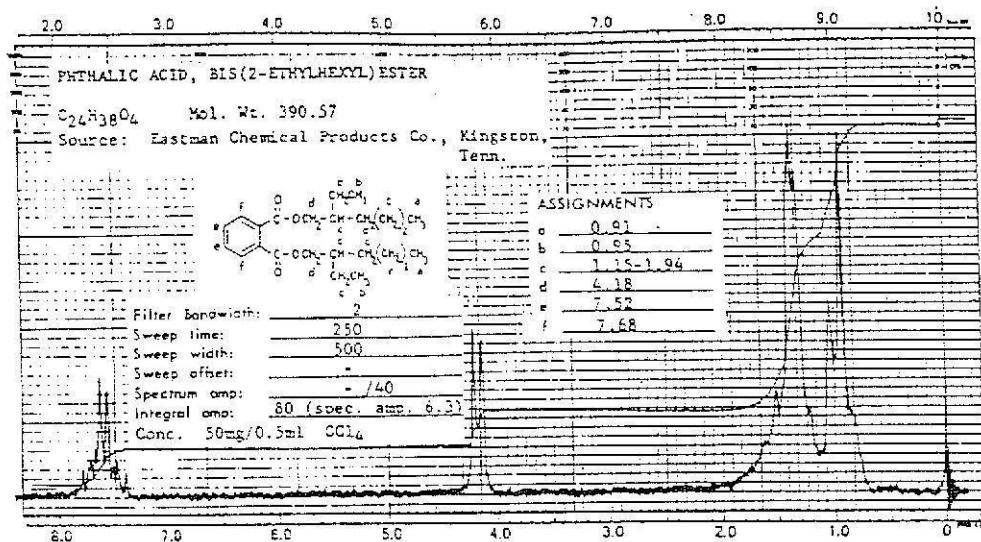


FIG. i₆ - Espectro de ¹H-RMN do ftalato bis(2- etil-hexílico)

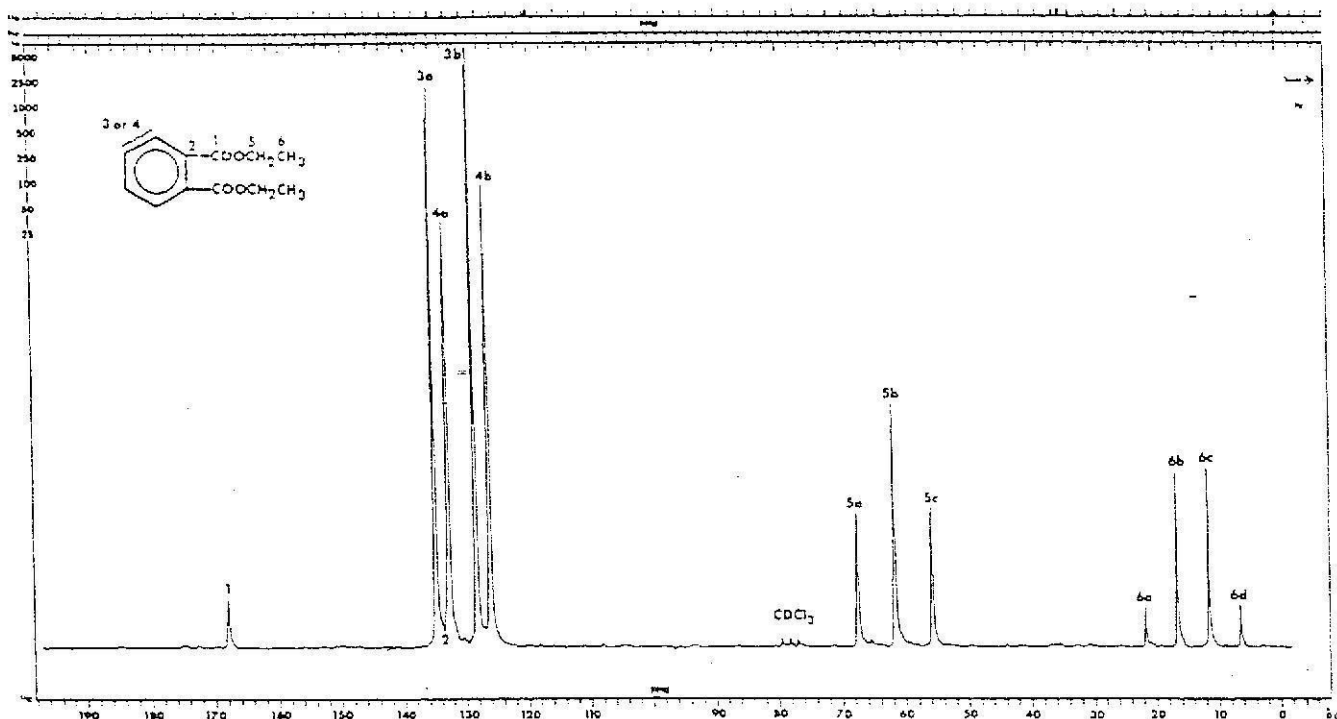


FIG. i₇ - Espectro de ¹³C-RMN do dietil-ftalato, com os prótons completamente acoplados, em CDCl₃ e a 25,2 MHz

ANEXO VI

QUADRO A-1-Efeito fototóxico (diâmetro de inibição em cm) da concentração de C (folhas) para *C.cucumerinum* e *F. culmorum*.

CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	FUNGO			
	<i>C. cucumerinum</i> (\emptyset cm)		<i>F. culmorum</i> (\emptyset cm)	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
0,35	0,0	1,0	0,5	1,0
0,37	0,2	1,3	1,0	1,4
0,49	0,3	1,4	1,1	1,5
0,52	0,5	1,6	1,5	1,6

QUADRO A-2-Efeito fototóxico (diâmetro de inibição em cm) da concentração de F (raízes), para *C. cucumerinum* e *F. culmorum*.

CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	FUNGO			
	<i>C. cucumerinum</i> (\emptyset cm)		<i>F. culmorum</i> (\emptyset cm)	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
3	0,3	0,5	0,4	0,5
3,8	0,4	0,6	0,9	1
4	0,7	0,7	1,4	1,4
4,1	0,7	0,7	1,5	1,5

QUADRO A-3-Efeito fototóxico (diâmetro de inibição em cm) da concentração de B (raízes) para *C. cucumerinum* e *F. culmorum*.

CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	FUNGO			
	<i>C. cucumerinum</i> (\varnothing cm)		<i>F. culmorum</i> (\varnothing cm)	
	ESCURO	LUZ	ESCURO	LUZ
0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
0,8	0,0	0,1	0,0	0,0
0,9	0,0	0,5	0,2	0,5
1	0,5	0,5	1,0	1,1

NOTA: Os valores dos diâmetro de inibição (\varnothing cm), assim como da área ocupada pelo composto, são o resultado de uma média aritmética de três valores, medidos segundo três direcções distintas na placa de PTLC.

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
52	9	figura 3.6	figura 3.5
52	19	figura 3.5	figura 3.6
56/57	Figs.3.9 a 3.14	Concentração (ug/mm)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)
ANEXO II	Título do eixo Y		Precipitação (mm)