



Caracterização Química e Propriedades Biológicas do subproduto industrial de *Salicornia ramosissima* ? Novas perspetivas de valorização

JORGE FILIPE PEREIRA REIS

outubro de 2021

Instituto Superior de Engenharia do Porto



**Caracterização Química e Propriedades
Biológicas do subproduto industrial de *Salicornia
ramosissima* – Novas perspetivas de valorização**

Jorge Filipe Pereira Reis

Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, ramo Qualidade

Orientadores: Professora Cristina Delerue-Matos e Doutora Francisca Rodrigues

Data: setembro de 2021

Agradecimentos

A realização desta dissertação apenas foi conseguida graças ao contributo de várias pessoas a quem gostaria de deixar o meu agradecimento.

À Professora Cristina Delerue-Matos, agradeço por toda a simpatia, disponibilidade e integração no Grupo de Reações de Análises Químicas (GRAQ) que me permitiu desenvolver todo o presente estudo.

À Doutora Francisca Rodrigues, agradeço por toda a dedicação, disponibilidade, ajuda, simpatia, integração no grupo de trabalho e por me ter guiado e incentivado a ser melhor ao longo de todo este estudo.

À Diana Pinto, agradeço por todos os ensinamentos transmitidos, por toda a ajuda na realização dos ensaios, por toda a paciência e disponibilidade em todas as horas passadas no laboratório.

À Ana Margarida, agradeço pela disponibilidade, ajuda e simpatia na realização dos ensaios celulares.

À empresa RiaFresh, agradeço pelas amostras fornecidas que permitiram a realização deste estudo.

Aos meus amigos, agradeço por sempre me acompanharem e permanecem do meu lado em todas os momentos da vida.

Por fim, agradecer à minha família, em especial aos meus pais, por todo o apoio, amor, confiança e dedicação e por todos os conselhos e incentivos para alcançar os meus objetivos.

Resumo

A *Salicornia ramosissima* é uma planta halófito, pertencente à família Chenopodiaceae, que se desenvolve em zonas marinhas vulgarmente encontrada em ambientes sapais, os quais são caracterizados por uma elevada concentração salina. A produção industrial da salicórnia tem aumentado a nível nacional, muito devido às suas diversas atividades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante, antibacteriana e anticancerígena. Recentemente, as características organoléticas e sensoriais desta planta evidenciaram a sua aplicação como alternativa ao sal marinho. A nível industrial a produção de salicórnia gera elevadas quantidades de um resíduo de colheita, vulgarmente descartado. Com efeito, o presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar química e biologicamente o resíduo da produção industrial de *S. ramosissima*. Numa etapa inicial recorreu-se à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para otimizar as condições de extração dos compostos bioativos deste subproduto, com recurso à extração convencional e utilizando água como solvente. As condições ótimas de extração, que maximizaram o teor de polifenóis e as atividades antioxidante e antiradical, ocorreram à temperatura de 80° C durante um período de 10 minutos. A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio FRAP, enquanto a atividade antiradical teve por base os ensaios de captação do radical DPPH[•] e do catião ABTS^{•+}. O extrato ótimo foi igualmente avaliado quanto à capacidade de captação de espécies reativas de oxigénio (nomeadamente ácido hipocloroso (HOCl) e radical superóxido (O₂^{•-})), perfil fenólico e efeitos na viabilidade celular de queratinócitos e fibroblastos, com recurso ao ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

O extrato ótimo de salicórnia apresentou um teor de polifenóis de 891,61 µg de equivalentes de ácido gálico por 100 mg de extrato seco (µg EAG/100 mg es). As capacidades antioxidante e antiradical, estando interligadas com o teor de polifenóis, não foram elevadas (FRAP = 13,56 µmol de equivalentes de FeSO₄ por 100 mg de extrato seco (µmol ESF/100 mg es); ABTS = 1272,20 µg de equivalentes de ácido ascórbico por 100 mg de extrato seco (µg EAA/100 mg es); DPPH = 1106,10 µg de equivalentes de Trolox por 100 mg de extrato seco (µg ET/100 mg es)), no entanto o extrato ótimo apresentou um bom potencial de captação do HOCl (CMI₅₀ = 26,61 µg/mL). No que toca ao potencial de captação do radical O₂^{•-} a CMI₅₀ calculada foi de 324,82 µg/mL. O perfil fenólico, avaliado por HPLC-MS, revelou a presença de uma grande quantidade de ácidos

fenólicos (ácido 3,5-dicafeoilquínico; ácido 1,4-dicafeoilquínico e ácido 4-cafeoilquínico), bem como flavonoides (derivados de quercetina e isoramnetina). Por fim, não se verificou uma diminuição da viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos após exposição às diferentes concentrações de extrato avaliadas (0,1 – 1000 µg/mL).

O presente trabalho permitiu assim reportar a composição do subproduto industrial da produção da salicórnia, abrindo novas perspectivas de futura valorização deste resíduo para diferentes indústrias, tais como a cosmética e a alimentar.

Palavras-chave: *Salicornia ramosissima*; espécies reativas; polifenóis; sustentabilidade; valorização de resíduos industriais.

Abstract

Salicornia ramosissima is a halophyte plant from Chenopodiaceae family widely found in marine areas, particularly salt marshes characterized by a high salt concentration. The industrial production of salicornia has increased in Portugal in the last years, largely due to the different biological activities associated with its consumption, namely antioxidant, antibacterial and anticancer activities. Recently, the organoleptic and sensorial characteristics of salicornia increased its use as an alternative to sea salt. At industrial level, the production of salicornia generates large amounts of a discarded residue. Therefore, the principal aim of this work was to characterize chemically and biologically the residue of industrial production of *S. ramosissima*.

In an early stage, the Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the extraction conditions of salicornia by-product by conventional technique and using water as solvent in order to optimize the antioxidant/antiradical composition. The optimal extraction conditions occurred at a temperature of 80° C and during a period of 10 minutes. The antioxidant activity was evaluated by FRAP assay, while the antiradical activity was screened by DPPH and ABTS assays. The optimal extract was also evaluated regarding the ability to scavenge reactive oxygen species (namely hypochlorous acid (HOCl) and superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$)) as well as regarding the phenolic profile and the effects on the viability of keratinocytes and fibroblasts using the colorimetric assay of reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

The optimal extract achieved a total phenolic content of 891.61 µg gallic acid equivalents per 100 mg of dry weight (µg EAG/100 mg dw), while the antioxidant activity, evaluated by the FRAP assay, was 13.56 µmol of ferrous sulphate equivalents per 100 mg of dry weight (µmol FSE/100 mg dw). Regarding the radical scavenging capacity, the ABTS assay led to a result of 1272.20 µg of ascorbic acid equivalents per 100 mg of dry weight (µg AAE/100 mg dw), while the DPPH assay achieved a value of 1106.10 µg Trolox equivalents per 100 mg of dry weight (µg TE/100 mg dw). The capacity to scavenge the reactive oxygen species was good, particularly regarding HOCl ($IC_{50} = 26,61$ µg/mL). Nevertheless, a lower potential was observed for the scavenge of $O_2^{\bullet-}$ ($IC_{50} = 324.82$ µg/mL). The phenolic profile revealed the presence of phenolic acids (3,5-dicaffeoylquinic acid, 1,4-dicaffeoylquinic acid and 4-caffeoylquinic acid) as well as flavonoids (quercetin and isoramnetine). The cell viability assays revealed the absence

of toxic effects on fibroblasts and keratinocytes after exposure to different extract concentrations (0.1 – 1000 µg/mL).

This work allowed to report the composition of the industrial by-product of salicornia production, opening new perspectives for future valorisations in different industries, such as food and cosmetics.

Keywords: *Salicornia ramosissima*; reactive species; polyphenols; sustainability; recovery of industrial waste.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Salicornia ramosíssima</i>	2
1.2. Distribuição geográfica.....	5
1.3. Produção	6
1.4. Composição nutricional.....	8
1.5. Atividades biológicas	9
1.5.1. Atividade antioxidante.....	10
1.6. Redução do sal e utilização da salicórnia como alternativa.....	17
2. Objetivos	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Reagentes	21
3.2. Amostra.....	22
3.3. Otimização das condições de extração	22
3.4. Processo de extração dos compostos bioativos	23
3.5. Processo de extração dos compostos bioativos nas condições ótimas.....	23
3.6. Caracterização química dos extratos	24
3.6.1. Determinação do conteúdo total de polifenóis (CTP)	24
3.7. Atividade antioxidante e antiradical	24
3.7.1. Avaliação da capacidade antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)	25
3.7.2. Avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH•	25
3.7.3. Avaliação da capacidade de inibição do radical ABTS ^{•+}	26
3.8. Determinação da capacidade de captação de espécies reativas	27
3.8.1. Condições gerais.....	27
3.8.2. Determinação da capacidade de captação do radical superóxido.....	27
3.8.3. Determinação da capacidade de absorção do radical de oxigénio.....	27
3.8.4. Determinação da capacidade de captação do ácido hipocloroso	28
3.9. Análise dos compostos fenólicos por HPLC-MS	28
3.10. Viabilidade Celular	29

4. Resultados	31
4.1. Validação do desenho experimental.....	31
4.2. Efeito das variáveis independentes nas respostas e condições ótimas de extração.....	34
4.3. Avaliação da capacidade de captação de espécies reativas	41
4.4. Determinação dos compostos fenólicos	43
4.5. Viabilidade celular	46
5. Conclusão	49
Referências	50

Lista de Figuras

Figura 1. Constituintes da <i>Salicórnia ramosissima</i> . a) Caule; b) Inflorescência; c) Conjunto florífero; d) Flor; e) Perspectiva lateral da semente com restos do perianto; f) Perianto; g) Semente; h) Corte longitudinal da semente (Castroviejo, 1991).	4
Figura 2. <i>Salicórnia ramosissima</i> com folhagem verde (1) e com folhagem avermelhada (2).....	4
Figura 3. Distribuição nacional da planta <i>Salicórnia ramosissima</i> (Adaptado de Flora-On - Araujo, et al., 2021).	5
Figura 4. Esquerda: Ácido benzoico e seus derivados / Direita: Ácido cinâmico e seus derivados (Soares, 2002)	12
Figura 5. Esquema de extração dos compostos bioativos de <i>S. ramosissima</i>	23
Figura 6. Microplaca referente ao ensaio CTP.....	24
Figura 7. Microplaca referente ao ensaio FRAP	25
Figura 8. Microplaca referente ao ensaio DPPH.	26
Figura 9. Microplaca referente ao ensaio ABTS.	26
Figura 10. Gráficos 3D da superfície de resposta para os efeitos de interação de variáveis independentes de tempo (min) e temperatura (°C) nas variáveis dependentes de CTP (A), ABTS (B), DPPH (C) e FRAP (D) e no índice de desejabilidade para respostas combinadas	35
Figura 11. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-MS no extrato de subproduto de <i>salicórnia</i>	43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica da <i>S. ramosíssima</i>	3
Tabela 2. Composição nutricional segundo Associação Portuguesa da Nutrição (APN, 2018).	9
Tabela 3. Diferentes estruturas dos flavonoides (Reis Giada, 2013).	14
Tabela 4. Quantidade de sódio presente na salicórnia (APN, 2018).	19
Tabela 5. DCC e rendimento de extração (%) por EUA dos compostos bioativos do subproduto da <i>S. ramosíssima</i>	32
Tabela 6. Resumo do modelo e da análise de variância (ANOVA) das respostas aos ensaios CTP (Y1), ABTS (Y2), DPPH (Y3) e FRAP (Y4) ao extrato de salicórnia.	33
Tabela 7. Previsão das condições ótimas de extração da salicórnia.	36
Tabela 8. Capacidade de captação do anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido ($ROO^{\bullet}$) pelo extrato de subproduto de <i>S. ramosíssima</i>	41
Tabela 9. Compostos fenólicos identificados por HPLC-MS no extrato do subproduto de salicórnia.	44
Tabela 10. Viabilidade celular de HaCaT e HFF-1 após exposição ao extrato ótimo de <i>S. ramosíssima</i> . Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3).	46

Lista de Abreviaturas

ROO•	- Radical peroxilo
AAPH	- 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihirocloreto
ABTS	- Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiozolino-6-sulfónico
ADN	- Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	- Análise de variância
APN	- Associação Portuguesa de Nutrição
AVC	- Acidente Vascular Cerebral
CMI ₅₀	- Metade da concentração máxima inibitória
CTP	- Conteúdo Total de Polifenóis
DCC	- Desenho composto central
DGS	- Direção-Geral de Saúde
DHR	- Di-hidrorodamina 123
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH•	- Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EAA	- Equivalentes de ácido ascórbico
EAG	- Equivalentes de ácido gálico
EAM	- Extração assistida por micro-ondas
EAU	- Extração assistida por ultrassom
EC	- Extração convencional
EFS	- Equivalentes de Sulfato Ferroso (FeSO ₄)
ERO	- Espécies reativas de oxigénio
Es	- Extrato seco
ET	- Equivalente Trolox
FRAP	- Poder Antioxidante por Redução do Ferro (do inglês, <i>Ferric Reducing Power Assay</i>)
HaCaT	- Queratinócitos
HFF-1	- Fibroblastos
HOCl	- Ácido hipocloroso
IAN-AF	- Inquérito Alimentar Nacional-Atividade Física
MSR	- Metodologia de Superfície de Resposta
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NADH - Dinucleótido β -nicotinamida adenina
NaOCl – Hipoclorito de sódio
NBT – Cloreto de azul nitrotetrazólio
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORAC – Capacidade de Absorção do Radical de Oxigénio
PMS - Metosulfato de fenazina
ROO• - Radical peroxilo
TPTZ – Complexo 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
UV – Radiação ultravioleta

1. Introdução

As plantas halófitas representam um conjunto de seres vivos que têm como principal característica a capacidade de lidar e sobreviver em ambientes em que a concentração de sal é muito elevada. Esta característica torna-as únicas, representando a maior vantagem adaptativa destes seres vivos, uma vez que a maior parte das culturas convencionais são muito afetadas pelo *stress* salino presente nos solos utilizados para a agricultura (Ventura & Sagi, 2013). Esta família de plantas tem mecanismos evoluídos ao nível das raízes, folhas e caules que lhes conferem capacidade de sobreviver na presença de água salgada. A camada exterior – epiderme - é constituída por um conjunto de células impermeáveis ao sal, enquanto a endoderme apresenta uma camada entre as células que permite a passagem de água, com o objetivo de aumentar a concentração de sal filtrado. Algumas destas plantas apresentam um conjunto de células especializadas nas folhas - glândulas de sal - que têm a capacidade de armazenar o sal em excesso. Por seu lado, as células presentes no interior têm como principal função tratar o sal, para que este possa ser absorvido pela planta (Costa, 2001).

As plantas halófitas representam, apenas, 1% de toda a flora mundial. A necessidade de adaptação do seu metabolismo tem como principal objetivo sobreviver em ambientes hostis e segue várias estratégias (Costa, 2001):

- Aumento da diluição iónica, a qual resulta no desenvolvimento da suculência das folhas mediante o incremento da relação volume/superfície externa;
- Aumento da capacidade de absorção de alguns iões, quando na presença de elevadas concentrações de sódio no meio envolvente;
- Desenvolvimento da capacidade de acumulação, em certas partes da planta, de grandes quantidades de sais resultantes do metabolismo, os quais mais tarde são eliminados, juntamente com os órgãos que serviam como armazém;
- Desenvolvimento da capacidade de excreção de sódio em halófilos submersos, através de mecanismos de extrusões iónicas;
- Desenvolvimento de certos órgãos, ou particularidades físicas, com o objetivo de aumentar a tolerância ao sal;
- Existência de glândulas de sal, as quais são responsáveis pela composição mineral de alguns halófitos;

Além disso, as plantas halófitas podem ser divididas em três grandes grupos (Costa, 2001):

- Halófitas obrigatórias, que necessitam de ambientes salinos para o seu desenvolvimento, como é o caso da salicórnia;
- Halófitas preferenciais, que preferem ambientes salinos como meio de desenvolvimento;
- Halófitas de subsistência, que têm a capacidade de tolerar ambientes salinos.

1.1. *Salicornia ramosíssima*

A classificação taxonômica da *Salicornia ramosíssima* (vulgarmente conhecida como salicórnia) encontra-se ainda mal definida, o que aumenta a dificuldade em classificar a maioria das espécies que pertencem a esta família (Vargas et al., 2007). Na verdade, lacunas relacionadas com a falta de informação morfológica, a diversidade fenotípica e os sistemas de reprodução, contribuem para a dificuldade em reconhecer se as plantas que coabitam na mesma área e compartilham uma morfologia idêntica apresentam o mesmo genótipo (Singh et al., 2014). Esta incerteza taxonômica é ainda reforçada por dois importantes aspectos, nomeadamente, a presença de uma elevada diversidade fenotípica (os mesmos genótipos foram classificados de forma desigual em diferentes regiões) e pelas semelhanças morfológicas marcantes, acompanhadas de uma fraca diferenciação. A Tabela 1 resume a classificação taxonômica comumente mais aceite pela comunidade científica (Singh et al., 2014).

Tabela 1. Classificação taxonómica da *S. ramosíssima*.

Classificação taxonómica	
Reino	Plantae
Filo	Angiospermophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Caryophylliidae
Ordem	Caryophyllales
Família	Chenopodiaceae
Género	Salicornia
Espécie	<i>Salicornia ramosissima</i>

A salicórnia pertence à família das Chenopodiaceae e, apesar de ser considerada uma planta terrestre, é vulgarmente encontrada em zonas costeiras e em sapais, estando adaptada a elevadas temperaturas e intensidades de luz, acompanhadas por grandes períodos de seca (Isca et al., 2014). O facto de estarem adaptadas a ambientes sapais, onde os níveis de salinidade são elevados, permitiu o desenvolvimento de um mecanismo de tolerância ao sal. Para além desta característica, esta planta apresenta ainda resistência a doenças e pragas, o que aumenta o interesse dos produtores para a criação de uma agricultura sustentável. Este interesse assenta no facto da salicórnia exibir propriedades nutricionais e funcionais notáveis, particularmente no que toca a compostos bioativos (Lima et al., 2020).

Morfológicamente, a salicórnia é uma planta pequena e sem folha aparente, podendo atingir cerca de 40 cm de altura, apresentando um caule carnudo, simples ou com muitas ramificações, com uma cobertura fotossintética de aspeto suculento (Castroviejo, 1991; Isca et al., 2014). Esta halófita apresenta ramos aproximadamente retos, onde cada espículo (ponta) apresenta inflorescências caracterizada por uma cimeira de três flores nas partes terminais (Biorede, n.d.). A flor central é geralmente arredondada, apresentando um comprimento igual ou ligeiramente superior à sua largura, senda esta sempre maior do que as flores laterais (Castroviejo, 1991). Os diferentes constituintes da salicórnia encontram-se apresentados na Figura 1.

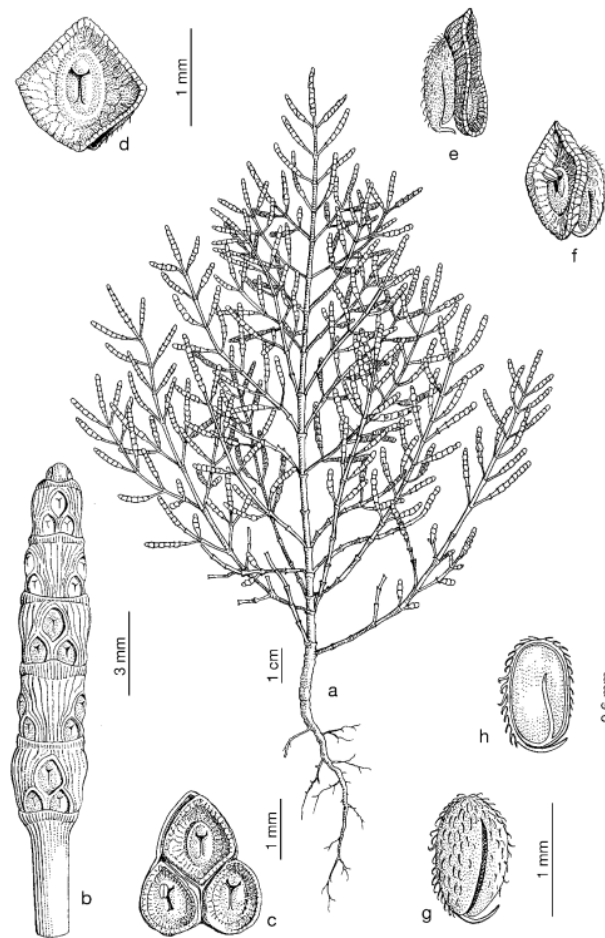


Figura 1. Constituintes da *Salicornia ramosissima*. a) Caule; b) Inflorescência; c) Conjunto florífero; d) Flor; e) Perspectiva lateral da semente com restos do perianto; f) Perianto; g) Semente; h) Corte longitudinal da semente (Castroviejo, 1991).

As suas folhas têm forma de escama e apresentam uma coloração diferente consoante a estação do ano, sendo verdes durante a primavera e o verão, e avermelhadas no outono (Figura 2).

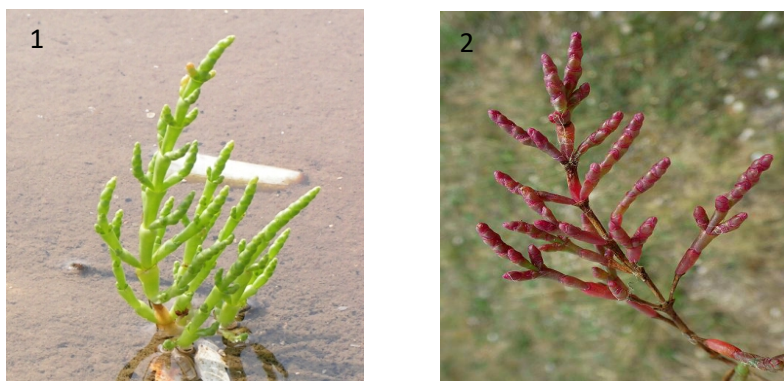


Figura 2. *Salicornia ramosissima* com folhagem verde (1) e com folhagem avermelhada (2).

1.2. Distribuição geográfica

A salicórnia tem capacidade de se desenvolver em diferentes tipos de clima, desde ambientes tropicais a climas moderados. Contudo, devido à sua tolerância ao sal, cresce preferencialmente em locais como pântanos, sapais salgados, salinas que se encontram temporariamente alagadas e litorais costeiros (Hupel et al., 2011). O seu crescimento encontra-se reportado na parte oeste da Europa, bem como na parte noroeste de África e no litoral da Península Ibérica (Isca et al., 2014). Em Portugal, esta planta está amplamente presente na zona da Ria de Aveiro, assim como no Algarve (Figura 3).

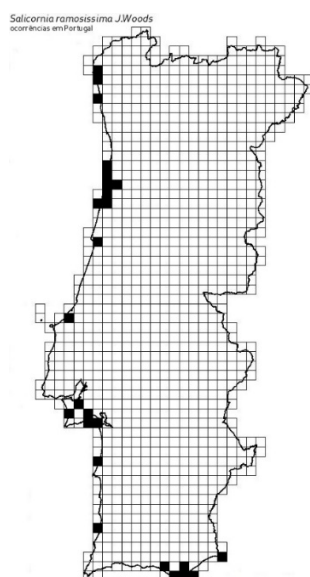


Figura 3. Distribuição nacional da planta *Salicornia ramosissima* (Araújo et al., 2021).

A salicórnia diferencia-se das outras halófitas pelo facto de ser encontrada na parte superior das marés, o que evidencia que passa grande parte do seu desenvolvimento fora de água, estando exposta durante grandes períodos à luz solar. Esta exposição é, muito provavelmente, responsável pelo teor em compostos fenólicos que apresenta, os quais lhe conferem foto-proteção (Hupel et al., 2011). Para além de sofrer grandes exposições aos raios ultravioleta (UV), a salicórnia é afetada por outros problemas que conduzem ao seu desaparecimento, nomeadamente pela seca, pelas elevadas concentrações de sal no solo, pela agitação marítima e pela biodiversidade, como a presença de algas (Watkinson & Davy, 1985).

A salicórnia pode ainda servir como proteção ao *habitat* onde se encontra, tornando-se uma das plantas mais importantes nos ecossistemas devido à sua capacidade de filtração de metais pesados e à proteção da zona costeira da abrasão marinha, provocada pela força das marés (Isca et al., 2014).

1.3. Produção

Nas últimas décadas têm-se verificado um aumento na procura de estilos de vida saudáveis, muito devido ao aumento do sedentarismo e das doenças associadas. O crescente consumo de sal na alimentação, a título exemplificativo, conduziu a um aumento das doenças cardíacas, levando a indústria alimentar a desenvolver alimentos que apresentem menores teores de sal na sua composição, mantendo simultaneamente o sabor e a textura. Um desses ingredientes recentemente introduzido é salicórnia, cujo consumo tem disparado a nível nacional. Atualmente, esta planta é considerada exótica na maioria dos mercados internacionais, sendo vulgarmente apelidada de “sal verde”. A sua procura é essencialmente feita por restaurantes *gourmet* com o objetivo de introduzir alimentos inovadores nas suas ementas (Barreira et al., 2017; Ferreira et al., 2018). Num ambiente doméstico, a sua utilização para substituição do habitual sal marinho na confeção de saladas tem apresentado um crescimento exponencial, devido às suas características organoléticas.

Com efeito, a produção de salicórnia pode representar um importante passo para a sustentabilidade, devido à utilização de solos que, sob o ponto de vista agrícola, se encontram inadequados para um cultivo convencional, transformando-se em áreas produtivas que não necessitam de água fresca. Uma das principais preocupações nos processos agrícolas é o uso de pesticidas e fertilizantes, os quais poderão ser evitados na produção desta planta, já que é altamente resistente a doenças agrícolas. Em Portugal, o cultivo de salicórnia pode ser realizado em grande escala devido à elevada área de zona litoral, a qual tem as condições ideais para a sua produção (Lopes et al., 2017). A nível nacional existem estudos para uma produção de salicórnia em ambiente de estufa, de forma a conseguir controlar algumas das condições que provocam a morte da planta, como o nível de salinidade, a temperatura e a luz. O controlo destas condicionantes pode modificar a sua composição e afetar as suas propriedades nutricionais, bem como os

potenciais efeitos benéficos para a saúde humana (Lima et al., 2020). Na verdade, a salinidade dos solos pode levar a variações no valor nutricional, mais propriamente no teor de proteínas e na capacidade antioxidante da salicórnia, sendo possível afirmar que as condições ótimas para o seu crescimento variam entre os 50 e os 250 mM de NaCl e, em situações extremas, entre os 200 a 400 mM de NaCl (Lima et al., 2020; Ventura & Sagi, 2013). Esta diferença de salinidade, dependendo do local em que se encontra, pode afetar diretamente a sua germinação (Ventura & Sagi, 2013).

A produção da salicórnia acresce ainda de algumas preocupações relacionadas com o reaproveitamento dos resíduos resultantes. Segundo o projeto AquaCombine (que visa criar indústrias circulares envolvendo a produção de alimentos, produtos farmacêuticos e bioenergia a partir de uma cultura agrônoma sustentável com pouca, ou quase inexistente, produção de resíduos) a salicórnia é uma planta de extremo interesse (AquaCombine Project, 2020). Com efeito, apenas as partes superiores da salicórnia são utilizadas, enquanto a restante planta (cerca de 80%) é considerada resíduo. Atualmente, estes resíduos são utilizados nos solos, o que pode causar um aumento do seu teor em sal. Como alternativa, a AquaCombine procura a utilização destes resíduos como fonte de ingredientes ativos para produtos farmacêuticos e nutracêuticos.

Um dos pontos cruciais antes da produção deste tipo de plantas, é a escolha do método de propagação das mesmas, tendo em conta o objetivo final pretendido. A produção pode ser realizada por propagação por semente ou técnicas *in-vitro*. A propagação por semente é a técnica normalmente utilizada na agricultura e tem como principais benefícios apresentar uma elevada produtividade e custos mais reduzidos, permitindo assim uma maior diversidade genética e novas combinações. Por outro lado, os métodos de propagação *in-vitro* aplicam-se quando se pretende manter as características genéticas de uma planta. Dentro deste último grupo, destaca-se a micropropagação, a qual representa uma produção seletiva das plantas a larga escala mantendo, simultaneamente, preços competitivos. A micropropagação é realizada em laboratório em condições controladas, o que promove a conservação por longos períodos de tempo devido à ausência de doenças ou fungos. Deste modo, possibilita uma redução do tempo e da área necessária para a reprodução. No entanto, esta técnica apresenta alguns problemas, como por exemplo os custos elevados e a instabilidade e qualidade genética das plantas em produção.

Apesar de ser um produto pouco procurado em Portugal, devido à falta de conhecimento acerca das suas diversas propriedades, a *S. ramosissima* apresenta inúmeras vantagens em relação a outras espécies da mesma família, nomeadamente por apresentar propriedades antioxidantes, antitumorais e diuréticas (Ferreira et al., 2018). Devido a este desconhecimento, torna-se difícil encontrar números concretos acerca da produção mundial e nacional da salicórnia. De acordo com um projeto desenvolvido em Figueira, concelho de Portimão, a produção anual pode ascender a 15 toneladas, sendo a maior percentagem exportada para a Holanda (Barlavento, 2019).

1.4. Composição nutricional

A composição nutricional da salicórnia tem sido alvo de estudo por diversos grupos de investigação. De acordo com Díaz *et al.*, nutricionalmente a salicórnia é rica em minerais e vitaminas, predominando vitaminas A e C, tendo igualmente aminoácidos essenciais, ácidos gordos e fibras (Díaz et al., 2013). Barreira *et al.* reportaram que a salicórnia é uma fonte de importantes minerais essenciais, nomeadamente sódio (89,9 mg/g), magnésio (9,43 mg/g), potássio (8,92 mg/g), cálcio (4,86 mg/g), ferro (1,53 mg/g) e manganês (204 µg/g). No entanto, o elevado teor em sódio pode conduzir a problemas de saúde (Barreira et al., 2017). Este elevado conteúdo em minerais essenciais deve-se ao ambiente salino em que a salicórnia se desenvolve e à sua capacidade de filtração dos mesmos (Isca et al., 2014). Ainda de acordo com os mesmos autores (Barreira et al., 2017), esta planta apresenta na sua composição ácidos gordos essenciais, nomeadamente ácido linoleico e ácido α -linolénico.

Isca *et al.* efetuaram uma caracterização lipofílica completa da *S. ramosissima*, reportando a presença de ácidos gordos livres e esterificados, álcoois gordos, esteróis, alcanos e alguns derivados de ácidos aromáticos (Isca et al., 2014). Foram ainda identificados, pela primeira vez, vários álcoois gordos secundários e ácidos dicarboxílicos. Vários destes compostos detetados podem ter grandes benefícios para a saúde, o que sugere que a salicórnia possa ser considerada uma fonte alimentar importante de fitoquímicos lipofílicos. A Tabela 2 resume a composição nutricional da salicórnia.

Tabela 2. Composição nutricional segundo Associação Portuguesa da Nutrição (APN, 2018).

Salicórnica fresca	Por 100 g
Energia (kJ / kcal)	160,54 / 38,37
Lípidos (g)	0,29
dos quais saturados (g)	0,18
Hidratos de carbono (g)	6,39
Proteína (g)	0,81
Fibra (g)	3,49
Sal (g)	2,94
Cálcio (mg)	62,51
Potássio (mg)	231,42
Magnésio (mg)	19,95
Sódio (mg)	1176,65
Cobre (mg)	144,97
Ferro (mg)	0,11
Zinco (mg)	3,35

1.5. Atividades biológicas

As atividades antioxidante, anticancerígena e antibacteriana da salicórnica foram recentemente constatadas (Ferreira et al., 2018). Apesar de ainda serem escassos os trabalhos realizados acerca da sua utilização como potencial agente anticancerígeno, foi comprovado que esta planta tem capacidade antiproliferativa em células cancerígenas, nomeadamente células pulmonares (linha A549) (Zhao et al., 2014) e intestinais (linha HT-29) (Patel, 2016; Ryu et al., 2009), aumentando assim a sua procura como potencial tratamento alternativo para diferentes doenças (Ferreira et al., 2018). Dentre as suas potenciais atividades biológicas destaca-se a atividade antioxidante, que de modo sumário se detalhará nos seguintes subpontos.

1.5.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante tem por base a presença de moléculas com capacidade para retardar ou inibir partículas oxidáveis, através da captação de radicais livres. Os antioxidantes podem ter origens diferentes, podendo ser exógenos (caso sejam obtidos através da alimentação ou de suplementos, destacando-se o β -caroteno, a vitamina E, o ácido ascórbico e os compostos fenólicos) ou endógenos (se forem produzidos pelo organismo, como é o caso da glutatona) (Barreiros et al., 2006; Gašparović et al., 2010).

Sob o ponto de vista químico, os antioxidantes são caracterizados como compostos que apresentam na sua composição um grupo hidroxilo, podendo ser sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos são suplementos nutricionais ou dietéticos cujo principal objetivo é o fornecimento de nutrientes que estão ausentes ou não são consumidos durante a alimentação. Estes antioxidantes podem ser incorporados nos alimentos, para aumentar a sua vida útil e a sua resistência a diferentes condições de armazenamento e de tratamento (Carocho & Ferreira, 2013). Normalmente, atuam na inibição do processo oxidativo ao transferir um hidrogénio para o radical livre (Poljsak et al., 2013).

Por outro lado, os antioxidantes naturais podem ser caracterizados como compostos bioativos obtidos através de qualquer alimento, salientando-se a sua presença em maior quantidade em vegetais, fruta e cereais integrais. Estes antioxidantes podem ser separados em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos (Ratnam et al., 2006). As enzimas antioxidantes também representam uma grande importância na saúde devido ao papel crucial na neutralização da toxicidade do oxigénio na ausência de compostos antioxidantes (Birben et al., 2012). A sua função é semelhante à dos sintéticos, diferenciando-se na forma como atuam. Os antioxidantes naturais podem atuar como agentes de redução, sequestradores de radicais livres ou supressores de oxigénio (Davy, 2009).

A nível alimentar, os antioxidantes têm uma importante função ao evitar a oxidação lipídica, principal reação que pode ocorrer desde o processo de produção até ao armazenamento dos alimentos. A oxidação lipídica é responsável pela origem de odores desagradáveis e por alterações na qualidade nutricional do alimento, afetando igualmente a sua segurança, uma vez que pode conduzir à formação de compostos tóxicos (Minatel et al., 2017; Soares, 2002). A escolha do antioxidante a utilizar deve basear-se em diferentes aspetos, como as características e a composição do alimento, os processos de

produção e armazenamento e os potenciais efeitos no organismo. A nível industrial, a legislação vigente, os custos associados e a preferências dos consumidores são os pontos mais relevantes a ter em consideração (Davy, 2009).

Nos extratos de plantas, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela existência de capacidade antioxidante, sendo que a sua produção pode ser induzida por condições de *stress* abiótico; contudo o *stress* salino pode influenciar a síntese destes compostos (Alhaddad et al., 2013). Segundo Lima et al., a produção de grupos fenólicos apresenta um aumento significativo quando o nível de salinidade se encontra abaixo de 200 mM (Lima et al., 2020). No entanto, um contínuo aumento da salinidade do meio de cultivo provoca uma perda da capacidade de produzir estes compostos, originando uma produção de antioxidantes protetores (Ventura et al., 2015). Porém, existe a possibilidade de plantas com elevados níveis de salinidade procurarem transferir os seus recursos energéticos para a produção de mecanismos de proteção contra a alta concentração de sal, nomeadamente a produção de osmólitos ou mecanismos que permitam a exclusão do sal (Slama et al., 2017).

Quando existe um desequilíbrio entre o número de oxidantes e antioxidantes favorecendo os oxidantes, surge o fenómeno de *stress* oxidativo (Betteridge, 2000; Sies, 1997). Os oxidantes, também denominados radicais livres, são normalmente formados naturalmente como consequência do metabolismo aeróbio, originando danos tanto no ácido desoxirribonucleico (ADN) como em proteínas presentes no corpo, dando origem a doenças como diabetes e cancro, ou contribuindo para o envelhecimento (Maritim et al., 2003; Sies, 2015). A produção de radicais livres no organismo pode ser agravada pela dieta, nomeadamente através da ingestão exagerada de açúcares, gordura e álcool. No entanto, o sere humano também pode ser exposto a radicais livres, como por exemplo poluição, radiação e fumo proveniente dos cigarros (Dix, 2018).

1.5.1.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes na maioria das plantas, apresentando uma grande diversidade de estruturas moleculares, desde moléculas simples até moléculas com elevado grau de polimerização. Estes compostos têm uma grande importância em todo o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo responsáveis pela pigmentação e características sensoriais das mesmas. Na verdade, os compostos fenólicos estão presentes na alimentação através da ingestão de produtos naturais como frutas e legumes, ou através de produtos sintéticos. Além disso, estes compostos têm grandes benefícios para a saúde, existindo estudos que demonstram os seus efeitos protetores e a sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica (Martins, 2017; Soares, 2002). Sob o ponto de vista químico, os compostos fenólicos apresentam na sua composição um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo, apresentando estruturas que variam desde compostos fenólicos simples até polímeros de elevado peso molecular.

Na salicórnia, os compostos fenólicos mais reportadas são os ácidos fenólicos e os flavonoides (Martins, 2017). Os ácidos fenólicos encontram-se na maioria dos vegetais e a nível químico são constituídos por um ou mais grupo hidroxilo, por um grupo carboxílico e por um anel aromático. Estes compostos estão divididos ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e os seus derivados (Figura 4).

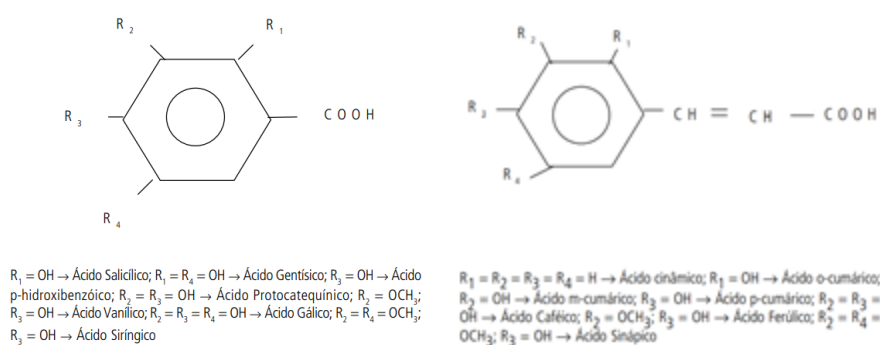


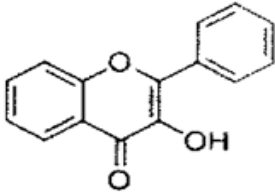
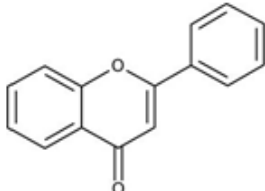
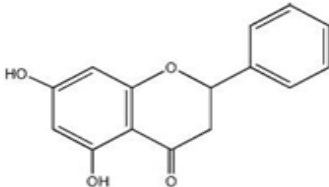
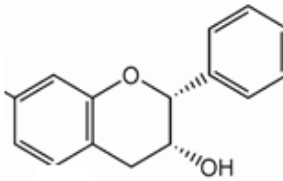
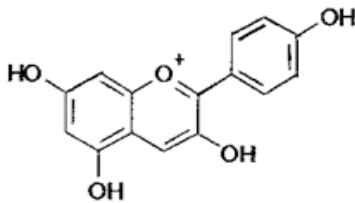
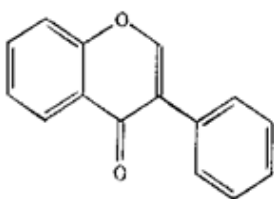
Figura 4. Esquerda: Ácido benzoico e seus derivados / Direita: Ácido cinâmico e seus derivados (Soares, 2002)

Os ácidos benzoicos são constituídos por sete átomos de carbono e representam o grupo mais simples encontrado na natureza. Os ácidos cinâmicos são constituídos por nove átomos de carbono, sendo que o ácido cinâmico mais comum no reino vegetal é o ácido cafeico. Os derivados resultam de combinações entre ácidos e compostos, sendo que a mais importante é a ligação entre o ácido cafeico e o ácido quinico, o qual origina o ácido clorogénico (Soares, 2002). Ambos os ácidos e seus derivados estão descritos na Figura 4.

Segundo Soares *et al.*, a elevada capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos reveste-se de importância na indústria alimentar, uma vez que podem substituir os antioxidantes sintético, aumentando a vida útil dos alimentos (Soares, 2002). Por outro lado, o benefício deste tipo de composto na saúde passa pela prevenção de doenças provenientes de danos oxidativos, como por exemplo o cancro (Soares, 2002). Os ácidos fenólicos, graças à sua atividade bioquímica, apresentam alguns benefícios medicinais, como a diminuição da ocorrência de doenças cardiovasculares, a prevenção de doenças cancerígenas, mais concretamente a prevenção de câncros da próstata (células DU145) devido à presença do ácido gálico, e propriedades anti-inflamatórias (Hooper et al., 2008; Veluri et al., 2006).

Os flavonoides representam o maior e mais importante grupo de metabolitos dos compostos fenólicos, sendo constituído por cerca de 8000 compostos (Giada, 2013). A nível químico, os flavonoides apresentam uma estrutura básica formada por carbonos, podendo esta estrutura diferenciar-se e originar 13 subclasses diferentes, entre as quais se destacam os flavonois, as flavonas, as isoflavonas, as antocianinas e as flavononas (Minatel et al., 2017; Giada, 2013). A Tabela 3 resume as diferentes estruturas básicas. Os flavonoides não são produzidos pelo corpo humano, pelo que são obtidos através da ingestão de produtos naturais, como por exemplo frutas e vegetais, ou suplementos alimentares (Giada, 2013). Este grupo fenólico, apresenta uma vasta atividade bioquímica, quer *in vitro* quer *in vivo*, tendo um importante papel em doenças cardiovasculares, mais concretamente no melhoramento do fluxo sanguíneo e da resistência dos vasos sanguíneos (Chua, 2013).

Tabela 3. Diferentes estruturas dos flavonoides (Giada, 2013).

Flavonoides	Estruturas básicas
Flavonois	
Flavonas	
Flavononas	
Flavanois	
Antocianinas	
Isoflavonas	

A atividade antioxidante dos flavonoides relaciona-se com a presença do grupo hidroxilo, sendo que a sua eficácia diminui com a substituição do grupo hidroxilo por açúcares (Giada, 2013). Ainda assim, apresentam uma grande capacidade antioxidante, sendo responsáveis pela inativação e eliminação do anião superóxido (Machado et al., 2008).

1.5.1.2. Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturais, encontrados na maioria dos vegetais e frutas, que desempenham um papel fulcral no processo de fotossíntese (Martins, 2017). Estes compostos são sintetizados apenas por plantas e microrganismos. Os carotenóides podem ser divididos em dois grupos: i) carotenos, os quais apresentam grupos terminais específicos compostos por hidrocarbonetos (entre os quais se destaca o licopeno e o β -caroteno) e ii) carotenoides oxidados, designados por xantofilas, que apresentam grupos hidroxilos (onde se destacam a zeaxantina e a luteína) (Carocho & Ferreira, 2013).

Os carotenóides são considerados importantes antioxidantes, tendo a capacidade de neutralizar o oxigénio singlete e diversos radicais livres. O β -caroteno é um dos carotenóides mais estudados, devido à sua forte ligação à prevenção do cancro, conseguindo destruir lípidos presentes nas células membranares e no material genético (Stahl & Sies, 2003; Young & Lowe, 2001). Para além de ser um dos principais antioxidantes, o β -caroteno é igualmente responsável pela produção da vitamina A, bem como pelo aumento do sistema imunitário e prevenção de problemas oculares (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Contudo, este composto apresenta uma melhor absorção corporal quando ingerido na forma de suplementos dietéticos do que em produtos naturais (Carocho & Ferreira, 2013; Madeira, 2015).

A vitamina A, também conhecida por retinol, tem um grande impacto ao nível da pele, olhos e órgãos internos. A capacidade de se combinar com os radicais livres peroxilo antes destes se oxidarem, confere-lhe uma enorme importância como antioxidante (Carocho & Ferreira, 2013).

1.5.1.3. Vitamina E

A vitamina E é uma molécula antioxidante lipossolúvel que apresenta uma ação protetora contra doenças causadas pelo *stress* oxidativo (Lucas-Del-Pozo et al., 2021). Este composto é constituído por oito isoformas que podem ser divididas em dois grupos: quatro tocoferóis (α -, β -, γ -, δ - tocoferol) e quatro tocotrienóis (α -, β -, γ -, δ - tocotrienol) (Carocho & Ferreira, 2013; Li et al., 2021).

De acordo com Li *et al.*, para além desta molécula ter a capacidade de auto-oxidação dos ácidos polinsaturados e de atuar ao nível do sistema imunitário, desempenha

também um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares e de doenças degenerativas (Li et al., 2021). A vitamina E tem ainda a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, ao fornecer um hidrogénio fenólico aos radicais peroxilo, formando assim uma nova molécula não reativa (tocoferoxil) que é incapaz de continuar a reação oxidativa (Carocho & Ferreira, 2013). No organismo humano a vitamina E aparece, preferencialmente, sob a forma de α -tocoferol, sendo esta a mais importante e abundante forma nos sistemas biológicos (Carocho & Ferreira, 2013; Martins, 2017). Esta vitamina, salvo os casos em que é regenerada, necessita de ser ingerida diretamente através da dieta. Segundo *Chang et al.*, quando os níveis desta se apresentam baixos, poderão notar-se alguns sinais desta deficiência como a degeneração muscular e a perda de peso. No mesmo estudo, comprova-se o papel importante que a vitamina E pode apresentar na redução do aparecimento de doenças neurodegenerativas, como o Parkinson, atuando como proteção das membranas celulares contra o *stress* oxidativo (Chang et al., 2021).

1.5.1.4. Ácidos gordos

Os ácidos gordos apresentam uma longa cadeia alifática, podendo ser classificados como saturados ou insaturados, consoante o número de ligações duplas presentes na cadeia (Lopes et al., 2017; Martins, 2017). Segundo Barreira *et al.*, no perfil lipofílico da salicórnica os ácidos gordos mais comuns são os saturados, sendo que o mais abundante é o ácido palmítico (Barreira et al., 2017). Contudo, existe uma divergência na composição dos ácidos gordos na planta, identificando também o ácido α -linolénico como o mais abundante, o que pode ser explicado pela diferença das partes da planta analisadas bem como pelas consequências que diferentes condições ambientais podem originar (Isca et al., 2014).

No corpo humano, apenas é possível sintetizar os ácidos gordos saturados e monoinsaturados, o que obriga a obter os polinsaturados (ómega-3 e ómega-6) de fontes vegetais, sendo por isso considerados ácidos gordos essenciais (Alabdulkarim et al., 2012). A existência destes compostos representa um elevado benefício para a saúde humana, atuando como protetores de doenças cardiovasculares (Gillingham et al., 2011; Lopes et al., 2017).

1.6. Redução do sal e utilização da salicórnia como alternativa

O consumo excessivo de sal na população portuguesa tornou-se um dos maiores riscos de saúde pública, aumentando a urgência de procurar novas políticas que contribuam para a redução do mesmo (DGS, 2015). Portugal apresenta uma das maiores taxas de mortalidade por acidentes vasculares cerebrais (AVC) na Europa, sendo a hipertensão um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. De acordo com o último Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF), entre 2015 e 2016 a população portuguesa apresentava uma ingestão média diária de sal de 7,3 g (cerca de 2,848 mg/dia de sódio), quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem como valor recomendado 5,0 g de sal por dia (Graça, 2013). No mesmo inquérito, foi concluído que o principal alimento responsável para o aumento da ingestão diária de sal nos portugueses é o pão e seus derivados (Santos et al., 2020). Com o objetivo de tornar a alimentação dos portugueses mais saudável, o Governo criou uma iniciativa, sujeita a candidatura e com atribuição de um selo de qualidade, onde propõem aos fabricantes da panificação um teor de sal inferior a 1 g sal/100 g de pão (Serviço Nacional de Saúde, 2018). Para atingir alguns objetivos, a Direção-Geral da Saúde (DGS) apresentou o Despacho nº 8272/2015 de 29 de julho, onde criou um grupo de trabalho, juntamente com organizações interministeriais, para a criação de estratégias ao nível da educação do consumidor e da oferta dos produtos alimentares para a sensibilização da redução do consumo de sal na população (DGS, 2015). Neste despacho foram apresentadas 14 propostas, entre elas:

- A redução do consumo de sal entre 3% a 4% ao ano na população portuguesa, com o objetivo de atingir a meta proposta pela OMS para um consumo de sal de 5 g/dia até 2025;
- Sensibilização para uma redução do consumo de sal direcionado quer ao consumidor, quer aos profissionais do sector alimentar, com o objetivo de acompanhar as mudanças e novas abordagens alimentares;
- Monitorização frequente da oferta de sal nas refeições colocadas no mercado pelo setor da restauração;
- No sector da restauração, sensibilizar para uma redução gradual no teor de sal em sopas/guarnições/acompanhamentos até um valor de referência de 0,2 g de sal/ 100 g de alimento.

A mesma DGS, através do Decreto Regulamentar nº 14/2012 de 26 de janeiro, promoveu atividades que têm por objetivo prevenir doenças cardiovasculares, definir condições técnicas para os cuidados de saúde, aumentar a qualidade do sistema de saúde e a elaboração e execução do Plano Nacional de Saúde (Graça, 2013). Como estratégia para uma gradual redução de sal, neste decreto foram definidos 5 objetivos estratégicos:

- Implementação de um sistema de avaliação da ingestão de sal e de monitorização da oferta de sal nos principais alimentos fornecidos à população portuguesa;
- Promoção de uma redução do consumo de sal nos consumidores através de campanhas de sensibilização;
- Promoção de uma otimização da informação presente nos rótulos dos produtos alimentares dando ênfase à quantidade de sal presente nos mesmos;
- Promoção de uma reformulação na indústria alimentar com a produção de produtos alimentares com menores conteúdos em sal;
- Avaliação e monitorização sistemática sobre o envolvimento da indústria alimentar, procurando também a opinião dos consumidores sobre as possíveis mudanças.

Com toda a sensibilização para a redução do consumo de sal, a procura por parte do consumidor de novas dietas com baixos teores de sal conduz ao surgimento de alternativas, como ervas aromáticas ou especiarias, num ambiente de uso doméstico. A utilização de ervas aromáticas influencia positivamente a saúde, cumprindo o principal objetivo na redução da quantidade de sal utilizado nas dietas, bem como beneficia a redução e prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancerígenas (Anabela Lopes et al., 2015). O uso de salicórnia como substituto do sal, vulgarmente usado na cozinha, apresenta grandes benefícios na redução da quantidade de sódio ingerido. Contudo, segundo a Associação Portuguesa da Nutrição, o seu uso deverá ser moderado já que é uma fonte de sódio na alimentação diária, como é possível verificar na Tabela 4 (APN, 2018).

Tabela 4. Quantidade de sódio presente na salicórnica (APN, 2018).

	Sódio (mg) /100 g Produto
Salicórnica fresca	1393
Salicórnica seca	9200
Salicórnica em pó	18700
Sal	40000

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi a caracterização química e biológica do subproduto da *S. ramosíssima*, através da extração dos compostos bioativos com recurso a um processo de extração convencional utilizando água como solvente. Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1) Otimizar, através da metodologia de superfície de resposta, as melhores condições de extração (tempo e temperatura) dos compostos bioativos presentes no subproduto industrial da salicórnia;
- 2) Avaliar o efeito das variáveis independentes (tempo e temperatura) nas variáveis dependentes (Conteúdo Total de Polifenóis e atividades antiradical e antioxidante);
- 3) Definir as condições ótimas de extração (binómio tempo/temperatura);
- 4) Avaliar a capacidade de captação de espécies reativas (radical de oxigénio, radical superóxido e ácido hipocloroso);
- 5) Determinar o perfil fenólico do extrato ótimo de salicórnia;
- 6) Estudar o efeito do extrato ótimo na viabilidade de queratinócitos e fibroblastos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Para a realização das diferentes metodologias abaixo referidas, foram utilizados reagentes de grau analítico, os quais se apresentam na seguinte lista:

1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihirocloreto (AAPH) (Sigma-Aldrich, EUA)
2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)
2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Acetato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA)
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Ácido ascórbico (Merck, Alemanha)
Ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Carbonato de Sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Catequina (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Cloreto de Alumínio
Cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Cloreto Férrico (Merck, Alemanha)
Di-hidrorodamina 123 (DHR) (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Dinucleótido β -nicotinamida adenina (NADH) (Sigma Aldrich, EUA)
Etanol absoluto anidro (Carlo Erba Reagents, França)
Flouresceína (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) (Merck, Alemanha)
Fosfato mossódico anidro (NaH_2PO_4) (VWR Chemicals, Bélgica)
Hidroxido de Sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Metanol (MeOH) (Honeywell, Seelze, Alemanha)
Metosulfato de fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich, EUA)
Nitrito de Sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha)
Persulfato de Potássio (Sigma-Aldrich, Alemanha)

Reagente de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemanha)

Sulfato Ferroso, FeSO_4 (Sigma-Aldrich, Índia)

3.2. Amostra

Na realização deste trabalho utilizaram-se amostras do subproduto industrial de *S. ramosissima* fornecida pela empresa RiaFresh, localizada em Sítio do Besouro, Faro, Portugal. A amostra foi aleatoriamente colhida a partir de 20 plantas, no mês de março de 2021, após remoção da parte comestível das mesmas. Após colheita, a amostra foi lavada e desidratada (Excalibur Food Dehydrator, USA) a 41 °C durante 24 h. Posteriormente foi moída (Moulinex A320), de modo a obter partículas com 1 mm de tamanho. Subsequentemente, a amostra foi armazenada a 4° C até posteriores ensaios.

3.3. Otimização das condições de extração

A determinação das melhores condições de extração foi realizada com recurso à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), uma ferramenta matemática. Esta metodologia centra-se em encontrar as condições ótimas para o processo de extração, baseando-se na influência de diferentes variáveis. No presente trabalho, foram analisadas duas variáveis independentes, tempo e temperatura de extração. Com efeito, foram realizadas 11 combinações experimentais, com 4 temperaturas (37,1; 40,0; 60,0 e 80,0 ° C) e 5 tempos diferentes (6,3; 10,0; 35,0; 60,0 e 63,7 min). A resposta utilizada nos desenhos experimentais foi o conteúdo total de polifenóis (CTP; Y_1), a atividade antioxidante avaliada pelos ensaios FRAP (Y_2) e a atividade antiradical avaliada pelos ensaios DPPH (Y_3) e ABTS (Y_4). Os valores ótimos de resposta Y foram obtidos resolvendo a equação de regressão e analisando a superfície de resposta e os gráficos de contorno, usando as equações preditivas da MSR. A precisão dos modelos foi avaliada através da realização de um conjunto de ensaios utilizando os valores críticos otimizados. O teste t foi utilizado para comparar as respostas em condições otimizadas com aquelas previstas pelos modelos. A MSR foi realizada com recurso ao software Design Expert versão 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EUA).

3.4. Processo de extração dos compostos bioativos

A obtenção dos compostos bioativos presentes no subproduto da salicórnia realizou-se com recurso a uma extração convencional utilizando água como solvente. Para a extração, foram adicionados 2,5 g de amostra a 50 mL de água destilada, seguindo-se os binómios determinados pelo modelo matemático (Tabela 5). Após extração, a amostra foi filtrada por gravidade com recurso a filtros de pregas e liofilizada (Telstar, model Cryodos -80, Spain), sendo posteriormente armazenado a 20 °C até análise.

3.5. Processo de extração dos compostos bioativos nas condições ótimas

Com as condições ótimas de extração estabelecidas através do modelo matemático, procedeu-se à extração de acordo com o mencionado no ponto 3.4. Com efeito, dissolveram-se 2,5 g de amostra em 50 mL de água destilada, colocando-se a mistura em banho-maria com agitação termostática durante 10,0 minutos, à temperatura de 80,0° C e a uma velocidade de agitação de 100 RPM. A mistura foi depois filtrada por gravidade, com recurso a filtro de prega. Para a avaliação das variáveis anteriormente descritas, bem como a avaliação da capacidade de captação de espécies reativas, a amostra depois de filtrada foi congelada a -80° C para posterior liofilização. O procedimento encontra-se ilustrado na Figura 5.

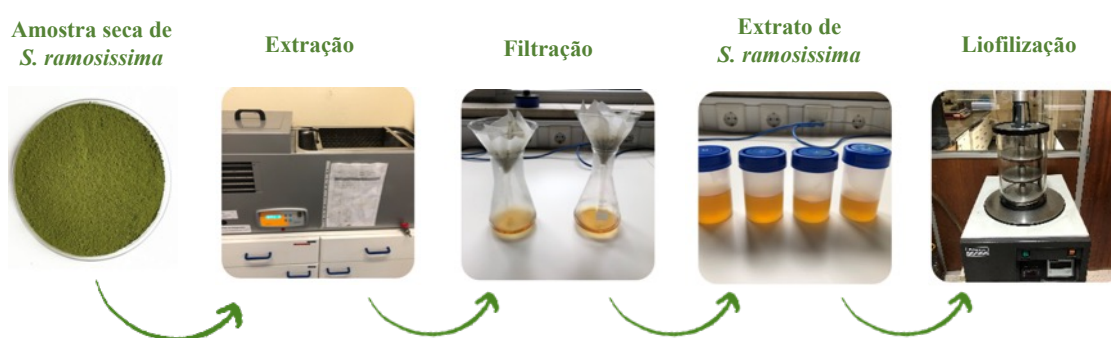


Figura 5. Esquema de extração dos compostos bioativos de *S. ramosissima*.

3.6. Caracterização química dos extratos

3.6.1. Determinação do conteúdo total de polifenóis (CTP)

O CTP das amostras foi determinado com recurso ao método de Folin-Ciocalteu desenvolvido por Singleton e Rossi (1965), e sujeito a ligeiras modificações. Este método tem como princípio a reação de redução entre os polifenóis e o reagente de Folin-Ciocalteu. O ensaio realizou-se em microplacas de 96 poços, como é possível ver na Figura 6, e todas as amostras foram diluídas numa concentração de 1 mg/mL em água destilada. De seguida, misturaram-se 30 μ L de amostra com 150 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e 120 μ L de uma solução de 7,5% de carbonato de sódio. A microplaca foi incubada num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA) a uma temperatura de 45 °C durante 15 minutos, arrefecendo de seguida 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Por fim, avaliou-se a absorvância, no leitor referenciado anteriormente, num comprimento de onda de 765 nm. A curva de calibração foi obtida a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (gama de concentrações entre 5 e 100 mg/L) diluído com água destilada. O resultado foi expresso em mg de ácido gálico por 100 gramas de extrato seco (mg EAG/100 g es) (Chavan et al., 2013).

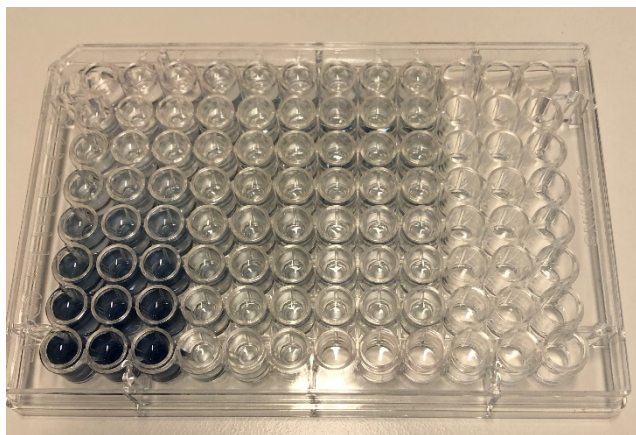


Figura 6. Microplaca referente ao ensaio CTP.

3.7. Atividade antioxidante e antiradical

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP). A atividade antiradical foi avaliada pela capacidade de sequestração dos radicais livres 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH[•]) e 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS^{•+}).

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

O ensaio FRAP avalia o potencial de redução do ião ferro com base na metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). O ensaio realizou-se numa microplaca de 96 poços (Figura 7), sendo a mistura da reação constituída por 35 μL de amostra e 265 μL do reagente de FRAP, previamente preparado com tampão acetato 0,3 M, solução TPTZ 10 mM e cloreto férrico 20 mM. A mistura foi incubada no leitor de microplacas a 37 °C durante 30 minutos. Após incubação, a leitura foi realizada a um comprimento de onda de 595 nm. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução-padrão de sulfato de ferro (II), FeSO_4 , a diferentes concentrações de FeSO_4 (gama de concentrações entre 25 e 500 μM). O resultado foi expresso em μmol de equivalentes de FeSO_4 por 100 mg de extrato seco ($\mu\text{mol ESF}/100 \text{ mg es}$).

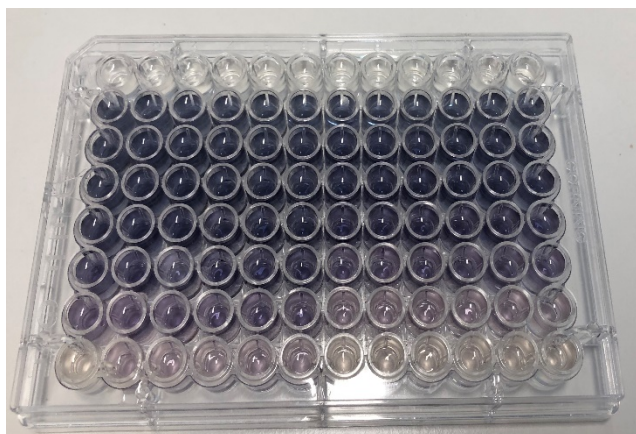


Figura 7. Microplaca referente ao ensaio FRAP.

3.7.2. Avaliação da capacidade de inibição do radical DPPH•

Este método foi utilizado para avaliar a capacidade de redução do radical DPPH• (Barros et al., 2007). O procedimento foi realizado numa microplaca de 96 poços, como demonstra a Figura 8, onde a mistura da reação foi constituída por 30 μL de extrato e 270 μL de reagente de DPPH ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$). A leitura de absorvância foi feita a cada minuto, durante 40 minutos, num comprimento de onda de 525 nm no leitor de microplacas mencionado. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução-padrão de Trolox a diferentes concentrações (entre 5 e 125 mg/L). O resultado foi expresso em μg de equivalentes de Trolox por 100 mg de extrato seco ($\mu\text{g ET}/100 \text{ mg es}$).

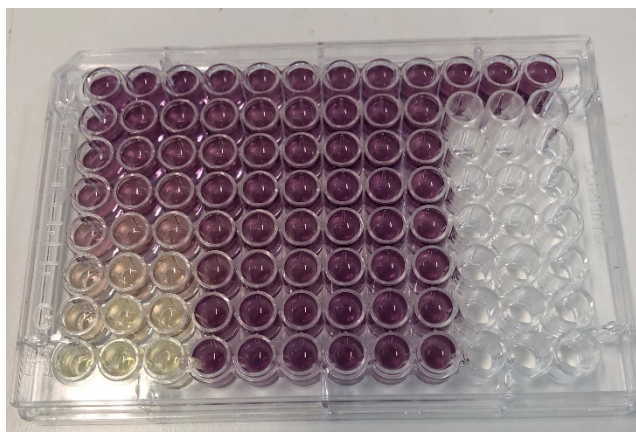


Figura 8. Microplaca referente ao ensaio DPPH.

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

Este método avalia a capacidade de sequestrar o radical $ABTS^{•+}$ (Re et al., 1999). O ensaio realizou-se numa microplaca de 96 poços (Figura 9), onde a mistura da reação foi constituída por 20 μ L de amostra e 180 μ L de solução de ABTS (7 mM), previamente preparada e enriquecida com persulfato de potássio (2,45 mM). Esta solução, antes da sua utilização, permanece no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas para que a reação se desenvolva. O ABTS deve apresentar uma absorvância de $0,70 \pm 0,02$, lida num comprimento de onda de 734 nm. Para a obtenção da curva de calibração utilizou-se uma solução de ácido ascórbico a diferentes concentrações (gama de concentração entre 5 e 100 μ g/mL). O resultado foi expresso em μ g de equivalentes de ácido ascórbico por 100 mg de extrato seco (μ g EAA/100 mg es).

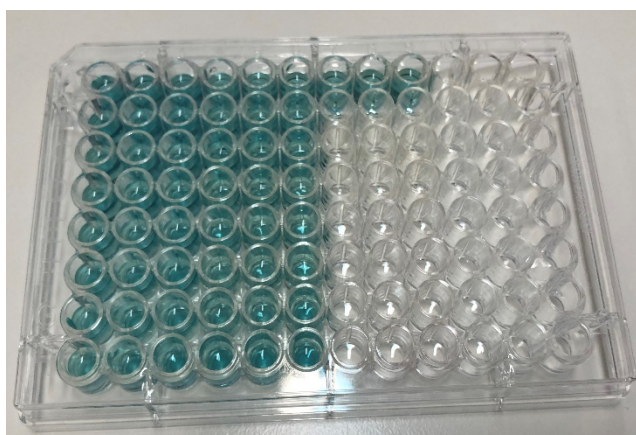


Figura 9. Microplaca referente ao ensaio ABTS.

3.8. Determinação da capacidade de captação de espécies reativas

3.8.1. Condições gerais

Nos procedimentos a seguir detalhados, todos os ensaios foram realizados num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT, EUA), equipado com termostato, permitindo a deteção colorimétrica, fluorimétrica e quimiluminométrica. Todas amostras, previamente liofilizadas, foram dissolvidas em tampão fosfato e testadas a diferentes concentrações. Como controlo positivo foram utilizados a catequina e o ácido gálico.

3.8.2. Determinação da capacidade de captação do radical superóxido

A capacidade de captação do radical superóxido, $O_2^{\bullet-}$, previamente originado pelo sistema NADH/PMS/ O_2 , foi determinada espectrofotometricamente no leitor de microplacas anteriormente mencionado, através do efeito do composto na redução do cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT) provocado pelo $O_2^{\bullet-}$, a qual origina diformazan. A reação decorreu em microplacas de 96 poços, sendo a mistura reacional constituída por 50 μ L de amostra, ou solvente branco no controlo, 50 μ L de NADH 166 μ M, 150 μ L de NBT 43 μ M e, por último, 50 μ L de PMS 2,7 μ M. Todos os reagentes (NADH, NBT e PMS) e amostras foram dissolvidos em tampão fosfato 19 mM a pH 7,4. A leitura da absorvância realizou-se durante 6 minutos, a 37° C, no comprimento de onda de 560 nm.

3.8.3. Determinação da capacidade de absorção do radical de oxigénio

A capacidade de captação dos radicais derivados do oxigénio foi avaliada através do efeito do extrato e do padrão Trolox na oxidação da fluoresceína. Esta oxidação foi gerada pela termodecomposição, num leitor de microplacas, do dicloridrato de 2,2-azobis 2-amidopropano (AAPH) a 37° C. O procedimento foi realizado numa microplaca de 96 poços, onde para a mistura reacional se adicionaram 150 μ L de fluoresceína 61,2 nM, 25 μ L de amostra, ou de tampão fosfato no branco e controlo, e 25 μ L de AAPH 19,1 mM. Todas as amostras foram previamente preparadas em tampão fosfato 7,5 mM e pH 7,4. A leitura foi realizada num leitor de microplacas, num comprimento de onda para a emissão

de 485 nm e para a excitação de 528 nm, durante 2 horas a 37° C, monitorizando o decréscimo minuto a minuto com o objetivo de detecção do sinal de fluorescência.

3.8.4. Determinação da capacidade de captação do ácido hipocloroso

A capacidade de captação do ácido hipocloroso (HOCl) foi determinado através do efeito do composto em estudo na oxidação de di-hidrorodamina 123 (DHR), causada pelo HOCl, a rodamina 123. De forma reduzida, o HOCl foi preparado a partir de uma solução de 1% (m/v) de NaOCl, ajustando o pH da solução a 6,2 com adição de H₂SO₄ 10% (v/v) gota a gota. A determinação da concentração de HOCl foi determinada, posteriormente, num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 235 nm. O método foi realizado numa microplaca de 96 poços, na qual foi adicionada a mistura reacional constituída por 150 µL de tampão fosfato 100 mM, 50 µL de amostra, ou solvente no branco e controlo, 50µL de DHR 5 µM e, por fim, 50 µL de HOCl 5 µM. A fluorescência foi lida no comprimento de onde de 485 ± 20 nm e de 528 ± 20 nm, a 37° C durante 5 minutos.

3.9. Análise dos compostos fenólicos por HPLC-MS

O extrato ótimo de salicórnia foi dissolvido em metanol, de forma a obter uma solução concentrada de 10 mg/mL. A determinação dos compostos fenólicos presentes no referido extrato foi realizada por cromatografia líquida, utilizando o sistema Agilent 1260, com detecção por matriz de díodos e espectrometria de massa MS500 (Varian) (MS) equipado com fonte de ionização por eletrospray, trabalhando no modo de ionização positiva e negativa. Como fase estacionária, foi utilizada a coluna Agilent C18 XDB 3 x 150 mm (3,5 µm). As fases móveis foram constituídas por água com 0,1% de ácido fórmico (A, eluente aquoso) e acetonitrilo (B, eluente orgânico). A composição inicial dos eluentes do programa cromatográfico foi de 90% do eluente A. Posteriormente utilizou-se um gradiente no qual a composição variou de 90% a 10% A em 35 minutos. O fluxo utilizado foi de 350 µL/min e o volume de injeção de 10 µL. Os resultados foram adquiridos tanto no modo de ionização positiva, como no modo de ionização negativa. No detetor ótico, foram detetados seis picos cujo espectro de UV foi atribuível aos ácidos hidroxycinâmicos. Os compostos foram identificados com base na comparação com

soluções padrão bem como através de comparação com a literatura específica publicada e que relacionada com os derivados de ácido cafeoilquínico isoméricos (Faustino et al., 2019; Gupta, 2014; Radwan & Nazif, 2007).

3.10. Viabilidade Celular

Recorreu-se ao ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), amplamente utilizado por diferentes autores, para avaliar a viabilidade celular (Pinto et al., 2021; Silva et al., 2021). Este ensaio baseia-se na monitorização da atividade mitocondrial através da medição da formação de um produto de *formazan* azul-escuro pela redução do anel de tetrazólio de MTT, sendo considerado um ensaio fiável na avaliação da proliferação celular *in vitro*.

Com efeito, recorreu-se a duas linhas celulares, respetivamente fibroblastos (HFF-1) e queratinócitos (HaCaT). Ambas as linhas celulares foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), previamente suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de aminoácidos essenciais e 1% de antibiótico. As células foram mantidas numa incubadora (Panasonic, CO₂ Incubator MCO-18AC, Japão) com 5% de CO₂ e a uma temperatura de 37 °C, sendo o meio de cultura mudado de dois em dois dias até atingirem a confluência. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, como descrito por Rodrigues *et al.* (Rodrigues et al., 2013). Em cada poço colocou-se a linha celular numa concentração de $2,5 \times 10^4$ células/mL, seguindo-se um período de incubação de 24 horas a uma temperatura de 37° C num ambiente com 5% de CO₂, com o objetivo de favorecer o crescimento e adesão celular. Após o período de incubação, foi retirado o meio de cultura e procedeu-se à lavagem das células com 200 µL de solução tampão de fosfato-salino. Em seguida, a linha celular foi incubada novamente durante 24 horas a 37° C, com as diferentes concentrações de amostra (0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL) dissolvidas no respetivo meio de cultura. Após a última incubação, os extratos foram removidos e as células novamente lavadas com uma solução tampão de fosfato-salino. A cada poço foram adicionados 200 µL de reagente MTT, sendo posteriormente colocados a incubar durante 3 horas a 37° C num ambiente com 5% CO₂. Após este período de tempo, removeu-se o reagente de MTT e adicionaram-se 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), colocando-se a agitar durante 10 minutos de modo a facilitar a solubilização dos cristais de MTT. A absorvância foi realizada num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Synergy HT,

EUA) num comprimento de onda de 570 e de 690 (de forma a obter um *background*). Para os fibroblastos foram utilizadas as passagens 12-13, enquanto para os queratinócitos se recorreu às passagens 79-80. Os resultados obtidos encontram-se expressos em percentagem de viabilidade celular.

4. Resultados

4.1. Validação do desenho experimental

Neste trabalho, as variáveis independentes em estudo foram a temperatura e o tempo. As condições experimentais de extração utilizada, bem como os valores previstos e experimentais dos ensaios CPT, FRAP, DPPH e ABTS dos extratos do subproduto de *S. ramosíssima* estão apresentados na Tabela 5.

Consoante é possível constatar, o valor de rendimento de cada extração variou entre $30,85 \pm 3,26$ % (extração 6, 60 °C, 35 min) e $36,53 \pm 4,92$ % (extração 7, 37 °C, 35 min). Relativamente às atividades avaliadas, verificou-se que o CPT oscilou entre $480,35 \pm 53,75$ µg EAG/100 mg es (extração 9, 40 °C, 10 min) e $905,16 \pm 115,53$ mg EAG/g es (extração 11, 80 °C, 10 min). O FRAP, por seu lado, variou entre $6,98 \pm 0,54$ µmol ESF/100 g es (extração 9, 40 °C, 10 min) e $13,91 \pm 2,53$ µmol ESF/100 g es (extração 11, 80 °C, 10 min). O DPPH compreendeu valores entre $145,85 \pm 39,89$ µg ET/100 mg es (extração 7, 37 °C, 35 min) e $1404,12 \pm 279,16$ µg ET/100 mg es (extração 11, 80 °C, 10 min), enquanto o ABTS variou entre $773,24 \pm 179,32$ µg EAA/100 mg es (extração 9, 40 °C, 10 min) e $1308,25 \pm 254,12$ µg EAA/100 mg es (extração 11, 80 °C, 10 min). Os resultados da análise da variância (ANOVA) permitem a avaliação da adequação e significância dos modelos por meio do teste *F* de Fisher e estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 5. DCC e rendimento de extração (%) por EUA dos compostos bioativos do subproduto da *S. ramosissima*.

Ext.	Tempo (min)	Temp. (°C)	Y ₁		Atividade antioxidante						Rendimento (%)
			CTP (µg EAG/100 mg es)		Y ₂		Y ₃		Y ₄		
					Experimental ^a	Previsto ^b	ABTS (µg EAA/100 mg es)	DPPH (µg ET /100 mg es)	FRAP (µmol ESF/100 mg es)		
X ₁	X ₂		Experimental ^a	Previsto ^b	Experimental ^a	Previsto ^b	Experimental ^a	Previsto ^b	Experimental ^a	Previsto ^b	
1	35	60	554,66 ± 102,15	560,77	821,63 ± 144,91	823,84	219,85 ± 47,17	192,12	8,43 ± 1,34	8,42	32,41 ± 2,38
2	60	40	625,71 ± 58,61	653,76	1022,23 ± 211,36	1047,04	197,56 ± 27,95	292,89	9,62 ± 0,56	10,10	34,58 ± 1,36
3	6	60	585,08 ± 94,19	612,01	933,02 ± 123,56	922,67	175,18 ± 38,97	348,50	8,71 ± 1,72	9,44	35,45 ± 4,30
4	63	60	707,28 ± 76,82	667,27	1017,55 ± 153,51	999,93	467,60 ± 98,01	373,86	10,89 ± 0,44	10,29	35,96 ± 4,18
5	35	83	827,08 ± 79,16	828,46	1200,91 ± 101,71	1210,48	1120,23 ± 250,83	1238,30	11,55 ± 1,18	11,86	34,48 ± 2,47
6	35	60	577,83 ± 65,64	560,77	773,35 ± 122,96	823,84	251,17 ± 47,30	192,12	8,46 ± 1,69	8,42	30,85 ± 3,26
7	35	37	521,51 ± 130,02	507,06	878,38 ± 187,24	840,84	145,85 ± 39,89	107,36	7,45 ± 1,08	7,28	36,53 ± 4,92
8	35	60	540,90 ± 141,08	560,77	857,42 ± 148,97	823,84	159,72 ± 31,96	192,12	8,45 ± 0,82	8,42	34,64 ± 1,94
9	10	40	480,35 ± 53,75	470,00	773,24 ± 179,32	793,88	150,66 ± 32,05	92,76	6,98 ± 0,54	6,69	34,87 ± 4,08
10	60	80	779,30 ± 102,97	798,26	1185,58 ± 177,61	1183,36	1094,97 ± 250,70	1100,47	11,21 ± 1,10	11,42	36,38 ± 3,07
11	10	80	905,16 ± 115,53	885,71	1308,25 ± 254,12	1301,85	1404,12 ± 279,16	1256,41	13,91 ± 2,53	13,35	36,24 ± 4,17

^a Média de determinações em triplicado de diferentes ensaios; ^b Baseado na avaliação do DCC.

Tabela 6. Resumo do modelo e da análise de variância (ANOVA) das respostas aos ensaios CTP (Y1), ABTS (Y2), DPPH (Y3) e FRAP (Y4) ao extrato de salicórnia.

	Soma dos Quadrados				Média dos Quadrados				Valor F				Valor p			
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y1	Y2	Y3	Y4	Y1	Y2	Y3	Y4	Y1	Y2	Y3	Y4
Modelo	187700	333400	2163000	41,28	37535,80	66681,14	432600	8,26	38,36	49,86	23,05	24,50	0,0005*	0,0003*	0,0335*	0,0016*
X ₁ . min	3845.86	7517,95	809,57	0,8960	3845,86	7517,95	809,57	0,8960	3,93	5,62	0,0431	2,66	0,1043	0,0639	0,1266	0,1639
X ₂ . °C	130100	172100	1611000	26,41	130100	172100	1611000	26,41	132,95	128,67	85,83	78,37	<0,0001*	<0,0001*	0,2978	0,0003*
X ₁ .X ₂	18389,12	34531,95	31695,54	7,14	18389,12	34531,95	31695,54	7,14	18,79	25,82	1,69	21,18	0,0075*	0,0038*	0,1469	0,0058*
X ₁ ²	12440,91	37792,10	57162,46	4,19	12440,91	37792,10	57162,46	4,19	12,71	28,26	3,05	12,42	0,0161**	0,0032*	0,0072*	0,0168**
X ₂ ²	22892,32	81466,57	462200	2,65	22892,32	81466,57	462200	2,65	23,39	60,91	24,62	7,86	0,0047*	0,0006*	0,2996	0,0378**
Residual	4893,11	6687,40	93844,01	1,68	978,62	1337,48	18768,80	0,3370								
Falta de ajuste	4196,24	3127,76	89523,67	1,68	1398,75	1042,59	29841,22	0,5614	4,01	0,5858	13,81	1701,77	0,2058	0,6801	0,0725	0,0006*
Erro puro	696,87	3559,63	4320,33	0,0007	348,44	1779,82	2160,17	0,0003								
Total	192600	340100	2257000	42,96												
R ² prev (Y1) – 0,8106				R ² adj (Y1) – 0,9492				Ratio – 17,99								
R ² prev (Y2) – 0,9061				R ² adj (Y2) – 0,9607				Ratio – 18,81								
R ² prev (Y3) – 0,6673				R ² adj (Y3) – 0,9168				Ratio – 11,50								
R ² prev (Y4) – 0,6697				R ² adj (Y4) – 0,9216				Ratio – 15,54								

Y1, CTP (µg EAG/100 mg es); Y2, ABTS (µg EAA/100 mg es); Y3, DPPH (µg ET/100 mg es) e Y4, FRAP (µmol ESF/100 mg es).

* significância $p < 0,01$; ** significância $p < 0,05$.

A variável independente X_1 (tempo, min) não apresentou efeito significativo sobre qualquer resposta, enquanto a variável independente X_2 (temperatura, °C) mostrou um efeito significativo na resposta aos ensaios CTP (Y_1), ABTS (Y_2) e FRAP (Y_3). O termo quadrático X_1 apresentou um efeito significativo na resposta de todos os ensaios realizados. O termo quadrático X_2 mostrou um efeito significativo na resposta do ensaio CTP (Y_1), ABTS (Y_2) e FRAP (Y_4). O R^2 é importante para verificar a adequação do modelo, podendo afirmar que relativamente a este estudo o modelo é satisfatório, dado que o R^2 ajustado apresentou valores próximos de 1. Os valores obtidos para o R^2 são, respetivamente, 81.06%, 90.61%, 66.73% e 66.97% da variação de X_1 e X_2 para os ensaios CTP, ABTS, DPPH e FRAP (Tabela 6). Para todos os ensaios realizados, a “falta de ajuste” não foi significativa ($p>0,05$) e o Ratio foi superior a 4, como seria desejável, indicando uma relação sinal/ruído adequada. Com efeito, todos os indicadores confirmam a adequação do modelo para representar os dados experimentais e para a previsão dos parâmetros analisados.

As equações das respostas (1 a 4) mostram, respetivamente, a dependência dos ensaios CTP (Y_1), FRAP (Y_2), DPPH (Y_3) e ABTS (Y_4) relativamente às variáveis tempo (X_1) e temperatura (X_2). Os parâmetros das equações foram determinados com recurso a uma análise de regressão múltipla dos resultados experimentais.

$$Eq. 1: CTP = 560,77 + 24,08X_1 + 140,05X_2 - 67,80X_1.X_2 + 59,90X_1^2 + 81,26X_2^2$$

$$Eq. 2: FRAP = 8,42 + 0,3675X_1 + 2,00X_2 - 1,34X_1.X_2 + 1,10X_1^2 + 0,8740X_2^2$$

$$Eq. 3: DPPH = 192,12 + 11,05X_1 + 492,81X_2 - 89,02X_1.X_2 + 128,40X_1^2 + 365,11X_2^2$$

$$Eq. 4: ABTS = 823,84 + 33,67X_1 + 161,07X_2 - 92,91X_1.X_2 + 104,41X_1^2 + 153,29X_2^2$$

4.2. Efeito das variáveis independentes nas respostas e condições ótimas de extração

Os gráficos de contorno 3D representam a relação entre as variáveis independentes (tempo e temperatura) e as variáveis dependentes (CTP, FRAP, DPPH e ABTS). A Figura 10 apresenta os gráficos de superfície de resposta da atividade antioxidante (FRAP) e antiradical (ABTS e DPPH) e do conteúdo total de polifenóis (CTP), em função do tempo e da temperatura de extração.

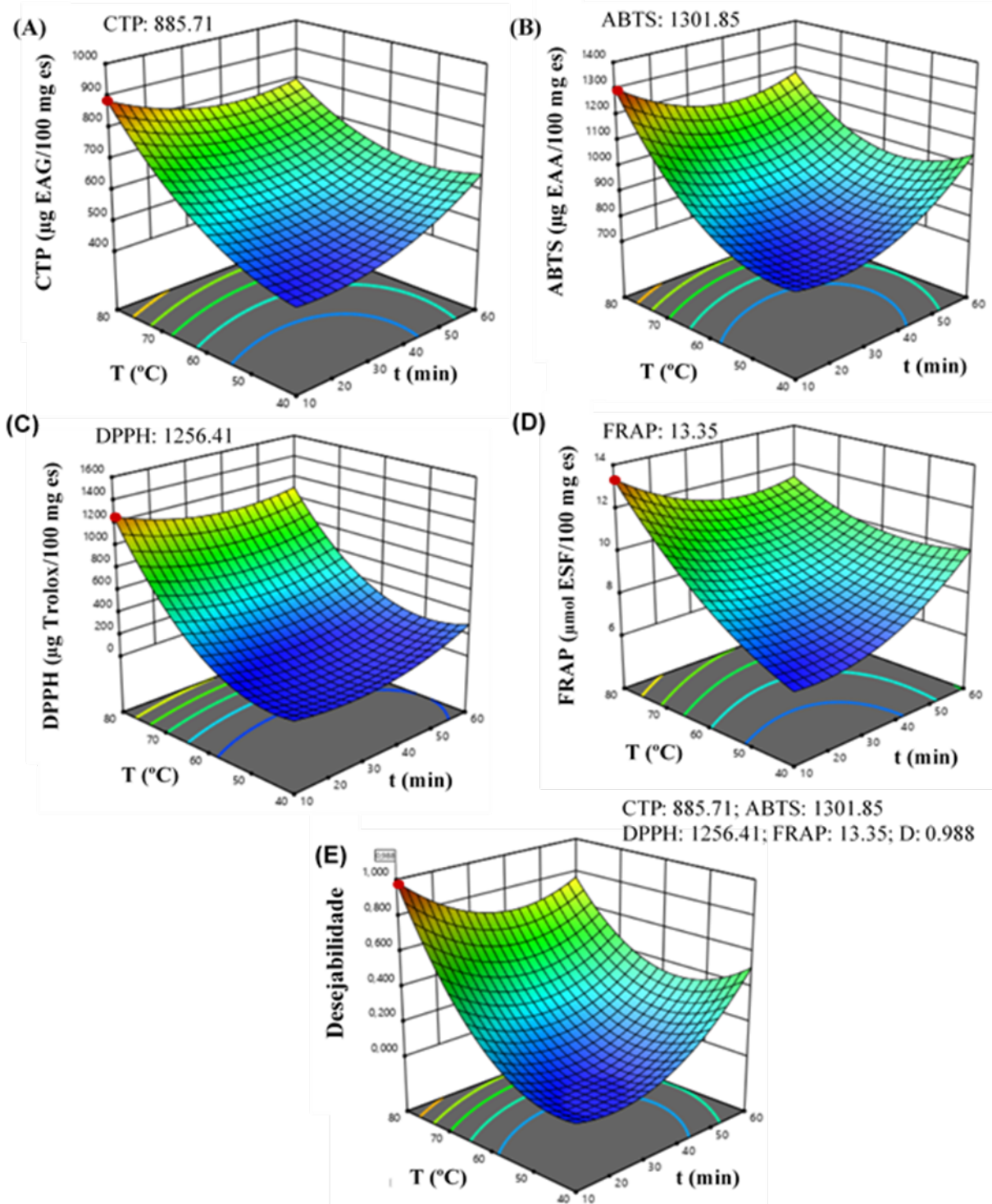


Figura 10. Gráficos 3D da superfície de resposta para os efeitos de interação de variáveis independentes de tempo (min) e temperatura (°C) nas variáveis dependentes de CTP (A), ABTS (B), DPPH (C) e FRAP (D) e no índice de desejabilidade para respostas combinadas

Como é possível verificar na Figura 10, a temperatura e o tempo de extração influenciam as respostas dos ensaios realizados. De acordo com a figura, a resposta é similar em todos os ensaios. Efetivamente, verificou-se uma maior resposta de atividade

(CTP = 885,71 µg EAG/100 mg es; ABTS = 1201,85 µg AAE/100 mg es; DPPH = 1256,41 µg ET/100 mg es; FRAP = 13,35 µmol FSE/100 mg es) quando as condições de extração foram de 80° C e 10 min, refletindo que nestas condições estão a ser extraídos mais compostos com atividade antioxidante e antiradical. A desejabilidade para o conjunto de ensaios foi de 0,988. No sentido contrário, verificou-se uma diminuição da resposta quando a temperatura de extração foi de 40 °C.

De acordo com o gráfico de desejabilidade, as condições ótimas de extração que permitem maximizar as atividades antioxidante e antiradical e o CTP foram de 80°C durante 10 minutos.

O valor experimental obtido para os quatros ensaios foi semelhante ao valor previsto, mostrando que o uso da MSR para otimizar o processo de extração de compostos bioativos da salicórnia é satisfatório, como é possível constatar na Tabela 7.

Tabela 7. Previsão das condições ótimas de extração da salicórnia.

	CTP (µg EAG/100 mg es)	ABTS (µg EAA/100 mg es)	DPPH (µg ET/100 mg es)	FRAP (µmol ESF/100 mg es)
Valor experimental	891,61 ± 124,28	1272,20 ± 54,40	1106,10 ± 113,75	13,56 ± 1,60
Valor previsto	885,71	1301,85	1256,41	13,35
<i>p</i>^b	0,48	0,27	0,13	0,43

^a Resultados estão expressos como média ± desvio padrão (*n*=3).

^b Significância (*p*<0,05).

O rendimento de extração apresentou valores entre 30,85% e 36,53%, sendo que para as condições ótimas de extração o valor do rendimento foi de 36,24%. Estes resultados são superiores aos reportados por Silva *et al.* para o mesmo método de extração em *S. ramosissima* (21,14%), bem como para a extração assistida por micro-ondas da mesma amostra (26,10%) (Silva et al., 2021). Por seu lado, Bakhouch *et al.* reportaram um rendimento de extração de 30,45% e 25,1% para as folhas de *Limonium delicatulum*, igualmente uma halófita, usando água e metanol como solventes de extração, respetivamente (Bakhouch et al., 2021). Medini *et al.*, por seu lado, obtiveram valores de rendimentos de extração entre 6,66% e 18% para a halófita *L. densiflorum*, usando o soxhlet como método de extração e diferentes solventes (hexano, diclorometano, metanol

e etanol) (Medini et al., 2015). Estes valores são consideravelmente inferiores aos reportados no presente estudo.

Segundo Mzoughi & Majdoub, o rendimento de extração para a salicórnia, usando água como solvente, deve situar-se entre o 1% e 34%, o que demonstra que os resultados obtidos no presente trabalho foram excelentes (Mzoughi & Majdoub, 2021).

Como referido anteriormente, o ensaio CTP foi realizado com recurso ao reagente de Folin-Ciocalteu, sendo este o ensaio colorimétrico mais comum e fácil de usar para uma determinação rápida em extratos de plantas, mostrando também uma grande reprodutibilidade e estando a quantidade de polifenóis proporcionalmente relacionada com a elevada atividade antioxidante (Sánchez-Rangel et al., 2013). Este método baseia-se em reações de oxidação-redução entre o reagente de Folin-Ciocalteu e os polifenóis, que ao reduzir o molibdénio e o tungsténio, originalmente com uma coloração amarelada, produzem um complexo com cor azul (Everette et al., 2010; Prior et al., 2005; Sánchez-Rangel et al., 2013). Contudo, este ensaio está sujeito a varias interferências, sendo a principal a presença de açúcares (Sánchez-Rangel et al., 2013). De acordo com a Tabela 7, o resultado do extrato ótimo para o ensaio CTP foi de 8,91 mg EAG/g es, um valor relativamente baixo. Silva *et al.* avaliaram igualmente o CTP da *S. ramosissima* utilizando duas técnicas de extração: convencional (utilizando água como solvente extrator a 100° C durante 5 minutos) e extração assistida por micro-ondas (num intervalo de temperaturas entre 72-94° C e de tempo entre 5-10 minutos) (Silva et al., 2021). De acordo com os autores, os valores obtidos para o CTP para ambas as técnicas foram de, respetivamente, 15,02 mg EAG/g es e 8,34 mg EAG/g es (Silva et al., 2021). Num outro estudo, Barreira *et al.* obtiveram um valor de CTP de 33,0 mg EAG/g es utilizando como solvente extrator etanol (1:40 m/v), sendo este valor bastante superior ao obtido no presente estudo (Barreira et al., 2017). O resultado obtido neste estudo encontra-se em linha com os descritos por Lima *et al.* para o CTP da salicórnia cultivada a diferentes concentrações salinas e extraída com 80 % acetona (1:40 m/v). De acordo com os autores, o CTP variou entre 6,18 mg EAG/g es e 12,9 mg EAG/g es, sendo que o valor mais elevado corresponde à concentração de 200 mM (Lima et al., 2020). Num outro estudo, Antunes *et al.* avaliaram o CTP da salicórnia quando extraída por ultrassons utilizando como solvente uma mistura de etanol: água (75:25 v/v) (Antunes et al., 2021). De acordo com os autores, o CTP foi avaliado em maio e julho, imediatamente após colheita e 14 dias após colheita, sendo que a amostra foi armazenada a uma temperatura de 4° C. Os valores reportados para maio foram de 24,57 mg EAG/g es imediatamente após colheita

e 50,74 mg EAG/g es passados 14 dias. No mês de julho o CTP foi de 41,07 mg EAG/g es e de 32,99 mg EAG/g es, respetivamente após colheita e após 14 dias de armazenamento (Antunes et al., 2021). Por seu lado, Lopes *et al.* reportaram um valor de CTP de 74,1 mg EAG/g es para uma extração de salicórnia com uma solução aquosa de 80% acetona (1:10 m/v) durante um período de 16 horas à temperatura ambiente (Lopes et al., 2016). Comparativamente ao valor obtido no presente estudo (Tabela 7), os valores reportados pelos autores supra citados no que toca ao CTP são superiores. O valor obtido no presente estudo pode ser consequência do facto da amostra ter permanecido algum tempo exposta à luz solar logo depois de colhida. Além disso, no presente trabalho utilizou-se água como solvente, enquanto a maior parte dos autores utilizam etanol ou acetona, solventes menos inócuos mas com capacidade de solubilizar maior quantidade de polifenóis.

Quando o CTP é comparado com os resultados obtidos para outras halófitas pertencentes à mesma família, verifica-se que o extrato ótimo de salicórnia obtido no presente trabalho é bastante mais promissor. Grigore *et al.* avaliaram o CTP de 5 espécies pertencentes à família da *S. ramosissima*, nomeadamente *S. europaea* (CTP = 1,04 mg EAG/g es), *Halimione verrucifera* (CTP = 2,96 mg EAG/g es), *Suaeda maritima* (CTP = 4,57 mg EAG/g es), *Petrosimonia triandra* (CTP = 4.06 mg EAG/g es) e *Atriplex prostrata* (CTP = 5,04 mg EAG/g es) (Grigore & Oprica, 2015). Estes valores são ligeiramente inferiores aos obtidos no presente trabalho, comprovando a maior capacidade antioxidante da *S. ramosissima*. Num outro estudo realizado por Costa *et al.* o CTP de *S. europaea*, extraída com ultrassons e utilizando etanol como solvente, variou entre 1.3 e 9.3 mg EAG/g es (Costa et al., 2018). Estes resultados são idênticos aos obtidos no presente estudo, contudo o uso de etanol como solvente extrator é menos ecológico do que o solvente utilizado neste trabalho.

O ensaio antiradical ABTS é um dos ensaios antiradical mais utilizado para amostras de plantas. Este ensaio baseia-se numa reação de oxidação do radical ABTS^{•+} a ABTS, com recurso a persulfato de potássio, provocando uma mudança de coloração para azul-esverdeado. A capacidade antioxidante é determinada pela diminuição na produção de ABTS^{•+}, a qual se reflete na absorvância, podendo esta ser medida por espectrofotometria a 734 nm (Krishnaiah et al., 2011; Siddeeg et al., 2021). De acordo com a Tabela 7, o extrato ótimo de salicórnia obteve um valor de 1272,20 µg EAA/100 mg es para este ensaio. Silva *et al.* analisaram igualmente a atividade antiradical do extrato de salicórnia, utilizando dois métodos de extração distintos, tendo reportado um

valor de 15,55 µg EAA/g es para a extração convencional e de 17,74 µg EAA/g es para a extração assistida com micro-ondas (Silva et al., 2021). No estudo realizado por Lima *et al.* avaliou-se a capacidade antiradical (ABTS) para diferentes concentrações de sal no solo, reportando um intervalo de valores de CMI₅₀ entre 2,12 e 4,44 mg/mL, sendo o valor mais alto referente à concentração de 275 mM (Lima et al., 2020). Costa *et al.* reportaram valores entre 4,5 e 22,8 mg ET/g para a *S. europaea* extraída por ultrassom com etanol, sendo que o valor máximo foi obtido com 40% de etanol (v/v) (Costa et al., 2018). Bakhouché *et al.* analisaram também a capacidade antiradical de um extrato de *L. delicatulum* através deste ensaio, usando uma extração convencional durante um período de 24 horas à temperatura ambiente e água como solvente extrator. Segundo os autores, o resultados obtido de CMI₅₀ foi de 5,02 µg/mL (Bakhouché et al., 2021). Contudo, não é possível a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com estes autores, uma vez que foram expressos em unidades diferentes.

O DPPH é um radical livre estável que reage com componentes que transferem átomos de hidrogénio, formando o composto difenil-picril-hidrazina. Este ensaio baseia-se na capacidade sequestradora do radical livre DPPH[•] através da adição de radicais ou antioxidantes que provocam uma mudança de coloração da solução DPPH, a qual inicialmente apresenta coloração roxa, mudando para amarelada no caso de ocorrer alguma reação (Krishnaiah et al., 2011; Mishra et al., 2012). A mudança de cor é monitorizada por um método espectrofotométrico a um comprimento de onda de 515 nm (Mishra et al., 2012). De acordo com a Tabela 7, o extrato ótimo de salicórnica apresentou um valor de 1106,10 µg ET/100 mg es para o ensaio DPPH. Barreira *et al.* analisaram a capacidade de sequestrar o radical DPPH[•] de extratos de 4 plantas halófitas, inclusive de *S. ramosissima*, reportando uma CMI₅₀ de 5,69 mg/mL (Barreira et al., 2017). Castañeda-Loaiza *et al.* avaliaram através deste ensaio a capacidade antiradicalar do extrato da *S. maritima* de duas origens diferentes, cultivada e selvagem, utilizando metanol como solvente de extração (Castañeda-Loaiza et al., 2020). De acordo com os autores, os valores de CMI₅₀ variaram entre 0,67 e 2,60 mg/mL, sendo o valor mais alto referente à planta selvagem oriunda de Espanha (Castañeda-Loaiza et al., 2020). Num outro estudo, Souid *et al.* analisaram a atividade antiradical da planta halófito *L. delicatulum*, usando um método de extração assistido por agitação magnética, e metanol (80%) como solvente de extração (Souid et al., 2018). O extrato foi avaliado durante 12 meses, verificando-se um intervalo de resultados de CMI₅₀ entre 2,31 e 4,38 µg/mL, sendo o valor mais alto correspondente ao mesmo de janeiro (Souid et al., 2018). Mazouz *et al.* avaliaram também

por este ensaio a atividade antiradical da halófita *L. spathulatum* utilizando uma técnica de extração assistida por ultrassons, com diferentes tipos de solvente extrator (éter de petróleo, clorofórmio e metanol) (Mazouz et al., 2020). Segundo os autores, o extrato obteve melhores resultados quando o metanol é o solvente extrator ($\text{CMI}_{50} = 10,47 \mu\text{g/mL}$), bem como com uma mistura de metanol:água ($\text{CMI}_{50} = 14,49 \mu\text{g/mL}$) (Mazouz et al., 2020). Contudo, é novamente impossível a comparação dos resultados dos autores mencionados com os do presente trabalho devido às diferentes unidades em que os resultados são apresentados.

Por último, o ensaio FRAP baseia-se na obtenção do ião ferroso (Fe^{2+}) a partir de uma reação de redução do ião férrico (Fe^{3+}) na presença do complexo TPTZ. Esta reação é avaliada por espectrofotometria, já que ocorre a mudança de cor da mistura reacional, podendo a absorvância desta ser lida a um comprimento de onda de 595 nm (Antolovich et al., 2002). De acordo com a Tabela 7, o extrato ótimo da salicórnia obteve um valor para este ensaio de $13,56 \mu\text{mol ESF}/100 \text{ mg es}$. Silva *et al.* analisaram o extrato de salicórnia quanto à capacidade de redução do Fe^{2+} , obtendo um valor de $60,61 \mu\text{mol ESF/g es}$ para a extração convencional e de $65,56 \mu\text{mol ESF/g es}$ para a extração assistida com micro-ondas (Silva et al., 2021). Comparando com o valor obtido no presente estudo, verifica-se que este apresenta uma menor capacidade antioxidante. Num outro estudo, Rodrigues *et al.* analisaram por este ensaio a atividade antioxidante de um extrato da halófita *L. algarvense*, obtido por uma técnica convencional com metanol (1:40 m/v) como solvente. Os resultados obtidos de CMI_{50} variaram entre 0,01 e 0,18 mg/mL (Rodrigues et al., 2015). Costa *et al.* analisaram a capacidade antioxidante de um extrato de *S. europaea* por este mesmo ensaio, utilizando duas técnicas de extração distintas, nomeadamente a técnica de extração por fluidos supercríticos com diferentes concentrações de etanol (10, 20 e 40 % v/v) e a extração assistida por ultrassons com diferentes concentrações de etanol (0, 10, 20, 40, 80 e 100% v/v) (Costa et al., 2018). Segundo os autores, a atividade antioxidante da *S. europaea* extraída por fluidos supercríticos apresentou valores compreendidos entre 5,22 (10% etanol) e 10,38 (40% etanol) $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g es}$, enquanto a extração assistida por ultrassons variou entre 27,4 (100% etanol) e 180,2 (80% etanol) $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g es}$ (Costa et al., 2018). Novamente, uma comparação com os resultados obtidos neste estudo torna-se impossível devido à falta de concordância de unidades entre os diferentes estudos mencionados.

4.3. Avaliação da capacidade de captação de espécies reativas

As espécies reativas são uma das principais causas do *stress* oxidativo, sendo responsáveis pelo processo de desenvolvimento de diversas doenças crónicas, tais como diabetes, Parkinson e cancro. Os resultados da capacidade de captação das espécies reativas de oxigénio (ERO) do extrato otimizado estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Capacidade de captação do anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido ($ROO^{\bullet}$) pelo extrato de subproduto de *S. ramosissima*.

	ERO		
	$O_2^{\bullet-}$	HOCl	ORAC
	CMI ₅₀ (µg/mL)		D _{amostra} /D _{Trolox}
Extrato do subproduto de <i>S. ramosissima</i>	324,82 ± 22,27	27,61 ± 0,42	0,0022 ± 0,0001
<i>Controlos positivos</i>			
Ácido gálico	24,08 ± 0,63	1,77 ± 0,06	1,493 ± 0,028
Catequina	41,80 ± 4,97	0,38 ± 0,01	0,416 ± 0,021

CMI₅₀ = concentração inibitória, *in vitro*, necessária para diminuir em 50% a quantidade de espécies reativas na amostra testada (média ± desvio padrão). (D_{amostra}/D_{Trolox}) - rácio obtido pela razão entre o declive da amostra (subproduto da *Salicornia ramosissima*) em estudo e o declive obtido pelo Trolox. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=4).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido pelo sistema imunológico com o objetivo de proteger o nosso organismo. Contudo, este radical é altamente tóxico, levando à origem de diversas reações que conduzem ao aparecimento de outras espécies de oxigénio, indicando assim o início de um processo de *stress* oxidativo (Mazouz et al., 2020). Este processo inicia-se com uma dismutação do radical superóxido através da superóxido dismutase, o qual leva à origem do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Pais, 2011).

De acordo com a Tabela 8, o extrato do subproduto de salicórnia apresentou uma capacidade de captação do radical superóxido (CMI₅₀) de 324,82 µg/mL. Este resultado é substancialmente superior aos obtidos pelos controlos positivos, nomeadamente pela catequina (CMI₅₀ = 41,80 µg/mL) e pelo ácido gálico (CMI₅₀ = 24,08 µg/mL), sendo possível concluir que ambos os controlos apresentaram melhores resultados do que o extrato do subproduto de salicórnia. Comparativamente ao estudo realizado por Silva et

al., é possível constatar que estes apresentam valores mais elevados ($CMI_{50} = 979,36 \mu\text{g/mL}$) do que os reportados no presente trabalho, o que mostra uma menor capacidade de captação do radical (Silva et al., 2021). Mazouz *et al.* avaliaram a capacidade de captação do radical superóxido pela halófita *L. spathulatum*, utilizando diferentes solventes, nomeadamente clorofórmio, metanol, ácido ascórbico e uma mistura de metanol-água, obtendo valores superiores a $400 \mu\text{g/mL}$, $3,45 \mu\text{g/mL}$, $3,55 \mu\text{g/mL}$ e $7,59 \mu\text{g/mL}$, respetivamente (Mazouz et al., 2020). Segundo Rodrigues *et al.*, a halófita *Polygonum maritimum* L. atingiu uma CMI_{50} de $40,4 \mu\text{g/mL}$ para a capacidade de captação deste radical (Rodrigues et al., 2019). Com efeito, ambas as plantas halófitas reportadas na literatura apresentaram melhores resultados do que o subproduto da salicórnia.

O ácido hipocloroso (HOCl) é um potente agente oxidante e antibacteriano que provem da reação catalítica da enzima mieloperoxidase (Mazouz et al., 2020). Esta substância é endógena em todos os mamíferos e mostra uma grande eficácia contra uma enorme gama de microrganismos, apresentando capacidade de destruir vírus por cloração, tornando-os inofensivos (Block & Rowan, 2020). De acordo com a Tabela 8, o extrato de salicórnia apresentou uma capacidade de captação do ácido hipocloroso de $27,61 \mu\text{g/mL}$, sendo bastante superior aos valores obtidos pelos dois controlos utilizados, nomeadamente catequina ($CMI_{50} = 0,38 \mu\text{g/mL}$) e ácido gálico ($CMI_{50} = 1,77 \mu\text{g/mL}$). Em comparação com o estudo realizado por Silva *et al.*, onde os autores reportaram um valor de CMI_{50} para a extração convencional e para a extração assistida por micro-ondas de $90,28 \mu\text{g/mL}$ e $104,64 \mu\text{g/mL}$, respetivamente, estes valores são bastante superiores (Silva et al., 2021).

O ORAC é um método espectrofluorimétrico que permite determinar a capacidade de uma amostra captar o radical peróxilo, o qual é gerado por uma fonte radicalar (AAPH) através da sua decomposição térmica (Tomei & Salvador, 2005). Neste ensaio, o radical reage com a fluoresceína, originando um composto não fluorescente, sendo este resultado expresso como o rácio entre o declive da curva formada pelos controlos positivos/extratos e o declive da curva formada pelo Trolox ($D_{\text{amostra}}/D_{\text{Trolox}}$). Na Tabela 8 estão reportados os valores obtidos para a captação do radical peróxilo para o extrato do subproduto de salicórnia (0,0022) e para ambos os controlos utilizados, nomeadamente a catequina (0,416) e o ácido gálico (1,493). Comparativamente aos controlos positivos, a amostra apresentou melhor atividade antioxidante para captação deste radical. Silva *et al.* avaliaram igualmente um extrato de salicórnia quanto à captação do radical peróxilo,

reportando um valor de 0,056 $\mu\text{mol ET/mg}$ es para a extração convencional e de 0,061 $\mu\text{mol ET/mg}$ es para a extração assistida por micro-ondas (Silva et al., 2021). Antunes *et al.* avaliaram a captação do radical peroxilo pelo extrato de salicórnia na altura de colheita e passado 14 dias, em dois meses distintos, maio e julho (Antunes et al., 2021). Para o mês de maio obtiveram o valor de 15,97 mM Trolox/100 g na colheita e de 9,55 mM Trolox/100 g passados 14 dias, enquanto em julho o valor na colheita foi de 2,74 mM Trolox/100 g e passados 14 dias foi de 2,84 mM Trolox/100 g. Esta diferença de valores entre os dois meses pode ser explicada pelo aumento da radiação ultravioleta, uma vez que esta pode conduzir a um aumento no conteúdo de polifenóis (Antunes et al., 2021). Contudo, ambos os estudos expressam os resultados em unidades diferentes das do presente trabalho, pelo que se torna impossível a sua comparação.

4.4. Determinação dos compostos fenólicos

O perfil de compostos fenólicos do extrato ótimo do subproduto da salicórnia foi obtido através de cromatografia líquida com espectrometria de massa, método vulgarmente usado para quantificar os compostos fenólicos em frutas e plantas (Ignat et al., 2011). O perfil fenólico do subproduto de salicórnia está representado na Figura 11, enquanto a Tabela 9 resume os diversos compostos identificados e quantificados.

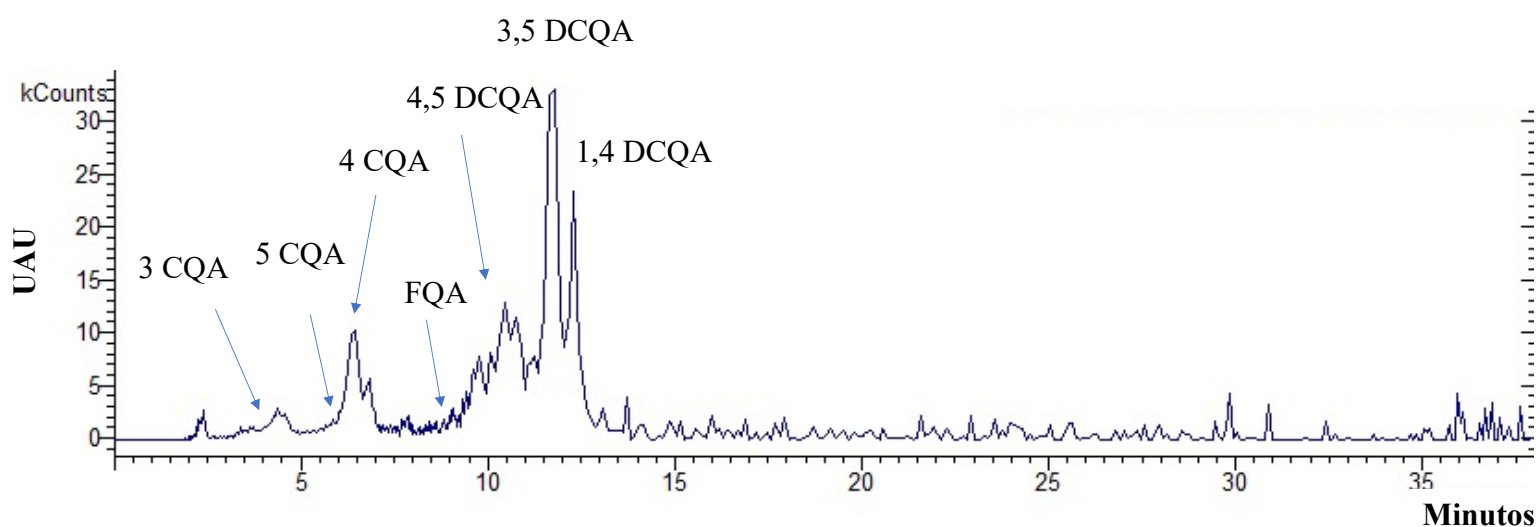


Figura 11. Perfil cromatográfico obtido por HPLC-MS no extrato de subproduto de salicórnia.

Tabela 9. Compostos fenólicos identificados por HPLC-MS no extrato do subproduto de salicórnia.

Identificação	Tempo de retenção (min.)	[M-H] ⁻	Fragmentação	Quantidade (mg/g)
Ácido 3-cafeoilquínico	4,34	353,07	191 (100) 179(60) 173 (2)	1,34
Ácido 5-cafeoilquínico	6,30	353,08	191 (100) 179(15) 173 (25)	0,58
Ácido 4-cafeoilquínico	6,83	353,07	191 (30) 179(70) 173 (100)	5,54
Ácido feruloil-quínico	8,32	367,03	193 (100) 191 (5)	0,03
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	10,50	515,10	353 (100)	0,61
Quercetina-3-O-glucósido	10,74	463,09	300 (100)	0,14
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	11,48	515,09	353 (100)	8,24
Ácido 1,4-dicafeoilquínico	12,20	515,09	353 (100)	6,78
isoramnetina-3-O-β-D-glucopiranosídeo	12,20	477,13	314 (100) 315 (50) 285 (24)	0,55
		[M+H] ⁺		mg/g
Cromona	8,55	193,049	178 (100) 163 (10)	2,74
Digaloil-metil glucopiranosídeo	9,35	499,1	319 (100) 288 (5) 270 (2)	5,44
Derivados de metoxi-isoflavona	10,70	303,08	285 (25) 257 (60) 229 (100)	0,40
Derivados de metoxi-isoflavona	11,60	303,085	285 (25) 257 (60) 229 (100)	0,42

De acordo com a Tabela 9, os ácidos fenólicos são os principais constituintes do extrato do subproduto de salicórnia, sendo o mais abundante o ácido 3,5-dicafeoilquínico (8,24 mg/g), seguido do ácido 1,4-dicafeoilquínico (6,78 mg/g) e do ácido 4-cafeoilquínico (5,54 mg/g). O extrato também apresenta flavonoides na sua composição, mais propriamente derivados de isoramnetina (0,55 mg/g) e quercetina (0,14 mg/g). Ambos apresentam uma forte atividade antioxidante, resultando num forte efeito protetor contra a oxidação lipídica.

A classe dos taninos também está presente na composição fenólica do extrato do subproduto da salicórnia. Os taninos hidrolisáveis são separados em dois grupos, galotaninos e elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico (Souza et al., 2015). Os galotaninos são compostos por galoil or di-galoil. Neste estudo foi identificado e quantificado um derivado de galotanino (nomeadamente o digaloil-metil glucopiranosídeo, na concentração de 5,44 mg/g). Além disso, foram identificados compostos heterocíclicos oxigenados, nomeadamente cromona (2,74 mg/g), um composto que aparece naturalmente nas plantas. As cromonas apresentam a capacidade

de inibir a atividades de algumas enzimas, nomeadamente em doenças neurodegenerativas (Shaw et al., 2009). Por fim, foram identificados derivados de isoflavonas, nomeadamente derivados de metoxi-isoflavona (10,7 min e 11,6 min), na concentração de 0,40 mg/g e 0,42 mg/g, respetivamente.

Isca *et al.* estudaram o perfil fenólico de um extrato de *S. ramosissima* através de cromatografia gasosa com espectrometria de massa. Os autores conseguiram quantificar alguns compostos fenólicos, sendo, contudo, os grupos mais abundantes os ácidos gordos saturados (31,27%) e os álcoois gordos (45,32%). Dentro do grupo dos ácidos gordos saturados, o mais abundante foi o ácido palmítico (12,08%), enquanto o álcool lignocérico (tetracosanol; 11,89%) foi o álcool gordo mais abundante na amostra. Foi também reportada a presença de ácidos carboxílicos, onde a classe menos abundante foi a dos ácidos dicarboxílicos (4% do total). A presença de ácidos gordos polinsaturados foi também constatada, sendo o ácido linoleico o mais abundante (4,9% do total). A terceira classe com maior representação no extrato foram os esteróis vegetais (cerca de 12%), essencialmente representados pelo estigmasterol e pelo β -sitosterol. Estes são derivados do 24-etilcolesterol, um esteroide característico das plantas da família da salicórnia (*Chenopodiaceae*) (Isca et al., 2014).

No estudo realizado por Silva *et al.*, os autores identificaram e quantificaram os compostos fenólicos do extrato convencional e de ultrassons da salicórnia através da técnica de HPLC-DAD (Silva et al., 2021). Segundo os autores, os principais constituintes presentes no extrato foram os ácidos fenólicos e os flavonóis, representando 50% e 40%, respetivamente. O componente maioritário foi a miricetina (0,4250 mg/g es para extração convencional), um flavonoide conhecido pelos benefícios para a saúde devido às suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias. Dentro dos ácidos fenólicos, o composto mais abundante foi o ácido gálico (0,2105 mg /g es), enquanto no grupo dos flavonóis os compostos maioritários foram a catequina e a epicatequina (0,1116 mg/g es e 0,0102 mg /g es, respetivamente). Foi igualmente reportada a presença de outros flavonóis, como o rutina, derivados de quercetina e derivados de kaempferol, bem como flavonas como a apigenina (Silva et al., 2021).

Zengin *et al.* avaliaram a composição fenólica da *S. europaea* através da técnica UHPLC acoplada à espectrometria de massa. Segundo os autores, foram identificados 11 componentes fenólicos, sendo que os componentes maioritários foram o ácido rosmarínico (346,41 μ g/g extrato), o ácido quinico (116,7 μ g/g extrato) e o ácido *p*-cumárico (72,06 μ g/g extrato) (Zengin et al., 2018). Mariem *et al.* identificaram e

quantificaram os compostos do extrato da halófita *Retama raetam* através da técnica de cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa. Os autores identificaram 17 ácidos fenólicos e 6 flavonoides. O principal componente foi o ácido siríngico, um ácido fenólico com forte capacidade antioxidante, antiproliferativa e anticancerígena, seguido pela cumarina, que apresenta a capacidade de atuar como antioxidante através da inibição do processo de oxidação lipídica. Esta capacidade está associada à presença de grupos hidroxilos. Este composto encontra-se distribuído homogeneamente por diferentes partes da planta, sendo mais abundante nas folhas e frutos (Mariem et al., 2014).

4.5. Viabilidade celular

O efeito do extrato ótimo na viabilidade celular de fibroblastos (HFF-1) e queratinócitos (HaCaT) foi efetuado com recurso ao ensaio MTT. Estas duas linhas apresentam uma grande importância de avaliação da toxicidade quando o objetivo é uma potencial utilização do extrato em produtos de aplicação tópica. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Viabilidade celular de HaCaT e HFF-1 após exposição ao extrato ótimo de *S. ramosissima*. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	HaCaT	HFF-1
DMEM	110,47 $\pm$ 8,58	100,00 $\pm$ 23,39
0.100	108,63 $\pm$ 8,56	98,92 $\pm$ 14,90
1,00	98,37 $\pm$ 16,84	95,65 $\pm$ 10,76
10,0	92,96 $\pm$ 12,44	91,02 $\pm$ 4,55
100	95,41 $\pm$ 12,09	91,05 $\pm$ 4,55
1,0x10 ³	93,81 $\pm$ 0,63	88,98 $\pm$ 6,77

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que não ocorreu um decréscimo da viabilidade celular dos queratinócitos nas concentrações entre 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se valores na ordem de 100% de viabilidade. No entanto, existe um pequeno decréscimo, não significativo, da viabilidade da mesma linha celular para as restantes concentrações avaliadas (entre 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), sendo a viabilidade sempre superior a 90%.

Quanto à viabilidade celular dos fibroblastos, o extrato de salicórnia não provocou um decréscimo da viabilidade na concentração de 0,1 µg/mL. Contudo, nas concentrações entre 1 e 1000 µg/mL notou-se uma pequena diminuição da viabilidade, mantendo-se sempre em valores próximos ou superiores a 90%. Com efeito, é possível concluir que o extrato do subproduto de *S. ramosissima* não afetou significativamente a viabilidade celular de ambas as linhas celulares, originando sempre valores superiores a 90% para todas as concentrações testadas.

Não existe na literatura qualquer estudo que avalie o efeito da salicórnia em linhas celulares. Optou-se, por isso, por comparar com outras matrizes que utilizem as mesmas linhas celulares. Pinto *et al.* avaliaram a viabilidade celular de queratinócitos e fibroblastos após exposição a extratos de cascas de castanha obtidos por duas técnicas de extração distintas (extração assistida por ultrassons com água e extração por fluidos supercríticos). Segundo os autores, a viabilidade celular de queratinócitos variou entre 67,99% e 97,76% para a extração assistida por ultrassons, e 57,32% e 82,70% para a extração por fluidos supercríticos. No que toca aos fibroblastos, ambas as técnicas de extração não resultaram num decréscimo da viabilidade para todas as concentrações testadas (Pinto et al., 2021). Da mesma forma, Taofiq *et al.* analisaram, para as mesmas linhas celulares, dois extratos (*Ganoderma lucidum* e *Pleurotus ostreatus*) obtidos através de uma extração convencional usando etanol como solvente. Os resultados reportados pelos autores comprovam que apenas a concentração mais elevada (10 mg/mL) afetou significativamente a viabilidade de queratinócitos, sendo que as restantes concentrações mantiveram a viabilidade acima dos 90%. Para os fibroblastos, acima da concentração de 100 µg/mL, ambos os extratos afetaram significativamente a viabilidade (Taofiq et al., 2019). Comparativamente ao extrato de salicórnia, ambos os estudos mencionados anteriormente mostram uma maior redução da viabilidade celular para as linhas celulares utilizadas.

Rodrigues *et al.* analisaram a viabilidade celular de HEK 293 (células embrionárias do rim) e HepG2 (células cancerígenas do fígado) após exposição a um extrato da halófito *L. algarviense* (Rodrigues et al., 2020). De acordo com os autores, os resultados obtidos foram superiores a 100% para ambas as linhas celulares (Rodrigues et al., 2020). Num outro estudo realizado pelos mesmos autores, analisou-se a viabilidade celular das linhas celulares S17 (células não tumorais) e HepG2 de cinco plantas halófitas (*A. macrostachyum*, *M. edule*, *J. acutus*, *P. coronopus* e *H. portulacoides*). Segundo os autores, para a linha celular HepG2 verificou-se um decréscimo significativo da

viabilidade celular para 39% quando exposta ao extrato de *P. coronopus* obtido por extração convencional (usando hexano como solvente), bem como após exposição ao extrato de *M. edule* obtido pelo mesmo método de extração (usando clorofórmio e éter dietílico como solventes (58% e 50% respectivamente) (Rodrigues et al., 2014). Saleem *et al.* avaliaram a viabilidade celular das linhas MCF-7, MDA-MB-231 (células cancerígenas da mama) e DU-145 (células cancerígenas da próstata) quando expostas à halófita *S. fruticosa*, usando uma extração por maceração com diclorometano e metanol (Saleem et al., 2021). Segundo os autores, a viabilidade celular da linha MCF-7 foi de 63,44% e de 45,01%, respectivamente após exposição ao extrato com metanol e diclorometano. Para a viabilidade celular da linha MDA-MB-231 obtiveram-se valores de 77,75%, usando o metanol como solvente, e de 67,22%, quando se recorre ao diclorometano. Por fim, para a linha DU-145, os valores de viabilidade foram de 62,83%, para o extrato metanólico, e de 25,88%, para o extrato com diclorometano (Saleem et al., 2021).

Segundo a literatura, as plantas halófitas são geralmente avaliadas quanto ao seu efeito na viabilidade celular utilizando células cancerígenas, muito devido às capacidades antioxidantes e anticancerígenas reportadas, pelo que se torna impossível a comparação com os resultados obtidos no presente estudo. Contudo, é possível concluir que a salicórnica não afeta a viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos para as concentrações testadas, atestando assim a sua segurança.

5. Conclusão

O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar e valorizar um subproduto produzido industrialmente durante o processamento da planta halófitas *S. ramosissima*, visando a reutilização da mesma em novas indústrias, como a cosmética ou a alimentar (como alternativa ao sal marinho).

Inicialmente, recorreu-se à metodologia de superfície de resposta para otimizar a extração dos compostos bioativos da salicórnia, através de uma extração convencional utilizando água como solvente, visando maximizar a atividade antioxidante/antiradical do extrato. De acordo com o modelo matemático, o extrato ótimo foi obtido a 80° C durante 10 minutos. Nestas condições, o rendimento de extração foi de 36,24%. Este extrato apresentou um teor de compostos fenólicos de 8,91 mg EAG/g es, enquanto o valor reportado para o FRAP foi de 13,56 µmol ESF/100 mg es; para o ABTS foi de 1272,20 µg EAA/100 mg es; e para o DPPH foi de 1106,10 µg ET/100 mg es. No que toca à capacidade de captação de espécies reativas ao oxigénio, constatou-se que o extrato ótimo apresentou uma boa capacidade de captação do ácido hipocloroso ($CMI_{50} = 26,61 \mu\text{g/mL}$) e do radical peróxido ($D_{amostra}/D_{Trolox} = 0,0022$). Contudo, verificou-se uma baixa capacidade de captação do radical superóxido ($CMI_{50} = 324,82 \mu\text{g/mL}$). O perfil fenólico demonstrou a presença de ácidos fenólicos, sendo que o ácido mais abundante foi o ácido 3,5-dicafeoilquínico, bem como flavonoides, mais concretamente derivados de quercetina e isoramnetina.

Através do ensaio MTT foi avaliado o efeito da exposição de duas linhas celulares, fibroblastos e queratinócitos, a diferentes concentrações do extrato. De acordo com os resultados obtidos, para ambas as linhas celulares não se verificou uma diminuição da viabilidade celular até à concentração máxima avaliada (1000 µg/mL), conseguindo manter sempre valores próximos ou superiores a 90%.

Como perspetiva de trabalho futuro, e tendo em conta os resultados obtidos, seria interessante proceder ao desenvolvimento de um produto cosmético, devido à elevada viabilidade celular das linhas testadas, bem como a realização de novos ensaios celulares com células intestinais com o objetivo de verificar quais os efeitos possíveis ao incorporar este subproduto na indústria alimentar.

Referências

- Alabdulkarim, B., Bakeet, Z. A. N., & Arzoo, S. (2012). Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *Journal of King Saud University - Science*, 24(4), 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2012.03.001>
- Alhdad, G. M., Seal, C. E., Al-Azzawi, M. J., & Flowers, T. J. (2013). The effect of combined salinity and waterlogging on the halophyte *Suaeda maritima*: The role of antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.10.010>
- Alonso Vargas, M. Á., Juan Gallardo, A. I., & Crespo Villalba, M. B. (2007). *Salicornia-Sarcocornia* : ¿una pesadilla o una realidad taxonómica? *Cuadernos de Biodiversidad*, 23, 18–20. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2007.23.03>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). *Methods for testing antioxidant activity*. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Antunes, M. D., Gago, C., Guerreiro, A., Sousa, A. R., Julião, M., Miguel, M. G., Faleiro, M. L., & Panagopoulos, T. (2021). Nutritional characterization and storage ability of *salicornia ramosissima* and *sarcocornia perennis* for fresh vegetable salads. *Horticulturae*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7010006>
- APN. (2018). *Aromatizar sabores: ervas aromaticas e salicornia*.
- AquaCombine Project. (2020). <https://www.aquacombine.eu/>
- Araújo, A., Carapeto, J., Neiva, P., Pereira, L., Lopes, U., Schwarzer, E., Portela-Pereira, & R. Faria. (2021). *Salicornia ramosissima* J.Woods - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica.
- Bakhouch, I., Aliat, T., Boubellouta, T., Gali, L., Şen, A., & Bellik, Y. (2021). Phenolic contents and in vitro antioxidant, anti-tyrosinase, and anti-inflammatory effects of leaves and roots extracts of the halophyte *Limonium delicatulum*. *South African Journal of Botany*, 139, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.030>
- Barlavento. (2019, October 3). *Salicornia, o sal do futuro já cresce e bem na Figueira*. <https://barlavento.sapo.pt/destaque/salicornia-o-sal-do-futuro-ja-cresce-e-bem-na-figueira>
- Barreira, L., Resek, E., Rodrigues, M. J., Rocha, M. I., Pereira, H., Bandarra, N., da Silva, M. M., Varela, J., & Custódio, L. (2017). Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits? *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 35–42.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.003>

- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, 29(1), 113–123. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>
- Barros, L., Baptista, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1731–1737. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.006>
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2 SUPPL. 1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
- Biorede. (n.d.). *Chenopodiaceae*. Retrieved June 16, 2021, from <http://www.biorede.pt/text.asp?id=3288>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. In *World Allergy Organization Journal* (Vol. 5, Issue 1, pp. 9–19). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Block, M. S., & Rowan, B. G. (2020). Hypochlorous Acid: A Review. In *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* (Vol. 78, Issue 9, pp. 1461–1466). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.06.029>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Castañeda-Loaiza, V., Oliveira, M., Santos, T., Schüler, L., Lima, A. R., Gama, F., Salazar, M., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Varela, J., & Barreira, L. (2020). Wild vs cultivated halophytes: Nutritional and functional differences. *Food Chemistry*, 333, 127536. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127536>
- Castroviejo, S. (1991). *Salicornia* L. *Studies in Plant Science*, 2(C), 69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89215-7.50096-8>
- Chang, M. C., Kwak, S. G., & Kwak, S. (2021). Effect of dietary vitamins C and E on the risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 40(6), 3922–3930. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.05.011>
- Chavan, J. J., Gaikwad, N. B., Kshirsagar, P. R., & Dixit, G. B. (2013). Total phenolics, flavonoids and antioxidant properties of three *Ceropegia* species from Western Ghats of

- India. *South African Journal of Botany*, 88, 273–277.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.08.007>
- Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 150, Issue 3, pp. 805–817). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.036>
- Costa, C., Lucia, P., Sara, S., Francesco, S., Nobile Matteo Alessandro, D., & Amalia, C. (2018). Study of the Efficacy of Two Extraction Techniques from *Crithmum maritimum* and *Salicornia europaea*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(7), 456–463.
<https://doi.org/10.12691/jfnr-6-7-6>
- Costa, J. C. (2001). Tipos de vegetação e adaptações das plantas do litoral de Portugal continental. *Homenagem (in Honório) Professor Doutor Soares de Carvalho*, 283–299.
http://www.isa.utl.pt/files/pub/ensino/cdocente/Adaptacoes_Plantas.pdf
- Davy, H. (2009). Antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, 6, 16–31.
- DGS. (2015). Proposta de Estratégia para a redução do consumo de sal na população portuguesa através da modificação da disponibilidade da oferta. *Direção Geral de Saúde*, 2015–2017.
http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/24C4E44D-33B0-4668-A275-A44002CE8D98/0/Estrategia_Sal.pdf
- Díaz, F. J., Benes, S. E., & Grattan, S. R. (2013). Field performance of halophytic species under irrigation with saline drainage water in the San Joaquin Valley of California. *Agricultural Water Management*, 118, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.11.017>
- Dix, M. (2018, September 29). *Oxidative Stress: definition, effects on the body, and prevention*. Everything You Should Know about Oxidative Stress.
<https://www.healthline.com/health/oxidative-stress>
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 652, pp. 18–26). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144.
<https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Faustino, M. V., Faustino, M. A. F., Silva, H., Cunha, Â., Silva, A. M. S., & Pinto, D. C. G. A. (2019). *Puccinellia maritima*, *Spartina maritima*, and *Spartina patens* Halophytic Grasses: Characterization of polyphenolic and chlorophyll profiles and evaluation of their biological

- activities. *Molecules*, 24(20). <https://doi.org/10.3390/molecules24203796>
- Ferreira, D., Pinto, D. C. G. A., Silva, H., Girol, A. P., & de Lourdes Pereira, M. (2018). Salicornia ramosissima J. Woods seeds affected the normal regenerative function on carbon tetrachloride-induced liver and kidney injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(May), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.153>
- Gašparović, A. Č., Lovaković, T., & Žarković, N. (2010). Oxidative stress and antioxidants: Biological response modifiers of oxidative homeostasis in cancer. *Periodicum Biologorum*, 112(4), 433–439.
- Gillingham, L. G., Harris-Janz, S., & Jones, P. J. H. (2011). Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. In *Lipids* (Vol. 46, Issue 3, pp. 209–228). *Lipids*. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3524-y>
- Graça, P. (2013). Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal. *Direção Geral de Saúde*, 27.
- Grigore, M., & Oprica, L. (2015). *Halophytes as Possible Source of Antioxidant Compounds*, in *a Scenario Based On Threatened Agriculture and Food Crisis*. 44(8), 1153–1155.
- Gupta, V. (2014). *Natural Products: Research Reviews Vol.2* (pp. 145–176).
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., Ryder, J. J., Hall, W. L., & Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38–50. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.1.38>
- Hupel, M., Lecointre, C., Meudec, A., Poupart, N., & Gall, E. A. (2011). 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*, 401(1–2), 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.03.004>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.12.026>
- Isca, V. M. S., Seca, A. M. L., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2014). An Overview of *Salicornia* Genus: The Phytochemical and Pharmacological Profile. *Natural Products: Research Reviews Vol. 2*, 2, 145–176.
- Isca, V. M. S., Seca, A. M. L., Pinto, D. C. G. A., Silva, H., & Silva, A. M. S. (2014). Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry*, 165, 330–336.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.117>

- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. In *Food and Bioprocesses Processing* (Vol. 89, Issue 3, pp. 217–233). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Li, J., Lu, Y., Chen, H., Wang, L., Wang, S., Guo, X., & Cheng, X. (2021). Effect of photoperiod on vitamin E and carotenoid biosynthesis in mung bean (*Vigna radiata*) sprouts. *Food Chemistry*, 358, 129915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129915>
- Lima, A. R., Castañeda-Loaiza, V., Salazar, M., Nunes, C., Quintas, C., Gama, F., Pestana, M., Correia, P. J., Santos, T., Varela, J., & Barreira, L. (2020). Influence of cultivation salinity in the nutritional composition, antioxidant capacity and microbial quality of *Salicornia ramosissima* commercially produced in soilless systems. *Food Chemistry*, 333, 127525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127525>
- Lopes, Anabela, Teixeira, D., Calhau, C., Pestana, D., Padrão, P., & Graça, P. (2015). Estratégia Para a Redução Do Sal Na Alimentação Dos Portugueses. *Dgs*, 1–19.
- Lopes, Andreia, Rodrigues, M. J., Pereira, C., Oliveira, M., Barreira, L., Varela, J., Trampetti, F., & Custódio, L. (2016). Natural products from extreme marine environments: Searching for potential industrial uses within extremophile plants. *Industrial Crops and Products*, 94, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.040>
- Lopes, M., Cavaleiro, C., & Ramos, F. (2017). Sodium Reduction in Bread: A Role for Glasswort (*Salicornia ramosissima* J. Woods). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1056–1071. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12277>
- Lucas-Del-Pozo, S., Moreno-Martínez, D., Tejero-Ambrosio, M., & Hernández-Vara, J. (2021). Vitamin E deficiency ataxia in a family with possible cardiac involvement. In *Neurologia* (Vol. 36, Issue 1, pp. 92–94). Spanish Society of Neurology. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.02.001>
- Machado, H., Nagem, T. J., Peters, V. M., Fonseca, C. S., & Oliveira, T. T. de. (2008). Flavonóides e seu potencial terapêutico: [revisão]. *Bol. Centro Biol. Reprod*, 39–33.
- Madeira, A. de M. B. (2015). *EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES PROVENIENTES DE DIFERENTES CULTIVARES DE CAPSICUM ANNUUM L. COM INTERESSE PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA*.
- Mariem, S., Hanen, F., Inès, J., Mejdi, S., & Riadh, K. (2014). Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte *Retama raetam*. *South African Journal of Botany*, 94, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.06.010>

- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. In *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 24–38). <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>
- Martins, C. (2017). *Chemical characterization and biological evaluation of Salicornia ramosissima*. <https://ria.ua.pt/handle/10773/22783>
- Mazouz, W., Haouli, N. E. H., Gali, L., Vezza, T., Bensouici, C., Mebrek, S., Hamel, T., Galvez, J., & Djeddi, S. (2020). Antioxidant, anti-alzheimer, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities of the endemic halophyte *Limonium spathulatum* (Desf.) kuntze on LPS-stimulated RAW264 macrophages. *South African Journal of Botany*, 135, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.021>
- Medini, F., Bourguou, S., Lalancette, K. G., Snoussi, M., Mkadmini, K., Coté, I., Abdelly, C., Legault, J., & Ksouri, R. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany*, 99, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.04.007>
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C.-Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In *Phenolic Compounds - Biological Activity*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66368>
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Mzoughi, Z., & Majdoub, H. (2021). Pectic polysaccharides from edible halophytes: Insight on extraction processes, structural characterizations and immunomodulatory potentials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 554–579. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.144>
- Pais, R. (2011). *Estudo sobre a Origem do Stress Oxidativo na Evolução*.
- Patel, S. (2016). Salicornia: Evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0418-6>
- Pinto, D., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Garcia, J., Saavedra, M. J., Freitas, V., Costa, P., Sarmiento, B., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). From soil to cosmetic industry: Validation of a new cosmetic ingredient extracted from chestnut shells. *Sustainable Materials and*

- Technologies*, 29, e00309. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00309>
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2013, p. 11). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Radwan, H., & Nazif, N. (2007). Phytochemical Investigation of *Salicornia fruticosa* (L.) And Their Biological Activity. *Research Journal Of*, 2(2), 72–78. <http://www.aensonline.com/rjmms/rjmms/2007/72-78.pdf>
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 113, Issue 3, pp. 189–207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reis Giada, M. de L. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech. <https://doi.org/10.5772/51687>
- Rodrigues, F., Palmeira-de-Oliveira, A., das Neves, J., Sarmiento, B., Amaral, M. H., & Oliveira, M. B. (2013). Medicago spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Industrial Crops and Products*, 49, 634–644. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.015>
- Rodrigues, M. J., Gangadhar, K. N., Vizetto-Duarte, C., Wubshet, S. G., Nyberg, N. T., Barreira, L., Varela, J., & Custódio, L. (2014). Maritime halophyte species from southern Portugal as sources of bioactive molecules. *Marine Drugs*, 12(4), 2228–2244. <https://doi.org/10.3390/md12042228>
- Rodrigues, M. J., Matkowski, A., Ślusarczyk, S., Magné, C., Poleze, T., Pereira, C., & Custódio, L. (2019). Sea knotgrass (*Polygonum maritimum* L.) as a potential source of innovative industrial products for skincare applications. *Industrial Crops and Products*, 128, 391–398. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.11.038>

- Rodrigues, M. J., Monteiro, I., Castañeda-Loaiza, V., Placines, C., Conceição Oliveira, M., Reis, C., Caperta, A. D., Soares, F., Pousão-Ferreira, P., Pereira, C., & Custódio, L. (2020). 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*, 143, 111930. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111930>
- Rodrigues, M. J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Varela, J., Barreira, L., & Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products*, 77, 315–322. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.08.061>
- Ryu, D. S., Kim, S. H., & Lee, D. S. (2009). Anti-proliferative effect of polysaccharides from *Salicornia herbacea* on induction of G2/M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 19, Issue 11, pp. 1482–1489). <https://doi.org/10.4014/jmb.0902.0063>
- Saleem, H., Khurshid, U., Sarfraz, M., Tousif, M. I., Alamri, A., Anwar, S., Alamri, A., Ahmad, I., Abdallah, H. H., Mahomoodally, F. M., & Ahemad, N. (2021). A comprehensive phytochemical, biological, toxicological and molecular docking evaluation of *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk.: An edible halophyte medicinal plant. *Food and Chemical Toxicology*, 154, 112348. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112348>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Santos, J., Alves, J., Braz, P., Brazão, R., Costa, A., Santos, M., Assunção, R., Caldas de Almeida, T., & Costa, L. (2020). *Reduction of salt (sodium) in bread and its contribution to the decrease of blood pressure in Portugal*. [https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/7272/1/Final HIA Report_Reduction of salt %28sodium%29 in bread-Portugal_INSA.pdf](https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/7272/1/Final%20HIA%20Report_Reduction%20of%20sodium%20in%20bread-Portugal_INSA.pdf)
- Serviço Nacional de Saúde. (2018). *Redução de sal e de açúcar*. <https://www.sns.gov.pt/noticias/2018/04/05/reducao-de-sal-e-de-acucar/>
- Shaw, A. Y., Chang, C. Y., Liao, H. H., Lu, P. J., Chen, H. L., Yang, C. N., & Li, H. Y. (2009). Synthesis of 2-styrylchromones as a novel class of antiproliferative agents targeting carcinoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(6), 2552–2562. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2009.01.034>

- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 28, Issue 3, pp. 1633–1644). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. In *Experimental Physiology* (Vol. 82, Issue 2, pp. 291–295). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. In *Redox Biology* (Vol. 4, pp. 180–183). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Silva, A. M., Lago, J. P., Pinto, D., Moreira, M. M., Grosso, C., Fernandes, V. C., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). Salicornia ramosissima bioactive composition and safety: Eco-friendly extractions approach (microwave-assisted extraction vs. conventional maceration). *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/app11114744>
- Singh, D., Buhmann, A. K., Flowers, T. J., Seal, C. E., & Papenbrock, J. (2014). Salicornia as a crop plant in temperate regions: Selection of genetically characterized ecotypes and optimization of their cultivation conditions. *AoB PLANTS*, 6. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu071>
- Slama, I., M'Rabet, R., Ksouri, R., Talbi, O., Debez, A., & Abdelly, C. (2017). Effects of salt treatment on growth, lipid membrane peroxidation, polyphenol content, and antioxidant activities in leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *Arid Land Research and Management*, 31(4), 404–417. <https://doi.org/10.1080/15324982.2017.1329759>
- Soares, S. E. (2002). Phenolic acids as antioxidants. In *Revista de Nutricao* (Vol. 15, Issue 1, pp. 71–81). <https://doi.org/10.1590/s1415-52732002000100008>
- Soud, A., Bellani, L., Magné, C., Zorrig, W., Smaoui, A., Abdelly, C., Longo, V., & Ben Hamed, K. (2018). Physiological and antioxidant responses of the sabkha biotope halophyte *Limonium delicatulum* to seasonal changes in environmental conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.008>
- Souza, R. D. de, Nunes, C. dos R., Pereira, S. M. de F., Oliveira, R. R. de, & Oliveira, D. B. de. (2015). Antioxidant activity and content of tannins, phenols, ascorbic acid and sugar in *Cereus fernambucensis*. *Revista Vértices*, 17(1), 183–201. <https://doi.org/10.5935/1809-2667.20150012>
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 24, Issue 6, pp. 345–351). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/S0098->

- Taofiq, O., Rodrigues, F., Barros, L., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies. *Food and Chemical Toxicology*, 127, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.045>
- Tomei, R., & Salvador, M. (2005). Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica*, 1963–1967.
- Veluri, R., Singh, R. P., Liu, Z., Thompson, J. A., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2006). Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 27(7), 1445–1453. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi347>
- Ventura, Y., Eshel, A., Pasternak, D., & Sagi, M. (2015). The development of halophyte-based agriculture: Past and present. In *Annals of Botany* (Vol. 115, Issue 3, pp. 529–540). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu173>
- Ventura, Y., & Sagi, M. (2013). Halophyte crop cultivation: The case for salicornia and sarcocornia. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.07.010>
- Watkinson, A. R., & Davy, A. J. (1985). Population biology of salt marsh and sand dune annuals. *Vegetatio*, 62(1–3), 487–497. <https://doi.org/10.1007/BF00044776>
- Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20–27. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2149>
- Zengin, G., Aumeeruddy-Elalfi, Z., Mollica, A., Yilmaz, M. A., & Mahomoodally, M. F. (2018). In vitro and in silico perspectives on biological and phytochemical profile of three halophyte species—A source of innovative phytopharmaceuticals from nature. *Phytomedicine*, 38, 35–44. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2017.10.017>
- Zhao, Y., Wang, X., Wang, H., Liu, T., & Xin, Z. (2014). Two new noroleanane-type triterpene saponins from the methanol extract of *Salicornia herbacea*. *Food Chemistry*, 151, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.030>

Esta página foi intencionalmente deixada em branco