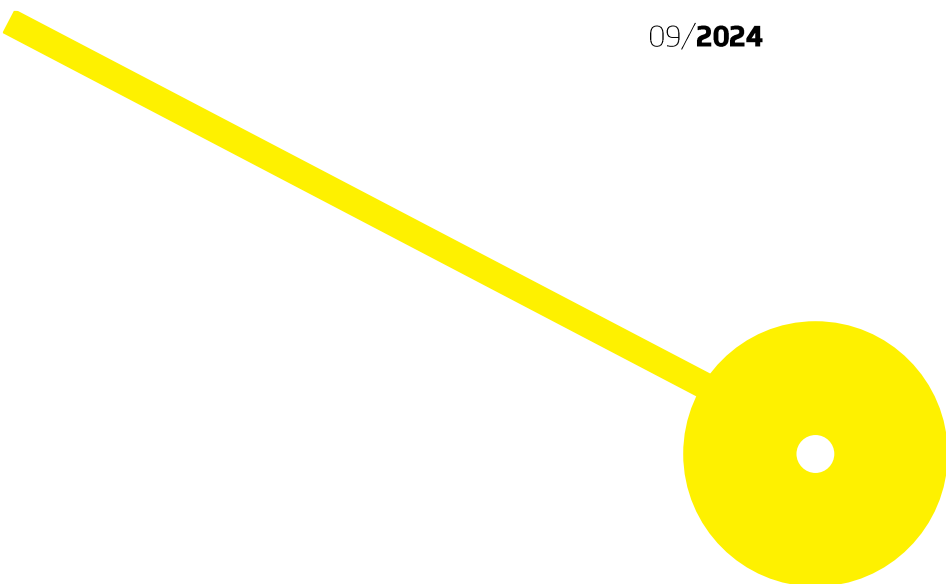




Valorização da planta halófita
Mesembryanthemum nodiflorum
para aplicação nutracêutica:
Digestão *in vitro* e bioacessibilidade
de compostos fenólicos

Raquel Alexandra Teixeira Vieira

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**Valorização da planta halófita *Mesembryanthemum nodiflorum* para aplicação
nutracêutica: digestão *in vitro* e bioacessibilidade de compostos fenólicos**

Autor

Raquel Alexandra Teixeira Vieira

Orientador(es)

Doutora Francisca Rodrigues, REQUIMTE/LAQV

Doutora Diana Andreia Pinto, REQUIMTE/LAQV

Doutora Mónica Vieira, Escola Superior de Saúde do Porto, ESS

Dissertação para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo em
Bioquímica Clínica e Metabólica pela Escola Superior de Saúde do
Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Começo por manifestar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação e que me acompanharam ao longo deste percurso.

Quero agradecer à Doutora Francisca Rodrigues pela oportunidade de poder desenvolver este tema e, principalmente, por me ter guiado neste processo, onde sempre que possível com disponibilidade para esclarecer dúvidas e fornecer feedback sobre o trabalho. Agradeço também por ter transmitido o seu conhecimento, pela motivação e pela dedicação.

Gostaria também de agradecer à Ana Margarida Silva pelo acolhimento no GRAQ, à RiaFresh pelo fornecimento da planta halófito utilizada ao longo deste trabalho e à professora Doutora Mónica Vieira pelo acompanhamento prestado.

Um agradecimento especial à Doutora Diana Pinto pelo apoio incondicional durante esta etapa, pelas sugestões e críticas construtivas, e por todo o esforço, acompanhamento, suporte técnico e feedback sem os quais a conclusão deste trabalho não teria sido possível. Agradeço também pela imensa paciência durante o trabalho de bancada e pela disponibilidade para responder às múltiplas questões que lhe coloquei.

Não posso deixar de expressar a minha gratidão à minha família e amigos, principalmente à Maria do Céu Moreira, pela compreensão, carinho e incentivo na realização deste mestrado, e pela paciência nos momentos de mais *stress* durante todo o meu percurso.

Resumo

A sustentabilidade ambiental tornou-se uma questão crucial devido à poluição e às alterações climáticas que afetam a agricultura, enfrentando esta o problema da escassez de água e dos solos salinizados. As plantas halófitas, como o *Mesembryanthemum nodiflorum*, surgem como uma potencial solução, por sobreviverem em condições extremas de escassez de água e salinidade do solo, produzindo metabolitos secundários protetores como polifenóis, os quais têm atividades benéficas para a saúde. Este trabalho teve como objetivo principal a valorização da halófita *M. nodiflorum* para aplicação nutracêutica, explorando os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* e da permeabilidade intestinal na bioacessibilidade e bioatividade dos polifenóis dos extratos preparados por extração assistida por ultrassons empregando solventes verdes (água e etanol). Para tal, foram avaliadas o teor de polifenóis e flavonoides totais (TPT e TFT, respetivamente), as atividades antioxidante/antiradicalar, a capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigénio, a citotoxicidade intestinal, as propriedades neuroprotetoras, e o impacto dos extratos e dos seus digestos na atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (LPO). Os compostos bioativos que permearam o modelo intestinal de co-cultura composto por Caco-2 e HT29-MTX foram identificados e quantificados por cromatografia líquida com espectrometria de massa. O etanol, de uma forma geral, foi o solvente que apresentou melhores resultados (TPT: 13,49 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato seco (ES); TFT: 12,48 mg equivalentes de catequina (EC)/g ES; capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP): 30,98 mg equivalentes de sulfato ferroso (ESF)/g ES; superóxido ($O_2^{\bullet-}$): metade da concentração máxima inibitória (IC_{50})=32,12 μ g/mL; radical peróxido ($ROO^{\bullet}$): 230,58 μ g equivalentes de Trolox (ET)/mg ES; enzima acetilcolinesterase (AChE): 31,17%; catalase (CAT): 447,15 nmol/min/g ES). A digestão *in vitro* conduziu a um aumento do TPT (21,25 mg EAG /g ES), da capacidade antioxidante (33,84 mg ESF/g ES) e antiradicalar (23,72 mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g ES) pela seguinte ordem: oral < gástrica < intestinal. As taxas de recuperação de polifenóis após a digestão intestinal foram superiores a 150% e taxas de recuperação dos flavonoides acima dos 50%, indicando que os compostos fenólicos e flavonoides se tornaram mais bioacessíveis após a ação das enzimas e das alterações de pH na digestão *in vitro*. O extrato alcoólico demonstrou propriedades neuroprotectoras (37,7%), e todos os extratos demonstraram efeitos na modulação positiva das atividades das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase após digestão *in vitro*. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que os extratos não tiveram efeitos adversos nas linhas

celulares intestinais Caco-2 e HT29-MTX até à concentração de 500 µg/mL. A análise preliminar da fase intestinal do extrato AQ permitiu identificar 10 compostos (triptofano, cinamamida, treonil-treonina, Lys-Asp-Tyr, dihidroactinidiolida, loliolida, álcool coniferílico, rosmanol e o ácido 5,5'-dihidroferúlico). Destes compostos somente o triptofano, o rosmanol, o ácido 5-5'-dihidroferúlico e o álcool coniferílico permearam o modelo de co-cultura com as seguintes percentagens de permeabilidade 92,5%, 59,1%, 15,4% e 17,5%, respetivamente. Os compostos dihidroactinidiolida, Lys-Asp-Tyr, loliolida, e treonil-treonina não permearam a barreira intestinal. Os resultados obtidos neste estudo dos extratos da halófita *M. nodiflorum* sustentam a sua promissora utilização como ingrediente nutracêutico.

Palavras-chave: Plantas halófitas, extração assistida por ultrassons, compostos fenólicos, ingredientes funcionais, permeação intestinal

Abstract

Environmental sustainability has become an emerging concern due to pollution and climate change, affecting agriculture that faces water shortages and salinized soils. Halophytic plants, such as *Mesembryanthemum nodiflorum*, could be a potential solution, as they are capable of surpassing extreme water scarcity and soil salinity conditions while producing protective secondary metabolites such as polyphenols, which have pro-healthy effects. This work aims to valorise the halophyte *M. nodiflorum* for nutraceutical application by exploring the effects of the *in vitro* gastrointestinal digestion and intestinal permeability on the bioaccessibility and bioactivity of polyphenols present in the extracts prepared by ultrasound-assisted extraction using green solvents (water and ethanol). For that, the total phenolic and flavonoid contents (TPC and TFC, respectively), the antioxidant/antiradical activities, the scavenging capacity against reactive oxygen species, the intestinal cytotoxicity, the neuroprotective properties, and the impact of the extracts and their digests on the antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation were evaluated. The bioactive compounds that permeated the intestinal co-culture model composed of Caco-2 and HT29-MTX cells were identified and quantified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Generally, ethanol was the solvent that achieved the best results (TPC: 13.49 mg gallic acid equivalents (GAE)/g on dry weigh (dw), TFC: 12.48 mg catechin equivalents (CE)/g dw, ferric reducing antioxidant power (FRAP): 30.98 mg ferrous sulfate equivalents (FSE)/g dw, superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$): half maximal inhibitory concentration (IC_{50})=32.12 μ g/mL; peroxy radical ($ROO^{\bullet}$): 230.58 μ g Trolox equivalents (TE)/mg dw; acetylcholinesterase (AChE): 31.17%; catalase (CAT): 447.15 nmol/min/g dw). The *in vitro* digestion led to an increase in the TPC (21.25 mg GAE/g dw), antioxidant (33.84 mg FSE/g dw), and antiradical capacities (23.72 mg ascorbic acid equivalents (AAE)/g dw) in the following order: oral < gastric < intestinal. The polyphenol and flavonoid recovery rates after intestinal digestion were above 150% and 50%, respectively, indicating that the phenolic and flavonoid compounds became more bioaccessible under the action of enzymes and pH changes. The ethanol extract also showed neuroprotective properties (37.7%) and in all extracts upmodulating effects on antioxidant enzymes activities (catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase) after *in vitro* digestion. The cell viability assays demonstrated that the extracts had no adverse effects on intestinal cell lines (Caco-2 and HT29-MTX) up to a concentration of 500 μ g/mL. The preliminary analysis of the intestinal digest of the aqueous extract allowed to identify 10 compounds (tryptophan, cinnamamide, threonyl-threonine, Lys-Asp-Tyr, dihydroactinidiolide,

loliolide, coniferyl alcohol, rosmanol and 5,5'-dihydroferulic acid). Of these compounds, only tryptophan, rosmanol, 5-5'-dihydroferulic acid, and coniferyl alcohol permeated the co-culture model with the following permeability percentages: 92.5%, 59.1%, 15.4%, and 17.5%, respectively. The compounds dihydroactinidiolide, Lys-Asp-Tyr, loliolide, and threonyl-threonine did not permeate the intestinal barrier. The results obtained in this study of the extracts of halophyte *M. nodiflorum* support its promising use as a nutraceutical ingredient.

Keywords: Halophytic plants, ultrasound-assisted extraction, phenolic compounds, functional ingredients, intestinal permeation

Comunicações em poster

1. Raquel Vieira, Diana Pinto, Cristina Delerue-Matos, Mónica Vieira, Francisca Rodrigues. Valorization of the halophyte plant *Mesembryanthemum nodiflorum* for nutraceutical application: *in vitro* digestion and bioaccessibility of phenolic compounds. 6th Meeting of Medicinal Biotechnology, 16 de Maio de 2024, Porto, Portugal.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Plantas halófitas.....	2
1.2. <i>Mesembryanthemum nodiflorum</i>	4
1.3. Técnicas verdes de extração.....	6
1.3.1. Extração assistida por ultrassons.....	7
1.3.2. Extração assistida por micro-ondas.....	9
1.3.3. Extração por fluídos supercríticos	9
1.4. Compostos bioativos e atividades biológicas associadas.....	10
1.4.1. Atividade antioxidante.....	14
1.4.2. Atividade anticancerígena.....	15
1.4.3. Atividade antimicrobiana.....	17
1.4.4. Impacto da digestão gastrointestinal nos compostos bioativos	18
2. Objetivos	21
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Amostra.....	22
3.3. Extração assistida por ultrassons.....	23
3.4. Digestão simulada <i>in vitro</i>	23
3.5. Determinação do Teor de Polifenóis Totais (TPT)	24
3.6. Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT).....	24
3.7. Avaliação <i>in-vitro</i> da capacidade antioxidante/antiradicalar.....	25
3.8. Avaliação da capacidade de captação de espécies reativas de oxigénio (ERO).....	26
3.9. Atividade da acetilcolinesterase.....	27
3.10. Atividades das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.....	28
3.11. Viabilidade celular	29
3.12. Permeabilidade intestinal <i>in vitro</i>	30
3.13. Identificação e quantificação de compostos fenólicos por UPLC-QTOF-MS	31
3.14. Análise estatística.....	31
4. Resultados e discussão	32
4.1. Rendimento do processo de extração.....	32

4.2.	TPT, TFT e atividade antioxidante e antiradicalar	32
4.3.	Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	35
4.3.1.	Efeitos da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> no TPT e TFT	35
4.3.2.	Bioacessibilidade	37
4.3.3.	Atividade antioxidante e antiradicalar após digestão <i>in vitro</i>	38
4.3.4.	Capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO)	39
4.3.5.	Inibição da acetilcolinesterase	43
4.3.6.	Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.....	44
4.4.	Viabilidade celular	46
4.5.	Perfil fitoquímico (metabólico).....	48
4.6.	Permeabilidade intestinal <i>in vitro</i>	51
5.	Conclusão e perspectivas futuras.....	56
	Referências Bibliográficas	58

Índice de figuras:	
Figura 1: <i>M. nodiflorum</i> , nome comercial Rossio (22).....	5
Figura 2: Mapa de distribuição nacional da <i>M. nodiflorum</i> (23).....	5
Figura 3: Representação esquemática do principal mecanismo da EAU, a cavitação.....	7
Figura 4: Principais classes de fitoquímicos (3, 43–45).....	11
Figura 5: Amostra de <i>M. nodiflorum</i> antes e depois de desidratada e triturada.....	23
Figura 6: Representação esquemática do processo de extração dos compostos bioativos da <i>M. nodiflorum</i>	23
Figura 7: Inibição da atividade da AChE dos extratos de <i>M. nodiflorum</i> preparados por EAU antes e depois da digestão <i>in vitro</i>	43
Figura 8: Efeitos dos extratos de <i>M. nodiflorum</i> preparados por EAU em diferentes concentrações na viabilidade celular de Caco-2 e HT29-MTX, através do ensaio de MTT.....	47
Figura 9: Principais compostos identificados no extrato AQ de <i>M. nodiflorum</i>	49
Figura 10: Cromatograma por UPLC do extrato AQ não digerido, e respectivas fases oral, gástrica e intestinal de <i>M. nodiflorum</i>	50
Figura 11: Medições da TEER durante 21 dias de modelo celular de co-cultura (90% Caco-2 e 10% HT29-MTX) em membranas Transwell® (A) e durante os 240 minutos do ensaio de permeabilidade (B).....	52

Índice de tabelas:

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos dois sistemas disponíveis para a EAU, nomeadamente a sonda de ultrassons e o banho de ultrassons (34, 36, 37).....	8
Tabela 2: Composição fitoquímica e atividades biológicas de plantas halófitas.....	12
Tabela 3: Rendimento extração dos extratos de <i>M. nodiflorum</i> preparados por EAU.....	32
Tabela 4: Teor de polifenóis e flavonoides total, bioacessibilidade e atividade antioxidante/antiradical dos extratos de <i>M. nodiflorum</i> preparados por EAU antes e após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	32
Tabela 5: Capacidade de eliminação de ERO dos extratos de <i>M. nodiflorum</i> preparados por EAU antes e depois da digestão <i>in vitro</i>	41
Tabela 6: Efeitos dos extratos de <i>M. nodiflorum</i> preparados por EAU nas atividades das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica antes e depois da digestão <i>in vitro</i>	45
Tabela 7: Permeabilidade intestinal dos digeridos intestinais do extrato aquoso de <i>M. nodiflorum</i>	54

Lista de abreviaturas

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
AChE: Enzima acetilcolinesterase
AL: Alcoólico
AQ: Aquoso
CAT: Catalase
CIM: Concentração inibitória mínima
DHR: 123-dihidrorodamina
DMEM: Meio de *Dulbecco's Modified Eagle's*
DMSO: Dimetilsulfóxido
EAA: Equivalentes de ácido ascórbico
EAG: Equivalente de ácido gálico
EAM: Extração assistida por micro-ondas
EAU: Extração assistida por ultrassons
EC: Equivalentes de catequina
EFS: Extração fluídos supercríticos
ERO: Espécies reativas de oxigénio
ES: Extrato seco
ESF: Equivalentes de sulfato ferroso
ET: Equivalentes de Trolox
FBS: Soro bovino fetal
FRAP: Capacidade antioxidante por redução do ião férrico
GRAS: Geralmente reconhecido como seguro
GSH-Px: Glutathione peroxidase
H₂O₂: Peróxido de hidrogénio
HA: Hidroalcoólico
HBSS: *Hank's balanced salt solution*
HR-MS: Espectrometria de massa de alta resolução
IC₅₀: Metade da concentração máxima inibitória
LPO: Peroxidação lipídica
MDA: Malondialdeído
MSR: Metodologia de superfície de resposta
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NADH: Dinucleótido β-nicotinamida adenina
NBT: Cloreto de azul nitrotetrazólio
O₂^{•-}: superóxido
PBS: *Phosphate-buffered saline solution* (Solução salina tamponada com fosfato)
PMS: Metosulfato de fenazina
QTOF: Quadrupole Time of Flight
ROO•: Radical peroxilo
SOD: Superóxido dismutase
TEER: Resistência elétrica transepitelial
TFT: Teor de flavonoides totais
TPT: Teor de polifenóis totais
TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
TR: Tempo de retenção
UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência

1. Introdução

A escassez de água e a salinidade dos solos são problemas mundiais que afetam uma grande percentagem da superfície terrestre (1, 2). A salinização dos solos pode ocorrer por processos naturais, como deposição de minerais intemperizados (conjunto de processos que provocam a desagregação das rochas por ação de agentes atmosféricos) com alto teor de sal, brisa do mar, deposição e ascensão capilar de águas subterrâneas salinas em regiões com lençol freático baixo, ou por processos antropogénicos, tais como práticas agrícolas insustentáveis, aplicação de sal nas estradas e atividades industriais que aceleram ou aumentam a salinidade do solo (2).

Este problema tem vindo a agravar-se de ano para ano, despertando um interesse crescente nas plantas halófitas, conhecidas por crescerem naturalmente em *habitats* salinos caracterizados por apresentarem água e solos de baixa qualidade (3). Estas características têm tornado as plantas halófitas fortes candidatas ao consumo humano, apresentando propriedades farmacológicas que despertaram o interesse por parte dos produtores e consumidores (4, 5). Na realidade, as plantas halófitas podem representar uma fonte adicional de alimento, forragem, bioenergia, bem como de matérias-primas para aplicações industriais, sendo ainda resistentes a pragas (3).

As soluções sustentáveis e amigas do ambiente têm sido uma aposta nas práticas agrícolas, como o cultivo em solos salinizados não aptos para a agricultura convencional ou o cultivo em sistemas sem solo (5). De modo particular, o cultivo em sistemas sem solo tem sido uma aposta na região sul de Portugal, uma zona onde a disponibilidade de água é limitada (5). Esta prática agrícola apresenta vantagens como o aumento da produtividade, a uniformidade do produto e a segurança alimentar, uma vez que permite controlar e evitar a hiperacumulação de metais pesados por várias espécies de halófitas (5). Uma das empresas de maior sucesso a nível nacional é a RiaFresh, a qual usa práticas sustentáveis de cultivo (5) aliadas à colaboração com a comunidade científica para assegurar a investigação de todo o potencial das plantas halófitas (6–9).

Para além do impacto das alterações climáticas nas práticas agrícolas, o crescimento populacional, as doenças relacionadas com a alimentação desequilibrada (por exemplo, diabetes, cancro, envelhecimento prematuro e patologias cardiovasculares, metabólicas e neurológicas) e o impacto da poluição na saúde conduziram à necessidade de explorar novas fontes sustentáveis de compostos bioativos (10–12). A indústria alimentar está assim focada em desenvolver novos

produtos alimentares mais nutritivos e funcionais, bem como eficazes na prevenção de doenças crônicas (12).

Desde a antiguidade, as plantas têm sido usadas como fontes naturais para promover a saúde, quer sob a forma de infusões de ervas, quer como sumos, elixires, extratos ou cataplasmas (13). Atualmente, com a sensibilização da população para um estilo de vida mais saudável, existe a necessidade de soluções mais sustentáveis e naturais (13). Com efeito, têm sido realizados diversos estudos em plantas para avaliar as suas atividades biológicas e o seu teor em compostos bioativos, de modo particular os antioxidantes que interrompem ou removem especificamente os radicais livres das células do corpo humano os quais causam danos oxidativos e têm um papel preponderante no desenvolvimento de algumas doenças como o cancro, a diabetes, doenças cardiovasculares, entre outras (11, 14).

Frequentemente têm sido encontrados metabolitos secundários em plantas halófitas, tais como polifenóis, ácidos fenólicos, glicosídeos flavonoides, taninos, estilbenos e saponinas, que estão associados a diversas atividades biológicas (como atividade antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, etc.) (14). A caracterização dos principais compostos bioativos de fontes naturais traz diversos benefícios, tanto em termos de biocompatibilidade como de sustentabilidade e preservação do ambiente (15).

1.1. Plantas halófitas

As plantas halófitas representam cerca de 2% das plantas terrestres mundiais (2, 4, 16), sendo capazes de sobreviver e reproduzir-se em condições extremas, tais como níveis heterogêneos de salinidade, situações de inundação e anoxia (salinas e mangais), temperaturas extremas, seca, sodicidade e alcalinidade (solos alcalinos e calcários) (3). Além disso, as halófitas estão expostas a vários outros fatores de *stress* abiótico (por exemplo nutrição inadequada, radiação ultravioleta-B (UV-B) intensa, acidificação do solo e poluentes como pesticidas, metais pesados e microplásticos), bem como a ameaças bióticas (por exemplo, competição, ferimentos, infeção por agentes patogénicos e ataques de insetos) (3, 5, 16).

As plantas halófitas podem ser encontradas em diferentes ecossistemas, tais como praias, costas rochosas, sapais, estuários e desertos interiores (17). Algumas espécies são halófitas obrigatórias, germinam e reproduzem-se de forma ideal em condições salinas, enquanto outras são halófitas facultativas, prosperando tanto na presença quanto na ausência de sal (3).

Nas regiões costeiras e mais inóspitas, onde a escassez alimentar é uma realidade, já existe uma tradição de consumo destas plantas (3). Em geral, as plantas halófitas são caracterizadas por um valioso perfil mineral e elevado teor em fibras (3, 18). Dependendo da espécie, as halófitas podem ainda ser uma fonte interessante de proteínas e/ou lípidos de alta qualidade (3, 18). São geralmente utilizadas como complemento da alimentação, mimetizando as hortícolas convencionais, ou como condimentos, além de serem empregues na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias, incluindo infeções bacterianas (3).

Para sobreviverem ao *stress* salino, as plantas halófitas desenvolvem diferentes mecanismos de adaptação, os quais podem ser de três níveis (celular, tecidual ou por toda a planta). Estes mecanismos incluem a exclusão e excreção de sais, bem como o deslocamento de iões pelo floema e a sua posterior acumulação em vacúolos, regulando assim a disponibilidade de água dentro da planta (2, 16). A salinidade diminui a capacidade da planta fazer fotossíntese, levando à redução dos teores de hidratos de carbono, ácidos gordos e proteínas (4). Por outro lado, observa-se a acumulação de compostos com nitrogénio, tais como aminoácidos (especialmente prolina, mas também alanina, arginina, glicina, serina, leucina, valina, glutamina e asparagina) (4). Além da acumulação de compostos nitrogenados, estas plantas também sintetizam metabolitos secundários protetores, entre os quais compostos fenólicos, saponinas e alcalóides, de modo a proteger as estruturas celulares dos efeitos prejudiciais da oxidação (por exemplo, a acumulação de espécies reativas de oxigénio – ERO) (3, 17, 19).

Estas moléculas desempenham um papel protetor crucial na planta e apresentam atividades biológicas relevantes, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-tumoral (17).

A produção de metabolitos secundários pelas plantas halófitas varia consoante o gradiente de concentração de sal (19), a espécie e outras condições às quais estão expostas (4). Com efeito, um estudo realizado em Portugal por Lima *et al.* (5) avaliou a produtividade, o perfil nutricional e as características sensoriais de duas espécies halófitas, *Inula crithmoides* e *Mesembryanthemum nodiflorum*, com seis níveis de salinidade. A produtividade das duas espécies diminuiu a partir de salinidades de 110 e 200 mmol L⁻¹, respetivamente para *I. crithmoides* e *M. nodiflorum*. O perfil nutricional manteve-se equilibrado, enquanto a produção de β -caroteno e luteína foi induzida pelo aumento da salinidade. Os compostos fenólicos foram mais abundantes nas plantas cultivadas em salinidades mais baixas, enquanto a atividade antioxidante aumentou em resposta ao *stress* salino. As características sensoriais foram avaliadas por um grupo de cozinheiros que mostraram preferência por plantas cultivadas com uma concentração de sal de 350 mmol L⁻¹ (5).

Este estudo concluiu que a salinidade melhorou significativamente o perfil nutricional, especialmente a capacidade antioxidante das plantas e os seus teores de carotenóides e vitaminas, tendo, contudo, influenciado negativamente a produtividade de biomassa (5).

Os mecanismos de tolerância das plantas halófitas ao *stress* salino também têm sido alvo de interesse pela engenharia genética, uma vez que são uma fonte de potenciais genes resistentes ao sal e promotores para aumentar a tolerância ao sal em culturas convencionais (3). Algumas culturas já foram alteradas com esses genes, tais como *Oryza sativa* (com o gene AgNHX1 da *Atriplex gmelini*), sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill cv. Bailichun (com o gene AhBADH da *Atriplex hortensis*) e *Cuminum cyminum* (com o gene SbNHX1 da *Salicornia brachiata*) (3).

O imenso potencial das plantas halófitas também tem despertado algumas preocupações, tanto em questões de saúde pública quanto ambientais. No que toca a estas últimas, dada a sua importância na proteção das áreas costeiras contra a erosão (3), a exploração excessiva de plantas halófitas pode causar um desequilíbrio ambiental (5). No que diz respeito às questões de saúde pública, estas plantas podem ser cultivadas em locais com água de fraca qualidade tornando-se um veículo para a ingestão de agentes infecciosos, uma vez que podem ser consumidas cruas ou minimamente processadas. Além disso, devido à capacidade de acumular minerais e substâncias tóxicas, a ingestão destas plantas pode causar desequilíbrios na saúde. Desta forma, a avaliação química e bacteriológica desempenha um papel essencial na caracterização destas plantas antes do seu consumo (20).

Outra preocupação associada ao consumo de alimentos crus é a presença de compostos anti-nutricionais, incluindo oxalatos, nitratos, fenóis, saponinas e taninos, os quais já foram identificados em algumas espécies de halófitas (14). Uma ingestão elevada de oxalatos pode ter efeitos adversos na saúde de indivíduos suscetíveis, como aqueles predispostos à formação de cálculos renais ou com baixos níveis plasmáticos de ferro e cálcio (14, 21).

1.2. *Mesembryanthemum nodiflorum*

As espécies do género *Mesembryanthemum* são halófitas facultativas, ou seja, têm capacidade de crescer tanto em condições de *stress* salino quanto em ambientes com baixa concentração de sal (19). Este género, compreende cerca de 70 espécies nativas da região do Mediterrâneo, Arábia Saudita, África do Sul, Austrália Meridional e Califórnia (19). O género *Mesembryanthemum* possui três espécies comestíveis de interesse, nomeadamente *M. edule*, *M. crystallinum* e *M. nodiflorum* (19).



Figura 1: *M. nodiflorum*, nome comercial Rossio (22).

Em Portugal, a *M. nodiflorum* (*Aizoaceae*) (Figura 1) está presente maioritariamente no litoral do Algarve (Figura 2) (23). É uma planta herbácea anual com caules até 30 cm, muito ramificada desde a base e com folhas semicirculares (19). As folhas são tenras e suculentas, ligeiramente salgadas e ácidas, sendo frequentemente usadas em saladas (19). Esta halófita é rica em vitamina B6, vitamina C, proteínas, fibra, ferro e manganês, sendo comercializada para consumo humano com o nome de “Rossio” (22).

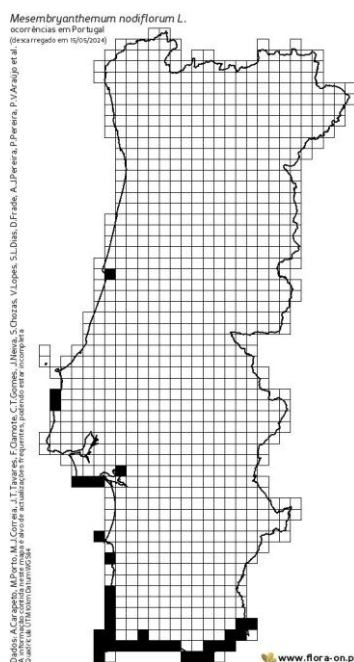


Figura 2: Mapa de distribuição nacional da *M. nodiflorum* (23).

Esta halófita tem demonstrado propriedades benéficas no combate a infeções oculares, enquanto os extratos das folhas têm fins diversos, tais como a produção de sabonetes e cataplasmas antissépticos que podem ser aplicados na pele para tratar queimaduras e feridas (19). Também existem relatos do seu uso para tratar doenças gástricas e como emético em envenenamento agudo (caso do arsénio) (24). Além disso, *M. nodiflorum* apresenta atividade bactericida e propriedades antitumorais sendo uma excelente candidata para a extração de compostos bioativos com potenciais aplicações em produtos farmacêuticos ou cosméticos (19).

1.3. Técnicas verdes de extração

As técnicas de extração convencionais, como a maceração e a extração por Soxhlet, apresentam algumas desvantagens, tais como baixa eficiência do processo, o elevado consumo de energia e tempo, a utilização de solventes tóxicos, a degradação térmica de compostos, a inadequada qualidade dos extratos, a utilização de grandes quantidades de amostra, e os custos elevados, gerando um impacto negativo no meio ambiente (25).

Devido à relevância das propriedades dos compostos bioativos, é essencial utilizar tecnologias de extração eco-inovadoras para minimizar a perda destes compostos (26) e que sejam “amigas” do ambiente, seguras e não tóxicas (27). As técnicas de extração verdes são métodos úteis e sustentáveis para aprimorar os processos de produção e reduzir o impacto ambiental (27). Também são conhecidas como técnicas de extração a “frio” uma vez que usam temperaturas relativamente baixas durante o processo, não afetando a estabilidade dos compostos extraídos (25).

A extração ecológica baseia-se na descoberta e conceção de processos de extração que reduzam o consumo de energia e permitam a utilização de solventes alternativos (a aplicação de solventes com que substituem os solventes orgânicos, tais como fluidos pressurizados e supercríticos, líquidos iónicos, solventes eutécticos profundos ou alta pressão estática) produzindo um extrato/produto de elevada qualidade (27, 28). Segundo More *et al.*, os seis princípios dos processos de extração verde envolvem: 1) utilização de bio-recursos renováveis e sustentáveis; 2) utilização de solventes verdes comumente designados como solventes GRAS (do inglês *Generally Recognized as Safe*); 3) menor consumo de energia; 4) produção de coprodutos a partir de resíduos; 5) número mínimo de operações unitárias; e 6) extrato resultante que preserva as características e propriedades bioativas e que seja biodegradável (29).

O método de extração deve ser escolhido para minimizar perdas e consumos elevados de energia, com rendimento máximo de extração dos compostos desejados (26). Com efeito, técnicas de extração sustentáveis, como extração assistida por ultrassons (EAU), micro-ondas (EAM) e fluídos supercríticos (EFS), são muito versáteis e aplicáveis a diferentes matrizes, com facilidade de implementação e baixo consumo energético (27).

1.3.1. Extração assistida por ultrassons

A EAU é baseada no processo rotacional de compressão e expansão de ondas sonoras (30) por mecanismo de variação da frequência sonora entre 18 a 100 kHz, o qual pode decompor as paredes celulares (26) e, efetivamente, acelerar o processo de transferência devido aos efeitos de cavitação, vibração, esmagamento e mistura (31).

A cavitação, representada esquematicamente na Figura 3, é um dos principais mecanismos da EAU, em que as ondas sonoras, alternadas entre baixa e alta pressão, se propagam através de uma matriz, criando compressão e expansão (ou rarefação) (29, 32). Durante a fase de expansão das ondas de alta intensidade, a pressão negativa excede as forças de atração molecular, separando-as e criando bolhas de cavitação (32). Estas bolhas aumentam de tamanho por coalescência e colapsam durante a fase de compressão (32), libertando uma quantidade de energia considerável e convertendo a energia cinética em calor no interior das cavidades (29, 33). O colapso das bolhas de cavitação gera ondas de choque e colisões aceleradas entre partículas, provocando vibrações radicais intensas que resultam na rutura e destruição da estrutura celular (32, 33). Durante o colapso, as bolhas produzem temperaturas e pressões extremamente elevadas, aproximadamente 5000 °C e 100 MPa, respetivamente (34). Alguns autores sugerem que as bolhas colapsam de forma assimétrica ao redor das partículas sólidas, direcionando um fluxo extremamente rápido do líquido para a superfície das partículas (33). A rápida fragmentação resulta na solubilização dos compostos bioativos, devido à redução do tamanho das partículas, ao aumento da área de superfície e à alta taxa de transferência de massa no limite da camada da matriz na superfície para o solvente (32, 33).

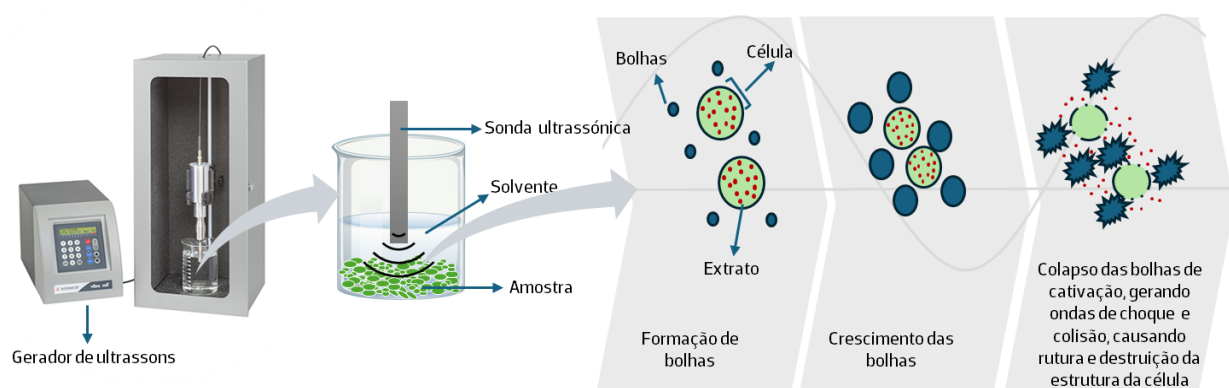


Figura 3: Representação esquemática do principal mecanismo da EAU, a cavitação. Adaptado de Patra *et al.* e Marhamati *et al.* (33, 35).

Para melhorar a solubilidade dos compostos e a eficiência da extração, pode-se aumentar a temperatura. Contudo, este aumento deve ser cuidadosamente monitorizado uma vez que pode conduzir à degradação de compostos termolábeis (25).

Existem dois sistemas disponíveis para a EAU, nomeadamente a sonda de ultrassons e o banho de ultrassons. Ambos possuem um transdutor que converte energia sonora (ondas ultrassónicas) (34). A Tabela 1 resume as vantagens e desvantagens destes dois sistemas.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos dois sistemas disponíveis para a EAU, nomeadamente a sonda de ultrassons e o banho de ultrassons (34, 36, 37).

	Banho de ultrassons	Sonda de ultrassons
Vantagens	Mais económico e fácil de operar. Pode processar mais que uma amostra em simultâneo	Efeito direto sobre a amostra (a qual aumenta a área de contacto com o material e reduz a resistência na transferência de massa). Produz mais energia e permite uma extração mais rápida e reprodutível.
Desvantagens	Menor eficiência de cavitação. Efeito indireto sobre a amostra (as ondas sonoras atingem o recipiente antes de alcançar a amostra).	Desgaste da sonda com a utilização, o que pode contaminar o meio, causando perda de eficiência. A desgaseificação provoca maior perda de compostos voláteis. Pode ocorrer contaminação cruzada.

A EAU tem sido usada com sucesso em diversas matrizes alimentares (por exemplo, frutas, vegetais e óleos comestíveis) para extração de compostos bioativos, como polifenóis, carotenóides, polissacarídeos (18), antocianinas e proteínas (31), além de pigmentos (26). A EAU é uma metodologia económica que permite a extração rápida e altamente eficiente dos compostos bioativos de interesse em comparação com métodos tradicionais (31), prevenindo a sua degradação pelo calor (31). Esta tecnologia é reprodutível e não exige instrumentação complexa ou grandes volumes de solvente (3, 25, 26, 38), proporcionando maiores rendimentos de extração, maior grau de pureza e eliminando o pós-tratamento de efluentes (25).

Resumidamente, o rendimento da extração depende da relação amostra/solvente, do tipo de solvente, da temperatura e tempo de extração, da agitação e propriedades físico-químicas da amostra (por exemplo, tamanho de partícula) (3, 38), assim como da conceção dos reatores ultrassónicos e da sonda ultrassónica (25). Estes fatores são essenciais para determinar a qualidade da extração, uma vez que o excesso de processamento pode resultar na degradação dos compostos bioativos (32). Por exemplo, compostos menos estáveis (como polímeros,

vitaminas e enzimas) podem decompor-se com ultrassons de alta energia e exposição prolongada, levando a uma diminuição do rendimento da extração (32). Quando comparada com a EAM ou a EFS, a EAU possui uma instrumentação mais simples, o que reduz os custos operacionais, e pode ser usada com uma maior variedade de solventes (33).

1.3.2 Extração assistida por micro-ondas

A EAM baseia-se na transformação de energia eletromagnética das micro-ondas em energia térmica (39). O calor gerado por este processo conduz a um aumento da temperatura da célula, resultando na rutura da estrutura celular, facilitando a entrada do solvente e dissolvendo os compostos (39).

O processo de extração é rápido, eficiente e económico (39, 40). A eficiência da técnica depende da combinação de tempo e temperatura de extração, da proporção sólido/líquido, da concentração do solvente e do tipo de solvente utilizado (39).

Em comparação com outras técnicas, as principais vantagens incluem a utilização de uma menor quantidade de solvente, a facilidade de instrumentação (25). No entanto, o tempo de extração é menor comparado como EAU (25). Como desvantagens, podem ocorrer alterações na estrutura química dos compostos bioativos, resultando na sua degradação devido à ação das micro-ondas, gerando uma menor eficiência de extração (25).

1.3.3. Extração por fluídos supercríticos

A EFS é uma das técnicas mais avançadas para substituir solventes orgânicos em diversos processos (26). Um fluído supercrítico é obtido aplicando pressão e temperatura acima do ponto crítico da substância, isto é, quando um fluído se comporta como um híbrido entre um líquido e um gás (28). Adquirindo assim características únicas, como a viscosidade e a densidade (28, 29). Cada substância tem um valor distinto de temperatura e pressão em que este estado supercrítico é atingido (29).

Quando o solvente atinge o estado supercrítico, torna-se altamente difusivo e apresenta baixa viscosidade, facilitando assim a penetração na célula (41). A absorção do solvente dilata e danifica a membrana celular, permitindo a separação por solubilidade dos compostos bioativos no solvente absorvido (41).

O dióxido de carbono supercrítico é considerado um dos melhores solventes para a EFS devido às suas inúmeras vantagens, tais como temperatura crítica moderada (31,2 °C) e baixa pressão

crítica (73,8 bar) (29). Além disso, é facilmente volatizado após a libertação da pressão do sistema, resultando em extratos de elevada pureza sem solventes. A temperatura, o tempo, a pressão e a relação sólido-líquido são alguns dos fatores que afetam o desempenho da EFS (41). A solubilidade da amostra, a polaridade, o teor de humidade e o tamanho das partículas também podem influenciar a eficácia da extração, exigindo a otimização dos parâmetros operacionais (29). A seleção do fluido supercrítico é crucial para o bom funcionamento da extração, sendo possível utilizar uma ampla gama de compostos como solventes (29).

A EFS é uma técnica promissora na recuperação de compostos bioativos de valor acrescentado, com vantagens como o reduzido tempo de extração, o elevado rendimento de extração, a utilização de solventes sustentáveis (25). No entanto, apresenta tais como o elevado custo dos dispositivos e equipamentos necessários e a baixa polaridade, embora esta última possa ser melhorada através da utilização de modificadores (25, 29).

1.4. Compostos bioativos e atividades biológicas associadas

Como referido anteriormente, as plantas halófitas são caracterizadas por produzirem compostos bioativos para lidarem com o *stress* salino. Na declaração de consenso da 23^a Reunião de Consenso de Hohenheim, os compostos bioativos foram definidos como "*compostos essenciais e não essenciais (por exemplo, vitaminas ou polifenóis) que ocorrem na natureza, fazem parte da cadeia alimentar e podem comprovadamente ter um efeito na saúde humana*" (42). Os fitoquímicos são compostos bioativos de origem vegetal produzidos pelas plantas para sua proteção (43). Podem ser obtidos a partir de várias fontes, como cereais integrais, frutos, legumes, frutos secos e ervas (43).

Estes compostos, como os carotenóides, fitoesteróis, fitoestrogénios, alcalóides, glucosinolatos, antocianinas e terpenóides (Figura 4), podem ser utilizados na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos (42).

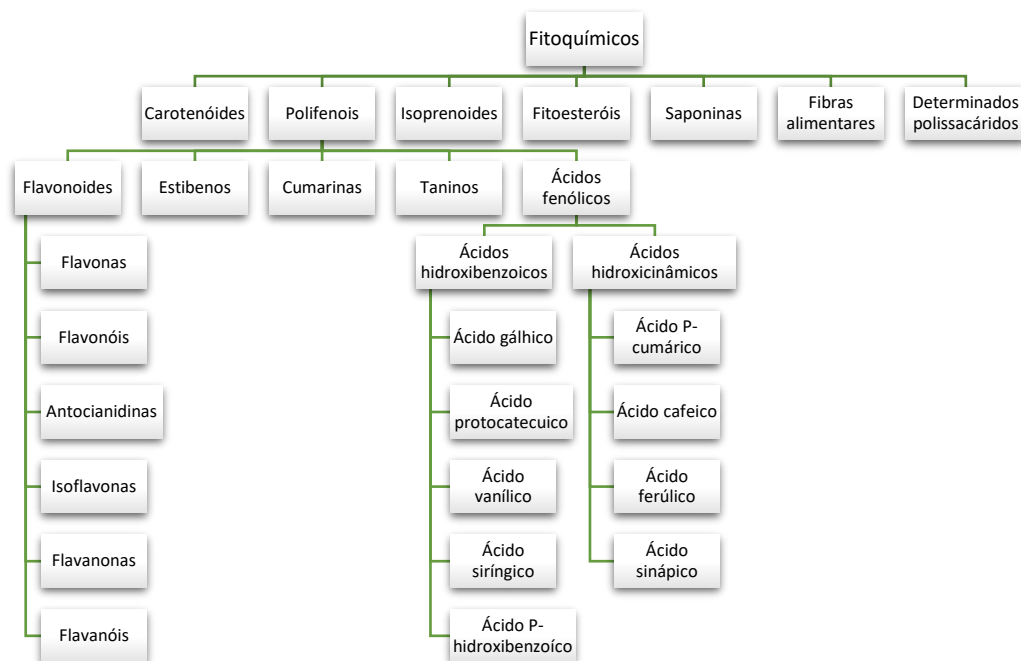


Figura 4: Principais classes de fitoquímicos (3, 43–45).

Outra aplicabilidade destes compostos é a utilização como suplementos alimentares, por exemplo, para diminuir/prevenir o *stress* oxidativo associado ao envelhecimento e certas doenças crônicas, tais como Parkinson ou Alzheimer, ou mesmo como ingredientes ativos antirrugas em produtos cosméticos (46).

Uma das classes de compostos que tem despertado mais interesse são os compostos fenólicos (polifenóis ou fenólicos) (25, 44). Estes compostos são conhecidos por exibirem atividades biológicas interessantes (tais como antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, antidiabética, cardioprotetora, neuroprotetora, efeito protetor gastrointestinal, imunoprotetora, etc.) com várias aplicações e múltiplos benefícios para a sociedade, especialmente no setor alimentar, cosmético e farmacêutico (3, 25, 47, 48). Por exemplo, os polifenóis podem prolongar o prazo de validade dos produtos alimentares, inibindo a proliferação de microrganismos e reduzindo processos oxidativos que são responsáveis pela deterioração da qualidade sensorial e nutricional dos produtos (25). Os polifenóis podem ainda ser incorporados em material de embalagem e, assim, contribuir adicionalmente para melhorar a qualidade do produto (25).

Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem, pelo menos, um anel aromático com capacidade de deslocar elétrons não emparelhados, conferindo efeitos antioxidantes (3). Podem ser encontrados nas plantas na forma livre (gliconas), esterificada e glicosilada, ou ligados a

macromoléculas (45). Geralmente são classificados com base no número de anéis aromáticos e são divididos em diferentes classes e subclasses, tais como flavonoides (flavonas, flavonóis, antocianidinas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis), ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e taninos (3, 44, 45). Os ácidos fenólicos ainda podem ser subdivididos em ácidos hidroxibenzóicos (por exemplo, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido sirínico, e ácido *p*-hidroxibenzóico) e ácidos hidroxicinâmicos (tais como ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, e ácido sinápico) (Figura 4) (3, 44, 45). A Tabela 2 apresenta a composição fitoquímica e as atividades biológicas de algumas das halófitas mais consumidas em Portugal.

Tabela 2: Composição fitoquímica e atividades biológicas de plantas halófitas.

Espécie	Compostos bioativos	Propriedades biológicas	Referências
<i>Salicornia ramosíssima</i> 	Ácido gálico Ácido protocatecuico Ácido vanílico Ácido clorogénico Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido cafeico Ácidos cafeoilquínicos Catequina/epicatequina Miricetina Kaempferol e derivados Quercetina e derivados Rutina	Atividade antioxidante Atividade anti-hialuronidase Atividade anti-elastase Ação protetora contra toxicidade testicular Ação fotoprotetora Atividade inibidora da ECA	(1, 49-54)
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> 	Clorofilas Carotenóides Minerais (Na, K e Ca) Polifenóis (ácido <i>p</i> -cumárico) Chalconas (floreína) Flavonóides glicosilados (avicularina, rutina e quercitrina) Flavonas (derivado da crisina)	Atividade antioxidante Efeito protetor contra peroxidação lipídica Atividade inibidora da ECA	(1, 54-56)
<i>Crithmum maritimum</i> 	Carotenóides (neoxantina, violaxantina, zeaxantina, luteína e β -caroteno) Tocoferóis Ácidos hidroxicinâmicos (ácidos clorogénico, neoclorogénico, criptoclorogénico e 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico) Ácidos hidroxibenzóicos (ácido protocatecuico esterificado a uma porção glicosídica) Flavonóides (3- <i>O</i> -rutínosido de quercetina e 3- <i>O</i> -glucósido de quercetina) Flavonas (formas glicosídicas da apigenina) Terpenóides	Atividade antioxidante Atividade hipoglicémica Atividade hipolipidémica Ação imunoestimulante e citoprotetora Atividade anti-inflamatória Atividade antibacteriana	(1, 54, 57-59)
<i>Disphyma crassifolium</i>	Ácido <i>p</i> -cumárico	Atividade antioxidante	(1, 8, 54)

	Ácido gálico Ácido elágico Flavonóis (isorhamnetina-3-O-rutinosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo e miricetina, glucósido de isorhamnetina) Catequina Luteolina	Atividade anticancerígena Atividade inibidora da ECA	
Mesembryanthemum nodiflorum 	Ácidos hidroxicinâmicos Flavonóis (avicularina) Flavanóis (hidrato de epicatequina e galocatequina) Flavanonas (eriodictiol e do seu derivado hexosídeo)	Atividade antioxidante Atividade anticancerígena Atividade antimicrobiana Atividade hipolipidêmica Atividade hepatoprotetora Atividade inibidora da ECA (enzima conversora da angiotensina)	(5, 19, 24, 54, 60)
Suaeda marítima 	Tiamina Flavonoides Taninos Alcalóides Ravoflavina	Atividade antioxidante Atividade antimicrobiana Atividade anti-inflamatória	(54, 61, 62)
Inula crithmoides 	Ácidos hidroxicinâmicos (ácido p-cumárico) Flavanonas (pinobanksina)	Atividade antioxidante Atividade inibidora da ECA	(1, 5, 54, 63)
Sarcocornia fruticosa 	Ácidos hidroxicinâmicos (ácido clorogénico ácido p-coumaroilquínico, ácido p-cumárico) Ácidos hidroxibenzóicos (arabinosídeo do ácido protocatecuico) Flavonoides (3-O-robinobiosídeo de isorhamnetina, hexosil pentosídeo de rhamnetina) Flavanóis (epicatequina) Flavanonas (eriodictiol e do seu derivado hexosídeo flavanonóis, dihidroquercetina)	Atividade antioxidante Atividade inibidora da ECA	(1, 54)
Cakile marítima 	Flavonóides (Quercetina-di-Hex-dHex, Quercetina-Hex-dHex, Kaempferol-Hex-Rut, Kaempferol-dHex-Hex) Oleuropeína Disinapoyl-Hex	Capacidade inibitória da tirosinase	(54, 64)
Plantago coronopus 	Ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siringico, ácido salicílico) Ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico, ácido ferúlico, verbascosídeo) Flavanóis (epicatequina) Flavonóis (quercetina) Flavonas (glucosídeo de luteolina-7-O, luteolina, Apigenina)	Atividade antioxidante	(54, 65)

1.4.1. Atividade antioxidante

Segundo diferentes autores (66, 67), um radical livre é qualquer molécula ou átomo que contém um ou mais elétrons não emparelhados, sendo extremamente reativo e, por isso, apresentando tendência para remover elétrons de outras moléculas ou átomos, causando a sua oxidação. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), os radicais de hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), os ácidos hipocloroso (HOCl) e hipobromoso (HOBr), o peroxinitrito (ONO_2^-), o nitrosoperoxicarbonato ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$) e o anião radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) são alguns exemplos de radicais livres, sendo estes parte das ERO (68).

As ERO são produzidas endogenamente e continuamente como resultado secundário de processos metabólicos, normalmente existindo um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a ação de antioxidantes (68–70). Os antioxidantes são moléculas que neutralizam as ERO nocivas, inibindo a reação oxidativa em cadeia, prevenindo a peroxidação lipídica (LPO), reduzindo a concentração de radicais livres e quelatando iões metálicos (69).

Quando existe um aumento da produção de espécies reativas em relação aos antioxidantes ocorre um fenómeno designado de *stress* oxidativo, o qual leva à interrupção da sinalização redox e a danos moleculares (70). A regulação do processo de geração de espécies reativas e a sua eliminação tem um papel importante para a integridade e viabilidade dos organismos vivos (68–70), tais como no controlo da proliferação celular, apoptose, expressão de genes, ativação da fagocitose, processos inflamatórios ou defesa contra microrganismos pela ativação do sistema imunológico (67, 68, 70–72).

A produção de radicais livres e de ERO beneficiam o corpo humano. Contudo, quando produzidos excessivamente, conduzem a danos oxidativos e diversas doenças (73). A produção excessiva de ERO resulta em danos em processos vitais como a replicação, transcrição e tradução, além de causar um aumento na mutação, morte celular, processos patológicos e envelhecimento (70). Com efeito, o dano oxidativo nas macromoléculas está associado a diversas doenças, incluindo Alzheimer, aterosclerose, diabetes, inflamação, cancro e doenças hepáticas, neurodegenerativas e cardiovasculares (69, 74).

Um défice de antioxidantes pode levar a uma acumulação de ERO. Os antioxidantes mais comuns são sequestradores de ERO, como a N-acetilcisteína que repõe glutatião e a GSH (antioxidante não enzimático) que tem um papel importante no equilíbrio redox celular (67). A superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT) também estão envolvidas na neutralização de ERO, sendo classificadas como antioxidantes enzimáticos

indiretos e endógenos (67, 75). A SOD, presente em diferentes compartimentos celulares, é a primeira defesa contra as ERO (76). A CAT decompõe o H_2O_2 , enquanto a GSH-Px neutraliza os hidroperóxidos e os hidroperóxidos lipídicos (76).

Uma alimentação rica em compostos antioxidantes, tais como vitaminas e fitoquímicos, parece estar associada a um aumento dos antioxidantes endógenos, contribuindo para manter o equilíbrio entre as ERO e os níveis de antioxidantes (75). Como já foi referido anteriormente, os polifenóis, nas suas diferentes estruturas, são reconhecidos pelo seu papel crucial na atividade antioxidante. O potencial antioxidante destes compostos varia de acordo com a sua estrutura, nomeadamente o número e a posição dos grupos hidroxilo, a presença de ligações duplas conjugadas, o tipo de grupos substituintes ligados ao(s) anel(is) e, finalmente, o grau de glicosilação (3). Atuam como agentes redutores ou doadores de átomos de hidrogénio (15), justificado pelo número e posição de grupos hidroxilo nos anéis aromáticos (45). Segundo Watson *et al.* (3), o efeito tem cinco modos de ação antioxidante principais: 1) rutura das reações oxidativas em cadeia por eliminação dos ERO; 2) subtração dos pró-oxidantes; 3) reciclagem de outros antioxidantes; 4) modulação da atividade enzimática; e 5) modificação das vias de transdução de sinais.

Os compostos fenólicos, assim como algumas vitaminas e pigmentos carotenóides, encontrados nas halófitas tem evidenciado atividade antioxidante (5).

1.4.2. Atividade anticancerígena

O cancro continua a ser identificado como uma das principais causas de morte a nível mundial (74), estimando-se que até 2040 o número de novos casos diagnosticados em todo mundo seja de 27,5 milhões, causando 16,3 milhões de mortes (17).

O cancro resulta da proliferação celular anormal e descontrolada que invade e destrói o tecido circundante, podendo resultar em morte. Este processo pode ser desencadeado por fatores externos e internos. Os principais fatores externos são a poluição, a radiação, o efeito de medicamentos, o tabagismo, o consumo de álcool, a obesidade, e a inatividade física. Os fatores internos são inalteráveis e endógenos por natureza, incluindo mutações espontâneas durante a replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN), envelhecimento, alterações hormonais e inflamação (74).

A ativação de células tumorais tem sido associada a níveis excessivos de ERO através da ativação de vias de sinalização pró-oncogénicas, incluindo a ativação da proteína quinase ativada

por mitogénio (MAPK), da quinase N-terminal de JUN (JNK), da expressão da ciclina D1 e das vias da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (74). Outra via de ativação do cancro, também associada a níveis moderados de ERO, é a ativação do NF- κ B, que medeia a inflamação persistente de baixo nível (74). A resposta ao *stress* oxidativo leva a processos biológicos envolvidos no desenvolvimento do cancro, como a propagação celular, as metástases, a angiogénese e a apoptose silenciosa (74).

Nos últimos anos, a investigação sobre o cancro tem-se intensificado, com avanços significativos tanto na compreensão da sua biologia quanto no desenvolvimento de métodos de prevenção e tratamento (17). A quimioterapia é a abordagem terapêutica mais comum, mas os seus efeitos secundários, como o impacto negativo no sistema imunitário e a resistência aos medicamentos, levam à necessidade de novos fármacos (17, 77). Os produtos naturais têm sido utilizados na profilaxia, prevenção e tratamento de vários tipos de cancro (74). Os vegetais e os frutos são ricos em polifenóis, flavonoides (como isoflavonas), cucurbitacinas e curcuminóides que suplementam o corpo humano com antioxidantes essenciais e substâncias anti-inflamatórias que reduzem o risco de desenvolvimento de cancro (74). Alguns medicamentos anticancerígenos naturais amplamente usados no tratamento do cancro são o paclitaxel e os seus derivados da casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), os alcalóides da vinca – a vincristina e a vinblastina – da pervinca de Madagáscar (*Catharanthus roseus*) e as podofilotoxinas da erva *Podophyllum* (17, 74).

Com efeito, os compostos bioativos controlam a proliferação celular através da regulação do ciclo celular e restringem a progressão celular, crescimento tumoral e metástases, estimulando a paragem do ciclo celular e a via apoptótica das células cancerígenas (78).

Os compostos fenólicos são conhecidos por apresentarem a atividade anticancerígena e, também devido ao seu potencial antioxidante, como potencial papel protetor e preventivo do cancro (74). O ácido cumárico, o ácido elágico e o kaempferol são os compostos fenólicos mais comuns nas halófitas, demonstraram inibir o crescimento de várias linhas celulares cancerígenas, como por exemplo a MCF-7 (cancro da mama humano, tecido de adenocarcinoma da mama), a CAL-27 (adeno-escamoso oral humano, carcinoma de células escamosas da língua), a HT-29 (cancro do cólon humano, polipose, tecido do intestino delgado), a LNCaP (adenocarcinoma da próstata humano, tecido de metástases do nódulo linfático supraclavicular esquerdo) e a HCT-116 (cancro do cólon humano, adenoma, tecido epitelial tumorigénico do cólon) (74).

Os compostos fitoquímicos, como fenólicos e flavonoides, atuam como sequestradores do ROO•, sendo responsáveis pela patogénese mediada por radicais, como a carcinogénese (78). Além disso, os compostos fenólicos e a vitamina E (α -tocoferol) atuam em sinergia para aumentar a capacidade de eliminação de radicais livres e, subsequentemente, prevenir o desenvolvimento de cancro (78). A vitamina E é um agente anticancerígeno usado na inibição da proliferação celular, induzindo a morte de células cancerígenas através da apoptose. Do mesmo modo, a vitamina C exerce efeitos citotóxicos nas células tumorais (78).

1.4.3. Atividade antimicrobiana

O problema atual associado à resistência aos antibióticos e antifúngicos tem incentivado a procura de novos agentes terapêuticos, explorando o potencial das plantas halófitas para a criação de novos produtos antimicrobianos (3). Este interessante assenta na presença de fenólicos (3, 79) os quais atuam de diferentes modos: 1) pela alteração da função da membrana citoplasmática; 2) perturbando as funções intracelulares; e 3) induzindo a morte por apoptose (80). O modo de ação dos compostos fenólicos deve-se ao aumento da lipofilicidade, favorecendo a interação com a membrana, bem como a sua infiltração e acumulação na camada lipídica. As alterações induzidas na membrana comprometem a sua estrutura, invadindo assim a célula bacteriana, induzindo a lise e a perda de constituintes celulares (3). No entanto, a atividade antimicrobiana destas plantas tem sido pouco explorada comparativamente à atividade antioxidante (3).

Nas plantas, os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, desempenham um papel importante na defesa assumindo relevância como inibidores de agentes patogénicos e respetivas toxinas (3). Por exemplo, a acumulação de compostos fenólicos em zonas da planta infetadas por microrganismos pode inibir enzimas produzidas por agentes infecciosos, ou formar uma barreira física que restringe tanto o fluxo de nutrientes da planta para o microrganismo como a difusão de toxinas do microrganismo para a planta (3).

Doudach *et al.* (24) avaliaram a ação antimicrobiana de extratos de *M. nodiflorum* e *Corrigiola telephiifolia*, obtidos por maceração em metanol e água, em *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) variaram entre 3,12 e 6,25 mg/mL, concluindo-se que estas duas espécies podem ter efeitos promissores nas infeções bacterianas multirresistentes e patogénicas (24).

1.4.4. Impacto da digestão gastrointestinal nos compostos bioativos

A maioria dos estudos sobre as propriedades biológicas dos compostos bioativos são realizados nos extratos na sua forma intacta (11). No entanto, durante o processo de digestão gastrointestinal, estes compostos podem sofrer modificações químicas e/ou reações metabólicas (tais como glucuronidação, sulfatação, metilação) que podem afetar a sua estabilidade, bioacessibilidade e absorção pelas células do intestino delgado (11).

A bioacessibilidade é definida como a fração de um composto que é libertada no trato gastrointestinal e se torna disponível para absorção intestinal (81, 82). Este conceito abrange as transformações digestivas dos alimentos em material pronto para assimilação, nomeadamente para absorção/assimilação nas células do epitélio intestinal, bem como metabolismo pré-sistêmico, intestinal e hepático (82). Por sua vez, quanto mais bioacessível for um composto, maior será a sua biodisponibilidade (81). A biodisponibilidade é definida como a fração de substância ativa que é absorvida e atinge a circulação sistêmica e que exerce as suas funções biológicas (45, 81), desde a digestão gastrointestinal, a absorção, o metabolismo, a distribuição nos tecidos e a bioatividade (82). Trata-se de um processo complexo que depende da libertação destes compostos, bem como da sua estabilidade digestiva e eficiência na passagem transepitelial (45).

A digestão e a bioacessibilidade dos fitoquímicos depende das características da matriz vegetal/alimentar, da interação destes com outros componentes alimentares, das condições fisiológicas do trato gastrointestinal e das propriedades físico-químicas dos próprios fitoquímicos (82).

Nos frutos e vegetais, a biodisponibilidade dos antioxidantes é determinada pela sua baixa bioacessibilidade devido a interações físicas e químicas entre os antioxidantes e os polissacarídeos não digeríveis das paredes celulares (81). Por exemplo, os hidratos de carbono podem aumentar a bioacessibilidade dos polifenóis e diminuir a interação entre a pepsina e os fenólicos (73). Outro exemplo é a presença de proteínas dos alimentos que podem interagir com os compostos fenólicos de forma covalente e não covalente, reduzindo a sua bioacessibilidade, enquanto os lípidos do leite podem promover a precipitação da combinação de proteínas e compostos fenólicos (73). Os polifenóis estão normalmente presentes nos alimentos sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, necessitando de hidrólise por enzimas digestivas ou pela microflora intestinal para serem absorvidos (82). Estima-se que cerca de 48% dos polifenóis são digeridos no intestino delgado, 42% no intestino grosso e apenas 10% permanecem não

digeridos na matriz alimentar (82). As agliconas, devido à sua elevada lipofilicidade, são as únicas formas capazes de atravessar as membranas biológicas para serem absorvidas (82).

Vários modelos de simulação *in vitro* estão disponíveis para avaliação do processo digestivo. A simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal apresenta algumas vantagens em comparação com métodos *in vivo*, sendo mais económica, mais rápida eficiente e não envolvendo restrições éticas, sendo uma abordagem que permite prever o comportamento gastrointestinal e a bioacessibilidade de um ingrediente ou produto alimentar (81, 83). Os métodos atualmente utilizados podem ser estáticos, semi- dinâmicos e dinâmicos (45).

O modelo estático é mais amplamente usado, e consiste em simular os processos bioquímicos que ocorrem durante a digestão gastrointestinal, de forma sequencial, incluindo as fases oral, gástrica e intestinal. Este modelo tem sido usado para estudar a digestibilidade, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos, simulando as alterações provocadas pela variação do pH, bem como pela ação das enzimas, dos sais biliares e dos fluídos digestivos (45). Contudo, não consegue simular a natureza dinâmica do processo digestivo (45). Por exemplo, a fase intestinal é tratada como uma única fase e não como fases sequenciais duodenal, jejunal e ileal, as quais apresentam diferentes diluições, conteúdo mineral, pH, atividades enzimáticas e conteúdo microbiano (82). Outra desvantagem deste modelo, é a variabilidade de protocolos que torna difícil a comparação de resultados entre estudos (45). Com o objetivo de harmonizar os sistemas estáticos *in vitro*, os a rede COST INFOGEST, publicou em 2014, um método de consenso internacional, definindo parâmetros e condições chave, abordando os principais componentes bioquímicos da digestão *in vivo* (82, 84). Neste protocolo as composições dos fluidos simulados da saliva, do estômago e do intestino delgado são padronizadas, incluindo os parâmetros como eletrólitos, atividade das enzimas, níveis de mucina e níveis de sais biliares, diluição, pH, tempos de transito e temperatura, são baseados em dados fisiológicos disponíveis (85, 86). É um método reproduzível, uma vez que foi estabelecido através de comparações interlaboratoriais, que alcançou um impacto positivo na comunidade científica com atualmente 3800 citações em várias instituições de investigação, sendo atualizado numa nova versão (INFOGEST 2.0) (84, 87).

O modelo dinâmico pode ser mono ou multicompartimental, sendo controlado por computador e simulando várias condições, como a geometria, as forças físicas e os parâmetros bioquímicos, bem como o transporte do alimento, as secreções de fluídos digestivos, os movimentos peristálticos, a concentração enzimática variável e as alterações no pH (45). Como desvantagens,

este modelo tem um custo mais elevado e é muito mais trabalhoso e demorado em comparação com o modelo estático (82). Além disso, nem todos os laboratórios dispõem de espaço para a implementação da maquinaria.

O método semi-dinâmico preenche lacunas entre modelos estáticos e dinâmicos, incorporando aspectos cinéticos da fase gástrica, como acidificação gradual, secreção de fluidos e enzimas, e esvaziamento, tornando-o mais fisiologicamente relevante (88). Tornando-o um modelo acessível e fácil de operar, não exigindo equipamento sofisticado. Contudo, apresenta variabilidade dos parâmetros (como a quantidade de alimento, o número de alíquotas de esvaziamento gástrico e a velocidade de mistura) (88). Além disso, o modelo semi-dinâmico, não inclui algumas forças mecânicas essenciais presentes em modelos mais dinâmicos e o processo manual de esvaziamento pode resultar em perdas de amostras e comprometer a reprodutibilidade (88).

Apesar das inúmeras vantagens dos modelos *in vitro*, devido à complexidade do sistema biológico, os estudos *in vivo* continuam a ser cruciais para a validação de novos ingredientes bioativos para aplicações alimentares e nutracêuticas (76).

Já existem alguns estudos que demonstram os efeitos da digestão gastrointestinal em alimentos, comprovando um aumento ou diminuição do teor de compostos fenólicos na fração bioacessível após a digestão gastrointestinal *in vitro* (10-12, 39, 41, 45, 47, 48, 73, 75, 81, 83, 89-98). A variação do teor de compostos fenólicos depende do composto estudado, da matriz alimentar estudada e do estado físico da mesma e do protocolo aplicado (45). Contudo, não temos conhecimento de estudos realizados em plantas halófitas, com a exceção de um estudo efetuado na infusão de *Capparis spinosa* L. e *Crithmum maritimum*, onde verificaram que a quantidade de fenóis totais nas infusões digeridas diminuiu significativamente (<1% em ambas as amostras) (99).

2. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo a valorização da halófito *M. nodiflorum* para aplicação nutracêutica através do estudo dos efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* e da permeabilidade intestinal na bioacessibilidade e bioatividade dos compostos extraídos.

Deste modo, os **objetivos específicos** foram:

- Extrair compostos bioativos da *M. nodiflorum* por EAU;
- Avaliar o teor de polifenóis e flavonoides totais e as capacidades antioxidantes/antirradicais *in vitro* (FRAP e ABTS) dos extratos e digestos;
- Avaliar a capacidade de captação de ERO pelos extratos e digestos;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos e digestos por cromatografia líquida de ultra eficiência;
- Avaliar a toxicidade dos extratos em linhas celulares intestinais, nomeadamente Caco-2 e HT29-MTX;
- Identificar e quantificar os compostos bioativos que permeiam num modelo intestinal de co-cultura composto por Caco-2 e HT29-MTX;
- Avaliar as propriedades neuroprotetoras dos extratos e digestos através da inibição da acetilcolinesterase (AChE);
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes e a capacidade de proteção contra a LPO na presença de extratos e digestos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Para a realização deste trabalho experimental, os produtos químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), nomeadamente 123-dihidrorodamina (DHR), ácido 2,2' - azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido gálgico, acetato de sódio, carbonato de sódio (NaCO_3), catequina, cloreto de alumínio (AlCl_3), cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT), fluoresceína, hidróxido de sódio (NaOH), metossulfato de fenazina (PMS), nitrito de sódio (NaNO_2), persulfato de potássio, reagente de *Folin-Ciocalteu*, e trolox.

2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato (AAPH), dinucleótido β -nicotinamida adenina (NADH), e sulfato ferroso foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A Merck (Darmstadt, Alemanha) forneceu ácido ascórbico, cloreto férrico, etanol absoluto anidro, fosfato monopotássico (KH_2PO_4), e H_2O_2 .

Os kits para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes, nomeadamente GSH-Px e SOD, e LPO foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os kits dos ensaios da CAT e AChE foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respetivamente.

O *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), soro bovino fetal (FBS), *Hank's balanced salt solution* (HBSS), aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina e tripsina-EDTA foram fornecidos pela Invitrogen Corporation (Life Technologies, S.A., Madrid, Espanha). O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido à AppliChem (Darmstadt, Alemanha).

As células Caco-2 (passagens 6-17) e HT29-MTX (passagens 63-64) foram adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA).

3.2. Amostra

As amostras de *M. nodiflorum* foram colhidas em setembro de 2023 pelo produtor RiaFresh e gentilmente entregues no GRAQ - Instituto Superior de Engenharia do Porto, Portugal. As amostras foram lavadas e desidratadas (Excalibur Food Dehydrator, EUA) a 41 °C durante 36 horas e, de seguida, trituradas num moinho (Moulinex A320, França) para obtenção de partículas de 1 mm (Figura 5). Posteriormente as amostras foram guardadas a 4 °C até extração.



Figura 5: Amostra de *M. nodiflorum* antes e depois de desidratada e triturada.

3.3. Extração assistida por ultrassons

A EAU foi realizada com recurso a uma sonda de ultrassons (Sonic Vibracell, modelo VCX50, Newtown, CT, EUA) com uma ponta de 13 mm de diâmetro, durante 31 minutos e a uma intensidade de 30 W/m^2 , de acordo com o modelo experimental validado por Silva *et al.* (76, 100). Os solventes usados foram água e etanol (100% de água, 100% de etanol e uma mistura hidroalcoólica 50:50 (v/v)), na proporção amostra/solvente de 10 %.

Após extração, as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM, a 20°C , durante 30 minutos e filtradas por gravidade com recurso a um filtro de pregas. Posteriormente, os extratos foram liofilizados (Telstar, model Cryodos -80, Espanha) e armazenados à temperatura ambiente até análise (Figura 6).

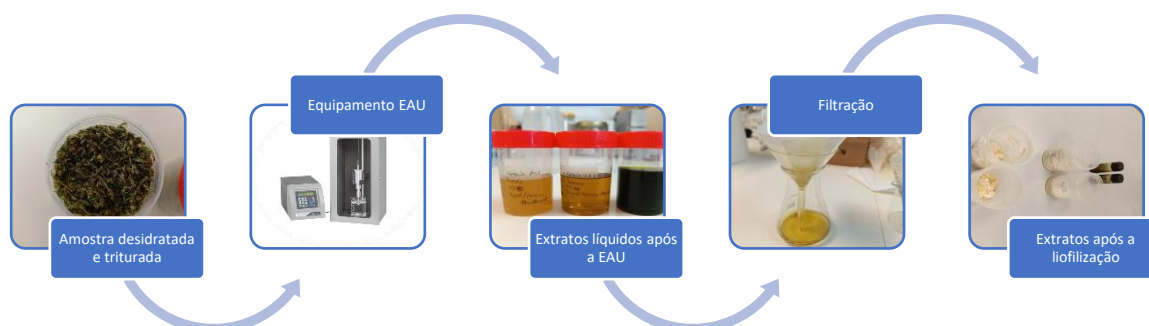


Figura 6: Representação esquemática do processo de extração dos compostos bioativos da *M. nodiflorum*.

3.4. Digestão simulada *in vitro*

A digestão simulada *in vitro* foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Pinto *et al.* (47). De forma resumida, os extratos foram dissolvidos no solvente de extração à concentração de 50 mg/mL . Para a fase oral, foi adicionado fluído salivar simulado (contendo α -amilase salivar a 75 U/mL) na proporção 1:1 (m/v), a pH 7 e as amostras foram incubadas durante 2 minutos a 37°C num banho de água. Após 2 minutos, foram recolhidas alíquotas de digestão oral. No que toca à fase gástrica, foi adicionado ao digesto oral o fluído gástrico simulado

(contendo pepsina 2000 U/mL), numa proporção de 1:1 (v/v), a pH 3. Após incubação a 37 °C durante 2 horas num banho de água, foram recolhidas alíquotas de digestão gástrica. Por fim, para a fase intestinal, foi adicionado ao digesto gástrico o fluido intestinal simulado (contendo pancreatina 100 U/mL e bÍlis 10 mM), numa proporção de 1:1 (v/v) a pH 7, tendo sido incubado a 37 °C durante 2 horas num banho de água. Após este período, foram recolhidas alíquotas de digestão intestinal. As alíquotas recolhidas foram centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

A taxa de recuperação de fenólicos e flavonoides foi determinada pela seguinte Equação 1:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Teor de fenólicos (ou flavonoides) na fração digerida}}{\text{Teor de fenólicos (ou flavonoides) na amostra não digerida}} \times 100$$

Equação 1

O índice de recuperação após todas as fases de digestão corresponde à bioacessibilidade (%).

3.5. Determinação do Teor de Polifenóis Totais (TPT)

Para a determinação do TPT foi usado o método Folin-Ciocalteu descrito por Pinto *et al.* (101). Numa microplaca de 96 poços, foram colocados 30 µL de branco/amostra/padrão e adicionaram-se 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v) e 120 µL de Na₂CO₃ a 7,5% (m/v). A microplaca foi incubada no leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, VT, EUA) a 45 °C durante 15 minutos e, posteriormente, 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. De seguida, procedeu-se à leitura da absorvância a 765 nm. Os ensaios foram efetuados em triplicado, tendo sido usado ácido gálgico para a curva de calibração (gama de concentrações entre 5 e 100 mg/L; $R^2 \geq 0,9951$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálgico (EAG) por grama de extrato seco (ES) (mg EAG/g ES).

3.6. Determinação do Teor de Flavonoides Totais (TFT)

Para a determinação do TFT foi seguido o procedimento descrito por Costa *et al.* (102). Numa microplaca de 96 poços, foram colocados 30 µL de branco/amostra/padrão, 75 µL de água destilada e 45 µL de NaNO₂ a 1% (m/v). Após 5 minutos, adicionaram-se 45 µL de solução de AlCl₃ a 5% (m/v), aguardou-se 1 minuto e adicionaram-se 60 µL de NaOH (1 M) e 45 µL de água destilada. Após homogeneização, procedeu-se à leitura da absorvância (BioTek Instruments, Synergy HT, VT, EUA) a 510 nm. Os ensaios foram efetuados em triplicado, tendo sido usada a solução de catequina para a curva de calibração (gama de concentrações entre 5 e 100 mg/L, R^2

$\geq 0,9833$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (EC) por grama de ES (mg EC/g ES).

3.7. Avaliação *in-vitro* da capacidade antioxidante/antiradicalar

3.7.1. Avaliação da capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)

Para a determinação da capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) foi usado o procedimento descrito por Benzie e Strain (103), com pequenas alterações (101). Numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 30 μ L de branco/amostra/padrão e 265 μ L de reagente FRAP previamente preparado (usando tampão acetato a 0,3 M de pH 3,6, solução de TPTZ a 10 mM e solução de cloreto férrico a 20 mM na proporção de 10:1:1 (v/v/v)). A microplaca foi incubada no leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, VT, EUA) a 37 °C durante 30 minutos. De seguida procedeu-se à leitura da absorvância a 595 nm. Os ensaios foram efetuados em triplicado, tendo sido usada a solução de sulfato ferroso para a curva de calibração (gama de concentrações entre 25 e 500 μ M, $R^2 \geq 0,9996$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de sulfato ferroso (ESF) por grama de ES (mg ESF/g ES).

3.7.2. Avaliação da capacidade de inibição do radical ABTS^{•+}

Para a determinação do ABTS foi seguido o procedimento descrito por Pinto *et al.* (104). A solução stock de ABTS^{•+} (7 mM), previamente preparada e enriquecida com persulfato de potássio (2,45 mM), permaneceu 16 horas no escuro, à temperatura ambiente, para que a reação ocorresse. Posteriormente, a solução foi filtrada com um filtro de nylon (0,22 μ m) e diluída em água ultrapura até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,02$ após leitura a 734 nm.

De seguida, numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 μ L de branco/amostra/padrão e 180 μ L da solução de trabalho de ABTS^{•+}. A microplaca foi incubada durante 6 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e procedeu-se à leitura da absorvância a 734 nm no leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, VT, EUA). Os ensaios foram efetuados em triplicado, tendo sido usada a solução de ácido ascórbico para a curva de calibração (gama de concentrações entre 5 e 100 μ g/mL, $R^2 \geq 0,9972$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por grama de ES (mg EAA/g ES).

3.8. Avaliação da capacidade de captação de espécies reativas de oxigénio (ERO)

A capacidade de captação de ERO dos extratos e respetivos digestos foi avaliada relativamente ao radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e radical peroxilo ($ROO^{\bullet}$). Os extratos foram dissolvidos na solução de tampão fosfato utilizada em cada ensaio, em diferentes concentrações. O ácido gálgico foi utilizado como controlo positivo e a leitura das microplacas foi realizada no leitor de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, VT, EUA).

3.8.1. Determinação da capacidade de captação do radical superóxido

A capacidade de captação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Pinto *et al.* (46), que consiste na geração do $O_2^{\bullet-}$ a partir de oxigénio dissolvido por acoplamento PMS/NADH, favorecendo a redução de NBT a *diformazan*, de cor roxa. Os reagentes NADH, NBT e PMS, bem como os extratos, foram dissolvidos em tampão fosfato 19 mM a pH 7,4. Numa microplaca de 96 poços, foram colocados 50 μ L de amostra/branco/controlo, 50 μ L de NADH 166 μ M e 150 μ L de NBT 43 μ M. Por fim, adicionaram-se 50 μ L de PMS 2,7 μ M e procedeu-se à leitura da absorvância a 560 nm durante 6 minutos. Como controlo positivo foi usado o ácido gálgico nas concentrações entre 3,91 e 125 μ g/ml. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição para os digestos e metade da concentração máxima inibitória (IC_{50}) para os extratos não digeridos e ácido gálgico.

3.8.2. Determinação da capacidade de captação de peróxido de hidrogénio

A capacidade de captação de H_2O_2 foi determinada segundo o procedimento descrito por Pinto *et al.* (6), detetando o H_2O_2 produzido num meio contendo ABTS e peroxidase. Numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 μ L de amostra/controlo/branco, 100 μ L de tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 e 20 μ L H_2O_2 10 mM. A microplaca foi incubada a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 30 μ L de ABTS 1,25 mM e 30 μ L de solução de peroxidase 1 U/mL. Após nova incubação da placa a 37 °C durante 10 minutos, procedeu-se à leitura da absorvância a 405 nm. Como controlo positivo, foi usado ácido gálgico nas concentrações entre 31,25 e 1000 μ g/ml. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição para os digestos e extratos não digeridos e IC_{50} para o ácido gálgico.

3.8.3. Determinação da capacidade de captação do ácido hipocloroso

A capacidade de captação do HOCl foi determinada segundo o método descrito por Pinto *et al.* (46), o qual consiste na oxidação de DHR, induzida por HOCl, e na formação de um composto fluorescente, a rodamina. Inicialmente o HOCl foi preparado através do ajuste de pH de uma solução de 1% (v/v) de NaOCl a 6,2, com adição gota a gota de H₂SO₄ a 10% (v/v). Posteriormente, foi determinada a concentração da solução de NaOCl preparada por leitura da absorvância a 235 nm num espectrofotómetro. De seguida, numa microplaca de 96 poços de fundo preto, foram adicionados 150 µL de tampão fosfato 100 mM a pH 7,4, 50 µL de amostra/branco/controlo, 50 µL de DHR 5 µM e 50 µL de HOCl 5 µM. A intensidade de fluorescência foi lida a 485 ± 20 nm e 528 ± 20 nm, a 37 °C durante 5 minutos. Como controlo positivo, foi usado o ácido gálico em concentrações entre 0,24 e 7,81 µg/ml. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição para os digestos e IC₅₀ para os extratos não digeridos e ácido gálico.

3.8.4. Determinação da capacidade de captação do radical peroxilo

A capacidade de captação do ROO•, foi determinada segundo o procedimento descrito por Pinto *et al.* (46), consistindo inicialmente na produção do radical por decomposição térmica do AAPH a 37 °C. Este radical oxida a fluoresceína, resultando num decaimento da intensidade de fluorescência (46).

Numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 150 µL de fluoresceína 61,2 nM, 25 µL amostra/padrão/branco e 25 µL de AAPH 19,1 nM. A intensidade de fluorescência foi lida a 485 ± 20 nm e 528 ± 20 nm, a 37 °C de minuto a minuto durante 120 minutos. O Trolox foi usado como padrão, sendo os resultados expressos em µg de equivalentes de Trolox (ET) por mg de ES (µg ET/mg ES).

3.9. Atividade da acetilcolinesterase

Para avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi usado o procedimento descrito pelo fornecedor do kit de ensaio (MAK119, Sigma-Aldrich, EUA). Numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 10 µL de amostra e 190 µL de reagente de reação. A microplaca foi incubada no leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, VT, EUA) à temperatura ambiente durante 2 minutos. De seguida, procedeu-se à leitura da absorvância inicial a 412 nm. A microplaca continuou a incubar por mais 10 minutos à temperatura ambiente, tendo-se procedido

novamente à leitura da absorvância a 412 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da atividade da AChE.

3.10. Atividades das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

A atividade das enzimas antioxidantes, nomeadamente CAT, GSH-Px, e SOD, foi avaliada utilizando kits enzimáticos comerciais e seguindo as indicações dos fabricantes. A LPO foi analisada por determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) usando um kit comercial. Para as leituras de absorvância foi utilizado o leitor de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, VT, EUA), exceto para o ensaio da GSH-Px no qual foi usado o espectrofotómetro Nicolet evolution 300 (ThermoScientific, Inglaterra).

3.10.1. Avaliação da atividade enzimática da catalase

O método para avaliação da atividade enzimática da CAT baseia-se na reação da enzima com o metanol, na presença de H_2O_2 . O formaldeído produzido é medido espectrofotometricamente com 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole (Purpald®). O Purpald® forma, especificamente, um heterociclo bicíclico com aldeídos que, após oxidação, passa de incolor a cor púrpura. Numa microplaca de 96 poços, adicionaram-se 100 μ L de tampão de ensaio, 30 μ L de metanol, 20 μ L de padrão/controlo/amostra e 20 μ L de H_2O_2 . A microplaca foi incubada num agitador durante 20 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 30 μ L de hidróxido de potássio e 30 μ L de Purpald® (cromogénio). A microplaca foi novamente incubada mais 10 minutos em agitação, à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 10 μ L de periodato de potássio e após incubar 5 minutos em agitação à temperatura ambiente procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm. O formaldeído foi usado como padrão. Os resultados foram expressos em nmol de formaldeído, por minuto, por grama de ES (nmol/min/g ES).

3.10.2. Avaliação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase

A atividade enzimática da GSH-Px foi determinada pelo método indireto que se baseia na oxidação do glutatião (GSH) em glutatião oxidado (GSSG), catalisada pela GSH-Px. O substrato usado para esta reação é o hidroperóxido de *terc*-butilo (*t*-Bu-OOH), o qual reage espontaneamente com o GSH. Numa cuvete de quartzo, adicionaram-se tampão de ensaio, NADPH, amostra/enzima e *t*-Bu-OOH, de acordo com os volumes descritos no protocolo do fabricante. Procedeu-se a seis leituras de absorvância a 340 nm de 10 em 10 segundos, tendo

sido a primeira leitura efetuada com um atraso de 15 segundos. Os resultados foram expressos em μmol de NADP^+ , por minuto, por grama de ES ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g ES}$).

3.10.3. Avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase

Na avaliação da atividade enzimática da SOD foi usado um kit comercial que se baseia na redução do WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico] que produz um corante formazan solúvel em água após a redução com o anião superóxido. A redução do superóxido está linearmente relacionada com a atividade da xantina oxidase que é inibida pela SOD. Numa microplaca de 96 poços, adicionaram-se 20 μL de amostra/padrão/branco, 200 μL de WST-1, e 20 μL de solução de trabalho de enzima, de acordo com o descrito no protocolo do kit. A microplaca foi incubada 20 minutos a 37 °C e a absorvância foi lida a 450 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g ES}$ relativos à atividade da SOD.

3.10.4. Avaliação da peroxidação lipídica

Para a avaliação da LPO foi usado um kit comercial que se baseia na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Em tubos de ensaio de vidro, foram colocados 125 μL de amostra e 375 μL de solução de TBA. Os tubos foram incubados a 90 °C durante 60 minutos. Após arrefecimento, transferiram-se 200 μL de cada tubo para uma microplaca de 96 poços, procedendo-se à leitura da absorvância a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por miligrama de ES (nmol MDA/mg ES).

3.11. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada em duas linhas celulares intestinais, nomeadamente Caco-2 e HT29-MTX. As duas linhas celulares foram cultivadas em frascos de cultura celular usando meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de aminoácidos essenciais e 1% (v/v) de antibiótico. As células foram incubadas (Panasonic, CO₂ Incubator MCO-18AC, Japão) a 37 °C num ambiente com 5% de CO₂. O meio de cultura foi mudado de dois em dois dias até atingirem a confluência. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este método permite avaliar a atividade metabólica das células através da absorção e redução do anel tetrazólico de MTT pelas mitocôndrias celulares (104). O ensaio de MTT foi realizado de acordo com o método descrito por Pinto *et al.* (104), numa

microplaca de 96 poços. As células foram semeadas, com uma densidade de $25 \times 10^3/\text{mL}$, e cultivadas durante 24 horas a 37 °C num ambiente com 5% de CO_2 . De seguida, adicionaram-se os extratos previamente dissolvidos em meio DMEM em diferentes concentrações (entre os 31,25 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tendo sido as placas incubadas nas mesmas condições durante 24 horas. Posteriormente, os extratos foram retirados, as células foram lavadas com uma solução tamponada com fosfato (PBS pH 7,4), e o reagente MTT, previamente dissolvido em meio DMEM, foi adicionado. A microplaca foi incubada a 37 °C durante 3 horas, para permitir a formação de cristais de formazan. De seguida, o meio foi removido e adicionaram-se 150 μL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. Procedeu-se à leitura da absorvância a 490 nm, com subtração de fundo a 630 nm. O meio DMEM e o reagente Triton X-100 foram usados, respetivamente, como controlos positivo e negativo.

3.12. Permeabilidade intestinal *in vitro*

De forma a simular a permeabilidade *in vitro*, os digestos intestinais dos extratos foram expostos a um modelo de co-cultura intestinal composto por Caco-2 e HT29-MTX, de acordo com o método descrito Antunes *et al.* (105).

Inicialmente, as células Caco-2 e HT29-MTX foram cultivadas até atingirem 90-95% de confluência. De seguida, as células foram semeadas no compartimento apical (densidade de 1×10^5 células/ cm^2) de placas Transwell® de 12 poços (3 μm de diâmetro dos poros, polycarbonato, 1,12 cm^2), aplicando um rácio de 90:10 (Caco-2: HT29-MTX). O meio foi mudado a cada dois dias e a resistência elétrica transepitelial (TEER) foi medida usando um voltímetro epitelial EVOM equipado com eléctrodos (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) para monitorizar a integridade da monocamada celular.

Após o período de cultivo de 21 dias, o meio de cultura foi removido e as monocamadas de células foram lavadas duas vezes com HBSS a 37 °C. Adicionaram-se 400 μL dos digestos intestinais de cada um dos extratos no compartimento apical e 1200 μL de HBSS no compartimento basolateral. A tempos fixos (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos), o TEER foi medido e foram recolhidas alíquotas de 200 μL do compartimento basolateral e reposto o mesmo volume de HBSS, mantendo-se sempre o modelo a 37 °C.

3.13. Identificação e quantificação de compostos fenólicos por UPLC–QTOF–MS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando um espectrômetro de massa de alta resolução. Para tal, recorreu-se ao equipamento Agilent 1290 UPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência), equipado com um amostrador automático e um conjunto de díodos da série 1290, atuando como cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massa Quadrupole Time of Flight (QTOF).

Após a coluna, o fluxo foi dividido com uma junção T passiva, direcionando o líquido para o conjunto de díodos ou para o espectrômetro de massa. O Agilent 6530 QTOF foi utilizado em modo Electrospray. O instrumento está equipado com uma fonte Jet Stream e opera em modo de íões positivos. Durante a aquisição, as massas foram calibradas utilizando a mistura de calibração da Agilent. Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna Agilent SB C18 (3 x 100 mm; 1,7 μ m). Os eluentes foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo com 0,1% de ácido fórmico (B). O caudal foi fixado em 0,5 ml/min. O gradiente começou com 90% de A e manteve-se isocrático durante 1 minuto, depois passou para 85% de B em 10 minutos e atingiu 90% de B em 12 minutos, permanecendo isocrático até 14 minutos.

Para a identificação dos compostos, adotaram-se três critérios diferentes: em primeiro lugar, a correspondência do HR–MS (Espectrometria de massa de alta resolução) e o cálculo da fórmula molecular; em segundo lugar, a correspondência dos dados de MS e de fragmentação, bem como a compatibilidade do espectro UV, com a estrutura química proposta e, em terceiro lugar, a comparação com o padrão de referência.

3.14. Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o Microsoft Office Excel® 2016, o SPSS® versão 29 (Testes de Homogeneidade de Variância e testes One Way ANOVA e Tukey's HSD) e o GraphPad Prism® versão 7. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para um valor de $p < 0,05$, as amostras foram consideradas estatisticamente significativas.

4. Resultados e discussão

4.1. Rendimento do processo de extração

A solubilidade dos compostos é influenciada por fatores como solvente de extração, a temperatura, a proporção soluto/solvente, o tempo de contato, a potência e o ciclo dos ultrassons (106). Estas variáveis foram estudadas em pormenor em vários estudos, e para reduzir o número de experiências e erros experimentais, a metodologia de superfície de resposta (MSR) tem sido utilizada como uma ferramenta matemática útil para avaliar a relação entre diversos parâmetros independentes (25, 31, 100). Esta metodologia é aplicada eficazmente nos procedimentos de EAU para estabelecer as condições ótimas de extração (31, 100).

Para este estudo, foram aplicadas as condições descritas por Silva *et al.* (100). Os resultados obtidos para o rendimento de extração dos extratos aquoso (AQ), hidroalcoólico (HA) e alcoólico (AL) de *M. nodiflorum* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento extração dos extratos de *M. nodiflorum* preparados por EAU.

Solvente	Aquoso	Hidroalcoólico	Alcoólico
% rendimento de extração	21,04 ± 0,09 ¹	20,98 ± 0,32 ¹	20,49 ± 0,30 ¹

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Números diferentes denotam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os extratos.

O valor mais elevado de rendimento de extração foi obtido para o extrato AQ (21,04%), seguido do extrato HA (20,98%) e do extrato AL (20,49%), sem diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). Os resultados obtidos foram inferiores aos alcançados em estudos realizados na halófita *Salicornia ramosíssima*, Correia *et al.* (7) obtiveram percentagens de rendimento de extração superiores, variando entre 21,27% e 21,65% para extratos preparados por extração subcrítica com água (ESA) a diferentes temperaturas (110–180 °C). Nesta mesma espécie, Silva *et al.* (9) alcançaram rendimentos de extração de 26,10% e 21,14%, respetivamente, para extratos preparados por EAM e extração convencional (maceração com água).

4.2. TPT, TFT e atividade antioxidante e antiradicalar

Os resultados de TPT, TFT e atividade antioxidante e antiradicalar (avaliada pelos ensaios ABTS e FRAP) dos extratos AQ, HA e AL de *M. nodiflorum* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Teor de polifenóis e flavonoides total, bioacessibilidade e atividade antioxidante/antiradical dos extratos de *M. nodiflorum* preparados por EAU antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*.

			TPT (mg EAG /g ES)	Recuperação de fenólicos (%)	TFT (mg EC/g ES)	Recuperação de flavonoides (%)	ABTS (mg EAA/g ES)	FRAP (mg ESF/g ES)
Aquoso	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	4,05 ± 0,07 ^c	97,76 ± 1,65 ^c	0,67 ± 0,00 ^c	8,70 ± 0,06 ^b	4,19 ± 0,20 ^c	3,67 ± 0,01 ^c
		Gástrico	8,24 ± 0,12 ^b	198,97 ± 2,89 ^b	0,76 ± 0,00 ^c	9,82 ± 0,01 ^b	4,86 ± 0,23 ^c	8,45 ± 0,12 ^b
		Intestinal	15,96 ± 0,16 ^a	385,23 ± 3,76 ^a	3,98 ± 0,07 ^b	51,31 ± 0,85 ^a	25,11 ± 0,21 ^a	14,25 ± 0,24 ^a
	Extrato não digerido		4,14 ± 0,57 ^{3,c}	–	7,75 ± 0,17 ^{2,a}	–	6,92 ± 0,96 ^{3,b}	8,72 ± 1,19 ^{3,b}
Hidroalcoólico	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	4,89 ± 0,01 ^c	78,18 ± 0,10 ^c	0,69 ± 0,00 ^c	8,56 ± 0,05 ^c	4,93 ± 0,04 ^c	6,09 ± 0,00 ^d
		Gástrico	7,59 ± 0,11 ^b	121,33 ± 1,82 ^b	1,60 ± 0,00 ^c	19,92 ± 0,03 ^b	7,23 ± 0,35 ^c	10,95 ± 0,04 ^c
		Intestinal	16,38 ± 0,06 ^a	261,79 ± 0,95 ^a	4,63 ± 0,14 ^b	57,80 ± 1,76 ^a	27,14 ± 0,11 ^a	19,21 ± 0,47 ^a
	Extrato não digerido		6,26 ± 0,81 ^{2,c}	–	8,02 ± 0,50 ^{2,a}	–	9,62 ± 1,19 ^{1,b}	14,51 ± 1,13 ^{2,b}
Alcoólico	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	7,41 ± 0,25 ^c	54,97 ± 1,88 ^c	1,03 ± 0,07 ^c	8,23 ± 0,56 ^b	3,72 ± 0,04 ^c	13,19 ± 0,40 ^b
		Gástrico	10,20 ± 0,14 ^b	75,59 ± 1,06 ^b	1,84 ± 0,06 ^c	14,78 ± 0,46 ^b	5,03 ± 0,15 ^c	18,70 ± 0,74 ^b
		Intestinal	21,25 ± 0,58 ^a	157,53 ± 4,31 ^a	6,56 ± 0,41 ^b	52,58 ± 3,28 ^a	23,72 ± 0,67 ^a	33,84 ± 0,02 ^a
	Extrato não digerido		13,49 ± 1,96 ^{1,b}	–	12,48 ± 1,87 ^{1,a}	–	8,12 ± 0,67 ^{2,b}	30,98 ± 3,44 ^{1,a}

EAG, equivalentes de ácido gálico. EC, equivalentes de catequina. EAA, equivalentes de ácido ascórbico. EFS, equivalentes de sulfato ferroso. FRAP, *ferric reducing antioxidant power*. ES, extrato seco. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes (a, b, c e d) denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre digestos dentro do mesmo extrato. Números diferentes (1, 2 e 3) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos não digeridos.

Considerando o solvente de extração, os resultados de TPT, TFT e FRAP melhoraram significativamente ($p < 0,05$) pela seguinte ordem AQ < HA < AL, com exceção do ensaio de TFT entre o extrato AQ e HA em que a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). No ensaio ABTS, o extrato HA apresentou os melhores resultados (Tabela 4).

Estes resultados corroboram o estudo efetuado por Silva *et al.* (8) na halófita *Disphyma crassifolium*, utilizando as mesmas condições de extração. De acordo com os autores, o extrato AL apresentou melhores resultados do que o extrato AQ, concluindo-se que o etanol foi o solvente que conferiu melhor capacidade de solubilidade dos compostos de interesse. Porém, a halófita *D. crassifolium* apresentou, de uma forma geral, resultados de TPT, TFT, ABTS e FRAP superiores aos obtidos no presente estudo.

Analisando mais detalhadamente os valores de TPT, observou-se uma menor quantidade de polifenóis no extrato AQ (4,14 mg EAG/g ES), aumentando no extrato HA (6,26 mg EAG/g ES) e obtendo-se uma concentração ainda maior no extrato AL (13,49 mg EAG/g ES), com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os três extratos.

Em comparação com estudos realizados na *M. nodiflorum*, mas utilizando técnicas de extração diferentes, a EAU apresentou melhores resultados. Arena *et al.* (19), obtiveram um TPT inferior a 4,5 mg EAG/g para extratos preparados por EFS, enquanto Lima *et al.* (5) reportaram um TPT de 4,39 mg EAG/g ES para extratos preparados em banho de ultrassons com 80% de acetona. Noutro estudo, Hanen *et al.* (107) obtiveram um valor de 1,72 mg EAG/g para um extrato preparado por maceração em metanol.

Observando outras espécies de halófitas, como *S. ramosissima*, o TPT foi superior (25,66 mg EAG/g ES) em extratos obtidos por ESA (7). Como mencionado anteriormente, a halófita *D. crassifolium* apresentou valores de 8,49 e 53,13 mg EAG/g ES nos extratos AQ e AL, respetivamente, usando a mesma técnica e condições de extração (8).

No que diz respeito ao TFT, não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os extratos AQ e HA (7,75 mg EC/g ES e 8,02 mg EC/g ES, respetivamente). O melhor resultado foi obtido para o extrato AL, com 12,48 mg EC/g ES, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) com os restantes. Hanen *et al.* (107) obtiveram um valor inferior a 0,45 mg EC/g ES para extratos metanólicos de *M. nodiflorum*.

Deste modo, a *M. nodiflorum* revelou um conteúdo semelhante de flavonoides em comparação com a halófita *D. crassifolium*, utilizando a mesma técnica e condições de extração (8,02 e 18,98 mg EC/g ES nos extratos AQ e AL, respetivamente) (8). No entanto, a espécie *M.*

nodiflorum revelou valores superiores aos da espécie *S. ramosissima* para extratos obtidos por EAM e EC (maceração com água), com TFT de 8,44 e 8,41 mg EC/g ES, respectivamente (9).

Relativamente à atividade antioxidante e antiradicalar, o extrato HA apresentou melhor capacidade de captação de radicais ABTS (9,62 mg EAA/g ES), seguido do extrato AL (8,12 mg EAA/g ES) e do extrato AQ (6,92 mg EAA/g ES), com diferenças significativas entre os três ($p<0,05$). No ensaio FRAP, o extrato AL apresentou um valor superior (30,98 mg ESF/g ES), seguido do extrato HA (14,51 mg ESF/g ES) e do extrato AQ (8,72 mg ESF/g ES), novamente com diferenças significativas entre os três ($p<0,05$).

Comparando com o estudo de Silva *et al.* (8), os resultados de ABTS no extrato HA de *M. nodiflorum* foram semelhantes aos do extrato AL da halófito *D. crassifolium* (9,37 mg EAA/g ES), tendo, no entanto, obtido um resultado inferior no ensaio FRAP (149,69 μ mol ESF/g ES). Da mesma forma, os extratos de *M. nodiflorum* apresentaram menor atividade antioxidante e antiradicalar do que os extratos da espécie *S. ramosissima* preparados por ESA (ABTS: 39,50 mg EAA/g ES; FRAP: 422,57 μ mol ESF/g ES) (7) e EAM (ABTS: 17,74 μ g EAA/g ES; FRAP: 65,56 μ mol ESF/g ES) (9).

A técnica de EAU com o solvente etanol obteve melhores resultados para a maioria dos ensaios comparando com os resultados obtidos para a mesma espécie com recurso a técnicas de extração diferentes, nomeadamente a maceração (107). Com efeito, esta técnica revelou ser promissora, empregando tempos de extração mais curtos, quantidades reduzidas de solventes e baixo consumo energético (100).

4.3. Digestão gastrointestinal *in vitro*

4.3.1. Efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* no TPT e TFT

Os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* no TPT e TFT dos três extratos de *M. nodiflorum* estão sumarizados na Tabela 4.

Após digestão gastrointestinal *in vitro*, verificou-se que houve uma variação significativa no TPT ao longo da fase digestiva, aumentando pela seguinte ordem oral < gástrico < intestinal ($p<0,05$) para os três extratos obtidos com diferentes solventes de extração. As percentagens de aumento do TPT após as fases gástrica e intestinal foram de 1,9 e 2,0 vezes, respetivamente, para o extrato AQ; 1,6 e 2,2 vezes, respetivamente, para o extrato HA; e 1,4 e 2,1 vezes, respetivamente, para o extrato AL.

Comparando os resultados dos extratos não digeridos com os digestos, o TPT diminuiu após digestão oral, sem significância quando comparado com os extratos não digeridos ($p>0,05$), com exceção do extrato AL, tendo aumentado na fase gástrica para valores superiores aos dos extratos ($p<0,05$), novamente com exceção do extrato AL. O TPT, em relação aos extratos não digeridos, aumentou 3,9 vezes no extrato AQ, 2,6 vezes no extrato HA, e 1,6 vezes no extrato AL após a fase intestinal, sendo o melhor resultado obtido para o extrato AL (21,25 mg EAG/g ES).

Num estudo semelhante, o mesmo padrão de variação de TPT foi observado por Li *et al.* (48), em nozes (*Juglans regia*), amêndoas (*Prunus dulcis*) e cajus (*Anacardium occidentale*). Os autores reportaram uma ligeira descida no TPT após a fase oral, em comparação com os extratos não digeridos, e um constante aumento durante as restantes fases digestivas. O melhor resultado foi obtido em nozes cruas, onde o TPT aumentou 6 vezes, de 0,52 para 3,14 mg EAG/g entre o extrato não digerido e após a fase intestinal (48). Igualmente, Liu *et al.* (98), obtiveram resultados semelhantes em cereja selvagem do Himalaia (*Prinsepia utilis*), com o TPT aumentando significativamente durante o processo digestivo em comparação com a amostra não digerida, correspondendo a um aumento de 1,2 vezes após a fase gástrica e 1,4 vezes após a fase intestinal. Noutro estudo envolvendo uma espécie de algas vermelhas (*Porphyra haitanensis*), também se verificou um aumento do TPT durante todo o processo digestivo, incluindo na fase oral (90). Resultados semelhantes foram também obtidos em polpa de jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (89), na pele de prata dos grãos de café (*Coffea arabica*, de várias origens) (108), em algas marinhas de praias australianas (*Phyllospora comosa*, *Ecklonia radiata*, *Durvillaea sp.*, *Sargassum sp.*, e *Cystophora sp.*) (91), em sementes de sésamo (*Sesamum indicum* L.) (97) e em feijão da espécie *Vigna* (*V. angularis*, *V. radiata*, *V. mungo* e *V. unguiculata*) (109).

Estes resultados sugerem que os fluídos digestivos e as respetivas mudanças de pH levam a uma libertação lenta e progressiva dos compostos fenólicos da matriz da halófito durante o processo digestivo, ou facilitam a sua metabolização noutros compostos fenólicos que se tornam potencialmente disponíveis para absorção intestinal. Os polifenóis em ambiente ácido podem sofrer hidrólise e alguns glicosídeos podem ser convertidos em agliconas, aumentando o conteúdo fenólico (89).

Existe igualmente a possibilidade de existirem compostos fenólicos ligados a fibras da matriz da planta, por ligações glicosídicas e ésteres (difíceis de separar e extrair) (91, 95), ocorrendo a sua libertação durante a digestão, tal como descrito por Dong *et al.* (92). Esta libertação ocorre por hidrólise ácida, hidrólise alcalina e pela ação enzimática (95). A pepsina promove a hidrólise

de ligações químicas (ligações covalentes, ligações de hidrogénio, etc.), levando à libertação de polifenóis que estejam ligados a macromoléculas, como proteínas e hidratos de carbono, enfraquecendo também algumas das ligações éster onde os ácidos fenólicos interagem com a parede celular, libertando-os (89).

Contrariamente, o TFT diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos três extratos após a digestão gastrointestinal *in vitro*, seguindo a ordem oral < gástrico < intestinal < extrato não digerido, com exceção entre as fases oral e gástrica em que a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). As percentagens de aumento do TFT após as fases gástrica e intestinal foram de 12,9% e 422,3%, respetivamente, para o extrato AQ; 132,8% e 190,1%, respetivamente, para o extrato HA; e 79,6% e 255,9%, respetivamente, para o extrato AL. Na fase gástrica verifica-se uma recuperação de flavonoides pouco expressiva em comparação com a fase oral para os três extratos, os quais foram mais eficazmente recuperados na fase intestinal, explicando a ação da pancreatina, dos sais biliares e do pH neutro na libertação de flavonoides dos extratos de *M. nodiflorum* para o meio digestivo. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em casca de castanha, frutos de mirtilo, grãos de café torrados e bolachas funcionais enriquecidas com extratos fenólicos (12, 41, 96, 109, 110).

4.3.2. Bioacessibilidade

A bioacessibilidade refere-se à quantidade de compostos fenólicos que são liberados do extrato durante a digestão gastrointestinal, tornando-se assim potencialmente disponíveis para absorção intestinal (41).

A recuperação de polifenóis e flavonoides aumentou pela seguinte ordem: fase oral < fase gástrica < fase intestinal. Como mostra na Tabela 4, a digestão oral foi a que reteve menos polifenóis (97,76%, 78,18% e 54,97%, respetivamente, nos extratos AQ, HA e AL). Uma grande parte foi recuperada na digestão gástrica (198,97%, 121,33% e 75,59%, respetivamente, nos extratos AQ, HA e AL). As maiores taxas de recuperação foram obtidas após a digestão intestinal (385,23%, 261,79% e 157,53%, respetivamente, nos extratos AQ, HA e AL), com diferenças significativas entre as três fases ($p < 0,05$).

Quanto à bioacessibilidade dos flavonoides, a digestão oral foi a que reteve menos flavonoides (8,70%, 8,56% e 8,23%, respetivamente, nos extratos AQ, HA e AL), aumentando após a digestão gástrica (9,82%, 19,92% e 14,78%, respetivamente, nos extratos AQ, HA e AL). A maiores taxas

de recuperação foram obtidas após a digestão intestinal (51,31%, 57,80% e 52,58%, respectivamente, nos extratos AQ, HA e AL).

Estes resultados foram de encontro aos valores de TPT obtidos, revelando-se bastante promissores. As taxas de recuperação acima dos 100% após a digestão intestinal reforçam a hipótese de que a neutralização do pH e as enzimas intestinais, tais como a pancreatina e os sais biliares, exercem uma influência significativa na recuperação de compostos fenólicos, quando comparados com os ambientes gástrico e oral (83). Estas taxas de recuperação elevadas podem estar associadas à maior solubilidade e polaridade destes compostos no meio intestinal (83), favorecendo a sua libertação da matriz alimentar e subsequente metabolização em compostos menos complexos ou biotransformação de ácidos fenólicos complexos e flavonoides em metabolitos mais pequenos (12). As interações dos compostos fenólicos e flavonoides com minerais, pigmentos, ácidos gordos e açúcares pode igualmente justificar as taxas de recuperação obtidas (41), uma vez que os fluídos digestivos em pH ácido e alcalino podem precipitar os compostos fenólicos (41).

As taxas de recuperação dos compostos fenólicos superiores a 100% são consistentes com estudos efetuados em nozes (*J. regia*), amêndoas (*P. dulcis*) e cajus (*A. occidentale*) (48), bem como em feijão da espécie *Vigna* (*V. angularis* e *V. unguiculata*) (109), após a fase intestinal. Um padrão idêntico foi também observado em bolachas enriquecidas com extrato de cascas de castanha (12), mas com valores inferiores.

4.3.3. Atividade antioxidante e antiradicalar após digestão *in vitro*

As propriedades antioxidantes e antiradicalares dos três extratos aumentaram pela seguinte ordem: oral < gástrico < extrato não digerido < intestinal (Tabela 4). A atividade antioxidante e antiradicalar, quando comparada com os extratos não digeridos, aumentou ao longo do processo digestivo pela ação de enzimas e alterações do pH.

No que diz respeito ao ensaio ABTS, o aumento da capacidade de captação de radicais entre a fase oral e gástrica não foi significativo ($p > 0,05$), correspondendo a 16%, 46,5% e 35,3%, respectivamente, para os extratos AQ, HA e AL. Após a fase intestinal, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de 416,7%, 275,7% e 371,9%, respectivamente, para os extratos AQ, HA e AL. O melhor resultado obtido para o ABTS foi de 27,14 mg EAA/g ES após a digestão intestinal do extrato HA.

No ensaio FRAP, as taxas de aumento tiveram um comportamento diferente entre os diferentes extratos. No extrato AQ, o maior aumento ocorreu entre a fase oral e gástrica, correspondendo a 130%, enquanto um aumento de 68,7% foi obtido após a fase intestinal. No extrato HA, o aumento foi de 79,8% e 75,5%, respetivamente, após as fases gástrica e intestinal. No extrato AL, após a fase gástrica o aumento foi de 41,7%, tendo aumentado para 63,3% após a fase intestinal. Comparando as diferentes fases da digestão, as alterações foram significativas ($p<0,05$), com exceção entre as fases oral e gástrica do extrato AL. O melhor resultado obtido no ensaio de FRAP foi de 33,84 mg ESF/g ES após a digestão intestinal do extrato AL.

Perante estes resultados, é possível afirmar que os efeitos da digestão gastrointestinal (alterações de pH e enzimas) otimizaram a capacidade antioxidante e antiradicalar dos três extratos, apresentando resultados concordantes com os valores obtidos para o TPT e confirmando a importância dos compostos fenólicos na atividade antioxidante e antiradicalar. O potencial antioxidante e antiradicalar dos extratos de *M. nodiflorum* após digestão gastrointestinal pode estar associado ao aumento dos grupos hidroxilo dos fenólicos libertados dos monómeros ou agliconas em ambiente intestinal, oferecendo melhores propriedades antioxidantes (83, 89). Além disso, a libertação dos compostos fenólicos da matriz alimentar e a sua biotransformação durante a digestão, com influência da alteração do pH e enzimas, em moléculas solúveis e interação com outros nutrientes (por exemplo, minerais, vitaminas, ácidos gordos, e fibras) podem conferir um maior potencial de captação de radicais livres (ABTS) e redução de iões férricos (FRAP) aos digestos em comparação com os extratos não digeridos (41). Foram verificados resultados semelhantes em feijão da espécie *Vigna* (109), na pele de prata dos grãos de café (108) e em cereja selvagem do Himalaia (*P. utilis*) (98), nos quais se verificou um aumento da atividade antioxidante e antiradicalar após a fase intestinal.

4.3.4. Capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigénio (ERO)

De acordo com a Tabela 5, os extratos não digeridos evidenciaram maior capacidade de captação de espécies reativas, seguidos pelos digestos intestinais (expeto para $O_2^{\bullet-}$). As eficiências de captação mais elevadas, após a digestão, foram obtidas para o HOCl.

A capacidade de eliminação de $O_2^{\bullet-}$, entre os extratos não digeridos, foi mais alta no extrato AL ($IC_{50}=32,12 \mu\text{g/mL}$), mas com uma capacidade de eliminação inferior quando comparada com o ácido gálico (IC_{50} de $23,84 \mu\text{g/mL}$) usado como controlo positivo ($p>0,05$). Entre os digestos, obteve-se um comportamento diferente para os três extratos. No extrato HA, a fase oral foi a que

revelou melhor percentagem de inibição (97,95%), seguida das fases gástrica e intestinal (88,11% e 23,73%, respetivamente), com diferenças significativas ($p < 0,05$). No extrato AQ, a melhor percentagem de inibição foi obtida na fase gástrica (96,92%), mas sem diferenças significativas quando comparada com a fase oral (91,52%), e com menor capacidade de inibição determinada na fase intestinal (7,95%, $p < 0,05$). No extrato AL, a fase gástrica teve a maior percentagem de inibição (62,39%), seguida da fase intestinal (49,13%) e fase oral (5,57%), com diferenças significativas entre os três digestos ($p < 0,05$).

Relativamente ao ensaio de captação de H_2O_2 , os três extratos apresentaram valores semelhantes para os digestos, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre digestos no extrato AQ e entre as fases oral e gástrica no extrato AL. A digestão intestinal foi a mais eficiente na eliminação desta espécie reativa, inibindo 54,97%, 54,66% e 54,41% do H_2O_2 produzido, respetivamente, nos extratos AQ, HA e AL. Após a digestão oral, observou-se uma captação desta espécie de 50,00% no AL, 46,31% no HA e 42,01% no AQ. No que diz respeito à digestão gástrica, verificou-se que esta foi a etapa menos eficiente na eliminação de H_2O_2 , com valores de captação de 44,37% no AL, 41,61% no AQ e 37,52% no HA. Com efeito, a digestão revelou um aumento do potencial de neutralização desta espécie reativa. Dos três extratos não digeridos, o extrato HA apresentou melhores resultados (43,46%), seguido do extrato AQ (38,25%) e do extrato AL (16,88%). O ácido gálico, usado como controlo positivo, foi o mais eficiente na eliminação do H_2O_2 ($IC_{50} = 400,71 \mu g/mL$).

Tabela 5: Capacidade de eliminação de ERO dos extratos de *M. nodiflorum* preparados por EAU antes e depois da digestão *in vitro*.

			O ₂ ^{•-}		H ₂ O ₂		HOCl		ROO [•]
			% Inibição	IC ₅₀ (µg/mL)	% Inibição	IC ₅₀ (µg/mL)	% Inibição	IC ₅₀ (µg/mL)	µg ET/mg ES
Aquoso	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	91,52 ± 5,30 ^a	–	42,01 ± 0,44 ^a	–	73,98 ± 1,64 ^c	–	2,45 ± 0,02 ^d
		Gástrico	96,92 ± 0,21 ^a	–	41,61 ± 1,91 ^a	–	81,46 ± 1,42 ^b	–	17,13 ± 1,51 ^c
		Intestinal	7,95 ± 0,40 ^b	–	54,97 ± 4,88 ^a	–	89,29 ± 0,13 ^a	–	35,89 ± 4,95 ^b
	Extrato não digerido		–	337,40 ± 5,03 ²	38,25 ± 3,56 ^{1,a}	–	–	78,42 ± 3,08 ²	198,99 ± 25,04 ^{2,a}
Hidroalcoólico	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	97,95 ± 0,02 ^a	–	46,31 ± 0,22 ^b	–	72,08 ± 0,57 ^b	–	1,43 ± 0,21 ^d
		Gástrico	88,11 ± 1,62 ^b	–	37,52 ± 0,67 ^c	–	86,84 ± 1,95 ^a	–	10,99 ± 1,66 ^c
		Intestinal	23,73 ± 0,68 ^c	–	54,66 ± 1,11 ^a	–	86,63 ± 0,61 ^a	–	26,58 ± 1,01 ^b
	Extrato não digerido		–	477,27 ± 20,62 ¹	43,46 ± 2,34 ^{1,b,c}	–	–	85,86 ± 3,11 ²	218,59 ± 34,90 ^{2,a}
Alcoólico	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	5,57 ± 0,02 ^c	–	50,00 ± 1,50 ^b	–	27,92 ± 3,33 ^c	–	2,97 ± 0,41 ^c
		Gástrico	62,39 ± 2,74 ^a	–	44,37 ± 1,31 ^b	–	63,95 ± 3,30 ^b	–	21,33 ± 3,30 ^c
		Intestinal	49,13 ± 2,56 ^b	–	54,41 ± 0,60 ^a	–	95,18 ± 0,22 ^a	–	53,53 ± 7,79 ^b
	Extrato não digerido		–	32,12 ± 0,40 ³	16,88 ± 0,56 ^{2,c}	–	–	179,91 ± 16,34 ¹	230,58 ± 26,01 ^{2,a}
Controlo positivo	Ácido gálglico		–	23,84 ± 0,32 ³	–	400,71 ± 5,68	–	3,67 ± 0,04 ³	764,14 ± 0,00 ¹

IC₅₀ refere-se à concentração *in vitro* necessária para eliminar 50% das espécies pró-oxidantes num meio testado (média ± desvio padrão da média, n = 3). Números diferentes (1, 2 e 3) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados de IC₅₀ do controlo positivo e extratos não digeridos. Letras diferentes (a, b, c e d) denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as percentagens de inibição dos digestos dentro do mesmo extrato. As percentagens de inibição foram determinadas diretamente nas alíquotas recolhidas de cada fase da digestão (fases oral, gástrica e intestinal) após o tempo necessário.

No ensaio de HOCl, o potencial de captação mais elevado entre os extratos não digeridos foi determinado para o extrato AQ ($IC_{50} = 78,42 \mu\text{g/mL}$), sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o extrato HA ($IC_{50} = 85,86 \mu\text{g/mL}$) e o extrato AL ($IC_{50} = 179,91 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$). Em relação aos digestos, a digestão intestinal foi a que apresentou melhor capacidade de eliminação do HOCl (95,18% no AL, 86,63% no HA e 89,29% no AQ), seguida da digestão gástrica (63,95% no AL, 86,84% no HA e 81,46% no AQ) e com menor percentagem de inibição na digestão oral (27,92% no AL, 72,08% no HA e 73,98% no AQ). Entre as diferentes fases da digestão, as diferenças foram significativas ($p < 0,05$), exceto no extrato HA entre a fase gástrica e intestinal ($p > 0,05$). O ácido gálico ($IC_{50} = 3,67 \mu\text{g/mL}$) foi o melhor inibidor da espécie HOCl.

O potencial de eliminação de $ROO^{\bullet}$ foi maior nos extratos não digeridos (230,58 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AL, 218,59 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato HA e 198,99 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AQ), sem diferenças significativas entre os extratos ($p > 0,05$). Relativamente aos digestos, a fase intestinal foi a que apresentou maior capacidade de eliminação deste radical (53,53 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AL, 35,89 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AQ e 26,58 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato HA), obtendo resultados significativos ($p < 0,05$) quando comparado com as restantes fases digestivas. A capacidade de captação de $ROO^{\bullet}$ diminuiu após as fases gástrica (21,33 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AL, 17,13 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AQ e 10,99 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato HA) e oral (2,97 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AL, 2,45 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato AQ e 1,43 $\mu\text{g ET/mg ES}$ no extrato HA). O ácido gálico foi, novamente, o melhor inibidor (764,14 $\mu\text{g ET/mg ES}$).

Comparando com o extrato da halófita *D. crassifolium*, utilizando as mesmas condições de extração (8), e com a *S. ramosissima* para extratos obtidos por EAM e extração convencional (maceração com água) (6, 9), a *M. nodiflorum* revelou uma maior capacidade de eliminação de $O_2^{\bullet-}$ no extrato AL e maior potencial de eliminação de $ROO^{\bullet}$ nos extratos AQ, HA e AL. De acordo com o estudo de Silva *et al.* (8) na *D. crassifolium*, o extrato AQ apresentou melhores resultados para $O_2^{\bullet-}$ ($IC_{50} = 172,46 \mu\text{g/mL}$) e $ROO^{\bullet}$ (0,08 $\mu\text{mol ET/mg}$), enquanto o extrato AL revelou melhor capacidade de eliminação do HOCl ($IC_{50} = 1,97 \mu\text{g/mL}$). No que toca à *S. ramosissima* Pinto *et al.* (6) obtiveram, por extração convencional, um valor de $IC_{50} = 324,82 \mu\text{g/mL}$ para $O_2^{\bullet-}$, $IC_{50} = 760,08 \mu\text{g/mL}$ para H_2O_2 e $IC_{50} = 27,61 \mu\text{g/mL}$ para HOCl. Já por EAM, Silva *et al.* (9) obtiveram para a *S. ramosissima* obtiveram uma percentagem de inibição de 39,76% para $O_2^{\bullet-}$, $IC_{50} = 104,64 \mu\text{g/mL}$ para HOCl e 0,061 $\mu\text{g ET/mg}$ para o $ROO^{\bullet}$.

Relativamente ao comportamento de eliminação de espécies reativas durante o processo digestivo, estes resultados apresentam um comportamento semelhante ao obtido na digestão

simulada de extratos de casca da castanha, em que a proficiência de eliminação aumentou na seguinte ordem: oral < gástrica < digestão intestinal < extrato não digerido, alcançando a maior eficiência de neutralização contra HOCl (47, 83).

4.3.5. Inibição da acetilcolinesterase

O acetato e a colina, envolvidos na transmissão sináptica, resultam da hidrólise da acetilcolina pela ação da enzima AChE, na fenda sináptica (111). O aumento da acetilcolina, por inibição da enzima AChE, melhora o sistema colinérgico proporcionando melhorias nas funções cognitivas, tais como a aprendizagem e a memória (111). De igual modo, previne a formação de placas β -amilóides, retardando a morte neuronal induzida por processos inflamatórios (111). Os inibidores da AChE, como a galantamina, são usados no tratamento de algumas doenças, tais como Parkinson e Alzheimer (111). Como alternativa aos fármacos com efeitos colaterais significativos, alguns biocompostos têm demonstrado atividade anticolinérgica, sendo potenciais candidatos para a terapia de distúrbios neurodegenerativos em fases iniciais e moderadas, tais como alcalóides, flavonoides e terpenóides (111).

A Figura 7 apresenta os resultados de inibição da AChE obtidos antes e depois da digestão *in vitro* dos extratos de *M. nodiflorum*.

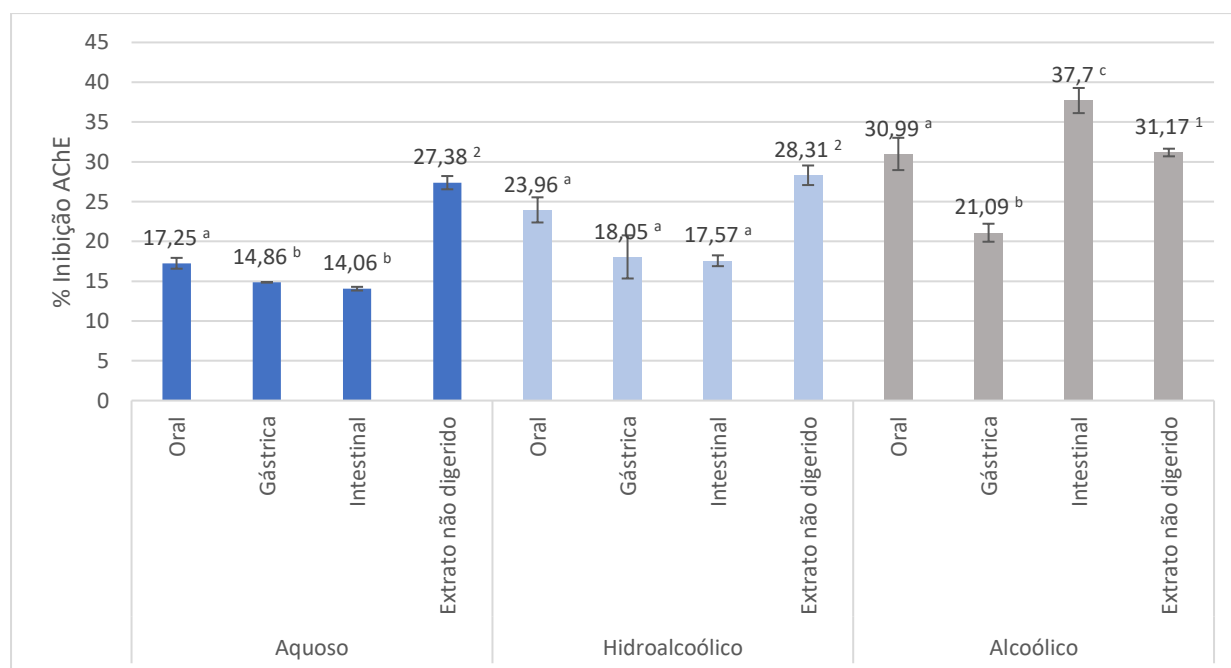


Figura 7: Inibição da atividade da AChE dos extratos de *M. nodiflorum* preparados por EAU antes e depois da digestão *in vitro*. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras diferentes (a, b e c) denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as percentagens de inibição dos digestos dentro do mesmo extrato. Números diferentes (1, 2 e 3) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados de inibição dos extratos não digeridos.

Os extratos não digeridos, testados a 1000 µg/mL, obtiveram percentagens de inibição de 31,17%, 28,31% e 27,38%, respetivamente, no AL, HA e AQ (sem diferenças significativas ($p>0.05$) entre os extratos AQ e HA).

Ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro*, a inibição da AChE nos extratos AQ e HA diminuiu pela seguinte ordem: oral > gástrica > intestinal (17,25%, 14,86% e 14,06%, respetivamente, no extrato AQ; 23,96%, 18,05% e 17,57%, respetivamente, no extrato HA). Contudo, os extratos AQ e HA não digeridos apresentaram maior capacidade de inibição da AChE (27,38% e 28,31%, respetivamente) em comparação com os respetivos digestos. Pelo contrário, no extrato AL, as percentagens de inibição diminuíram após as fases oral e gástrica, aumentando após a fase intestinal para 37,70%, sendo ligeiramente superior à percentagem de inibição do extrato não digerido (31,17%). Este ligeiro aumento após a fase intestinal em comparação com o extrato não digerido corrobora com os resultados obtidos para o TPT, no qual o processo digestivo levou a um aumento da concentração de compostos fenólicos. Estes resultados sugerem uma melhoria da atividade anticolinérgica associada a estes compostos, conduzindo a um aumento das propriedades neuroprotetoras. Esta tendência observada ao longo do processo digestivo foi também evidenciada após a digestão simulada de extratos de casca da castanha preparados por diferentes técnicas de extração (37,14%, 40,34%, e 45,19% após a fase intestinal, respetivamente, para extratos preparados por extração convencional, EFS e ESA, com melhores percentagens de inibição nos extratos não digeridos, respetivamente, 68,02%, 70,79%, e 74,47%) (41, 47, 83).

Os resultados dos extratos não digeridos estão de acordo com os obtido por Pinto *et al.* (6) no subproduto de *S. ramosissima* por extração convencional em que obtiveram um valor de 32,34% à concentração de 1000 µg/mL.

4.3.6. Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

O *stress* oxidativo é minimizado pelas enzimas antioxidantes que diminuem os efeitos tóxicos de espécies pró-oxidantes (41). A atividade destas enzimas diminui com a idade e com uma alimentação desequilibrada, sendo este efeito contrariado por compostos bioativos que aumentem a sua atividade (41). Na Tabela 6, encontram-se os apresentados os resultados do efeito dos extratos não digeridos e digestos na atividade das enzimas antioxidantes e LPO.

Tabela 6: Efeitos dos extratos de *M. nodiflorum* preparados por EAU nas atividades das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica antes e depois da digestão *in vitro*.

			CAT (nmol/min/g ES)	GSH-Px (μ mol/min/g ES)	SOD (μ mol/min/g ES)	LPO (nmol MDA/mg ES)
Aquoso	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	33,28 $\pm$ 4,50 ^a	52,48 $\pm$ 8,00 ^b	63,29 $\pm$ 1,02 ^b	198,43 $\pm$ 20,67 ^c
		Gástrico	31,85 $\pm$ 2,86 ^a	93,33 $\pm$ 2,31 ^b	32,25 $\pm$ 0,17 ^d	612,39 $\pm$ 81,88 ^b
		Intestinal	32,40 $\pm$ 1,75 ^a	276,23 $\pm$ 74,25 ^a	70,77 $\pm$ 1,02 ^a	3938,27 $\pm$ 67,73 ^a
	Extrato não digerido		24,38 $\pm$ 2,25 ^{a,2}	154,34 $\pm$ 44,56 ^{a,1}	43,36 $\pm$ 2,22 ^{1, c}	228,09 $\pm$ 34,45 ^{c, 2}
Hidroalcoólico	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	73,01 $\pm$ 6,74 ^b	47,46 $\pm$ 8,55 ^b	46,86 $\pm$ 2,73 ^b	427,44 $\pm$ 27,56 ^b
		Gástrico	98,16 $\pm$ 8,52 ^b	153,99 $\pm$ 10,25 ^a	37,20 $\pm$ 1,02 ^c	332,08 $\pm$ 55,13 ^b
		Intestinal	323,45 $\pm$ 24,30 ^a	171,61 $\pm$ 13,20 ^a	66,18 $\pm$ 1,71 ^a	1984,83 $\pm$ 116,55 ^a
	Extrato não digerido		60,94 $\pm$ 4,50 ^{b,2}	98,39 $\pm$ 23,65 ^{b,1}	32,97 $\pm$ 1,20 ^{1, c}	380,35 $\pm$ 43,07 ^{b, 2}
Alcoólico	Digestão simulada <i>in vitro</i>	Oral	92,09 $\pm$ 9,44 ^b	64,69 $\pm$ 13,64 ^c	41,79 $\pm$ 2,73 ^b	383,58 $\pm$ 0,00 ^c
		Gástrico	53,73 $\pm$ 4,81 ^b	134,23 $\pm$ 2,63 ^b	50,97 $\pm$ 1,71 ^b	368,20 $\pm$ 58,37 ^c
		Intestinal	130,46 $\pm$ 16,80 ^b	178,46 $\pm$ 7,67 ^a	65,82 $\pm$ 0,17 ^a	3178,72 $\pm$ 133,09 ^b
	Extrato não digerido		447,18 $\pm$ 62,94 ^{a,1}	104,50 $\pm$ 9,55 ^{b,1}	22,10 $\pm$ 4,61 ^{2, c}	3748,45 $\pm$ 223,95 ^{a,1}

Letras diferentes (a, b e c) denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os digestos do mesmo extrato. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Números diferentes (1, 2 e 3) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados dos extratos não digeridos. Os digestos foram testados diretamente, enquanto os extratos não digeridos foram testados a 10 mg/mL.

O extrato AL não digerido evidenciou melhor atividade da CAT (447,15 nmol/min/g ES), sendo 7,3 vezes superior ao extrato HA e 18,3 vezes superior ao extrato AQ ($p < 0,05$). Contudo, após a digestão simulada *in vitro* do extrato AL, houve perda de atividade da CAT nas fases oral e gástrica, com uma ligeira subida na fase intestinal, mas sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as fases digestivas. O extrato AQ apresentou valores muito baixos de atividade de CAT, não se verificando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os digestos e extrato não digerido. Os melhores resultados da atividade de CAT, após digestão, foram obtidos no extrato HA. Com efeito, a capacidade de regular a atividade da enzima CAT aumentou ao longo do processo digestivo pela seguinte ordem: extrato não digerido < oral < gástrico < intestinal. Após a fase intestinal, o aumento da atividade da CAT foi 5,3 vezes superior em relação ao extrato não digerido.

A atividade da GSH-Px nos três extratos melhorou após o processo digestivo, obtendo-se valores superiores aos obtidos nos extratos não digeridos. Comparativamente aos extratos não digeridos, após a fase intestinal, a atividade da GSH-Px aumentou 1,7 vezes nos três extratos, sendo o melhor resultado obtido no extrato AQ.

Foi observada uma resposta semelhante para a atividade da SOD, com aumentos de 1,6, 2 e 2,9 vezes, respetivamente, após a digestão intestinal dos extratos AQ, HA e AL, em comparação com os extratos não digeridos, verificando-se diferenças significativas ($p < 0,05$).

A LPO ocorre, normalmente, por influência das ERO, resultando na produção de MDA. Com efeito, a LPO é um indicador útil de lesões oxidativas nos tecidos vivos, desempenhando um papel fundamental na patogénese de várias doenças crónicas (47). Em oposição aos resultados das enzimas antioxidantes, após a fase intestinal, houve perda da proteção contra a LPO. Os extratos não digeridos (exceto o AL), após as fases oral e gástrica, evidenciaram uma resposta mais protetora, comparativamente com a fase intestinal. O melhor resultado foi obtido no extrato AQ após a fase oral (198,43 nmol MDA/g ES), seguido do seu extrato não digerido (220,09 nmol MDA/g ES).

No geral, o processo digestivo melhorou a atividade das enzimas antioxidantes estudadas, o que corrobora, uma vez mais, os resultados obtidos para o TPT. Após a fase intestinal, o extrato AQ revelou melhor atividade das enzimas antioxidantes, exceto na CAT.

No estudo realizado por Pinto *et al.* (41, 47) em casca de castanha houve um comportamento semelhante durante a digestão simulada, em que as digestões intestinal e gástrica melhoraram mais eficientemente as atividades da SOD, CAT e GSH-Px, mas o extrato não digerido demonstrou uma melhor eficiência na atividade destas enzimas, o que corrobora com o valor de TPT que obtiveram.

4.4. Viabilidade celular

A maior parte da digestão e absorção de compostos bioativos ocorre no intestino delgado. Por esta razão, foram selecionadas duas linhas celulares intestinais, nomeadamente Caco-2 e HT29-MTX, para avaliar os potenciais efeitos dos compostos bioativos no intestino delgado (15). As células Caco-2 formam uma monocamada de células polarizadas com junções estreitas e microvilosidades, características que se assemelham aos enterócitos do intestino humano (113). Contudo, apresentam a desvantagem de não produzir muco (113). Esta desvantagem pode ser ultrapassada com recurso às células HT29-MTX, as quais produzem mucina, considerando que o muco tem influência no transporte de compostos no trato intestinal (113).

A viabilidade celular pode ser avaliada quantitativamente através da medição da absorvência dos cristais de *formazan* produzidos por redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial das células vivas (114).

Os resultados da viabilidade celular pelo ensaio de MTT estão apresentados na Figura 8.

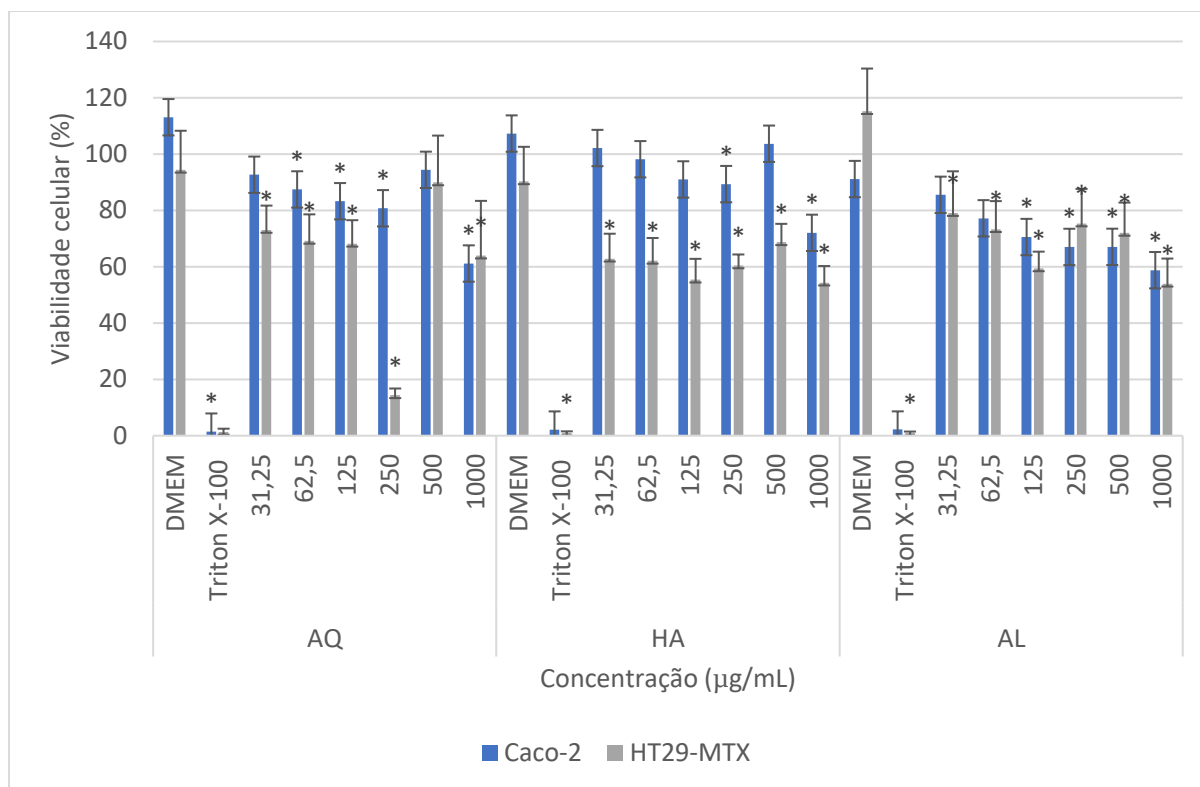


Figura 8: Efeitos dos extratos de *M. nodiflorum* preparados por EAU em diferentes concentrações na viabilidade celular de Caco-2 e HT29-MTX, através do ensaio de MTT. Os valores expressam a média $\pm$ desvio padrão (n = 3). * $p < 0,05$ versus controle.

No extrato AQ, a viabilidade celular mais elevada foi alcançada após exposição à concentração de 500 µg/mL do extrato, em ambas as linhas celulares (94% nas células Caco-2 e 90% nas HT29-MTX), sem diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparado com o controlo positivo (DMEM). Igualmente, no extrato HA, a concentração de 500 µg/mL conduziu à viabilidade celular mais elevada (104% nas Caco-2 e 69% nas HT29-MTX), tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,05$) com o controlo positivo (DMEM)

O extrato AL, de forma geral, foi o que mais diminuiu a viabilidade celular. Nas células Caco-2, em relação ao controlo, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações de 62,5 e 31,25 µg/mL, obtendo-se percentagens de viabilidade de 77% e 86%, respetivamente. No que toca às células HT29-MTX, a viabilidade celular mais elevada foi verificada após exposição à concentração de 250 µg/mL.

Fazendo uma comparação entre extratos nas mesmas concentrações, existem diferenças significativas ($p < 0,05$) na concentração de 500 µg/mL para o extrato AL nas células Caco-2. Nas células HT29-MTX, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os extratos na concentração de 250 µg/mL e na concentração de 500 µg/mL entre os extratos AQ e HA.

Com base nos resultados obtidos para ambas as linhas celulares, pode-se considerar que a concentração ótima não citotóxica foi de 500 µg/mL para os três extratos. As menores percentagens de viabilidade celular foram observadas no extrato AL, com 67% para as células Caco-2, e no extrato HA com 69% para as células HT29-MTX.

Arena *et al.* (19) avaliaram a citotoxicidade em fibroblastos HS-68 por exposição ao extrato de *M. nodiflorum* preparado por EFS. De acordo com os autores, após 48 horas, o extrato não induziu toxicidade em comparação com o controlo, concluindo que protege as células contra a mortalidade induzida pelo *stress* oxidativo. No estudo realizado por Pinto *et al.* (9) na halófita *S. ramosíssima* por extração convencional e EAM, verificaram que à concentração mais elevada testada (1000 µg/mL), a viabilidade das células HT29-MTX foi de 97,04% e 94,32%, respetivamente, para os extratos de extração convencional e EAM. Já para as células Caco-2, a amostra obtida por extração convencional conduziu a uma diminuição da viabilidade em concentrações até 1000 µg/mL e por EAM, à concentração mais elevada (1000 µg/mL), a viabilidade de Caco-2 diminuiu para 86,55% (9).

Silva *et al.* (8) avaliaram o efeito na viabilidade celular das células Caco-2 e HT29-MTX após exposição do extrato de *D. crassifolium*, ao qual verificaram que à concentração mais elevada testada (1000 µg/mL) para o extrato AQ, a viabilidade foi de 77,35% para as células HT29-MTX e à concentração 0,1 µg/mL a viabilidade foi de 76,7% para as células Caco-2.

Num estudo realizado por Elhawary *et al.* os extratos de *M. nodiflorum* obtidos por maceração em etanol a 70% demonstraram atividade inibidora de crescimento de linhas de cancro do cólon (HCT116; IC₅₀=0,82 µ/poço), do colo do útero (HELA; IC₅₀= 0,705 µ/poço), do fígado (HEPG2; IC₅₀= 1,39 µ/poço) e pele (HFB4; IC₅₀= 1,01 µ/poço) (60).

4.5. Perfil fitoquímico (metabólico)

O perfil metabólico foi obtido através de UPLC acoplada a deteção por espectroscopia de massa. A Figura 9 apresenta o cromatograma que sintetiza os principais compostos identificados no extrato AQ de *M. nodiflorum*, após digestão intestinal, com base nos tempos de retenção (TR) e nos iões fragmentados detetados pelo espectrómetro de massa.

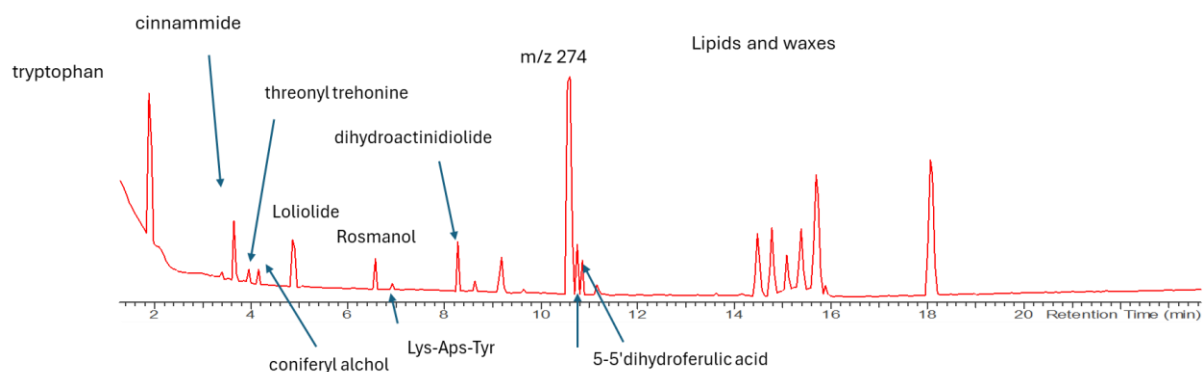


Figura 9: Principais compostos identificados no extrato AQ de *M. nodiflorum*.

O extrato AQ apresentou um número limitado de picos com absorção UV significativa e uma quantidade relativamente reduzida de picos de alta intensidade. Com base nos sinais mais intensos e nos dados obtidos por espectroscopia de massa, foram selecionados dez compostos distintos para monitorização durante os ensaios de permeação. Entre os compostos selecionados encontram-se o aminoácido triptofano; a amina cinamamida; os péptidos treonil-treonina e Lys-Asp-Tyr (lisina-aspartato-tirosina); os sesquiterpenos dihydroactinidiolida e loliolida; e, como compostos fenólicos, o álcool coniferílico (álcool fenólico), o rosmanol (fenol diterpénico) e o ácido 5,5'-dihidroferúlico (ácido hidroxicinâmico). Estes compostos têm atividade biológicas que estão descritas na seção da permeabilidade intestinal *in vitro*.

O pico principal a m/z 274 não pode ser atribuído a nenhum derivado conhecido e pode estar relacionado com a degradação de lípidos.

Durante o processo de digestão *in vitro*, a cromatografia revelou alterações limitadas na composição dos compostos. No entanto, a amostra da fase intestinal apresentou um cromatograma significativamente distinto, devido à elevada presença de sais biliares e outros constituintes do suco intestinal, como se pode observar na Figura 10.

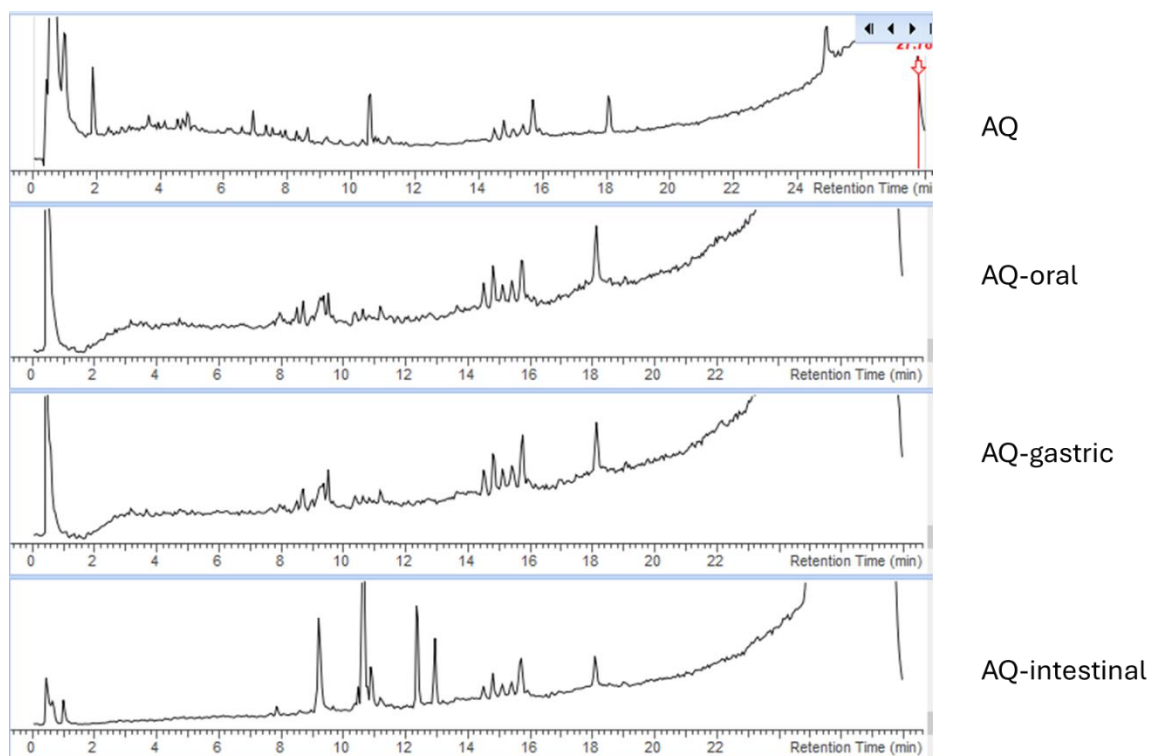


Figura 10: Cromatograma por UPLC do extrato AQ não digerido, e respectivas fases oral, gástrica e intestinal de *M. nodiflorum*.

Até à data, a literatura sobre a química desta planta é muito limitada e as plantas da espécie *Mesembryanthemum* que foram previamente estudadas, atestando a presença de classes muito diferentes de metabolitos secundários. Assim, apesar da grande quantidade de compostos menores detetados, foi avaliada a permeação dos compostos mais proeminentes.

Todos os compostos identificados no extrato AQ também foram detetados no extrato AL. O extrato AL exibiu uma composição mais diversificada, com um maior número de constituintes, os quais poderão ser analisados em maior detalhe em estudos futuros por LC-MS. Assim como, o perfil metabólico dos extratos não digeridos AQ, HA e AL será analisado com mais detalhe em estudos posteriores.

Num estudo por realizado por Elhawary *et al.* (60), foram identificados nove terpenos (tetratriacontanoato de α -amirina, torvosídeo A, ofiopogonina C, espinacósido D, (3R,9R)-3,9-dihydroxymegastigm-5-en-4-one, 6,10,14-trimetilpentadecano-2-ona, isoterpinoleno, capsianosídeo VI, e apteniol A), oito ácidos fenólicos (1,26-hexacosanediol diferulado, ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico, ferulado de metilo, 4-sulfato de ácido dihidroferúlico, 1,2-disinapoilgentiobiose, ácido dihidrocafeico, 2-fenil-4-benzopirão, e ramontosídeo), sete flavonóides (rutina, kaempferol 3-[2"-glucosil-6"-acetilgalactosídeo] 7-glucósido, kaempferol 3-O-rutinósido, apigenina-7-O-glucósido, taxifolina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo, lamprantina

II, e 2',8-dihidroxi-3',4',5',7-tetrametoxiflavano), cinco esteróis (α -linolenato de campesterilo, sitoindosídeo I, palmitato de β -sitosterol, occidentósido, e espinacósido D), três lignanas (ácido arjunólico 3-glucósido, torvósido A, e ofiopogonina C), três alcalóides (hordenina, isobutilamida do ácido 2,4,14-eicosatrienóico, e ácido tormêntico) e um composto hidrocarbonado (octano) no extrato de *M. nodiflorum* obtido por maceração em etanol a 70% (60).

Já no estudo realizado por Oliveira-Alves *et al.* (1), em extratos obtidos por extração em banho de ultrassons com etanol a 80%, foram identificados os seguintes compostos: ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico), ácidos hidroxibenzóicos, ácidos fenólicos, flavona, flavanol (hidrato de epicatequina e galocatequina), flavanona (eriodictiol e do seu derivado hexosídeo), flavonol (avicularina), flavonóides, e galotanino.

Até à data, a composição de *M. nodiflorum* por EAU não se encontra descrita na literatura.

4.6. Permeabilidade intestinal *in vitro*

Para além dos ensaios de digestão gastrointestinal, são também utilizados modelos *in vitro* de cultura celular que mimetizam a mucosa intestinal humana para prever a absorção dos nutrientes digeridos a partir dos digestos recolhidos após digestão simulada *in vitro* (76, 115). Os modelos de cultura celular, comparados com os modelos *in vivo*, são de baixo custo, pouco morosos e apresentam vantagens em termos de preocupações éticas (76). Como alternativa aos modelos *in vivo*, o modelo de co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX tem sido habitualmente usado para avaliação da permeação intestinal de compostos bioativos (76, 115).

Na Figura 11 encontram-se as medições de TEER durante os 21 dias de co-cultura (A) e durante os 240 minutos do ensaio de permeabilidade (B). Este método não invasivo é aplicado para monitorizar as células vivas durante várias fases de crescimento e diferenciação, permitindo confirmar a integridade e a permeabilidade das culturas celulares através da sua condutância iónica (116-118). Uma redução dos valores de TEER pode ser um indicador de diminuição da integridade da membrana (118).

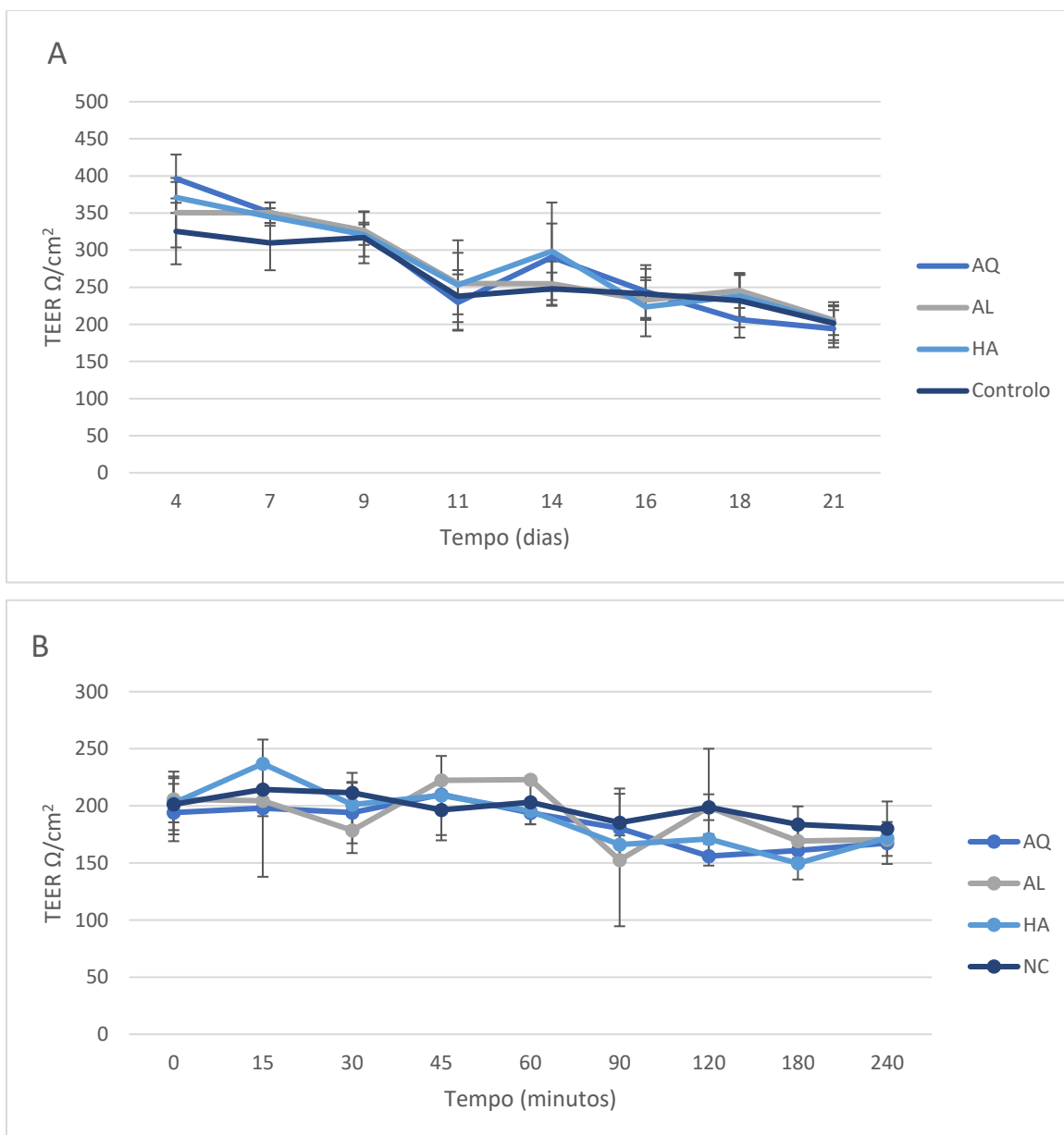


Figura 11: Medições da TEER durante 21 dias de modelo celular de co-cultura (90% Caco-2 e 10% HT29-MTX) em membranas Transwell® (A) e durante os 240 minutos do ensaio de permeabilidade (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$) de duas experiências independentes.

De acordo com a Figura 11 A, os valores de TEER nos poços onde se testaram os digestos de *M. nodiflorum* tiveram um decréscimo gradual para os três extratos até ao 11º dia (229,5 Ω/cm^2 no AQ, 255 Ω/cm^2 no AL, 253 Ω/cm^2 no HA e 238,1 Ω/cm^2 no controlo). Ao 14º dia houve um ligeiro aumento dos valores de TEER (290,5 Ω/cm^2 no AQ, 254,8 Ω/cm^2 no AL, 298,5 Ω/cm^2 no HA e 248,1 Ω/cm^2 no controlo), atingindo os valores mais baixos ao 21º dia (194,2 Ω/cm^2 no AQ, 205,7 Ω/cm^2 no AL, 202,5 Ω/cm^2 no HA e 201,5 Ω/cm^2 no controlo).

Os modelos de co-cultura com células HT29-MTX originam valores de TEER mais baixos do que modelos só com células Caco-2, uma vez que estas células segregam muco que modula as junções estanques das células Caco-2, originando espaços intracelulares (47, 117, 119).

Durante o ensaio de 240 minutos (Figura 111 B), os valores de TEER mantiveram-se constantes, variando entre 156 Ω/cm^2 (aos 120 minutos) e 210 Ω/cm^2 (aos 45 minutos) no digesto AQ, entre 152,6 Ω/cm^2 (aos 90 minutos) e 223 Ω/cm^2 (aos 45 minutos) no digesto AL, entre 149,7 Ω/cm^2 (aos 180 minutos) e 237 Ω/cm^2 (aos 15 minutos) no digesto HA e entre 214,4 Ω/cm^2 (aos 15 minutos) e 180 Ω/cm^2 (aos 240 minutos) no controlo. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.* (76) na permeação do extrato da folha de *Actinidia arguta*, bem como por Pinto *et al.* (47) na avaliação da permeação do extrato da casca de *Castanea sativa* Mill e Teixeira *et al.* (119) na permeação do extrato de bagas de *Lycium barbarum* L.

Vários parâmetros podem influenciar a permeação intestinal, tais como a concentração, o tamanho molecular, a estrutura e a hidrofiliicidade do composto, o tempo de permeação e o TEER (47, 119).

Como anteriormente foi referido, foram selecionados dez compostos diferentes para serem monitorizados durante os ensaios de permeação. Na Tabela 7 encontra-se resumidos os compostos detetados e quantificados nos diferentes pontos temporais.

Tabela 7: Permeabilidade intestinal dos digeridos intestinais do extrato aquoso de *M. nodiflorum*.

Tempo de retenção (TR) (min)	[M+H] (m/z)	Fórmula química	Compostos	Permeação (%)								
				15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	Apical 240 min
1,98	205,0975	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	0,66 ± 0,03 ^b	2,00 ± 0,10 ^b	2,39 ± 0,12 ^b	5,31 ± 0,27 ^b	85,31 ± 4,27 ^a	87,50 ± 4,38 ^a	92,19 ± 4,61 ^a	92,50 ± 4,63 ^{a,2}	12,81 ± 0,64 ¹
3,65	284,1037	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃	Cinamamida	-	-	-	-	-	-	-	-	0,98 ± 0,05
3,97	221,11665	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₅	Treonil-treonina	-	-	-	-	-	-	-	-	73,60 ± 3,68
4,14	181,08564	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	Álcool coniferílico	-	-	9,41 ± 0,47 ^c	11,91 ± 0,60 ^b	12,19 ± 0,61 ^b	12,50 ± 0,63 ^b	13,75 ± 0,69 ^b	17,50 ± 0,88 ^{a,2}	82,28 ± 4,11 ¹
4,9	197,11724	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	Loliolida	-	-	-	-	-	-	-	-	74,39 ± 3,72
6,26	331,20923	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	Rosmanol	3,06 ± 0,15 ^c	29,69 ± 1,48 ^b	34,38 ± 1,72 ^b	50,00 ± 2,50 ^a	51,56 ± 2,58 ^a	52,81 ± 2,64 ^a	56,88 ± 2,84 ^a	59,06 ± 2,95 ^{a,2}	92,98 ± 4,65 ¹
6,56	425,19225	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₇	Lys-Asp-Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	94,13 ± 4,71
8,28	181,1224	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	Dihidroactinidiolida	-	-	-	-	-	-	-	-	92,75 ± 4,64
10,4	391,13625	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	Ácido 5,5'-Dihidroferúlico	0,50 ± 0,03 ^c	4,84 ± 0,24 ^b	11,31 ± 0,57 ^b	11,94 ± 0,60 ^b	14,06 ± 0,70 ^a	14,22 ± 0,71 ^a	15,16 ± 0,76 ^a	15,38 ± 0,77 ^{a,2}	86,54 ± 4,33 ¹
10,56	391,13625	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	Ácido 5,5'-Dihidroferúlico	0,58 ± 0,03 ^c	4,66 ± 0,23 ^b	11,38 ± 0,57 ^b	12,03 ± 0,60 ^b	13,59 ± 0,68 ^a	14,38 ± 0,72 ^a	15,25 ± 0,76 ^a	15,41 ± 0,77 ^{a,2}	78,80 ± 3,94 ¹

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de tempo de cada composto. Números diferentes (1 e 2) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os fluídos no compartimento apical e no compartimento basolateral aos 240 minutos.

O triptofano (TR: 1,8 min) foi o principal composto identificado e quantificado em todos os tempos analisados, alcançando uma permeabilidade intestinal de 92,5% aos 240 min. O triptofano é um aminoácido essencial obtido apenas pela alimentação, sendo fundamental na biossíntese de proteínas e o precursor de compostos bioativos importantes, influenciando processos como a função neuronal, o metabolismo, a inflamação, o *stress* oxidativo, as respostas imunitárias e a homeostasia intestinal (120).

Por outro lado, o rosmanol (TR: 6,26 min) foi o principal composto determinado no primeiro tempo analisado (3,06%), atingindo uma permeabilidade de 59,06% no último ponto. O ácido 5-5'-Dihidroferúlico, com TR 10,4 e 10,56, apareceu também no primeiro tempo (0,5% e 0,58%, respectivamente), atingindo uma permeabilidade de 15,38% e 15,41%, respectivamente, no tempo final. O álcool coniferílico foi detectado aos 45 minutos (TR: 4,14), alcançando uma permeabilidade intestinal de 17,50%. As taxas de permeabilidade mais baixas podem dever-se à sua biotransformação em metabolitos e baixa solubilidade em solventes aquosos, influenciando a permeação intestinal (121). O rosmanol tem sido referenciado como potente antioxidante e anti-inflamatório devido às suas capacidades de inibição da produção de aniões superóxido, bem como da LPO e capacidade de eliminação de radicais livres (122). Um estudo *in vitro* também demonstrou que o rosmanol inibe a proliferação do cancro do cólon e do neuroblastoma humano (122).

Relativamente à cinamamida, verifica-se uma diminuição de 99,02% no compartimento apical após 240 minutos, no entanto o composto não foi detectado no compartimento basolateral, o que sugere que possa ter ficado retido na barreira celular intestinal, impedindo a sua passagem para o compartimento basolateral. Este fenómeno pode dever-se à sua estrutura química complexa, com múltiplos anéis, ou à sua biotransformação em metabolitos difíceis de identificar, devido à ausência de padrões de referência e à presença de componentes celulares que interferem com os métodos de deteção (47).

Já os compostos dihidroactinidiolida, Lys-Asp-Tyr, Loliolida e Treonil-treonina, não atravessaram o modelo utilizado, uma vez que não foram identificados no compartimento basolateral após 240 minutos. Só uma pequena percentagem (26,4%, 25,61%, 5,87%, 7,25%, respectivamente) destes compostos ficaram retidos na barreira intestinal.

Os compostos retidos na barreira celular podem também exercer benefícios para a saúde (tais como a citoproteção celular), atenuando as consequências do *stress* oxidativo implicado no transporte de compostos através das membranas celulares (121).

5. Conclusão e perspectivas futuras

O presente estudo forneceu novos dados sobre a valorização da halófita *M. nodiflorum* para aplicação nutracêutica, através do estudo dos efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* e da permeabilidade intestinal na bioacessibilidade e bioatividade dos compostos extraídos.

Neste trabalho, três extratos da *M. nodiflorum* foram obtidos por EAU, uma técnica verde e amigável ao ambiente, utilizando três tipos de solvente, AQ, HA e AL, todos designados como solventes GRAS. Nos resultados de rendimento de extração, não se observaram diferenças significativas entre os três extratos, mas, na maioria dos ensaios, o extrato AL foi o que apresentou melhores resultados (TPT: 13,49 mg EAG/g ES; TFT: 12,48 mg EC/g ES; FRAP: 30,98 mg ESF/g ES; $O_2^{\bullet-}$: $IC_{50}=32,12 \mu\text{g/mL}$; $ROO^{\bullet}$: 230,58 $\mu\text{g TE/mg ES}$; AChE: 31,17%; CAT: 447,15 nmol/min/g ES).

Os resultados da digestão *in vitro* simulada demonstraram um aumento do TPT (21,25 mg EAG/g ES), da capacidade antioxidante (33,84 mg ESF/g ES) e antiradicalar (23,72 mg EAA/g ES) pela seguinte ordem: oral < gástrica < intestinal. As taxas de recuperação de polifenóis e flavonoides aumentaram ao longo do processo digestivo, atingindo valores máximos após a digestão intestinal (percentagens de recuperação dos fenólicos de 385% no AQ, 262% no HA e 157% no AL; percentagens de recuperação de flavonoides de 51% no AQ, 58% no HA e 53% no AL). Estes resultados corroboram com os resultados da TPT e da TFT, indicando que os compostos fenólicos e flavonoides se tornaram mais bioacessíveis após a ação das enzimas e das alterações de pH na digestão *in vitro*. Contudo, os extratos não digeridos evidenciaram maior capacidade de captação de espécies reativas em comparação com os digestos intestinais, sendo o HOCl a espécie que revelou as melhores eficiências após a digestão *in vitro*.

O extrato AL demonstrou melhor capacidade neuroprotetora (37,7% após a digestão intestinal e 37,17% no extrato não digerido). Contrariamente, o extrato AQ e HA evidenciaram melhores resultados no extrato não digerido (27,38% e 28,31%, respectivamente). De forma geral, o processo digestivo melhorou a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GSH-Px e SOD), mas os extratos não digeridos evidenciaram uma resposta mais protetora contra a LPO, comparativamente com a fase intestinal.

Um dos objetivos deste trabalho também passou pela avaliação da toxicidade dos extratos de *M. nodiflorum* em linhas celulares intestinais, nomeadamente Caco-2 e HT29-MTX, tendo-se verificado que à concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ os extratos não apresentaram efeitos adversos em ambas as linhas celulares intestinais.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos e digestos terá seguimento em estudos posteriores. Foram identificados 10 compostos na fase intestinal no extrato AQ (triptofano, cinamamida, treonil-treonina, Lys-Asp-Tyr, dihidroactinidiolida, loliolida, álcool coniferílico, rosmanol e o ácido 5,5'-dihidroferúlico).

No modelo de co-cultura intestinal composto por células Caco-2 e HT29-MTX, o composto com maior percentagem de permeabilidade foi o triptofano (92,5%), seguido do rosmanol (59,06%), o ácido 5,5'-dihidroferúlico (15,38% e 15,41%) e o álcool coniferílico (17,50%). A cinamamida, embora não tenha permeado para o compartimento basolateral, registou uma diminuição de 99,02% no compartimento apical após 240 minutos, sugerindo que possa ter ficado retida na barreira celular intestinal, impedindo a sua passagem para o compartimento basolateral. Por outro lado, os compostos dihidroactinidiolida, Lys-Asp-Tyr, loliolida e treonil-treonina não atravessaram o modelo utilizado, uma vez que não foram identificados no compartimento basolateral após 240 minutos. Apenas uma pequena percentagem (26,4%, 25,61%, 5,87%, 7,25%, respetivamente) destes compostos ficaram retidos na barreira intestinal.

Numa perspetiva futura e de continuidade do presente trabalho, irão ser analisadas em maior detalhe o perfil metabólico dos extratos não digeridos e digeridos. Também deverão ser tidas em conta a realização de análises toxicológicas (por exemplo, pesticidas, metais, etc.), uma vez que estas plantas se desenvolvem em *habitats* salinos caracterizados por apresentarem água e solos de baixa qualidade.

Os resultados obtidos podem representar um ponto de partida para estudos mais aprofundados sobre os compostos libertados durante as fases de digestão *in vitro* e após a fermentação da microbiota, a fim de avaliar os potenciais benefícios para a saúde. Esta espécie tem sido referenciada com atividade antimicrobiana, pelo que seria interessante explorar esta atividade, especialmente em bactérias multirresistentes.

De igual modo, seria interessante explorar o valor nutracêutico de subprodutos, como raízes e sementes, para a aplicação na cosmética.

Referências Bibliográficas

1. Oliveira-Alves SC, Andrade F, Sousa J, Bento-Silva A, Duarte B, Caçador I, *et al.* Soilless Cultivated Halophyte Plants: Volatile, Nutritional, Phytochemical, and Biological Differences. *Antioxidants*. 2023;12(6):1161–96.
2. Litalien A, Zeeb B. Curing the earth: A review of anthropogenic soil salinization and plant-based strategies for sustainable mitigation. *Science of the Total Environment*. 2020;698.
3. Lopes M, Sanches-Silva A, Castilho M, Cavaleiro C, Ramos F. Halophytes as source of bioactive phenolic compounds and their potential applications. 2023. p. 1078–101.
4. Ben Hsouna A, Michalak M, Kukula-Koch W, Ben Saad R, Ben Romdhane W, Zeljković SC, *et al.* Evaluation of Halophyte Biopotential as an Unused Natural Resource: The Case of *Lobularia maritima*. *Biomolecules*. 2022;12(11):1583.
5. Lima AR, Gama F, Cruz RMS, Castañeda-Loaiza V, Costa C, Schüller LM, *et al.* Nutritional and functional evaluation of *Inula crithmoides* and *Mesembryanthemum nodiflorum* grown in different salinities for human consumption. *Molecules*. 2021;26(15).
6. Pinto D, Reis J, Silva AM, Salazar M, Dall'Acqua S, Delerue-Matos C, *et al.* Valorisation of *Salicornia ramosissima* biowaste by a green approach – An optimizing study using response surface methodology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2021;24.
7. Correia A, Silva AM, Moreira MM, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Salazar M, *et al.* *Salicornia ramosissima*: A New Green Cosmetic Ingredient with Promising Skin Effects. *Antioxidants*. 2022;11(12).
8. Silva AM, Moreira MM, Teixeira F, Ferraz R, Salazar M, Delerue-Matos C, *et al.* Insights into the Bioactive Composition, Antioxidant Properties and *In Vitro* Cell Effects of *Disphyma crassifolium*. *Foods* [Internet]. 2024;13(8).
9. Silva AM, Lago JP, Pinto D, Moreira MM, Grosso C, Fernandes VC, *et al.* *Salicornia ramosissima* bioactive composition and safety: Eco-friendly extractions approach (microwave-assisted extraction vs. conventional maceration). *Applied Sciences (Switzerland)*. 2021;11(11).
10. Martineau-Côté D, Achouri A, Pitre M, L'Hocine L, Karboune S, Wanasundara J. Investigation of the nutritional quality of raw and processed Canadian faba bean (*Vicia faba* L.) flours in comparison to pea and soy using a human *in vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Research International*. 2023;173.
11. Ciont C, Ranga F, Lelia Pop O, Cristian Vodnar D, Szabo K, Simon E, *et al.* Phenolic profile of micro- and nano-encapsulated olive leaf extract in biscuits during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 2023;428.
12. Pinto D, Moreira MM, Švarc-Gajić J, Vallverdú-Queralt A, Brezo-Borjan T, Delerue-Matos C, *et al.* *In-vitro* gastrointestinal digestion of functional cookies enriched with chestnut shells extract: Effects on phenolic composition, bioaccessibility, bioactivity, and α -amylase inhibition. *Food Bioscience*. 2023;53.
13. Rodrigues MJ, Castañeda-Loaiza V, Placines C, Pereira C, Custódio L, Monteiro I, *et al.* Growth performance, *in vitro* antioxidant properties and chemical composition of the halophyte *Limonium algarvense* Erben are strongly influenced by the irrigation salinity. *Industrial Crops and Products*. 2020;143.
14. Amin E, Abdel-Bakky MS, Mohammed HA, Chigrupati S, Qureshi KA, Hassan MHA. Phytochemical Analysis and Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Five Halophytes from Qassim Flora. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2022;31(4):3005–12.

15. Almeida D, Pinto D, Santos J, Vinha AF, Palmeira J, Ferreira HN, *et al.* Hardy kiwifruit leaves (*Actinidia arguta*): An extraordinary source of value-added compounds for food industry. Food Chemistry. 2018;259:113–21.
16. Castañeda-Loaiza V, Oliveira M, Santos T, Schüler L, Lima AR, Gama F, *et al.* Wild vs cultivated halophytes: Nutritional and functional differences. Food Chemistry. 2020;333.
17. Custodio L, Garcia-Caparrós P, Pereira CG, Castelo-Branco P. Halophyte Plants as Potential Sources of Anticancer Agents: A Comprehensive Review. Pharmaceutics. 2022;14(11):2406–50.
18. Sousa G, Alves MI, Ferreira-Dias S, Neves M, Tecelão C. Enrichment of Sunflower Oil with Ultrasound-Assisted Extracted Bioactive Compounds from *Crithmum maritimum* L. Foods. 2022;11(3).
19. Arena R, Manuguerra S, Renda G, Messina CM, Santulli A, Collins E, *et al.* Antioxidant properties of a supercritical fluid extract of the halophyte *Mesembryanthemum nodiflorum* L. from sicilian coasts: Nutraceutical and cosmeceutical applications. Applied Sciences (Switzerland). 2020;10(7).
20. Cardoso M, Silva H, Patinha C, Costa N, Nunes S, Cunha Â. From the saltpan to the plate: An evaluation of the use of the edible halophyte *Salicornia ramosissima* in catering. Annals of Applied Biology. 2022;180(1):99–108.
21. Farzana T, Guo Q, Rahman MS, Rose TJ, Barkla BJ. Salinity and nitrogen source affect productivity and nutritional value of edible halophytes. 2023. p. e0288547–e.
22. Rossio: *Mesembryanthemum nodiflorum*. RiaFresh®; 2024. Disponível em: <https://riafresh.com/produto/rossio/> (Acedido a 19/06/2024).
23. Carapeto A, Porto MJC, Tavares J, Clamote F, Gomes C, Neiva J, Chozas S, *et al.* *Mesembryanthemum nodiflorum* L. – mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica; 2024 Disponível em: <http://www.flora-on.pt/#wMesembryanthemum+nodiflorum> (Acedido a 19/06/2024).
24. Doudach L, Meddah B, Alnamer R, Faouzi M, Cherrah Y, Abdelhakim E, *et al.* *In vitro* Antibacterial Potential Activity of the Methanolic and Aqueous Extracts of *Corrigiola telephiifolia* Pourr. and *Mesembryanthemum nodiflorum*. Journal of Biologically Active Products from Nature. 2012;2(5):284–91.
25. Savic IM, Savic Gajic IM. Development of the Sustainable Extraction Procedures of Bioactive Compounds from Industrial Food Wastes and Their Application in the Products for Human Uses. Sustainability. 2023;15(3).
26. Usman I, Hussain M, Imran A, Afzaal M, Saeed F, Javed M, *et al.* Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. International Journal of Food Properties. 2022;25(1):1215–33.
27. Gattuso A, Piscopo A, Romeo R, De Bruno A, Poiana M. Recovery of Bioactive Compounds from Calabrian Bergamot Citrus Waste: Selection of Best Green Extraction. Agriculture; Basel. 2023;13(5):1095–109.
28. López-Salas L, Expósito-Almellón X, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A. Design of experiments for green and GRAS solvent extraction of phenolic compounds from food industry by-products – A systematic review. Trends in Analytical Chemistry. 2024;171.
29. More PR, Jambrak AR, Arya SS. Green, environment-friendly and sustainable techniques for extraction of food bioactive compounds and waste valorization. Trends in Food Science & Technology. 2022;128:296–315.

30. Rahaman A, Kumari A, Farooq MA, Zeng X-A, Hassan S, Khalifa I, *et al.* Novel Extraction Techniques: An Effective Way to Retrieve the Bioactive Compounds from Saffron (*Crocus Sativus*). Food Reviews International. 2023;39(5):2655-83.
31. Ashok B, Susmita D, Aiping X, Yong D, Ziggiju Mesenbet B, Rana R, *et al.* Ultrasound-assisted extraction (UAE) of antioxidant phenolics from *Corchorus olitorius* leaves: a response surface optimization. Chemical and Biological Technologies in Agriculture. 2023;10(1):1-18.
32. Ultrasound-assisted Extraction as a Potential Method to Enhanced Extraction of Bioactive Compound. Nusantara Science and Technology Proceedings; 2022 2022-11-22: Galaxy Science.
33. Marhamati M, Kakhaki ZK, Rezaie M. Advance in Ultrasound-Assisted Extraction of Edible Oils: A Review. Journal of Nutrition, Fasting & Health. 2020;8(4):220-30.
34. Lameirão F, Pinto D, Vieira EF, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Costa P, *et al.* Green-sustainable recovery of phenolic and antioxidant compounds from industrial chestnut shells using ultrasound-assisted extraction: Optimization and evaluation of biological activities *in vitro*. Antioxidants. 2020;9(3).
35. Patra A, Abdullah S, Pradhan RC. Application of artificial neural network-genetic algorithm and response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cashew apple bagasse. Journal of Food Process Engineering. 2021;44(10):1-15.
36. Sanjaya YA, Tola PS, Rahmawati R. Ultrasound-assisted Extraction as a Potential Method to Enhanced Extraction of Bioactive Compound. Nusantara Science and Technology Proceedings; 2022 2022-11-22: Galaxy Science.
37. Dash DR, Pathak SS, Pradhan RC. Improvement in novel ultrasound-assisted extraction technology of high value-added components from fruit and vegetable peels. Journal of Food Process Engineering. 2021;44(4):1-11.
38. Kobus Z, Krzywicka M. Energy Aspects of Flavonoid Extraction from Rowanberry Fruits Using Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction. Energies (19961073). 2023;16(13):4966-79.
39. Kashyap P, Riar CS, Jindal N. Effect of extraction methods and simulated *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of Meghalayan cherry (*Prunus nepalensis*) pomace extracts. LWT. 2022;153.
40. Nicky Rahmana P, Yustisia Y, Heryanto RB, Asmaliyah A, Miswanti M, Dwila Nur R, *et al.* Advancements and challenges in green extraction techniques for Indonesian natural products: A review. South African Journal of Chemical Engineering. 2023;46(88-98):88-98.
41. Pinto D, López-Yerena A, Lamuela-Raventós R, Vallverdú-Queralt A, Delerue-Matos C, Rodrigues F. Predicting the effects of *in-vitro* digestion in the bioactivity and bioaccessibility of antioxidant compounds extracted from chestnut shells by supercritical fluid extraction – A metabolomic approach. Food Chemistry. 2024;435.
42. Johnson JB, Walsh KB, Naiker M, Ameer K. The Use of Infrared Spectroscopy for the Quantification of Bioactive Compounds in Food: A Review. Molecules. 2023;28(7):3215-47.
43. Kumar A, P N, Kumar M, Jose A, Tomer V, Oz E, *et al.* Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. Molecules. 2023;28(2):887-927.
44. Zhor C, Wafaa L, Ghzaïel I, Kessas K, Zarrouk A, Ksila M, *et al.* Effects of polyphenols and their metabolites on age-related diseases. 2023. p. 115674.
45. Dantas AM, Fernandes FG, da Silva Campelo Borges G, Magnani M. Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds in fruits and their derivatives: an overview. Food Research International. 2023;170.

46. Pinto D, Vieira EF, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Peixoto AF, Freire C, *et al.* Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry*. 2021;334.
47. Pinto D, Silva AM, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Dall'Acqua S, Sut S, *et al.* Simulated Gastrointestinal Digestion of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Shell Extract Prepared by Subcritical Water Extraction: Bioaccessibility, Bioactivity, and Intestinal Permeability by *In Vitro* Assays. *Antioxidants*. 2023;12(7).
48. Li M, Lu P, Wu H, de Souza TSP, Suleria HAR. *In vitro* digestion and colonic fermentation of phenolic compounds and their bioaccessibility from raw and roasted nut kernels. *Food & Function*. 2023.
49. Correia A, Silva AM, Moreira MM, Salazar M, Švarc-Gajić J, Brezo-Borjan T, *et al.* *Salicornia ramosissima*: A New Green Cosmetic Ingredient with Promising Skin Effects. *Antioxidants*. 2022;11(12):2449.
50. Silva AM, Lago JP, Pinto D, Moreira MM, Grosso C, Cruz Fernandes V, *et al.* *Salicornia ramosissima* Bioactive Composition and Safety: Eco-Friendly Extractions Approach (Microwave-Assisted Extraction vs. Conventional Maceration). *Applied Sciences*. 2021;11(11):4744.
51. Ferreira D, Isca VMS, Leal P, Seca AML, Silva H, Pereira M, *et al.* *Salicornia ramosissima*: Secondary metabolites and protective effect against acute testicular toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. 2018;11(1):70–80.
52. Surget G, Stiger-Pouvreau V, Le Lann K, Kervarec N, Couteau C, Coiffard LJM, *et al.* Structural elucidation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015;143:52–60.
53. Hupel M, Lecointre C, Meudec A, Poupart N, Gall EA. Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2011;401(1):36–47.
54. Produtos Riafresh® <https://riafresh.com/produtos/>: RiaFresh®; 2024 Disponível em <https://riafresh.com/produtos/> (Acedido a 19/06/2024)
55. Kim YJ, Kim HM, Kim HM, Lee HR, Jeong BR, Lee H-J, *et al.* Growth and phytochemicals of ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) as affected by various combined ratios of red and blue LEDs in a closed-type plant production system. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2021;20:100267.
56. Hanen F, Riadh K, Samia O, Sylvain G, Christian M, Chedly A. Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(9):2308–13.
57. Nartea A, Orhotohwo OL, Fanesi B, Lucci P, Loizzo MR, Tundis R, *et al.* Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) leaves and flowers: Bioactive compounds, antioxidant activity and hypoglycaemic potential. *Food Bioscience*. 2023;56:103417.
58. Alves-Silva JM, Guerra I, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Figueirinha A, *et al.* Chemical composition of *Crithmum maritimum* L. essential oil and hydrodistillation residual water by GC-MS and HPLC-DAD-MS/MS, and their biological activities. *Industrial Crops and Products*. 2020;149:112329.
59. Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A, Abdelly C, Ksouri R. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonitrile extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry*. 2014;145:1031–8.

60. Elhawary S, Hassan MHA, AbouZid S, Mohammed R, Mostafa D, Sleem AA. Comparative Phytochemical and Biological Study for *Mesembryanthemum nodiflorum* and *Aptenia cordifolia* Plants Growing in Egypt. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2020;63(7):2511–24.
61. Rod-in W, You S, Park WJ, Surayot U. *Suaeda maritima* polysaccharides attenuate LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells and antioxidative activity. *International Immunopharmacology*. 2024;137.
62. Patra JK, Dhal NK, Thatoi HN. *In vitro* bioactivity and phytochemical screening of *Suaeda maritima* (Dumort): A mangrove associate from Bhitarkanika, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011;4(9):727–34.
63. Inês João F, Ana Rita CD, Mário D, Ricardo S. Unveiling the Antioxidant Potential of Halophyte Plants and Seaweeds for Health Applications. *Oxygen*. 2024;4(2):163–80.
64. Placines C, Castañeda-Loaiza V, Rodrigues MJ, Pereira CG, Stefanucci A, Mollica A, *et al.* Phenolic profile, toxicity, enzyme inhibition, in silico studies, and antioxidant properties of *Cakile maritima* scop. (*Brassicaceae*) from southern Portugal. 2020.
65. Pereira CG, Custódio L, Rodrigues MJ, Neng NR, Nogueira JMF, Carlier J, *et al.* Profiling of antioxidant potential and phytoconstituents of *Plantago coronopus*. *Brazilian Journal of Biology*.
66. Nikolaidis MG, Margaritelis NV. Free radicals and antioxidants: appealing to magic. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2023.
67. Yaqin W, Shuang J, Yuanyuan D, Shijin X, Sergio G. Balanced basal-levels of ROS (redox-biology), and very-low-levels of pro-inflammatory cytokines (cold-inflammaging), as signaling molecules can prevent or slow-down overt-inflammaging, and the aging-associated decline of adaptive-homeostasis. *Experimental Gerontology*. 2023;172(112067–).
68. Nilsson R, Liu N-A. Nuclear DNA damages generated by reactive oxygen molecules (ROS) under oxidative stress and their relevance to human cancers, including ionizing radiation-induced neoplasia part I: Physical, chemical and molecular biology aspects. *Radiation Medicine and Protection*. 2020;1(3):140–52.
69. Qasim M, Abideen Z, Adnan MY, Gulzar S, Gul B, Rasheed M, *et al.* Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. *South African Journal of Botany*. 2017;110:240–50.
70. Maya-Cano DA, Arango-Varela S, Santa-Gonzalez GA. Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium spp*) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. *Heliyon*. 2021;7(2).
71. Zhang J, Bar-Peled L. Chemical biology approaches to uncovering nuclear ROS control. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2023;76.
72. Castro LDS, Bracht L, Peralta RM, Maróstica HVP, Comar JF, Sá-Nakanishi ABD, *et al.* Free radical quenching in liver mitochondria by selected antioxidants abundant in foods and supplements. *Food Bioscience*. 2023;54.
73. Qi Y, Xie L, Deng Z, Zhang B, Li H. Stability and antioxidant activity of 10 isoflavones and anthocyanidins during *in vitro* digestion. *Food Bioscience*. 2023;56.
74. Mohammed HA, Emwas A-H, Khan RA. Salt-Tolerant Plants, Halophytes, as Renewable Natural Resources for Cancer Prevention and Treatment: Roles of Phenolics and Flavonoids in Immunomodulation and Suppression of Oxidative Stress towards Cancer Management. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5171–200.
75. Cañas S, Rebollo-Hernanz M, Martín-Trueba M, Braojos C, Gil-Ramírez A, Benítez V, *et al.* Exploring the potential of phenolic compounds from the coffee pulp in preventing cellular oxidative stress after *in vitro* digestion. *Food Research International*. 2023;172.
76. Silva AM, Almeida A, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Dall'Acqua S, Loschi F, *et al.* Insights into the 3D *In Vitro* Permeability and *In Vivo* Antioxidant Protective Effects of Kiwiberry Leaf

Extract: A Step Forward to Human Nutraceutical Use. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(22).

77. Othman A, Inoue Y, Shimizu K, Amen Y. Phytochemical Analysis, Anti-inflammatory, and Anticancer Activities of the Halophyte Herb *Bassia indica*. Natural Product Communications. 2022;17(11).

78. Sehrawat N, Yadav M, Kumar S, Devi A, Singh R, Sharma V, *et al.* Mung bean as a potent emerging functional food having anticancer therapeutic potential: Mechanistic insight and recent updates. 2023.

79. Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Abdelly C, Mhamdi B, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. Food and Chemical Toxicology. 2009;47(8):2083–91.

80. Chen X, Lan W, Xie J. Natural phenolic compounds: Antimicrobial properties, antimicrobial mechanisms, and potential utilization in the preservation of aquatic products. Food Chemistry. 2024;440.

81. Odriozola-Serrano I, Vaz AA, Martín-Belloso O, Nogueira DP, Esparza I, Jiménez-Moreno N, *et al.* Stability and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Rosehip Extracts during *In Vitro* Digestion. Antioxidants. 2023;12(5).

82. Wojtunik-Kulesza K, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Combrzynski M, Nowakowska D, Matwijczuk A. Influence of *In Vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. Nutrients. 2020;12(5):1401–28.

83. Pinto D, Ferreira AS, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Lozano-Castellón J, Laveriano-Santos EP, *et al.* Exploring the Impact of *In Vitro* Gastrointestinal Digestion in the Bioaccessibility of Phenolic-Rich Chestnut Shells: A Preliminary Study. Separations. 2023;10(9).

84. Fernandez-Tome S. Role of Food Digestion and Digestive System in the Nutritional, Functional and Health Properties of Food Bioactives. Nutrients. 2024;16(5):712–6.

85. Zhou H, Tan Y, McClements DJ. Applications of the INFOGEST *In Vitro* Digestion Model to Foods: A Review. Annual Review of Food Science and Technology. 2023;14:135–56.

86. Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, *et al.* A Standardised Static *in Vitro* Digestion Method Suitable for Food – an International Consensus. 2014.

87. Menard O, Lavoisier A, Morzel M, Nebbia S, Dupont D, Lesmes U, *et al.* Static *in vitro* digestion model adapted to the general older adult population: an INFOGEST international consensus. Food and Function. 2023;14(10):4569–82.

88. Mulet-Cabero AI, Egger L, Portmann R, Ménard O, Le Feunteun S, Dupont D, *et al.* A standardised semi-dynamic: *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. Food and Function. 2020;11(2):1702–20.

89. Cheng M, He J, Gu Y, Wu G, Tan L, Li C, *et al.* Changes in Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jackfruit) Pulp during *In Vitro* Gastrointestinal Digestion. Antioxidants. 2024;13(1):37–49.

90. Chen X, Xu Y, Du X, Li Z, Yang Y, Jiang Z, *et al.* Effect of *Porphyra haitanensis* polyphenols from different harvest periods on hypoglycaemic activity based on *in vitro* digestion and widely targeted metabolomic analysis. Food Chemistry. 2024;437(Part 1).

91. Subbiah V, Ebrahimi F, Agar OT, Dunshea FR, Barrow CJ, Suleria HAR. *In vitro* digestion and colonic fermentation of phenolic compounds and their antioxidant potential in Australian beach-cast seaweeds. Scientific Reports. 2024;14(1):1–14.

92. Li H, Liu T, Li F, Wu X, Wu W. Effects of rice bran rancidity on the release of phenolics and antioxidative properties of rice bran dietary fiber *in vitro* gastrointestinal digestion products. Food Research International. 2023;173.

93. Matou M, Merciris P, Marianne-Pepin T, Bercion S, Nevriere R, Luz Sanchez-Villavicencio M, *et al.* Polyphenolic compounds of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. (1827) and diabetes-related activity of an aqueous extract as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Ethnopharmacology*. 2023;315.
94. Herrera-Balandrano DD, Wang J, Chai Z, Zhang X, Wang J, Wang N, *et al.* Impact of *in vitro* gastrointestinal digestion on rabbiteye blueberry anthocyanins and their absorption efficiency in Caco-2 cells. *Food Bioscience*. 2023;52.
95. Zhang L, Wu T, Zhang Y, Chen Y, Ge X, Sui W, *et al.* Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation *in vitro*. *Food Chemistry*. 2023;402.
96. Wu H, Liu Z, Lu P, Barrow C, Dunshea FR, Suleria HAR. Bioaccessibility and bioactivities of phenolic compounds from roasted coffee beans during *in vitro* digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry*. 2022;386.
97. Luo J, Li M, Wu H, Liu Z, Barrow C, Dunshea F, *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds from sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Food Processing & Preservation*. 2022;46(7):1-13.
98. Liu X, Shi J, Yi J, Zhang X, Ma Q, Cai S. The effect of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on phenolic bioaccessibility and bioactivities of *Prinsepia utilis* Royle fruits. *LWT*. 2021;138.
99. Siracusa L, Ruberto G, Kulisic-Bilusic T, Politeo O, Krause I, Dejanovic B. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(23):12453-9.
100. Silva AM, Pinto D, Moreira MM, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Costa PC. Valorization of Kiwiberry Leaves Recovered by Ultrasound-Assisted Extraction for Skin Application: A Response Surface Methodology Approach. *Antioxidants*. 2022;11(4).
101. Pinto D, Braga N, Rodrigues F, Oliveira MBPP. *Castanea sativa* Bur: An undervalued by-product but a promising cosmetic ingredient. *Cosmetics*. 2017;4(4).
102. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Barreira SVP, Nunes MA, Cunha LM, *et al.* Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops & Products*. 2014;53:350-7.
103. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
104. Pinto D, Cádiz-Gurrea MdL, Sut S, Ferreira AS, Leyva-Jimenez FJ, Dall'Acqua S, *et al.* Valorisation of underexploited *Castanea sativa* shells bioactive compounds recovered by supercritical fluid extraction with CO₂: A response surface methodology approach. *Journal of CO₂ Utilization*. 2020;40.
105. Antunes F, Andrade F, Araújo F, Ferreira D, Sarmiento B. Establishment of a triple co-culture *in vitro* cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;83(3):427-35.
106. Ozdemir M, Gungor V, Melikoglu M, Aydinler C. Solvent selection and effect of extraction conditions on ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from galangal (*Alpinia officinarum*). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2024;38.
107. Hanen F, Riadh K, Samia O, Chedly A, Christian M, Sylvain G. Interspecific variability of antioxidant activities and phenolic composition in *Mesembryanthemum* genus. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(9):2308-13.

108. Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Ritieni A. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of coffee silverskin polyphenolic extract and characterization of bioactive compounds using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules*. 2020;25(9).
109. Li M, Bai Q, Zhou J, de Souza TSP, Suleria HAR. *In Vitro* Gastrointestinal Bioaccessibility, Bioactivities and Colonic Fermentation of Phenolic Compounds in Different *Vigna* Beans. *Foods*. 2022;11(23):3884–903.
110. Muñoz-Fariña O, López-Casanova V, García-Figueroa O, Roman-Benn A, Ah-Hen K, Bastias-Montes JM, *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds in fresh and dehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry Advances*. 2023;2.
111. Pinto D, Silva AM, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Freitas V, Vallverdú-Queralt A. Microwave-Assisted Extraction as a Green Technology Approach to Recover Polyphenols from *Castanea sativa* Shells. *ACS Food Science and Technology*. 2021;1(2):229–41.
112. Lin Y-H, Lin Y-K, Lin Y-H. Photoprotective Effects of Ice Plant (*Mesembryanthemum crystallinum*) Callus Extract on Gene Expression of Human Dermal Fibroblast Against UV Exposure. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 2019;13(4):570–5.
113. Smit B, Chinaka CC, Scott AA, Gaiduschek K, Hatje E, Katouli M, *et al.* Efficacy of Selected Live Biotherapeutic Candidates to Inhibit the Interaction of an Adhesive-Invasive *Escherichia coli* Strain with Caco-2, HT29-MTX Cells and Their Co-Culture. *Biomedicines*. 2022;10(9).
114. Choi BH, Kim M-R, Jung YN, Kang S, Hong J. Interfering with Color Response by Porphyrin-Related Compounds in the MTT Tetrazolium-Based Colorimetric Assay. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1):562–76.
115. Srivarathan S, Addepalli R, Adiamo OQ, Kodagoda GK, Phan ADT, Wright ORL, *et al.* Edible Halophytes with Functional Properties: *In Vitro* Protein Digestibility and Bioaccessibility and Intestinal Absorption of Minerals and Trace Elements from Australian Indigenous Halophytes. *Molecules*. 2023;28(10):4004–21.
116. González F, García-Martínez E, Camacho M, Martínez-Navarrete N, Sarmiento B, Fernandes I, *et al.* Insights into the development of grapefruit nutraceutical powder by spray drying: physical characterization, chemical composition and 3D intestinal permeability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(10):4686–94.
117. Cuffaro D, Pinto D, Silva AM, Bertolini A, Bertini S, Saba A, *et al.* Insights into the Antioxidant/Antiradical Effects and *In Vitro* Intestinal Permeation of Oleocanthal and Its Metabolites Tyrosol and Oleocanthalic Acid. *Molecules*. 2023;28(13):5150–64.
118. Machado M, Costa EM, Silva S, Rodriguez-Alcalá LM, Gomes AM, Pintado M. Understanding the Anti-Obesity Potential of an Avocado Oil-Rich Cheese through an *In Vitro* Co-Culture Intestine Cell Model. *Molecules*. 2023;28(15):5923–34.
119. Teixeira F, Silva AM, Delerue-Matos C, Rodrigues F, Ferraz R, Sut S, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from goji berries: Optimization, bioactivity, and intestinal permeability assessment. *Food Research International*. 2024;188.
120. Xue C, Li G, Zheng Q, Gu X, Shi Q, Su Y, *et al.* Tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Metabolism*. 2023;35(8):1304–26.
121. Pinto D, Lozano-Castellón J, Margarida Silva A, de la Luz Cádiz-Gurrea M, Segura-Carretero A, Lamuela-Raventós R, *et al.* Novel insights into enzymes inhibitory responses and metabolomic profile of supercritical fluid extract from chestnut shells upon intestinal permeability. *Food Research International*. 2024;175.
122. Jiang D, Xu J, Liu S, Nasser MI, Wei W, Mao T, *et al.* Rosmanol induces breast cancer cells apoptosis by regulating PI3K/AKT and STAT3/JAK2 signaling pathways. *Oncol Lett*. 2021;22(2):631.