

Caracterização nutricional e atividade biológica de urtiga selvagem (*Urtica dioica* L.)

Jacqueline de Oliveira Silva

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau
de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por:

Professora Doutora Joana Amaral

Professora Doutora Ailey Aparecida Coelho Tanamati

Bragança

2017

Aos meus pais

Ao meu irmão

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por fazer possível a minha jornada até aqui e por ter me abençoado durante esses dez meses, sem ele nada disso seria possível.

A professora Joana Amaral que graças a sua colaboração e paciência permitiu que a realização desta dissertação fosse possível, muito obrigada por me orientar, ajudar e me ensinar tanto ao longo desses meses, eu sou eternamente grata por isso.

A professora Ailey Tanamati que mesmo longe sempre esteve disposta a ajudar e a passar seus conhecimentos, obrigada professora.

A todos os professores do IPB e da UTFPR por todos ensinamentos passados até aqui.

A Maria João, do laboratório de processos químicos (LPQ), por compartilhar seu conhecimento, por toda paciência e ajuda durante todo o trabalho, muito obrigada.

Aos meus pais e familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir meus sonhos, eu sou tão grata por vocês existirem e me amarem tanto, obrigada mãe por nunca desistir dos meus sonhos, obrigada pai por sempre estar disposto a me ajudar, você é meu herói. Eu amo vocês.

Aos meus amigos que eu fiz antes e durante a minha estadia em Bragança, de uma forma ou de outra vocês me deram força e foram minha família ao longo desses meses, as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram antes e durante minha estadia em Portugal, vocês são indispensáveis na minha vida, e outras que acabaram se tornando durante este período de trabalho e pesquisa, eu amo vocês.

Aos meus amigos mais próximos Heloísa, Rafael e Cleno que foram minha família durante esses meses, obrigada pelos almoços de domingo e pelas risadas eternas, vocês fizeram desse intercambio inesquecível.

Em especial ao Philippe que foi meu suporte e porto seguro nos últimos meses, obrigada por todo amor e carinho.

“ Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos “

Friedrich Nietzsche

Índice Geral

Lista de Tabelas	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Abreviaturas	XIII
Resumo	VX
Abstract	VXII
1. Introdução	3
2. Motivações e objetivos	7
3. Revisão bibliográfica	11
3.1 Botânica	11
3.2 Fitoquímicos.....	12
3.2.1 Composição fenólica	13
3.2.2 Flavonoides	14
3.2.3 Compostos fenólicos do tipo não flavonoides	15
3.3 Análise Nutricional	17
3.4 Atividade Biológica	18
3.4.1 Atividade Antioxidante	18
3.4.2 Atividade Antimicrobiana	23
4. Matérias e Métodos	27
4.1 Obtenção e preparação das amostras	27
4.2 Padrões e reagentes	27
4.3 Caracterização nutricional	28
4.3.1 Teor de umidade	28
4.3.2 Teor de proteína bruta	28
4.3.3 Teor de cinza bruta	29
4.3.4 Teor de gordura bruta	29
4.3.5 Hidratos de carbono	30
4.4 Ácidos gordos	30
4.5 Determinação dos compostos bioativos.....	31
4.5.1 Extração das amostras	31
4.5.2 Compostos fenólicos totais	32
4.5.3 Flavonoides totais	33

4.6	Determinação da atividade antioxidante.....	34
4.6.1	Poder redutor	34
4.6.2	Captação do radical DPPH	35
4.6.3	Inibição da descoloração do β -caroteno.....	36
4.7	Determinação da atividade Antimicrobiana	37
4.7.1	Método de difusão em placas	37
5.	Resultados e Discussão	41
5.1	Análise nutricional	41
5.2	Composição dos ácidos gordos	44
5.3	Compostos bioativos	47
5.4	Atividade antioxidante	51
5.5	Atividade antimicrobiana	58
6.	Conclusão e perspectivas futuras	63
7.	Referências bibliográficas	69
8.	Anexos	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição de nutrientes de <i>U. dioica</i> (folhas escaldadas; apenas considerada a porção comestível) (adaptado da Base de Dados Nacional de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Versão 28).....	18
Tabela 2. Humidade (g/100 g de amostra fresca) e composição nutricional (g/100 g de massa seca) das amostras de <i>U. dioica</i> estudadas (média \pm DP, n=2).....	41
Tabela 3. Composição em macronutrientes (g/100g matéria fresca) e valor calórico de vegetais crus.	44
Tabela 4. Composição em macronutrientes (g/100g matéria fresca) e valor calórico de vegetais cozidos.....	44
Tabela 5. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das amostras estudadas.....	45
Tabela 6. Determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais estudadas nas amostras de <i>U. dioica</i>	50
Tabela 7. Resultados da atividade antioxidante (valores de EC ₅₀ , mg/mL) determinada por diferentes métodos.....	53
Tabela 8. Diâmetro da zona de inibição (mm) obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana face a distintos microrganismos	59

Lista de Figuras

Figura 1 . Imagens ilustrativas de <i>U. dioica</i> na natureza.....	11
Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários descritos nas folhas de <i>U. dioica</i> , 1: rutina, 2: ácido clorogénico, 3: isoquercitrina (adaptado de Jan et al., 2016)	13
Figura 3. Estruturas genéricas dos principais flavonoides (Fonte: adaptado Crozier et al., 2006)	15
Figura 4. Estrutura dos principais compostos fenólicos do tipo não-flavonoides de interesse (Fonte: adaptado Crozier et al., 2006)	16
Figura 5. Esquema do mecanismo de reação de redução do radical DPPH.....	22
Figura 6. Fotografia da determinação de fenólicos totais da solução padrão de ácido gálico com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).....	33
Figura 7. Fotografia da determinação de flavonoides totais da solução padrão de catequina com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).....	34
Figura 8. Fotografia da determinação do poder redutor da solução padrão de Trolox com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).....	35
Figura 9. Fotografia da determinação da % de captação do radical DPPH utilizando a solução padrão de Trolox com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita)	36
Figura 10. Fotografia da determinação de Inibição da descoloração do β -caroteno utilizando a solução padrão de Trolox com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita)	37
Figura 11. Cromatograma obtido pela análise por GC-FID da mistura Supelco de 37 FAMES concentrada (A) e de uma amostra de folhas cruas de <i>U. dioica</i> (B).....	46
Figura 12. Curva de calibração para a determinação do teor total de fenóis expressos em ácido gálico	49
Figura 13. Curva de calibração para a determinação do teor total de flavonoides expressos em catequina.....	49
Figura 14. Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e caules de <i>U. dioica</i>	54
Figura 15. Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas cozidas e água de cozimento A e B de <i>U. dioica</i>	55

Figura 16. Fotografia da determinação da % de captação do radical DPPH utilizando extratos da amostra cozida B com concentrações decrescentes de extratos (da esquerda para a direita) **55**

Figura 17. Poder redutor de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e caules de *U. dioica*..... **56**

Figura 18. Poder redutor de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas cozidas (A e B) e águas de cozimento de *U. dioica*..... **56**

Lista de abreviaturas

ACR	Atividade captadora de radicais livres
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
DOP	Denominação de origem protegida
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	Equivalentes em ácido gálgico
FID	Detector de ionização em chama
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MS	Espectrometria de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
SFA	Ácidos gordos saturados
SI	Sem inibição
TBHQ	Terc-butil-hidroxiquinona
TEAC	Trolox Capacidade Antioxidante Equivalente

Resumo

Algumas plantas podem ser consumidas de variadas formas, cruas ou cozidas, como parte de refeições principais, aperitivos ou até como forma de sumos. Destas destacam-se as plantas selvagens edíveis, que frequentemente desempenham um papel relevante na dieta de populações mais carenciadas em todo o mundo. Entre as muitas espécies existentes, a urtiga comum (*Urtica dioica* L.), uma espécie de plantas selvagens edíveis distribuída no mundo inteiro, foi antigamente utilizada na alimentação humana, apesar da sua utilização ter caído em desuso.

O estudo desenvolvido teve como objetivo a caracterização da urtiga comum, por forma a valorizar esta espécie selvagem tradicionalmente consumida em meios rurais Portugueses e contribuir para a recuperação de hábitos alimentares. Para tal, procedeu-se à avaliação de amostras colhidas em Portugal no que respeita o seu valor nutricional e sua composição em compostos bioativos (fenóis totais, flavonoides totais e composição em ácidos gordos) e atividades biológicas (atividade antioxidante e antimicrobiana). Pretendeu-se ainda analisar o impacto da confeção por cozimento, pois esta planta é geralmente consumida após processamento térmico para destruição do seu carácter urticante.

As amostras de folhas cruas apresentaram um elevado conteúdo proteico (variando entre 25,01-30,22g/100 g de massa seca) e reduzido de gordura (3,17-4,03 g/100 g de massa seca). Contudo, esta evidenciou um valor dietético elevado, dado o seu conteúdo elevado em ácidos gordos polinsaturados, com particular destaque para o ácido essencial α -linolénico, que tem sido associado à proteção contra doenças cardiovasculares. Os resultados demonstraram que, após a cozedura das folhas de *U. dioica*, não houve perdas expressivas de macronutrientes. Além de serem ricas em nutrientes, as urtigas demonstraram ter uma boa atividade antioxidante devido aos compostos bioativos presentes na planta. Contrariamente ao observado para o valor nutricional, verificou-se que o processo de cozimento afeta negativamente o teor de compostos bioativos e potencial antioxidante da planta, verificando-se a passagem de parte destes compostos para a água de cozimento. Em relação a atividade antimicrobiana, verificou-se uma atividade muito elevada face a *P. Aeruginosa*, já os restantes microrganismos testados, não se verificou um grande efeito inibitórios, com algumas exceções, nomeadamente face a *S. aureus* e *B. subtilis*.

Os resultados obtidos em termos nutricionais e de potencial antioxidante permitem destacar a *U. dioica* como uma espécie promissora para diferentes aplicações,

nomeadamente gastronómicas, mas também como fonte de extratos/compostos bioativos que podem ser usados como aditivos noutros produtos alimentares.

Palavras chave: Urtiga; composição nutricional; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

Abstract

Some plants can be consumed in various forms, raw or cooked, as part of main meals, appetizers or even as juices. These include edible wild plants, which often play a relevant role in the diet of the most deprived populations around the world. Among the many existing species, common nettle (*Urtica dioica* L.), a species of edible wild plants distributed worldwide, was formerly used in human food, although its use has fallen into disuse.

The objective of the study was to characterize the common nettle in order to value this wild species traditionally consumed in Portuguese rural environments and contribute to the recovery of eating habits. For this purpose, the samples collected in Portugal were evaluated for their nutritional value and their composition in bioactive compounds (total phenols, total flavonoids and composition in fatty acids) and biological activities (antioxidant and antimicrobial activity). It was also intended to analyze the impact of confection by cooking, since this plant is usually consumed after thermal processing to destroy the stinging character.

The samples of raw leaves showed a high protein content (ranging from 25.01 - 30.22 g / 100 g dry mass) and reduced fat (3.17-4.03 g / 100 g dry mass). However, it has shown a high dietary value, given its high content in polyunsaturated fatty acids, with particular emphasis on α -linolenic acid, which has been associated with protection against cardiovascular diseases. The results showed that, after firing *U. dioica* leaves, there were no significant losses of macronutrients. In addition to being rich in nutrients, nettles proved to have a good antioxidant activity due to the bioactive compounds present in the plant. Contrary to that observed for the nutritional value, it was verified that the cooking process adversely affects the content of bioactive compounds and antioxidant potential of the plant, with the passage of some of these compounds to the cooking water. In relation to the antimicrobial activity, there was a very high activity against *P. aeruginosa*, while the other microorganisms tested did not have a great inhibitory effect, with some exceptions, especially against *S. aureus* and *B. subtilis*.

The results obtained in terms of nutritional and antioxidant potential allow *U. dioica* to be highlighted as a promising species for different applications, namely gastronomic, but also as a source of bioactive extracts / compounds that can be used as additives in other food products.

Keywords: Nettle; Nutritional composition; antioxidant activity; antimicrobial activity.

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Introdução

A urtiga selvagem (*Urtica dioica* L.) é uma das plantas mais populares e cosmopolitas presente na Europa, África, Ásia e América, cujos benefícios dietéticos e terapêuticos são conhecidos desde tempos ancestrais. Apesar de ser frequentemente considerada como uma erva-daninha por muitos agricultores, esta planta tem vindo a ganhar um crescente interesse científico e comercial por ser fonte de muitos produtos naturais com valor agregado e também pelo facto de se poder explorar todas as partes da planta (caules, folhas, raízes e sementes) (Di Virgilio et al., 2015). À semelhança do linho e do cânhamo, a urtiga tem uma longa história na utilização como fibra têxtil. O uso desta planta tem também uma longa tradição na alimentação humana, tendo sido uma das plantas selvagens muito utilizadas pelos índios Americanos (Phillips et al., 2014), estando igualmente descrita a sua utilização em diversos países Europeus, em particular como parte da Dieta Mediterrânica (Guarrera & Savo, 2016). Esta dieta, reconhecida em 2013 como Património Cultural Imaterial da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO), apesar de apresentar alguma variabilidade de país para país, é geralmente rica em vegetais (incluindo plantas selvagens, como a urtiga), produtos frescos e pouco processados, alimentos locais e sazonais, entre outras características. De facto, vários estudos sugerem que, na Europa, a utilização de plantas selvagens edíveis foi recorrente como forma de complementar a alimentação proveniente da agricultura, particularmente em tempos de maior escassez de alimentos, como nos períodos de guerra. Contudo, atualmente muitas destas espécies já não são colhidas na natureza e o seu consumo é apenas lembrado pela população mais idosa (Menendez-Baceta et al., 2012).

Apesar do uso das urtigas na gastronomia tradicional ter caído em desuso, esta planta foi antigamente usada na confeção de sopas e outros pratos tais como omeletes, risotos, tartes e consumido como vegetal cozido (Menendez-Baceta et al., 2012; Guarrera & Savo, 2016; Đurović et al., 2017). Atualmente, na Península Ibérica, o seu uso tem sido promovido através da incorporação em sobremesas e na produção de queijos. Para tal, contribuiu a criação da Confraria da urtiga, em 2009 em Fornos-de-Algodres, bem como a realização de diversas festividades na região Espanhola da Galiza (Portugal de Sabores e Tradições, 2017; La Voz de Galicia, 2017).

O valor nutricional da urtiga é basicamente devido a duas partes da planta: folhas e sementes verdes. Os caules não são utilizados como alimento, devido ao facto de serem

muito fibrosos e, como tal, o seu consumo ser desagradável. As folhas e brotos jovens são usados como alimento, pois são considerados como sendo uma fonte rica em polissacarídeos, ferro, potássio, manganês, cálcio, proteína e aminoácidos essenciais, silício, fosfato e vitamina C, importante para a absorção de ferro. Esta planta é ainda conhecida por apresentar um baixo teor de gorduras saturadas. Contudo, as suas folhas contêm uma ampla quantidade de ácidos gordos essenciais, nomeadamente ácido α -linolénico e ácido linoleico, contendo igualmente carotenoides tais como luteína e β -caroteno. Dada o seu elevado valor nutritivo, as folhas podem ser incluídas na dieta humano para o fortalecimento do corpo, sendo ainda consideradas uma forma natural de conferir sabor a outros alimentos (Jan et al., 2016).

Adicionalmente, vários estudos têm confirmado a presença de numerosos compostos ativos, especialmente nas folhas, com aplicação promissora em diferentes áreas, tais como nas indústrias agroalimentar, farmacêutica e cosmética. Embora, com elevado potencial de mercado, os produtos feitos de urtiga são, atualmente, mais um resultado da curiosidade do que de uma produção industrial em larga escala, principalmente devido à falta de conhecimentos no que respeita a colheita e pós-colheita desta planta (Di Virgilio et al., 2015; Fiol et al., 2016).

Por último, refira-se que a urtiga apresenta como particularidade a presença de pelos urticantes nas suas folhas e caules, que causam uma característica sensação de comichão e ardor devido à ação de compostos existentes no fluido destes pelos, tais como a histamina e acetilcolina (Upon, 2013). Desde a antiguidade, o seu carácter urticante tem sido aproveitado para estimular a circulação e ter um efeito termogénico nas articulações e extremidades do corpo, sendo por isso usada na medicina popular como um remédio para artrite, reumatismo e paralisia muscular (Adrikari et al., 2016). Segundo alguns autores, a atividade terapêutica dos extratos de urtiga poderá estar relacionada com a presença de compostos fenólicos e respetiva atividade antioxidante (Stanojević et al., 2016). Também por este motivo, recentemente, tem existido um grande interesse no estudo da composição química e ação farmacológica das folhas de urtiga.

CAPÍTULO 2

Motivações e objetivos

2. Motivações e objetivos

De acordo com os resultados provenientes de diversos estudos epidemiológicos, o consumo de vegetais e fruta tem efeitos benéficos para a saúde, estando associado à prevenção de determinadas doenças crónicas tais como cancro, diabetes, doenças cardiovasculares, entre outras (Liu, 2013). Pensa-se que muitos dos efeitos benéficos de vegetais e frutos está relacionado com o seu elevado teor em fitoquímicos, com ênfase em compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante.

Apesar da recomendação da inclusão de vegetais na dieta por parte de diversas entidades internacionais, deve-se ter em atenção que em alguns países subdesenvolvidos o acesso a alimentos nutritivos pode ser escasso. Atualmente, uma temática que tem tido crescente atenção pela comunidade científica internacional é a questão da disponibilidade alimentar (*Food security*), que se refere ao fácil acesso e disponibilidade de quantidade suficiente de alimentos nutritivos e seguros para uma alimentação base (FAO, 2003; Mahlangeni et al., 2016). Por este motivo, é também importante estudar fontes alternativas que permitam a obtenção de nutrientes de uma forma acessível, tendo em conta que a biodiversidade alimentar é cada vez mais considerada como sendo muito relevante para a sustentabilidade do fornecimento de alimentos a nível global (Burlingame et al., 2009). Neste âmbito, torna-se relevante o estudo de plantas selvagens, tal como as urtigas, antigamente utilizadas na nutrição das populações rurais, mas que, entretanto, caíram em desuso com o desenvolvimento da indústria agroalimentar, sobretudo nos países desenvolvidos. Apesar de um declínio no hábito de consumo de plantas selvagens edíveis, nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento do interesse científico nestas plantas, verificando-se a realização de diversos estudos etnobotânicos em todo o mundo sobre o consumo deste tipo de plantas.

Por outro lado, nos países considerados desenvolvidos, assiste-se atualmente a um renovado interesse social nestas plantas. De facto, tem ocorrido uma tendência de recuperação de tradições, com diversos consumidores a estarem cada mais disponíveis para consumir produtos de valor acrescentado, tais como alimentos com denominação de origem protegida (DOP), bem como produtos inovadores desenvolvidos com base em alimentos tradicionais. Neste sentido, a utilização da urtiga tem sido promovida na confeção de pratos inovadores, tais como na formulação de sobremesas e queijos devido ao seu *flavor* distinto com características herbáceas, ácidas e a frutos secos (Fiol et al., 2016). Nestes países, tem-se assistido ainda a uma maior propensão para o consumo de produtos

considerados naturais, com diversos consumidores a evitarem produtos processados adicionados de antioxidantes sintéticos. A utilização de aditivos em determinados produtos, torna-se muito importante, sendo, por exemplo, uma das formas mais eficientes de inibir a peroxidação lipídica em produtos cárneos processados (Stanojević et al., 2016; Latoch & Stasiak, 2017). No entanto, hoje em dia, verifica-se uma demanda crescente pela utilização de produtos considerados como sendo mais “naturais”, representando os extratos de plantas uma alternativa à utilização de antioxidantes sintéticos. Desta forma, para além do recomendável consumo direto de vegetais, muitas plantas têm vindo a ser estudadas pois os seus extratos podem potencialmente ser usados como ingredientes funcionais em alimentos e bebidas, bem como noutras áreas tais como em suplementos alimentares e cosméticos.

Considerando que a urtiga é uma planta selvagem com distribuição ubíqua em Portugal, utilizada antigamente como alimento em diversas aldeias Portuguesas, e que em trabalhos prévios de outros autores demonstrou ter uma composição interessante em compostos fenólicos (Otlés & Yalcin, 2012; Orčić et al., 2014), o presente trabalho pretende ser um contributo para a sua caracterização. Assim, o trabalho teve como objetivo determinar o valor nutricional da planta recolhida em diferentes localizações geográficas e diferentes períodos, e proceder à sua caracterização em termos de composição total de compostos bioativos (fenóis totais, flavonoides totais e composição em ácidos gordos) e potenciais atividades biológicas (atividade antioxidante e antimicrobiana). Considerando que esta planta é frequentemente consumida cozinhada, por forma a eliminar o seu carácter urticante, pretendeu-se também avaliar o impacto da confeção por cozimento no seu valor nutricional.

CAPÍTULO 3

Revisão bibliográfica

3. Revisão bibliográfica

3.1 Botânica

A urtiga (*Urtica dioica* L.) (Figura 1) é uma planta herbácea selvagem de floração perene, característica das plantas que possuem folhas durante todo ano, e cujo tempo médio de vida pode ser superior a dois anos. O nome científico da urtiga, pertencente à família Urticaceae, é derivado do verbo latino urere que significa arder ou queimar, sendo esse nome originado pelo carácter urticante da erva (Taylor, 2009). O nome dioico vem do grego “oikos” que significa “duas casas”, uma denominação botânica dada às espécies em que os sexos se encontram individualmente separados, podendo assim ser chamados de unissexuados (Upton, 2013). Os clones masculinos florescem antes dos clones femininos e os grãos de pólen são extremamente pequenos. Geralmente é polinizada pelo vento, sendo dificilmente polinizada por insetos (Taylor, 2009). Como referido, os seus caules e folhas encontram-se cobertos com pelos urticantes (Adhikari et al., 2016). Esta planta é raramente comida por gado ou coelhos, sendo, contudo, atrativa para algumas espécies de caracóis, larvas de borboletas e outros insetos fitofágicos. Moderadamente tolerante à sombra, a urtiga desenvolve-se melhor em terrenos húmidos e frescos. É uma planta nativa da Europa, Ásia, norte da África e América do Norte, atualmente encontrando-se presente no mundo inteiro (Taylor, 2009).



Figura 1 . Imagens ilustrativas de *U. dioica* na natureza (adaptado de <http://bioweb.uwlax.edu>).

2.1 Fitoquímicos

A atividade biológica dos extratos de urtiga pode provavelmente ser atribuída à presença de biomoléculas do metabolismo secundário das plantas, incluindo compostos fenólicos (Orčić et al., 2014). A fim de obter uma melhor compreensão do seu perfil químico, Orčić et al. (2014) desenvolveu um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção de massa (HPLC-MS/MS) para a quantificação de 45 compostos fenólicos frequentemente encontrados em plantas comuns, em extratos hidrometanólicos (20:80, v/v) de amostras de *U. dioica* provenientes de duas regiões da Sérvia. O método desenvolvido no referido estudo foi aplicado na determinação quantitativa de compostos fenólicos em extratos de diferentes partes da planta, nomeadamente caules, inflorescências, folhas e raízes, tendo-se concluído que apenas 21 dos 45 compostos investigados estavam presentes em níveis acima do limite de quantificação confiável. Embora a composição qualitativa dos extratos investigados fosse similar entre si, observou-se uma variação significativa no teor de compostos fenólicos. De uma maneira geral em todos os extratos, o composto mais abundante, contribuindo com até 3,6% de peso do extrato, foi o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, seguido pela quercetina 3-*O*-ramnosilglucósido (rutina) e 3-*O*-glucósido (isoquercitrina) (Orčić et al., 2014).

Os precursores biogénéticos do ácido clorogénico, ácido quínico e ácido cafeico, também apresentaram conteúdos relevantes, principalmente nas partes da planta acima do solo. Todos os outros compostos detetados apresentaram quantidades diminutas, sendo que o seu teor total não excedeu o valor de 0,19% de peso do extrato. Os autores concluíram ainda que a composição das raízes difere daquela apresentada pelas partes aéreas da planta, apresentando um conteúdo significativamente menor para a maioria dos compostos investigados (em alguns casos, em três ordens de grandeza), e a presença característica de secoisolariciresinol, composto este detetado apenas nos extratos de raízes (Orčić et al., 2014). Nas folhas de *U. dioica*, o ácido fenólico e flavonoide maioritários (ácido clorogénico e rutina, respetivamente) apresentaram ambos uma grande diferença de valores entre as amostras provenientes de diferentes localizações geográficas, variando entre 1,23-28,0 mg/g de extrato seco e 0,0018- 4,6 mg/g de extrato seco. Este trabalho permitiu confirmar dados anteriores que sugerem que o extrato de *U. dioica* é uma fonte rica de ácido 5-*O*-cafeoilquínico, rutina e isoquercitrina (Pinelli et al., 2008; Nencu et al., 2015), compostos descritos como tendo atividades biológicas interessantes, tais como antioxidante e anti-inflamatória (Rogerio et al., 2007) e cuja estrutura química pode ser visualizada na Figura 2.

Estes dados suportam a utilização da urtiga como potencial fonte de compostos bioativos bem como a sua aplicação na medicina tradicional, tornando-se um tema interessante de investigação adicional, especialmente no que se refere à sua potencial atividade biológica.

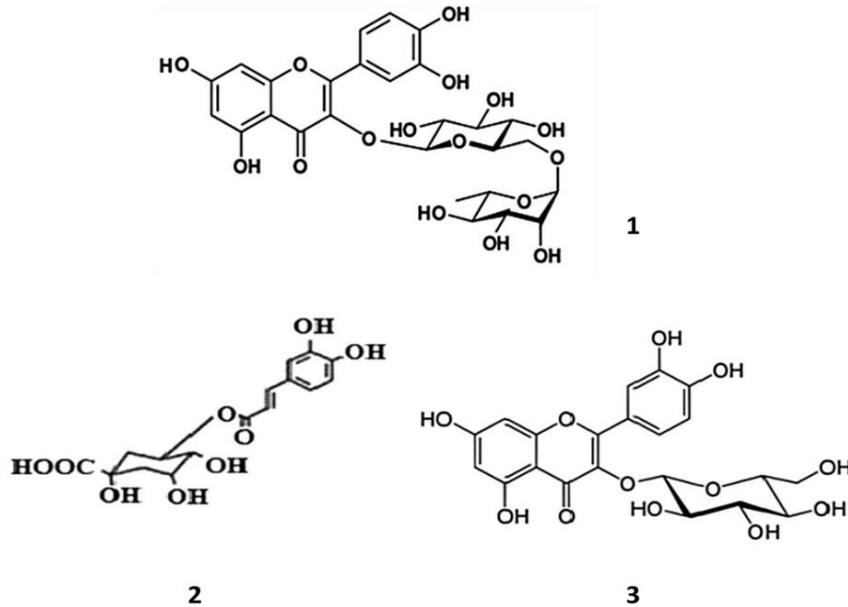


Figura 2. Estrutura química dos compostos maioritários descritos nas folhas de *U. dioica*, 1: rutina, 2: ácido clorogénico, 3: isoquercitrina (adaptado de Jan et al., 2016).

2.1.1 Composição fenólica

As plantas sintetizam uma diversidade de compostos orgânicos que são tradicionalmente classificados como metabolitos primários e secundários. Metabolitos primários são compostos produzidos por todas as plantas e que desempenham funções essenciais, tais como na fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento. Estes incluem fitoesteróis, nucleotídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outros (Seigler, 2012). A composição fenólica, provém do metabolismo secundário, que pode sofrer alterações de stress que podem ocorrer devido ao cultivo e outros fatores. Eles são estruturalmente diversos e muitos encontram-se distribuídos em um número limitado de espécies no reino vegetal (Taiz e Zeiger, 2004). Os compostos secundários são produzidos por vias biossintéticas diferentes daquelas dos metabólitos primários, incluindo a glicólise, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), vias dos aminoácidos alifáticos e aminoácidos aromáticos, via das pentoses e via do ácido chiquímico (Aharoni e Galili, 2011).

Os compostos fenólicos são caracterizados por apresentarem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados. Os fenólicos variam de compostos simples, de baixo peso molecular, de anel aromático único, a taninos grandes e complexos e polifenóis derivados. Eles podem ser classificados com base no número e disposição de seus átomos de carbono e são comumente encontrados conjugados com açúcares e ácidos orgânicos. Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grandes grupos: os flavonóides e os não-flavonóides (Crozier et al., 2006). A presença destes compostos em plantas tem sido muito estudada por estes inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (Soares, 2002). Segundo Soares (2012) diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem em uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de elevada polaridade, muito reativos, e suscetíveis à ação de enzimas.

2.1.2 Flavonoides

Os flavonoides são metabolitos secundários da classe dos polifenóis, sendo considerados dos mais abundantes no reino vegetal (Fraga et al., 2010). Eles estão presentes em altas concentrações na epiderme das folhas e na pele dos frutos e têm papéis importantes e variados como metabolitos secundários. As principais subclasses de flavonóides são as flavonas, flavonóis, flavan-3-óis, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas (Figura 3) (Crozier et al., 2006). A distribuição dos flavonoides nas plantas depende de diversos fatores, bem como da variação das espécies. No que respeita a sua via biosintética, eles são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e da via do acetato. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente UV-B, pois a formação dos flavonoides é acelerada pela luz (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Consequentemente, de uma forma geral, em plantas cultivadas em estufas, onde os raios ultravioletas são bloqueados, o conteúdo de flavonoides é reduzido. Em pesquisas epidemiológicas alguns flavonoides apresentam-se associados com a proteção contra

doenças do envelhecimento, o que pode ser justificado pela sua ação antioxidante (Degáspari & Waszczyński, 2004).

Na natureza, os compostos fenólicos raramente são encontrados na forma livre, sendo que, no caso dos flavonoides, estes ocorrem predominantemente na forma heterosídica. Os flavonoides têm por base a estrutura flavânica, englobando um enorme grupo de moléculas, resultado de pequenas alterações estruturais e, conseqüentemente, diferentes mecanismos de ação e actividades farmacológicas. Os flavonoides têm vindo a ser estudados e reconhece-se hoje o seu enorme potencial de atuação ao nível de variados sistemas biológicos, tal como a atividade antioxidante (Proença da Cunha, 2005; Carvalho, 2014).

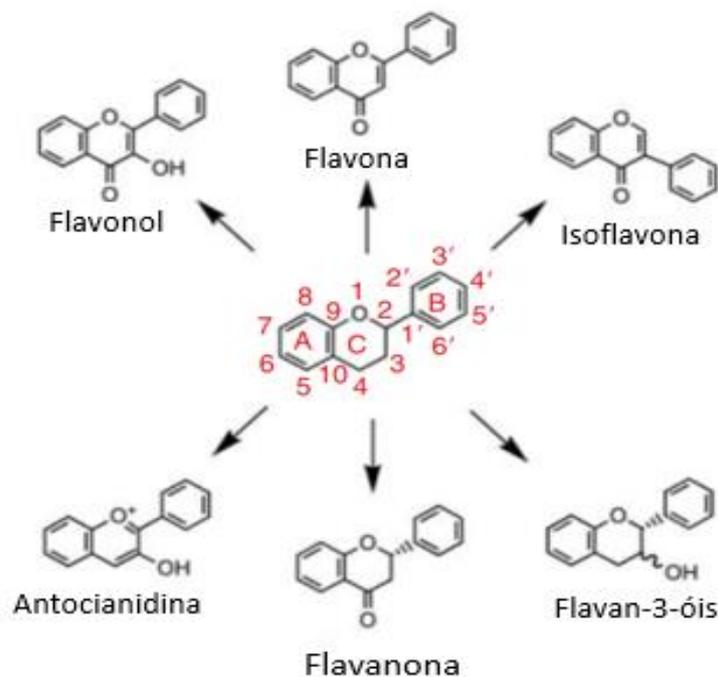


Figura 3. Estruturas genéricas dos principais flavonoides (Fonte: adaptado Crozier et al., 2006).

2.1.3 Compostos fenólicos do tipo não flavonoides

Os principais não-flavonoides de significância dietética são os ácidos benzoicos, mais notavelmente o ácido gálico, que é o precursor de taninos hidrolisáveis, os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados conjugados, e os estilbenos polifenólicos (Crozier et al., 2006). Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbonada, constituída por 3 carbonos ligada ao anel (estrutura

C6-C3, Figura 4). Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são exemplos dos ácidos hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, como por exemplo o ácido clorogénico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres. Isómeros do ácido clorogénico e do ácido caféico são descritos com antioxidantes (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

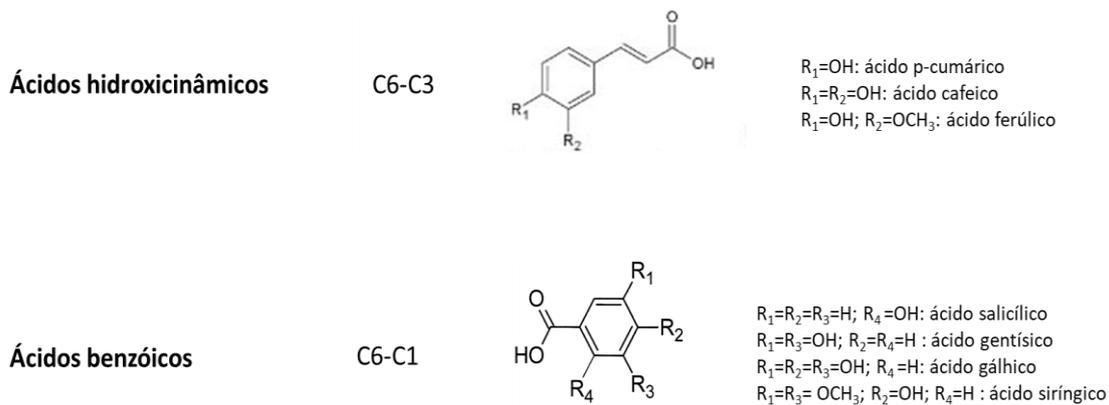


Figura 4. Estrutura dos principais compostos fenólicos do tipo não-flavonoides de interesse (Fonte: adaptado adaptado de Giada, 2013; Oliveira & Bastos, 2011).

No grupo dos ácidos hidroxibenzoicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatéquico, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálhico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos têm apresentado propriedades antioxidantes. Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é geralmente, determinada pelo número de hidroxilos presentes na molécula. A hidroxilo do ácido ferúlico existente na posição orto com o grupo metoxilo, doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil e aumenta a eficiência antioxidante do composto (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). A presença de um segundo hidroxilo na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante. O ácido caféico, que apresenta essa característica, possui uma atividade antioxidante maior do que o ácido ferúlico (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). O efeito sequestrante de radicais parece estar diretamente relacionado aos grupos hidroxilo localizados na posição para no anel aromático. Os ácidos

sináptico, ferúlico e *p*-cumarico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzoico, tais como ácido protocatéquico, siríngico e vanílico. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CHCOOH}$), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

2.3 Análise Nutricional

A urtiga é cozida como um vegetal verde em muitas regiões do mundo devido ao seu alto teor de proteína, sendo igualmente rica noutros constituintes, tais como carotenoides, vitaminas C, B2 e B5, ferro, cálcio, magnésio e fósforo (Tabela 1). O processamento térmico destrói os pelos urticantes e substâncias irritantes neles contidas (Carvalho, 2014), permitindo a sua fácil integração na alimentação humana. Rutto et al. (2013) estudaram o efeito do processamento nas propriedades nutritivas e dietéticas da porção comestível de urtigas, demonstrando que, mesmo após secagem ou cozedura, esta não perde o seu valor nutricional, retendo minerais e vitaminas, além de permanecer bastante rica em fibra e proteína, o que lhe confere valor a nível alimentar. No referido estudo, as folhas (200 g) foram lavadas e processadas por branqueamento (1 min a 96-98 °C) ou cozedura (7 min a 98-99 °C) com ou sem sal (5 g/L), tendo-se determinado os teores de macronutrientes, minerais, aminoácidos e vitaminas. Os resultados mostraram que a urtiga processada pode fornecer cerca de 90% a 100% de vitamina A (na forma de β -caroteno), sendo ainda uma boa fonte de cálcio, ferro e proteína. No mesmo estudo foi estimado o valor nutritivo com base em porções de 100 g, evidenciando o seu baixo aporte calórico. Assim, os autores recomendam o consumo de urtiga fresca ou processada como sendo um alimento de alto teor proteico e fibra, de baixo teor calórico e uma fonte de nutrientes essenciais, tais como minerais e vitaminas, sendo por isso especialmente adequado em dietas vegetarianas, para diabéticos ou outras especializadas (Rutto et al., 2013).

Tabela 1. Composição de nutrientes de *U. dioica* (folhas escaldadas; apenas considerada a porção comestível) (adaptado da Base de Dados Nacional de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Versão 28).

Nutrientes	Unidade	Valor por 100g de massa fresca
Humidade	g	87,67
Energia	kcal	42
Proteína	g	2,71
Lípidos totais	g	0,11
Carboidratos, por diferença	g	7,49
Fibra, dieta total	g	6,9
Açúcares, g total	g	0,25
Cálcio, Ca	mg	481
Ferro, Fe	mg	1,64
Magnésio, Mg	mg	57
Fósforo, P	mg	71
Potássio, K	mg	334
Sódio, Na	mg	4
Zinco, Zn	mg	0,34
Tiamina	mg	0,008
Riboflavina	mg	0,160
Niacina	mg	0,388
Vitamina B-6	mg	0,103
Folato, DFE	µg	14
Vitamina A, RAE	µg	101
Vitamina K, filoquinona	µg	498,6

2.4 Atividade Biológica

A utilização de *Urtiga dioica* na medicina tradicional tem sido associada a várias atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, antidiabética, antimutagénica, antimicrobiana e anti-inflamatória (Jan et al., 2016). Até à presente data encontram-se descritos na bibliografia vários estudos que visam a avaliação de atividades biológicas de extratos de urtiga, em particular atividade antioxidante e antimicrobiana, as quais se detalham nas seguintes subseções, dado que a sua avaliação constitui um dos objetivos deste trabalho.

2.4.1 Atividade Antioxidante

A oxidação é um dos principais fatores que afetam a vida útil dos alimentos, em particular aqueles mais suscetíveis à deterioração lipídica. Por este motivo, é frequente a utilização de aditivos como os antioxidantes, os quais são substâncias que retardam a velocidade das reações de oxidação através de mecanismos diversos, tais como a inibição de radicais livres intermediários (Almasi et al., 2016). Existem dois tipos de antioxidantes

disponíveis, os sintéticos e os naturais, ambos devendo ser seguros para a saúde por forma a poderem ser utilizados em alimentos. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais comuns são o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o *terc*-butil-hidroxiquinona (TBHQ) e o propil galato (PG), enquanto que, entre os naturais os mais utilizados são o ácido ascórbico, vitamina E e o β -caroteno (Almasi et al., 2016).

Nos últimos anos, tem-se assistido a uma preocupação crescente por parte dos consumidores relativamente ao consumo de aditivos sintéticos, existindo uma tendência para optar por alimentos contendo aditivos provenientes de fontes naturais, em detrimento dos sintéticos. Assim, diversos autores têm proposto como alternativa a utilização de extratos de plantas como fonte de produtos naturais, uma vez que estas são frequentemente ricas em compostos fenólicos, os quais são considerados, de uma forma geral, como sendo ótimos antioxidantes (Duarte et al., 2006; Stanojević et al., 2016). Diversos investigadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas.

Segundo Angelo & Jorge (2007), os métodos de análise de compostos fenólicos podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos. A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração utilizado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de armazenamento, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de compostos fenólicos presentes nos alimentos, sendo que a sua solubilidade varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos compostos e suas interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etilo, propanol, e suas combinações. Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos, é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes (Angelo & Jorge, 2007).

Segundo alguns autores, os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinérgicos, removedores/sequestradores de oxigénio, biológicos, agentes quelantes e

antioxidantes mistos (Ramalho & Jorge, 2006). Os antioxidantes primários, nos quais se integram os compostos fenólicos, promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, interrompendo assim a reação em cadeia. Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com estes. Os removedores de oxigénio, como o nome indica, são compostos que reagem com o oxigénio presente no meio, através de reações químicas estáveis, diminuindo desta forma as reações de autooxidação. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como a glucose oxidase, superóxido dismutase e catalase. Os agentes quelantes complexam iões metálicos que podem catalisar as reações de oxidação lipídica (Ramalho & Jorge, 2006).

Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais são moléculas presentes nos alimentos, em pequenas quantidades, que possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres. Sendo assim, são capazes de reduzir a velocidade das reações de oxidação dos compostos lipídicos presentes em determinado produto. Entre os antioxidantes naturais mais utilizados na indústria alimentar estão a Vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferóis), o β -caroteno. Os tocoferóis, por serem um dos melhores antioxidantes naturais são amplamente aplicados como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos gordos insaturados. Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Ramalho & Jorge, 2006). Os compostos fenólicos em geral, são amplamente encontrados em todo o reino vegetal, contudo alguns deles podem encontrar-se mais especificamente em apenas algumas plantas. Por apresentarem diferentes atividades farmacológicas, antinutricional e inibirem a oxidação lipídica, a presença de compostos fenólicos em plantas vem sendo estudada, os quais são geralmente encontrados em todo o reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em um só tipo de planta (Ramalho & Jorge, 2006).

O β - caroteno é um pigmento natural entre o mais abundante do grupo dos carotenoides, presente nos alimentos. Segundo Naves (1998) é encontrado, especialmente, em vegetais e frutas de cor amarelo alaranjado e em vegetais folhosos de cor verde-escura. Nestes, a cor natural dos carotenoides é mascarada pela clorofila, presente nos cloroplastos

(Naves, 1998). As funções biológicas do β -caroteno, consideradas como propriedades essenciais para o bem-estar dos organismos, incluem transferência de energia na fotossíntese; transferência de energia para foto proteção, e conversão metabólica a retinóides. A conversão metabólica do β -caroteno à vitamina A é quimicamente possível devido a sua estrutura molecular que contém anéis β -ionona não substituídos, ligados à cadeia lateral poliênica. Sendo assim, os carotenoides podem, teoricamente, gerar duas moléculas de vitamina A (Naves, 1998). O β -caroteno é encarado como a melhor eliminador do oxigênio singlete, além de ser excelente na procura por radicais livres em uma concentração de oxigênio baixa (Ramalho & Jorge, 2006).

Ensaio da Capacidade de Captação de Radicais DPPH

Um dos métodos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), que contém uma coloração púrpura. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\bullet$), o DPPH \bullet é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (Figura 5), com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorada pela diminuição da absorbância em 517nm. A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (EC_{50}), ou seja quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (Angelo e Jorge, 2007).

O ensaio de DPPH apresenta vantagens por ser uma técnica simples, rápida e que não requer nenhum tratamento especial da amostra, porém o método também apresenta algumas limitações uma vez que o reagente DPPH não deve ser dissolvido em meio aquoso, só pode ser dissolvido em meios orgânicos, os resultados podem ser afetados pelas alterações do reagente decorrentes da ação da luz e do oxigênio, sendo preferencialmente preparado fresco (Karadag et al., 2009).

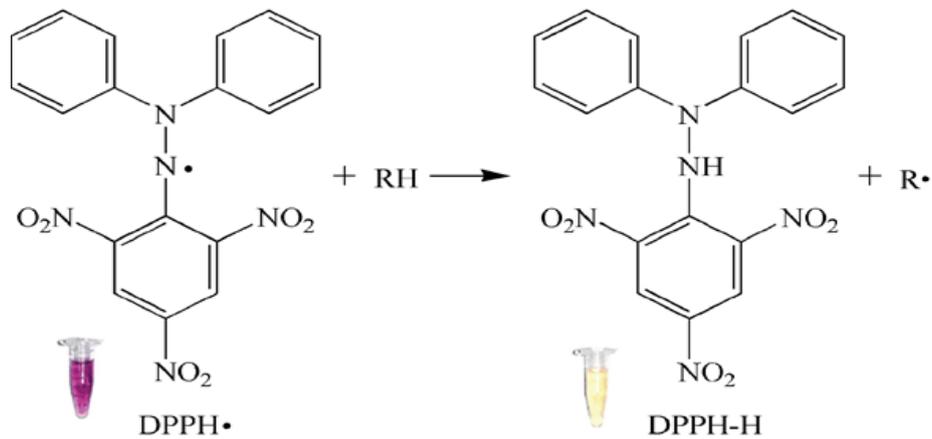


Figura 5. Esquema do mecanismo de reação de redução do radical DPPH.

Ensaio de poder redutor

O ensaio de poder redutor é baseado na capacidade de redução do Fe (III), que apresenta uma coloração amarela, a Fe (II), que apresenta uma tonalidade entre o verde e o azul; esta reação acontece em meio ácido (Karadag et al., 2009). No que diz respeito às suas limitações, qualquer composto (mesmo sem propriedades antioxidantes) com um potencial redox inferior ao do par redox Fe (III) /Fe (II) pode, teoricamente, reduzir o Fe (III) a Fe (II), influenciando e induzindo falsos resultados. Por outro lado, nem todos os antioxidantes reduzem Fe (III). Outro aspeto a ter em consideração é a produção simultânea de Fe (II), que é um conhecido pró-oxidante e pode resultar na formação de radicais adicionais no meio de reação, tal como o radical hidroxilo a partir de H₂O₂. Finalmente, os compostos que absorvem no comprimento de onda da determinação podem interferir, causando sobrestimação do resultado (Magalhães et al., 2008).

Ensaio da Inibição da descoloração do β-caroteno

De acordo com Laguerre et al. (2007), o método de autooxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico representa uma das estratégias para a determinação da atividade antioxidante de uma molécula ou extrato frente a oxidação lipídica. As demais incluem: padrão de consumo de oxigénio na etapa de iniciação do processo oxidativo e determinação dos produtos primários e secundários da oxidação, tais como os hidroperóxidos, malonaldeído e compostos voláteis (álcoois, cetonas e aldeídos). Neste método, oxigénio e calor atuam como iniciadores da oxidação do ácido gordo (substrato lipídico) presente no

meio reacional, o qual é constituído por água arejada, β -caroteno e ácido linoleico. Utilizando geralmente temperatura em torno de 50 °C durante 2 horas, radicais com predominância do peróxido são formados e podem atacar a estrutura poliénica do carotenóide acarretando na perda de coloração do sistema, que é espectrofotometricamente monitorada a 470 nm.

A presença de um antioxidante (nomeadamente, fenólico) pode impedir a extensão da destruição do β -caroteno ao neutralizar o radical livre do ácido gordo e quaisquer outros radicais livres formados no interior do sistema (ou seja, utilizando o seu potencial redox). Assim, para inibir a descoloração do β -caroteno basta adicionar uma amostra contendo antioxidantes (ex: extratos vegetais) pois estes podem ceder átomos de hidrogénio aos radicais, prevenindo assim a descoloração do β -caroteno (Amarowicz et al., 2004)

2.4.2 Atividade Antimicrobiana

As propriedades antimicrobianas de substâncias que as plantas contêm como produtos do seu metabolismo secundário têm sido reconhecidas durante séculos, porém apenas há relativamente pouco tempo têm sido confirmadas cientificamente. Vários grupos de investigadores têm vindo a estudar a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. Adicionalmente, o aumento de resistência de alguns microrganismos patogénicos face à maioria dos antibióticos conhecidos, tem incentivado a procura por antimicrobianos de origem natural. Em diversos estudos realizados até à presente data, diferentes extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Duarte, 2006).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais sendo que os mais conhecidos incluem ensaios *in vitro* utilizando técnicas de difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição). Enquanto que o primeiro, pela sua simplicidade, é muito adequado à realização de testes de screening, os métodos por diluição são mais adequados quando se pretende a determinação da concentração mínima inibitória. Existem outros métodos como a autobiografia, uma técnica útil para determinar compostos bioativos com atividade antimicrobiana de extratos de plantas a partir da inibição do crescimento de micro-organismos através da detecção de anticorpos antimicrobianos. Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no

descobrimto de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos (Ostrosky et al., 2008).

CAPÍTULO 4

Materiais e métodos

4. Materiais e métodos

4.1 Obtenção e preparação das amostras

A colheita das amostras de *U. dioica* utilizadas neste estudo, realizou-se em duas localizações geográficas distintas e em diferentes meses do ano, tendo sido designadas como amostras A, B e C de acordo com a região/época de colheita. A amostra A, foi colhida em Março de 2017, numa propriedade situada na margem do rio Pavia na cidade de Viseu (40° 39' 39" N, 7° 54' 34" E), situada na região centro de Portugal. A amostra B, foi colhida no mesmo período (Março de 2017), mas na cidade de Vila Real (41° 17' 45" N, 7° 44' 46") situada na região Portuguesa de Trás-os-Montes e Alto Douro. A amostra C, foi colhida na mesma localização da amostra A (Viseu), em Junho de 2017. As plantas foram transportadas em sacos de plástico convencionais e trazidas de carro até o laboratório onde posteriormente foram separadas as folhas dos caules. Parte das amostras de folhas foram trituradas para realização da análise nutricional, sendo outra parte, bem como os caules, liofilizada, triturada e armazenada a -20°C. Parte das folhas frescas (amostras A e B), foram ainda cozidas numa proporção de 5 g/100 mL de água destilada durante 5 min, após o que se procedeu à sua liofilização. Adicionalmente, a amostra B foi submetida a cozimento similar, mas por um período de tempo superior (10 min). As águas de cozimento foram filtradas, congeladas e liofilizadas. Todos os liofilizados foram mantidos a -20 °C até ao momento da preparação dos extratos.

4.2 Padrões e reagentes

O Butil-hidroxitolueno (BHT), o trifluoreto de boro (solução de BF₃ em metanol a 14%), o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), o hidróxido de potássio e o sulfato de magnésio foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich Chemical Co.; o β-caroteno foi adquirido à Cayman Chemicals e o ácido linoleico à Alfa Aesar; o cloreto de sódio e o metanol p.a. foram adquiridos à empresa AnalaR Normapur; o *n*-heptano, com pureza adequada para GC, foi comprado à Chromanorm Co. Para identificação dos ácidos gordos utilizou-se a mistura 37 FAME (material de referência certificado CRM47885) e os ésteres metílicos individuais FAME C24:0 e FAME C20:5n3 da Supelco. O padrão usado na determinação de compostos fenólicos totais foi o ácido gálgico, o qual foi comprado à Merck; para a determinação de flavonoides totais utilizou-se a catequina como padrão, adquirida na Cayman Chemical

Company. O reagente de Folin-Ciocalteu e o tween 80 foram adquiridos à Panreac. Para a preparação das soluções de carbonato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio, hidróxido de sódio, tampão fosfato de sódio, ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético, cloreto de ferro III, ácido sulfúrico e ácido clorídrico foram utilizados reagentes de pureza pró-análise.

4.3 Caracterização Nutricional

4.3.1 Teor de humidade

O teor de humidade foi determinado com base nos procedimentos AOAC (1999), tendo-se utilizado o método de secagem em estufa ($105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), baseado na remoção da água por aquecimento. Dois gramas (2 g) de cada uma das amostras foram rigorosamente pesados em capsulas de porcelana previamente taradas e colocadas na estufa. Após secagem, as capsulas contendo as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente, em exsiccador, determinando-se novamente a sua massa. Este procedimento foi repetido até à obtenção de massa constante (por aproximadamente 6 h). As determinações foram realizadas em duplicado e o teor de humidade (%) foi determinado usando a Equação 1.

$$\text{Teor de humidade (\%)} = 100 - (m_1 * 100) / m_2 \quad (1)$$

Onde m_1 é a massa de água obtida por diferença entre a massa inicial e final da amostra, e m_2 é a massa inicial da amostra de urtiga.

4.3.2 Teor de proteína bruta

A determinação da quantidade de proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl, como descrito na norma AOAC 920.152 (AOAC, 1999), tendo por base a determinação do teor de azoto na amostra a partir da mineralização da matéria orgânica por ácido sulfúrico, na presença de um catalisador, fazendo a transformação do azoto em sal de amónio. O amoníaco é libertado em meio alcalino, destilado, recolhido em meio ácido e titulado. Aproximadamente 2,0 g de amostra triturada foram rigorosamente pesados e transferidos para o balão de mineralização para digestão, sendo adicionadas duas pastilhas

de catalisador (2,5 g de selênio), algumas esferas de vidro ou porcelana e 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. A digestão foi feita a uma temperatura de aquecimento regulada de modo a que a ebulição fosse suave. A mineralização foi interrompida cerca de 30 minutos depois do líquido ficar claro ou límpido e se verificar a ausência de fumo branco. O balão foi arrefecido, colocado no aparelho de Kjeldahl e adicionou-se cuidadosamente 50 ml de água destilada e 50 ml de NaOH a 40% para neutralizar o ácido e deslocar o amoníaco. O destilado foi recolhido durante 20 minutos num Erlenmeyer de 200 ml contendo 50 ml de ácido bórico a 4% e 4 gotas de indicador misto (vermelho de metilo/azul de metileno) e em seguida titulado com ácido clorídrico 0,1M. Para cálculo do teor total de proteína utilizou-se o fator de conversão de 6,25.

4.3.3 Teor de cinzas bruta

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla, com base no método da AOAC (1999). Dois gramas (2g) de amostra foram rigorosamente pesados num cadinho de porcelana previamente tarado, o qual foi colocado em mufla a uma temperatura inicial de 100 °C. A temperatura foi gradualmente aumentada diariamente, tendo os cadinhos permanecido na mufla (550 °C ± 5°C) até total incineração da matéria orgânica. Posteriormente, foram arrefecidos num exsiccador até temperatura ambiente e a sua massa registada. O teor de cinzas (%) foi determinado utilizando a Equação 2.

$$\text{Cinzas (\%)} = ((m_1 - m_2) * 100) / m_3 \quad (2)$$

Onde m_1 é a massa do cadinho + cinzas, em g, e m_2 é a massa do cadinho vazio, em g, e m_3 é a massa inicial da amostra de urtiga, em g. As determinações foram realizadas em duplicado.

4.3.4 Teor de gordura bruta

O teor de gordura foi determinado pelo método de extração em Soxhlet descrito na norma AOAC (1999). Cada amostra (aproximadamente 2,0 g) foi pulverizada com sulfato de sódio anidro, colocada numa cartucha apropriada e extraída durante 4 horas com cerca de 160 ml do solvente *n*-hexano. Em seguida, o solvente foi evaporado em rotavapor (Büchi) e o balão contendo a amostra de gordura foi levado à estufa a 105 ± 5 °C durante 1 hora.

Posteriormente, o balão foi arrefecido num exsicador até temperatura ambiente, pesado e este procedimento repetido até à obtenção de massa constante. As determinações foram realizadas em duplicado.

4.3.5 Hidratos de carbono

Os hidratos de carbonos foram determinados, em percentagem, por diferença, utilizando a equação 3, se as amostras estiverem em peso seco, ou a equação 4, se as amostras estiverem em peso húmido:

$$HC (\%) = 100 - (\% \text{ cinzas} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ proteínas}) \quad (3)$$

$$HC (\%) = 100 - (\% \text{ água} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ proteínas}) \quad (4)$$

O valor energético das amostras foi calculado com base no sistema de Atwater, baseado na determinação hidratos de carbono, gordura total e proteínas. O valor de cada nutriente foi multiplicado por seu equivalente calórico e o somatório expressou a quantia de calorias na amostra. Os fatores utilizados foram relativos aos hidratos de carbono (4 kcal/g), proteínas (4 kcal/g) e lípidos (9 kcal/g) (Santos, 2010).

4.4 Ácidos gordos

Para a análise da composição em ácidos gordos procedeu-se à extração da gordura com *n*-hexano em aparelho de Soxhlet. Para minimizar eventuais reações de oxidação, adicionaram-se 100 µL de solução BHT (10mg/ml) à amostra antes da extração. Inicialmente, procedeu-se à maceração da amostra em *n*-hexano a frio durante 1 hora, seguida de extração a quente durante 1 hora. Depois da extração da gordura, a maioria do *n*-hexano foi eliminado em rotavapor (Büchi) seguida de secagem em corrente de azoto. As amostras foram imediatamente utilizadas para a preparação de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMES) ou guardadas em atmosfera de azoto e protegidas da luz. Cada amostra foi submetida a extração em duplicado. Para proceder à reação de transmetilação, adicionou-se diretamente no balão aproximadamente 2 mL de *n*-heptano para solubilizar a gordura e transferi-la para um vial de vidro. Após evaporação em corrente de azoto do *n*-heptano

adicionado, adicionaram-se 4 mL de solução metanólica de KOH (11 g/L), tendo-se homogeneizado a mistura obtida por agitação vigorosa em vórtex. Em seguida, o vial foi colocado na estufa a 90°C, durante 15 minutos, proporcionando a ocorrência da reação de transesterificação dos ácidos gordos. Após este período, as amostras foram retiradas da estufa e arrefecidas, adicionou-se 1 mL de solução metanólica de BF₃ e levou-se novamente o vial à estufa a 90 °C, durante um período de 30 min. Após arrefecimento do vial, adicionou-se 2 mL de *n*-heptano e 2 mL de solução saturada de NaCl, seguindo-se uma agitação vigorosa em vórtex. Após centrifugação (1 min a 4000 rpm) para separação de fases, retirou-se a fase superior para um novo vial, ao qual foi adicionado sulfato de sódio anidro. Após diluição da amostra em *n*-heptano (1:2), estas foram analisadas num sistema de cromatografia gasosa (GC) Bruker SCION 436-GC, equipado com um injetor split-splitless, um detetor de ionização em chama (FID) e um amostrador automático Bruker CP-8410. A separação de ácidos gordos foi realizada numa coluna cromatográfica de sílica CP-Sil 88 (50m x 0.25mm i.d x 0.39mm e.d., Agilent J&W). O injetor foi colocado a 260°C, o volume de injeção foi de 1 µL de amostra. O gás de arraste utilizado foi o hélio com um caudal na coluna de 1 mL/min e utilizou-se uma razão de split de 1:25. O forno foi colocado a uma temperatura inicial de 160°C, a qual foi mantida durante três minutos, após o que foi programada para aumentar a 3°C/min até atingir a temperatura final de 229 °C, sendo esta mantida durante dois minutos. A temperatura do detetor FID foi fixada em 270°C com os seguintes fluxos de gases: Ar= 350mL/min, Hidrogénio= 35mL/min e Azoto= 30mL/min. A recolha e tratamento dos dados obtidos foram efetuados utilizando o software CompassCDS 3.0 (Bruker, Alemanha). Os picos de FAMES foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os obtidos com a mistura de 37 FAMES (material de referência certificado CRM47885da Supelco) e os padrões individuais (FAME) de C20:5n3 e C24:0. O ácido vacénico (C18:1n7) foi identificado com base nas informações obtidas na literatura (Bicalho et al., 2008; Rodrigues et al., 2015). As amostras foram analisadas em triplicado e os resultados expressos em percentagem relativa de cada composto identificado.

4.5 Determinação dos compostos bioativos

4.5.1 Extração das amostras

As amostras estudadas no presente trabalho foram extraídas com etanol absoluto. Para tal, foram adicionados 50 mL de etanol a 2,0 g de cada uma das amostras previamente

lioofilizadas e moídas, sendo a mistura agitada durante 2 horas, à temperatura ambiente e 320 rpm. Após esse período, as amostras foram colocadas num banho de ultrassons (J. P. Selecta, 50 Hz) durante 15 min, foram filtradas e os resíduos obtidos foram ré-extraídos sob as mesmas condições. Após junção dos extratos de cada amostra, procedeu-se à evaporação do solvente em rotavapor Buchi, a 40 °C. O resíduo obtido foi redissolvido em metanol e utilizado após diluição adequada para as determinações seguintes. Todas as amostras de folhas e caules foram extraídas em duplicado.

3.5.2 Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos metanólicos das folhas e caules de *U. dioica* foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Para a obtenção da curva de calibração, utilizou-se uma solução metanólica de ácido gálgico, composto fenólico usado como padrão, com concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,125 e 0,25 mg/ml (Figura 6). Foram preparadas diferentes concentrações dos extratos das amostras, tendo-se usado diluições seriadas 1:2. Misturou-se 500 µl de extrato com 2,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v, em água) e 2 ml de carbonato de sódio (75 g/l). Os tubos foram vortexados por 15 s e colocados a repousar, no escuro, durante 30 min a 40 ° C, para o desenvolvimento de cor. Em simultâneo, foi preparado um branco contendo apenas solvente. Seguidamente, foi medida a absorvância a 765 nm num espectrofotómetro de feixe duplo (Jasco V-530) e calculada a concentração utilizando uma curva padrão obtida com ácido gálgico. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálgico por grama de extrato (mg EAG/ g extrato). Todos os extratos foram analisados, pelo menos, em duplicado.

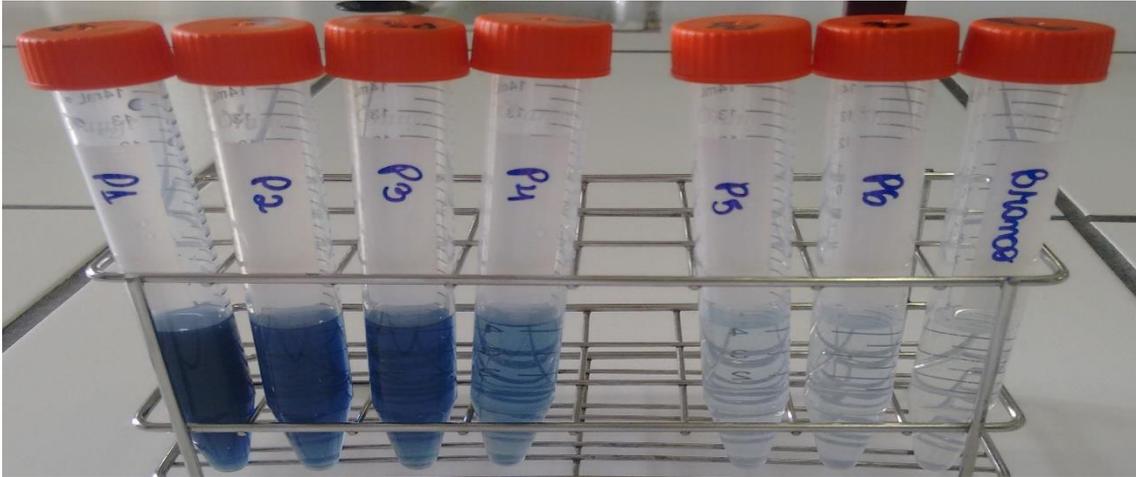


Figura 6. Fotografia da determinação de fenólicos totais da solução padrão de ácido gálico com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).

4.5.2 Flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada por espectrofotometria segundo a metodologia descrita por Jia et al. (1999), tendo-se utilizado uma solução padrão de catequina com concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/ml para obtenção da curva de calibração (Figura 7). Prepararam-se diferentes concentrações (1:2) dos extratos das amostras por diluição em metanol. Misturou-se 500 μ l da solução de extrato ou padrão com 2 ml de água destilada e, posteriormente, com 150 μ l da solução de NaNO₂ (5%). Os tubos foram vortexados por 15 s e deixados repousar por 6 min; após adição de 150 μ l de solução de AlCl₃ (10%), os tubos foram levados ao vortex por 15 s e deixados repousar por mais 6 minutos. Misturou-se 2 ml da solução de NaOH (4%), 200 μ l de água destilada, vortexou-se por 15 s e deixou-se repousar por mais 15 min. No final, caso a solução se apresente turva/com partículas em suspensão, procedeu-se à sua centrifugação. Por último, mediu-se a absorvância a 510 nm e calculou-se a concentração de flavonoides totais utilizando uma curva padrão obtida com catequina, sendo os valores expressos como mg de catequina por g de extrato. Todos os extratos foram analisados, pelo menos, em duplicado.

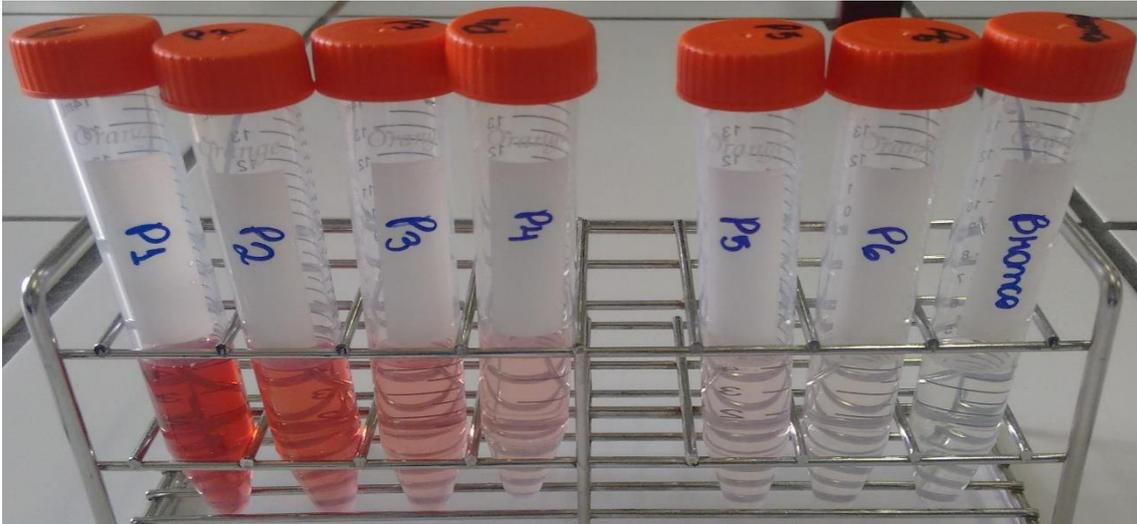


Figura 7. Fotografia da determinação de flavonoides totais da solução padrão de catequina com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).

4.6 Determinação de atividade antioxidante

4.6.1 Poder redutor

O poder redutor dos extratos foi determinado de acordo com o método descrito por Miceli et al. (2009), com ligeiras modificações. Prepararam-se diferentes diluições dos extratos das amostras ((0,0195mg/ml a 2,5 mg/ml). Misturou-se 500 μ l de extrato com 500 μ L de tampão de fosfato de sódio (0,2 M a pH=6,6) e 500 μ L de solução a 1% de ferricianeto de potássio. A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e, após arrefecimento, adicionou-se 500 μ L de ácido tricloroacético (10%). Foi retirado 1 mL do sobrenadante e adicionado 1 mL de água desionizada e 0,4 mL de FeCl₃ (0,1%). A absorvância da mistura obtida foi medida a 690 nm com um espectrofotômetro de feixe duplo (Jasco V-530,2004). A concentração de extrato correspondente ao EC₅₀ foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Como padrão de referência utilizou-se uma solução de trolox em metanol com concentrações entre $9,75 \times 10^{-3}$ - 2,5 mg/ml (Figura 8). Todos os extratos foram analisados, pelo menos, em duplicado.



Figura 8. Fotografia da determinação do poder redutor da solução padrão de Trolox com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).

4.6.2 Captação do radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi executada num espectrofotômetro de feixe duplo (Jasco V-530,2004) tendo-se utilizado Trolox como padrão de referência (com concentrações de $4,88 \times 10^{-3}$ a 0,625 mg/mL) (Figura 9). Para as amostras de folhas de Urtiga dioica (A, B e C) foram preparadas diferentes diluições (correspondendo às concentrações 0,195 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL), enquanto que para as amostras de caules foram utilizadas as seguintes diluições 0,078 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL. Misturou-se 100 μ L de cada uma das diferentes concentrações de extrato com 900 μ L de solução metanólica de DPPH (6×10^{-5} M), colocando-se a mistura obtida ao abrigo da luz durante 1 hora. Procedeu-se de forma similar utilizando metanol para a preparação do branco de reação. A redução do radical DPPH foi avaliada através da medição da absorvância a 517 nm. A atividade captadora de radicais livres (ACR) foi calculada em função da percentagem de descoloração do DPPH usando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(Abs_{\text{DPPH}} - Abs_{\text{Sol}}) / Abs_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Onde Abs Sol representa a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração, e Abs DPPH representa a absorvância da solução de DPPH (branco de reação). A concentração de extrato correspondente a 50% da atividade captadora de radicais (EC50) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem de ACR em função da concentração da amostra. Todos os extratos foram analisados, pelo menos, em duplicado.

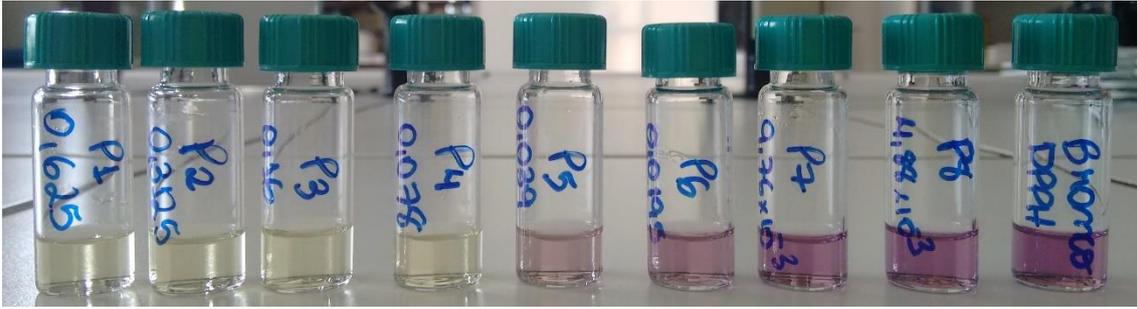


Figura 9. Fotografia da determinação da % de captação do radical DPPH utilizando a solução padrão de Trolox com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita).

4.6.3 Inibição da descoloração do β -caroteno

A determinação da inibição da descoloração do β -caroteno realizou-se com base no método descrito por Barreira et al. (2008), com algumas modificações. Preparou-se uma solução de β -caroteno (2 mg/ml) em clorofórmio e transferiu-se 1,5 ml desta solução para um balão de fundo redondo. Procedeu-se à evaporação do solvente em corrente de azoto, adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml), agitando-se vigorosamente. Seguidamente, transferiram-se 4,8 ml de emulsão obtida para tubos de ensaio contendo 0,2 ml de diferentes concentrações de extrato. Imediatamente após a adição da emulsão, procedeu-se à homogeneização da mistura e leu-se a absorvância a 470 nm (correspondente ao tempo zero, T0). Os tubos foram protegidos da luz e após 2 horas de incubação a 50 °C com agitação (100 rpm), mediou-se novamente a absorvância (Figura 10). Em simultâneo, foi preparado um branco de reação utilizando 0,2 ml de metanol. Foi ainda preparada uma emulsão sem β -caroteno para obtenção do zero de absorvância no espectrofotómetro. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação 3:

$$(\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno após 2 h de ensaio}/\text{conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100 \quad (3)$$

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC50) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extrato.

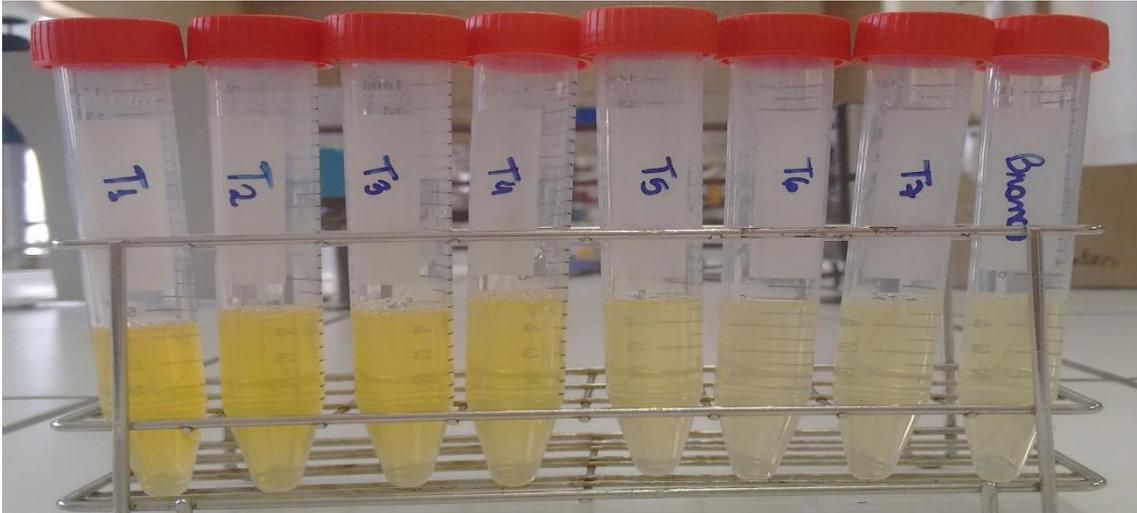


Figura 10. Fotografia da determinação de Inibição da descoloração do β -caroteno utilizando a solução padrão de Trolox com concentrações decrescentes (da esquerda para a direita, T=2 horas).

4.7 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de folhas frescas e caules de urtiga foi avaliada pelo método da difusão em disco em placas de ágar. A atividade antimicrobiana foi avaliada face aos seguintes microrganismos de referência: *Bacillus cereus* (NCTC 10320), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 33186), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Candida albicans* (obtido por isolamento, coleção ESAB). As culturas foram obtidas por crescimento em caldo nutritivo ou caldo BHI, durante 24 horas, a 37°C.

4.7.1 Método da difusão em placas

Os ensaios foram realizados em placas de petri esterilizadas contendo meio Muller-Hinton (LiofilChem). Após ajustar os inóculos a 0,5 McFarland (aproximadamente 108 UFC/mL), as placas foram inoculadas por sementeira à superfície utilizando uma zaragatoa estéril. Procedeu-se à impregnação dos discos de papel (6 mm de diâmetro), previamente esterilizados, utilizando-se 10 μ L de cada um dos extratos (25 mg/ml). Deixou-se evaporar o solvente, adicionou-se mais 10 μ L de extrato e deixou-se evaporar novamente o solvente. Utilizou-se a penicilina (10 μ g) ou canamicina (30 μ g) como controlo positivo e discos

impregnados com 10 μL + 10 μL de metanol como controlo negativo. Os discos foram transferidos para a superfície do ágar e as placas foram colocadas na estufa a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição (mm). Todos os processos descritos foram realizados em câmara de segurança biológica (Telstar Bio II Advance) de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

CAPÍTULO 5

Resultados e discussão

5. Resultados e discussão

5.1 Análise nutricional

A escolha por uma alimentação mais adequada, é uma preocupação cada vez maior dos consumidores, uma vez que existe uma correlação entre alimentação e saúde. O conhecimento do valor calórico e das propriedades nutricionais dos alimentos, permitem ao consumidor selecionar aqueles mais adequados à sua alimentação. Apesar de *U. dioica* ter sido utilizada na alimentação, desde há séculos, em algumas regiões do mundo, como descreve Otles e Yalcin (2012), existe pouca informação disponível no que diz respeito ao seu valor nutricional. No presente estudo, as amostras foram caracterizadas relativamente à sua humidade, proteínas, cinzas, teor de gordura e hidratos de carbono. Os resultados da composição em macronutrientes e minerais (cinzas) obtidos, apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2. Humidade (g/100 g de amostra fresca) e composição nutricional (g/100 g de massa seca) das amostras de *U. dioica* estudadas (média \pm DP, n=2).

Amostra	Humidade	*Proteína	*Cinzas	*Gordura	*Hidratos de carbono	Energia (kcal)
Crua A	83,72 \pm 0,36	26,72 \pm 0,21	20,53 \pm 0,09	4,03 \pm 0,72	48,72 \pm 0,22	55,06
Crua B	79,75 \pm 0,08	30,22 \pm 0,48	16,05 \pm 0,01	3,73 \pm 0,02	50,00 \pm 0,06	81,68
Crua C	78,49 \pm 0,10	28,85 \pm 0,04	20,14 \pm 0,02	3,31 \pm 0,01	47,70 \pm 0,00	72,27
Cozida A 5min	81,89 \pm 0,66	25,01 \pm 0,06	16,82 \pm 0,13	3,97 \pm 0,13	54,20 \pm 0,07	63,85
Cozida B 5 min	80,20 \pm 0,18	29,54 \pm 0,02	13,89 \pm 0,02	3,17 \pm 0,46	53,40 \pm 0,01	71,34

*Valores expressos em g/100g de massa seca

Em todas as amostras, a água foi o componente que apresentou maior abundância, tendo os seus valores variado entre 78,49-83,72 g/100 g amostra fresca. Observou-se também que não houve um aumento expressivo no teor de humidade depois da cozedura da amostra, o que pode dever-se ao facto da amostra ter sido muito bem escorrida, quando retirada da água de cozedura e antes da determinação de humidade. De uma forma geral, os valores de humidade obtidos para as folhas cruas foram inferiores aos descritos na literatura, os quais variaram entre 84,5-89,0% (Rutto et al., 2013; Pradhan et al., 2015; Jan et al., 2016), à exceção de uma amostra colhida na Primavera que apresentou um valor inferior (75,1%) o que sugere a influência da altura de colheita neste parâmetro (Rutto et

al., 2013). De forma similar, as amostras cozidas apresentaram valores ligeiramente inferiores aos descritos na literatura, tendo estes últimos variado entre 84,6 e 87,7% (Rutto et al., 2013; Phillips et al., 2014). Tal como para diversos outros vegetais, é sabido que os valores altos de humidade contribuem para uma fácil degradação/má conservação das plantas, o que pode acarretar a possibilidade de fácil crescimento de microrganismos.

A proteína foi o terceiro componente mais abundante em todas as amostras estudadas, variando entre 25,01-30,22 g/100 g de massa seca (correspondendo a 4,4 a 5,9% em amostra fresca), o que está de acordo com o descrito na literatura (26,9 a 33,8% em massa seca) (Jan et al., 2016; Adrikari et al., 2016). Dependendo da época de colheita (Outono ou Primavera), Rutto et al. (2013) reportaram valores de proteína entre 3,7% e 6,3% e entre 3,6% e 3,8% (g/100g amostra fresca), para folhas cruas e cozidas respetivamente.

Os resultados obtidos demonstram que não houve perdas expressivas de proteínas devido ao processo de cozedura, e ainda que o conteúdo de proteína foi similar para as amostras provenientes de diferentes regiões geográficas (A e B) e épocas de colheita (A e C). Adrikari e co-autores (2016) avaliaram a composição nutricional de urtigas colhidas no Nepal e farinhas de trigo e cevada, tendo concluído que o teor de proteína em *U. dioica* pode apresentar valores em massa seca (33,8%) de até cerca de 3 vezes superior comparativamente com os existentes nos cereais tradicionais, como o arroz, trigo e cevada (33,8% vs. 10,6-11,8%). Os autores referem ainda que, considerando o elevado teor proteico da urtiga, é expectável que esta forneça concentrações superiores de aminoácidos essenciais. O mesmo foi descrito num estudo anterior, no qual *U. dioica* foi descrita como tendo um melhor perfil de aminoácidos do que a maioria de outros vegetais de folha verde (Rutto et al., 2013).

O quarto componente mais abundante nas amostras estudadas foram os minerais (cinzas). As amostras cruas (A e C) apresentaram valores de cinzas superiores aos da amostra B, o que sugere a influência do tipo de solo/região geográfica onde elas foram colhidas. Já o parâmetro “época de colheita” não conduziu à existência de diferenças relevantes nos valores obtidos. Adicionalmente, observou-se uma perda ligeira de minerais após a cozedura das amostras A e B, o que está de acordo com o reportado por Mahlangeni et al. (2016). Contudo, os valores obtidos para as amostras cozidas (2,7-3,1% em massa fresca) são, assim mesmo, superiores aos descritos para outros vegetais de folha verde crus tais como o agrião (0,94% em massa fresca) (Pinela et al., 2016) e o espinafre (1,96%) (Murcia

et al., 1992) e idênticos ao descrito por Adrikari et al. (2016) para amostras de urtiga crua (16,2% em peso seco).

No que respeita os teores de gordura total, todas as amostras apresentaram valores baixos, variando entre 3,17-4,03% em peso seco, o que está de acordo com o descrito noutros trabalhos (Upton, 2013; Adrikari et al., 2016; Jan et al., 2016). As amostras de folhas de urtiga estudadas apresentaram um elevado valor nutricional, sendo uma fonte rica em proteínas e minerais, mas de baixa contribuição calórica, dado o seu reduzido teor em gordura. Após cozedura, as folhas de urtiga não perderam o seu valor nutricional de modo expressivo, permanecendo bastante rica em proteínas e minerais, o que lhe confere valor a nível alimentar, sendo por isso adequado/saudável a sua inclusão na dieta.

A Tabela 3 apresenta a comparação da composição em macronutrientes de alguns vegetais consumidos usualmente, com os valores obtidos neste estudo para *U. dioica*. Comparativamente com os restantes, a urtiga é o alimento que apresenta o teor de proteínas superior (sendo cerca de duas vezes superior ao do agrião e do espinafre, frequentemente usados na confeção de sopas), assim como de cinzas, indicando que possivelmente terá um conteúdo superior em minerais essenciais. Devido ao seu superior teor proteico e em hidratos de carbono, o seu valor calórico é superior ao dos restantes vegetais, sendo contudo um valor relativamente baixo.

Na Tabela 4 apresenta-se a composições em macronutrientes de alguns vegetais cozidos e escorridos (sem adição de sal), incluindo as informações para as folhas de urtiga obtidas no presente trabalho e as provenientes da base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA Food Composition Databases) (folha de urtiga, escaldada). Podemos observar que as amostras de urtiga estudadas neste trabalho apresentaram valores superiores aos da USDA, em parte devido ao seu teor inferior em água.

Comparando os valores de amostras cruas (Tabela 3) e cozidas (Tabela 4), verifica-se que, no caso da couve, ocorre uma perda considerável de proteína e minerais após o aquecimento. Tal não acontece na urtiga, que parece apresentar uma característica mais eficiente de retenção de nutrientes, sendo por isso mais adequado o seu consumo em sopas e outros pratos confecionados com processamento térmico, comparativamente com a couve.

Tabela 3. Composição em macronutrientes (g/100g matéria fresca) e valor calórico de vegetais crus.

Amostras	Humidade	Proteína	Minerais (Cinzas)	Gordura	Hidratos de carbono	Energia (kcal)
<i>U. dioica</i> ^a	79,75	5,77	3,34	0,71	10,43	71
<i>Agrião</i> ^b	95,12	2,29	0,57	0,09	1,29	12
Couve ^b	84,04	4,28	0,82	0,93	8,75	49
Espinafre ^b	91,40	2,86	0,87	0,39	3,63	23
Repolho ^b	92,18	1,28	0,27	0,10	5,80	25

^a Dados do presente trabalho; ^b Adaptado da Base de Dados Nacional de Nutrientes da USDA, Versão 28 (2016). Os valores e massas de nutrientes são para a porção comestível.

Comparativamente com os restantes vegetais cozidos apresentados na Tabela 3, e com base na sua composição nutricional, a urtiga apresenta-se como uma opção interessante podendo ser usada como substituto destes/fonte alternativa de nutrientes. Por ser considerada uma “erva daninha” de fácil crescimento e se encontrar espalhada pelo mundo inteiro, a urtiga pode ser uma fonte de proteína em populações de baixos rendimentos monetários, contribuindo para o combate à desnutrição em populações carenciadas.

Tabela 4. Composição em macronutrientes (g/100g matéria fresca) e valor calórico de vegetais cozidos.

Amostras	Humidade	Proteína	Minerais (Cinzas)	Gordura total	Hidratos de carbono	Energia (kcal)
<i>U. dioica</i> ^a	81,05	5,21	2,89	0,67	10,19	68
<i>U. dioica</i> ^b	87,67	2,71	0,95	0,11	7,49	42
Brócolos ^b	89,25	2,38	0,40	0,41	7,18	35
Couve ^b	91,20	1,90	0,37	0,40	5,63	28
Espinafre ^b	91,21	2,97	0,82	0,26	3,75	23
Repolho ^b	92,57	1,27	0,30	0,06	5,51	23

^a Dados do presente trabalho; ^b Adaptado da Base de Dados Nacional de Nutrientes da USDA, Versão 28 (2016). Os valores e massas de nutrientes são para a porção comestível.

5.2 Composição de ácidos gordos

Os resultados da composição em ácidos gordos em percentagem relativa dos compostos identificados, incluindo ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), ácidos gordos polinsaturados (PUFA), e as razões de PUFA/SFA e n-6/n-3, apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 5. Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das amostras estudadas.

Ácido gordo	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra B cozida
C12:0	1,01 ± 0,11	0,39 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,61 ± 0,03
C14:0	2,44 ± 0,65	0,74 ± 0,05	0,83 ± 0,01	1,18 ± 0,04
C15:0	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02
C16:0	9,30 ± 0,67	10,33 ± 0,17	14,09 ± 0,11	12,89 ± 0,47
C16:1	1,32 ± 0,05	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,00	0,96 ± 0,08
C17:0	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,02
C18:0	1,20 ± 0,01	1,22 ± 0,07	3,25 ± 0,00	1,54 ± 0,06
C18:1n9c	3,31 ± 0,15	1,55 ± 0,07	5,39 ± 0,03	1,99 ± 0,07
C18:1n7	0,46 ± 0,09	0,53 ± 0,00	0,26 ± 0,05	0,50 ± 0,08
C18:2n6c	19,91 ± 1,02	30,17 ± 0,50	22,97 ± 0,11	23,25 ± 0,36
C20:0	1,67 ± 0,02	2,57 ± 0,00	2,65 ± 0,04	2,07 ± 0,27
C18:3n3	51,29 ± 2,72	42,78 ± 0,50	41,92 ± 0,29	47,26 ± 0,43
C21:0	0,17 ± 0,00	0,25 ± 0,04	0,35 ± 0,01	0,27 ± 0,01
C20:2n6	0,54 ± 0,00	1,04 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,68 ± 0,06
C22:0	1,12 ± 0,75	2,52 ± 0,34	2,70 ± 0,09	2,20 ± 0,26
C20:3n3	0,21 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,37 ± 0,03
C20:4n6	1,02 ± 0,02	2,07 ± 0,02	1,73 ± 0,02	1,57 ± 0,04
C23:0	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01
C20:5n3	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,30 ± 0,03
C24:0	1,59 ± 0,03	2,56 ± 0,08	0,27 ± 0,01	1,74 ± 0,01
C22:6n3	0,55 ± 0,04	0,65 ± 0,09	1,67 ± 0,03	0,35 ± 0,06
Σ SFA	21,2 ± 0,3	20,6 ± 0,4	25,1 ± 0,1	22,4 ± 0,5
Σ MUFA	5,1 ± 0,2	2,1 ± 0,3	6,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Σ PUFA	73,8 ± 0,3	77,3 ± 0,2	69,0 ± 0,1	72,9 ± 0,8
PUFA/SFA	3,5	3,8	2,8	3,3
ω6/ω3	0,41	0,76	0,57	0,53

Média ± DP de 3 injeções cromatográficas para cada extrato (n=6).

No total, foram identificados 21 ácidos gordos com base na informação obtida da análise por GC-FID da mistura padrão contendo 37 FAMES (Figura 11). Como referido, os compostos foram quantificados em % relativa. Nas amostras de folhas cruas de urtiga, os compostos maioritários foram os ácidos α -linolénico (com uma variação entre 41,9-51,3%), linoleico (19,9-30,2%) e palmítico (9,3-14,1%). Trabalhos anteriores realizados com urtigas colhidas nos EUA, Espanha e Sérvia, descrevem igualmente o ácido α -linolénico como sendo o composto predominante (22,6-49,55%), contudo apresentando o ácido palmítico valores ligeiramente superiores aos do ácido linoleico (16,30-20,2% e 11,7-23,4%, respetivamente) (Guil-Guerrero et al., 2003; Rutto et al., 2013; Đurović et al., 2017). A nível qualitativo,

verificou-se a presença de diversos ácidos gordos cuja presença em plantas foi já descrita (Guil et al., 1996), sendo que o perfil obtido está de acordo com o descrito por Đurović et al. (2017) para *U. dioica*.

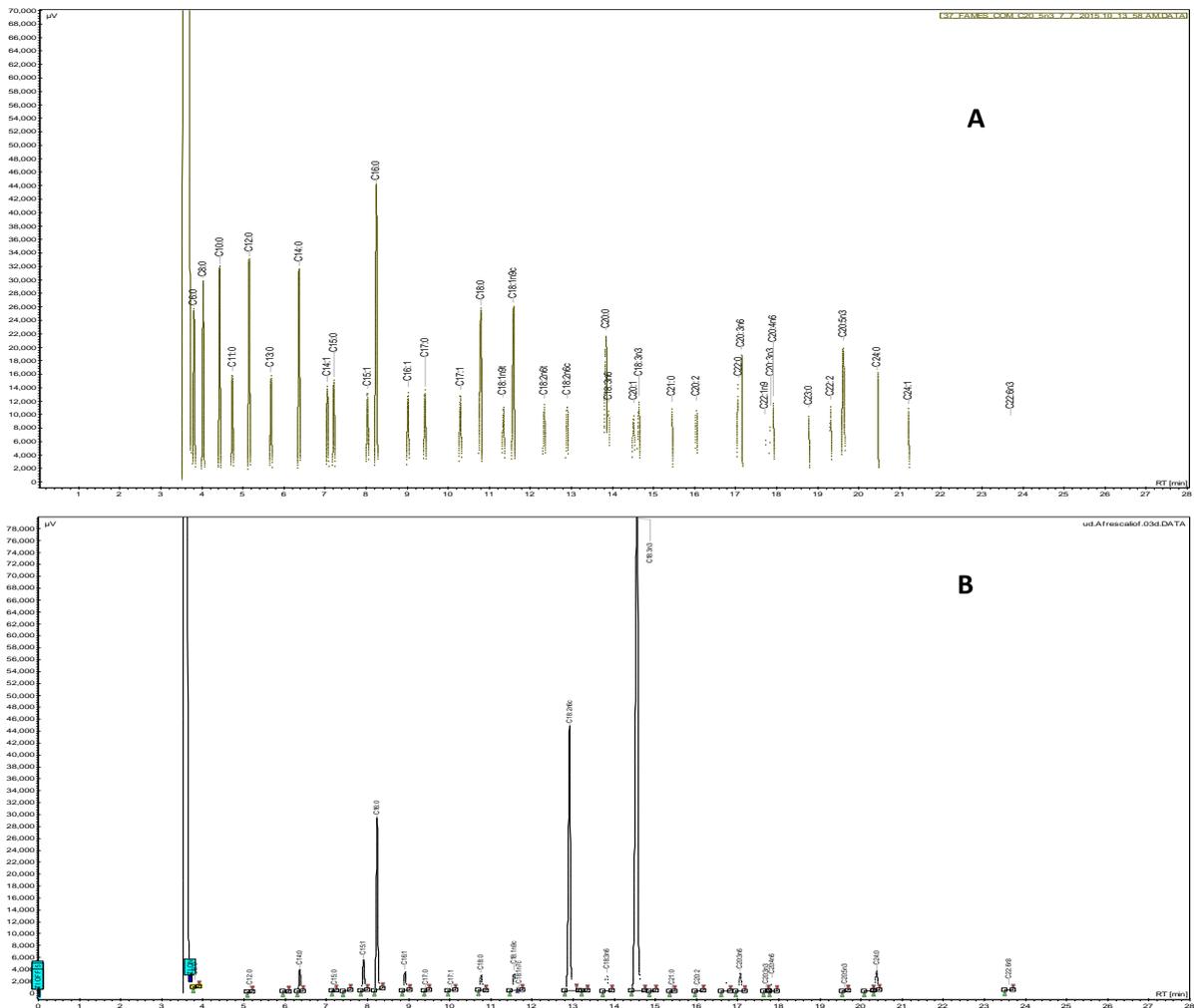


Figura 11. Cromatograma obtido pela análise por GC-FID da mistura Supelco de 37 FAMES concentrada (A) e de uma amostra de folhas cruas de *U. dioica* (B).

De uma forma geral, as três amostras de folhas de urtiga cruas revelaram uma nítida prevalência de PUFA (Tabela 5). Contudo, apesar das três amostras apresentarem um perfil qualitativo similar entre si, as diferenças quantitativas foram notórias. Quando comparadas as amostras A e B, ambas colhidas no mês de Março, mas em regiões geográficas distintas, verifica-se que a amostra proveniente de Viseu apresentou um teor muito superior em ácido α -linolénico e menor em ácido linoleico, comparativamente com a amostra colhida em Vila Real. Quando comparadas as amostras A e C, ambas colhidas no mesmo local, mas em meses diferentes (Março e Junho), verifica-se a diminuição do teor de ácido α -linolénico e

um aumento dos ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Apesar dos resultados sugerirem a influência quer da localização geográfica/tipo de solo, quer da época de colheita na composição em ácidos gordos da folha de urtiga, refira-se que outros fatores podem também conduzir a variações, nomeadamente o grau de maturação das folhas. Guil-Guerrero et al. (2003) estudou a composição de folhas jovens e maduras de urtiga, tendo descrito valores muito dispares entre estas, nomeadamente no que se refere ao composto maioritário, ácido α -linolénico, o qual apresentou um teor de $40,7 \pm 3,2$ % e $29,6 \pm 2,1$ % nas folhas maduras e jovens, respetivamente. Na colheita e separação das folhas de urtiga, observou-se que de facto algumas folhas eram muito grandes e desenvolvidas comparativamente a outras, mas este fator não foi tido em consideração, podendo ser também um parâmetro influenciador dos resultados. Neste tipo de estudo, é sempre aconselhável proceder ao estudo de um maior número de amostras, se possível, colhidas em 3 anos distintos, por forma a minorar a influência das variações (temperatura, pluviosidade, radiação solar, etc.) que ocorrem naturalmente em cada ano. Assim, com base nos resultados obtidos, em estudo subsequentes, as folhas deverão ser separadas em folhas jovens e maduras ou por escalas de tamanho diferentes, por forma a eliminar a influência deste parâmetro e confirmar a influência da localização geográfica e época de colheita na composição da urtiga.

No que se refere às amostras cozidas, o estudo foi apenas efetuado para as amostras colhidas no mês de Março (amostras A e B). No entanto, devido a escassez de quantidade da amostra A disponível, recorreu-se a uma amostra triturada e congelada. Para as duas amostras, verificou-se um comportamento muito distinto o que poderá estar relacionado com o facto referido. A amostra B cozida apresentou um perfil quantitativo similar à amostra crua, com algumas variações, nomeadamente um decréscimo da percentagem de ácido linoleico, com a conseqüente aumento da maioria dos restantes compostos, refletindo-se em particular no composto maioritário, ácido α -linolénico. Similarmente, Rutto et al. (2013) descreveu a ocorrência de um aumento do teor de ácido α -linolénico com o processamento térmico da folha de urtiga (48,8% para 55,5%, valor médio) e uma diminuição do teor de ácido linoleico (23,6% para 20,9%, valor médio), sendo estas variações mais intensas no caso das folhas cozidas durante 7 min comparativamente a folhas escaldadas em água fervente. No caso da amostra A, verificou-se um comportamento totalmente distinto, com uma redução de cerca de 3 a 4 vezes o teor de ácido α -linolénico e o conseqüente aumento da maioria dos restantes compostos, com particular ênfase para os compostos saturados, os

quais aumentaram de 21,2% para 61,3%, ao passo que o total de PUFA diminuiu de 73,8% para 32,1%. Este resultado poderá muito possivelmente à diferença de procedimento referida no cozimento da amostra A face à amostra B.

De uma maneira geral, é sabido que a gordura saturada (particularmente ácidos gordos de cadeia curta, e especialmente o ácido mirístico) estão associados a um aumento da concentração plasmática de colesterol, ocorrendo uma associação contrária para os PUFA e, também, para os MUFA. Por outro lado, o consumo de ácidos gordos ómega-3, especialmente de origem marinha, sendo precursores de eicosanoides e outros mediadores anti-inflamatórios, podem ter possíveis benefícios para inúmeras condições patológicas, incluindo as cardiovasculares (Santos et al., 2013). No que se refere aos ácidos gordos ómega-3 de origem vegetal, como o ácido gordo essencial α -linolénico, a maior parte dos estudos sugere que o seu consumo pode proteger contra eventos cardiovasculares. No que respeita o papel da razão ómega-6/ómega-3 na dieta na patogénese de doenças cardiovasculares, inflamatórias e autoimunes, este tem sido algo controverso (Santos et al., 2013), contudo alguns autores referem que a razão ómega-6/ómega-3 mais adequada deve ser inferior a 4,0 e que a razão PUFA/SFA deve ser superior a 0,45 (Guil et al., 1996). Considerando esta informação e tendo em conta o perfil de ácidos gordos obtido para a maioria das amostras, a urtiga apresenta uma gordura com um perfil interessante e cujo consumo pode ser potencialmente benéfico para a saúde.

5.3 Compostos bioativos

Nas últimas décadas, diversos extratos de plantas aromáticas e ervas medicinais têm sido estudados devido à sua atividade antioxidante, a qual é geralmente atribuída ao conteúdo em compostos fenólicos. Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como sendo substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Até à presente data, existem cerca de cinco mil compostos fenólicos descritos, destacando-se os flavonoides, ácidos fenólicos e fenóis simples, entre outros (Angelo e Jorge, 2007).

Neste trabalho, o teor total de fenóis foi determinado por espectrofotometria pelo método de Folin-Ciocalteu, com base na construção de uma curva de calibração usando uma solução padrão de ácido gálgico com concentração definida e respetivas diluições. O teor total de flavonoides foi igualmente determinado por espectrofotometria e expresso em

equivalentes de catequina. Para determinações realizadas em diferentes dias foram calculadas novas curvas de calibração. Nas Figuras 12 e 13 apresentam-se uma das curvas obtidas para a determinação do teor total de fenóis e de flavonoides, respectivamente, onde se pode verificar a elevada correlação obtida.

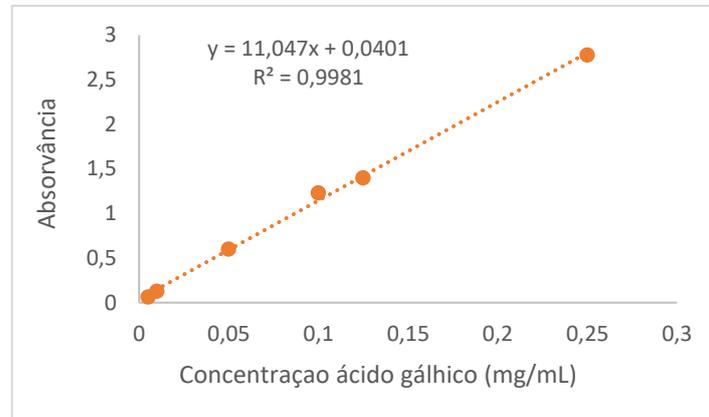


Figura 12. Curva de calibração para a determinação do teor total de fenóis expressos em ácido gálico.

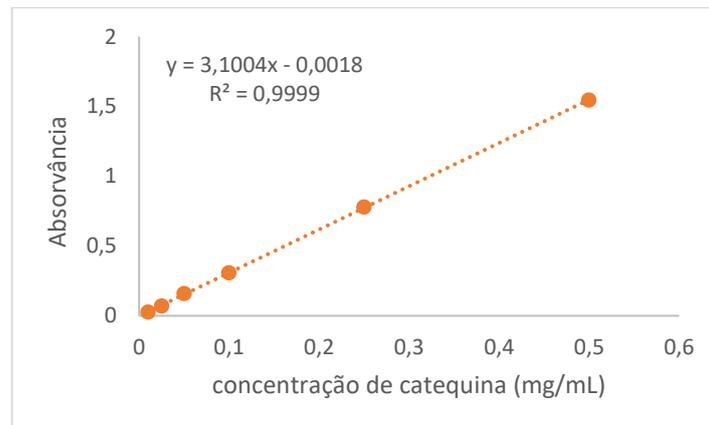


Figura 13. Curva de calibração para a determinação do teor total de flavonoides expressos em catequina.

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos para o teor total de compostos fenólicos e flavonoides das amostras estudadas. Atualmente, muitos subprodutos alimentares (folhas, cascas, etc.) têm vindo a ser estudados com vista ao seu eventual aproveitamento. Assim, para estas determinações, incluíram-se os caules das 3 amostras de urtiga avaliadas, pois, apesar desta parte da planta ser geralmente descartada, pode, contudo, ser uma fonte interessante de compostos bioativos. Considerando que as amostras podem ser consumidas em sopas, mas também cozidas e consumidas como vegetal, descartando a água, a determinação de compostos bioativos foi igualmente

realizada para as águas de cozimento das amostras A e B. Atendendo a que as urtigas cozem muito facilmente, selecionou-se um período curto de cozimento (5 min). Adicionalmente, a amostra B foi submetida a um cozimento de 10 min, sendo que as folhas ficaram demasiado cozidas e desfeitas. Desta forma, optou-se por realizar as determinações apenas na água de cozimento.

Tabela 6. Determinação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais estudadas nas amostras de *U. dioica*.

Amostras	Fenólicos totais (mg EAG/g extrato)	Flavonoides totais (mg EC/g extrato)
Caule A	29,33±2,90	19,97±1,52
Caule B	26,57±3,17	21,93±1,49
Caule C	50,73±5,10	24,37±2,09
Folhas A	35,69±3,16	31,31±3,27
Folhas B	53,44±3,97	34,38±1,07
Folhas C	67,09±9,80	29,63±3,56
Cozida A	20,61±2,50	11,58±2,00
Cozida B	18,50±2,33	18,05±2,11
Ac. A 5 min	2,15±0,10	1,54±0,09
Ac. B 5 min	4,45±0,55	2,94±0,47
Ac. B 10 min	14,72±1,8	4,64±0,37

EAG: equivalentes de ácido gálico; EC: equivalentes de catequina; Média ± DP de duas determinações para cada extrato (n=4).

Em trabalhos prévios, têm sido vários os solventes descritos na extração de compostos bioativos de *U. dioica*, sendo os mais comuns o metanol ou misturas metanol/água (Stanojević et al., 2016), etanol (Sarikurkcu et al., 2017) e água (Belščak-Cvitanović et al., 2015). Neste trabalho optou-se por não utilizar metanol, uma vez que se trata de um solvente orgânico tóxico, não sendo por isso adequado o seu uso em na extração de bioativos destinados, por exemplo, à fortificação de alimentos (Belščak-Cvitanović et al., 2015). Tendo-se selecionado etanol absoluto para a preparação dos extratos, a realização das determinações de compostos bioativos e atividade antioxidante nas águas de cozimento, permite também fazer a comparação da eficiência de extração de compostos bioativos quando a amostra é submetida a decocção por 5 min.

O teor de compostos fenólicos nas folhas variou entre 35,7-67,1 mg EAG/g extrato, sendo superiores ao valor reportados por Sarikurkcu et al. (2017), que obteve 16,6 mg EAG/g

extrato etanólico. A amostra de folhas C, colhida em Junho, foi a que apresentou valores mais elevados de fenólicos totais, seguindo-se as folhas B e os caules C. Já no que respeita os valores de flavonoides totais, estes foram similares entre as 3 amostras de folhas e entre as amostras de caules, sendo superiores nas primeiras. Em ambas as partes analisadas da planta C, observou-se um teor muito superior de compostos fenólicos face ao de flavonoides. Já nas folhas A, os resultados sugerem que a maioria dos compostos fenólicos seja do tipo flavonoide, sendo a amostra que apresenta os valores inferiores de fenóis totais o que pode ser indicativo de uma atividade antioxidante inferior, uma vez que os compostos fenólicos contribuem para esse tipo de mecanismo.

Como referido, neste trabalho não foi levado em consideração a idade das plantas, nem o grau de maturação das folhas para o consumo, apenas a variação do mês de colheita. No entanto, como as plantas foram colhidas exatamente na mesma localização, é expectável que a idade das plantas fosse superior na amostra C face à amostra A. Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007) a época em que uma planta é colhida é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade, e até mesmo a natureza dos constituintes ativos, não é constante durante o ano inteiro, havendo variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos, entre outros.

Outro ponto abordado no trabalho de Gobbo-Neto & Lopes (2007), é a correlação positiva entre intensidade de radiação solar e a produção de compostos fenólicos, tais como flavonoides, taninos e antocianinas. Tal pode ser explicado, principalmente no caso de flavonoides e fenilpropanóides relacionados, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B. No caso específico dos flavonoides, estes são acumulados principalmente em tecidos superficiais e utilizados pela planta como filtros UV, pois absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Comparando os valores das amostras A e C, verifica-se um aumento do teor total de fenóis, sendo os valores de flavonoides algo similar o que poderá dever-se ao facto das plantas terem sido colhidas num local de sombra, protegidas pela copa de árvores.

No que respeita o processamento térmico, pode-se observar que as amostras perdem uma quantidade considerável de compostos bioativos devido ao processo de cozimento, uma vez que as amostras cozidas apresentam teores muito inferiores comparativamente

com as cruas (perda entre 42-65% no caso dos fenóis e 63-79% nos flavonoides) e o teor encontrado nas águas de cozimento é diminuto. Belščak-Cvitanović et al. (2015) comparou a eficiência de extração de compostos fenólicos de folhas de urtiga quando submetidos a maceração com água, infusão e decocção por 20 min, sendo que as concentrações mais baixas foram detetadas no decocto (cozimento). Os resultados obtidos permitem concluir ainda que o tempo de cozimento é provavelmente um fator que deve ser levado em consideração, uma vez que ocorreu uma extração superior de compostos com o aumento do tempo. Como mencionado, as amostras cozidas por 10 min não apresentaram, visualmente, uma textura apelativa ao seu consumo como vegetal cozido. Assim, tempos mais longos de cozimento serão provavelmente usados apenas na confecção de sopas; neste caso, apesar de ocorrer uma maior extração de compostos com o período maior de cozimento, estes permanecem na solução aquosa, sendo consumidos. No caso da urtiga ser consumido como vegetal cozido, os resultados sugerem que se deve utilizar um curto tempo de cozimento, por forma a reduzir a perda de compostos bioativos para a água de cozimento.

5.4 Atividade antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos de plantas. Foram escolhidos três métodos para avaliar a atividade antioxidante das amostras, de forma a englobar mecanismos diferentes. Um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), que contém uma coloração púrpura. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\bullet$), o DPPH \bullet é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorada pela diminuição da absorbância. A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (EC_{50}), ou seja quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (Angelo e Jorge, 2007).

Outro método utilizado foi o poder redutor que tem como princípio da reação, a doação direta de elétrons na redução de ferricianeto ($[Fe(CN)_6]_3$) em ferrocianeto ($[Fe_4(CN)_6]_4$), em meio neutro ($pH = 6,6$). O produto foi visualizado por adição de íons livres de Fe^{3+} após a reação de redução, que resulta na formação de um complexo com coloração

azul intensa, $\text{Fe}_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$. Uma maior absorvência da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra.

As amostras de *U. dioica* mostraram atividade antioxidante em todos os métodos aplicados e os resultados, encontram na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados da atividade antioxidante (valores de EC_{50} , mg/mL) determinada por diferentes métodos.

Amostra	DPPH ^a	Poder redutor ^b	Descoloração do β -caroteno ^c
Trolox	0,03±0,00	0,05±0,01	0,28±0,07
Caule A	1,58±0,04	0,64±0,07	2,10±0,28
Caule B	1,32±0,03	0,72±0,08	2,17±0,30
Caule C	0,53±0,01	0,46±0,03	1,05±0,08
Folhas A	1,03±0,11	0,62±0,04	0,86±0,09
Folhas B	0,67±0,08	0,34±0,02	0,55±0,03
Folhas C	0,61±0,07	0,31±0,01	0,65±0,05
Cozida A	>5,0	6,98±0,68	1,00±0,08
Cozida B	>5,0	4,12±0,41	0,97±0,07
Ac. A 5 min	11,09±0,27	7,11±0,02	10,72±1,94
Ac. B 5 min	8,51±0,50	3,12±0,05	5,33±0,34
Ac. B 10 min	7,23±0,08	4,45±0,20	2,29±0,25

^a EC_{50} - Concentração para uma captação do radical DPPH de 50%; ^b EC_{50} - Concentração efetiva na qual a absorvência é 0,5; ^c EC_{50} - Concentração correspondente a 50% de descoloração em comparação com o sistema de referência (branco); Ac.: água de cozimento. Média ± DP de duas determinações para cada extrato (n=4).

O valor de EC_{50} para o ensaio com o radical DPPH, para as amostras de folhas frescas variou entre 0,61-1,03 mg/mL, sendo superiores aos descritos por Stanojević et al. (2016) em extratos preparados com metanol/água (50%, v/v), que apresentaram um valor de 0,33 mg/mL. Por outro lado, as amostras apresentaram atividade antioxidante muito superior ao descrito por Yildirim et al (2013) em extratos metanólicos de *U. dioica* colhidas em diversas localizações da Turquia (12,6-33,7 mg/mL)

As Figuras 14 e 15 apresentam as curvas de percentagem de inibição do radical DPPH para as amostras de folhas e caules e para as amostras cozidas e de águas de cozimento, respetivamente. Como expectável, as amostras de caules e folhas cruas apresentaram uma

atividade superior às amostras cozidas e respetivas águas de cozimento, o que está de acordo com os teores mais elevados de fenóis e flavonoides dessas amostras. De todas as amostras, o caule da amostra C foi o que apresentou o melhor resultado, o que poderá ser explicado pelo elevado conteúdo em fenóis totais desta amostra. As folhas frescas B e C tiveram uma atividade muito similar entre si e superior às folhas A, enquanto que nos caules, as amostras A e B apresentaram uma atividade menor comparativamente ao caule C, como se pode observar analisando o gráfico da Figura 14.

Se compararmos as amostras da mesma região geográfica, mas de alturas diferentes (A e C) podemos concluir que o mês de Junho será mais adequado para colheita de *U. dioica* (na região de Viseu), no que diz respeito à atividade antioxidante da planta.

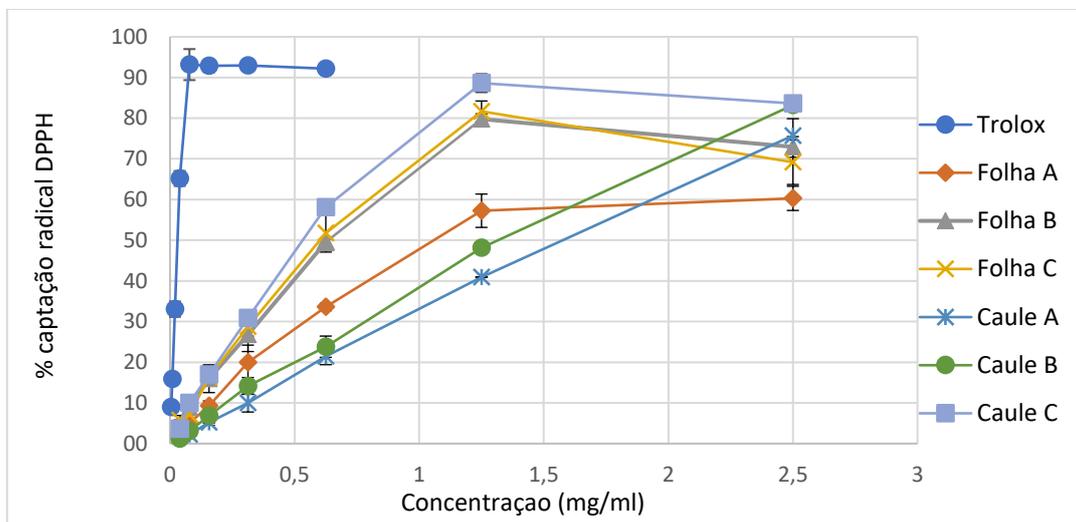


Figura 14. Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e caules de *U. dioica*.

No gráfico da Figura 15, podemos observar que a concentração utilizada para que a captação de radical DPPH das amostras cozidas e água de cozimento (A e B) fosse maior que 50 %, foram concentrações elevadas se comparadas com a das folhas frescas e os caules.

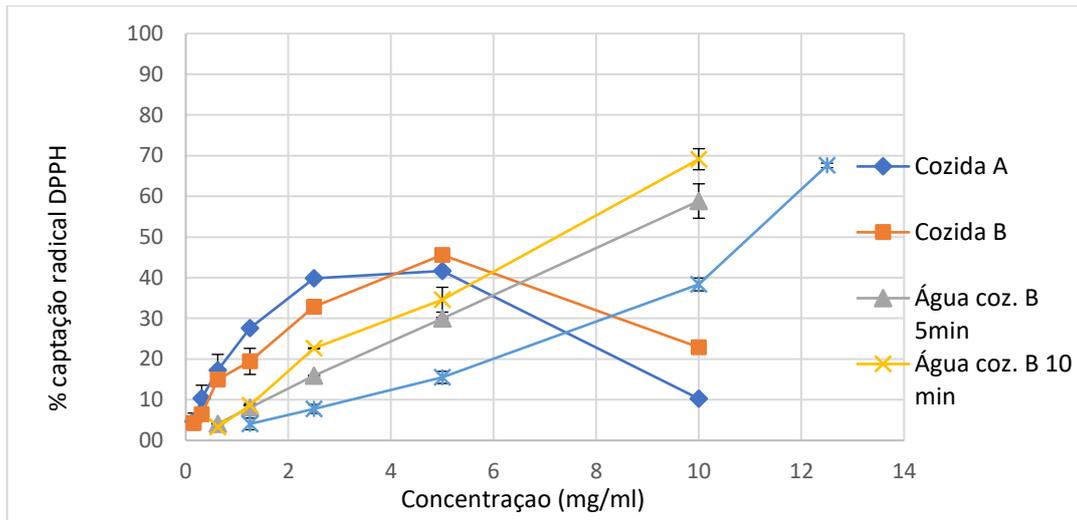


Figura 15. Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas cozidas e água de cozimento A e B de *U. dioica*.

Mais ainda, verificou-se que, mesmo com concentrações mais elevadas, houve um decréscimo na atividade antioxidantes das amostras cozidas A e B, não chegando a atingir 50% de captação. Este resultado pode ser explicado pelo fato da pigmentação verde dos extratos mais concentrados ser tão intensa que conduziu à leitura de aborvâncias elevadas e acabou por mascarar a leitura da cor amarela, como podemos observar na Figura 16. Pela observação das Figuras 9 e 10, pode-se inferir que possivelmente os valores de EC_{50} estejam situados entre 2,5-10 mg/mL. Assim, nestas amostras em especial, torna-se muito importante proceder à avaliação da atividade antioxidante por outras metodologias.

Refira-se ainda que o fator que pode ter sido determinante para a ocorrência deste problema, foi a escolha do solvente usado na extração (etanol), que se mostrou muito eficiente na extração das clorofilas, prejudicando a leitura das amostras cozidas. Uma forma de resolver esse problema seria separar a clorofila antes da preparação dos extratos.



Figura 16. Fotografia da determinação da % de captação do radical DPPH utilizando extratos da amostra cozida B com concentrações decrescentes de extratos (da esquerda para a direita).

Os resultados obtidos para o ensaio do poder redutor, para as amostras de folhas e caules de urtiga, podem ser visualizados no gráfico da Figura 17. Entre os caules a que apresentou melhor atividade foi a amostra C, seguido do caule A. Quanto às folhas seguiram a mesma ordem de atividade do ensaio de captação do radical DPPH, nomeadamente C > B > A.

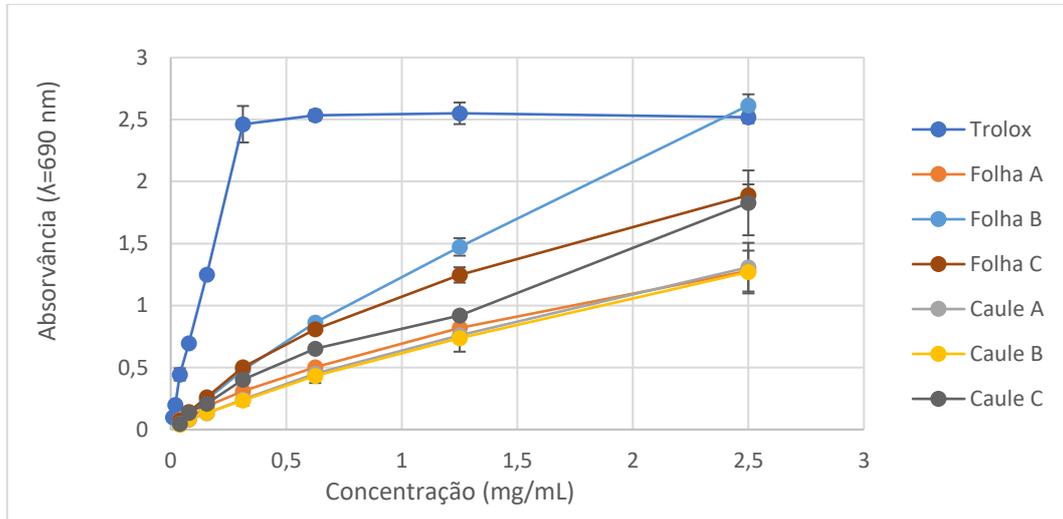


Figura 17. Poder redutor de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e caules de *U. dioica*.

No ensaio de poder redutor as amostras cozidas A e B, apresentaram uma baixa atividade comparada com as amostras frescas, uma vez que foi necessária uma concentração superior para obter absorvância de 0,5 como podemos observar no gráfico da Figura 18.

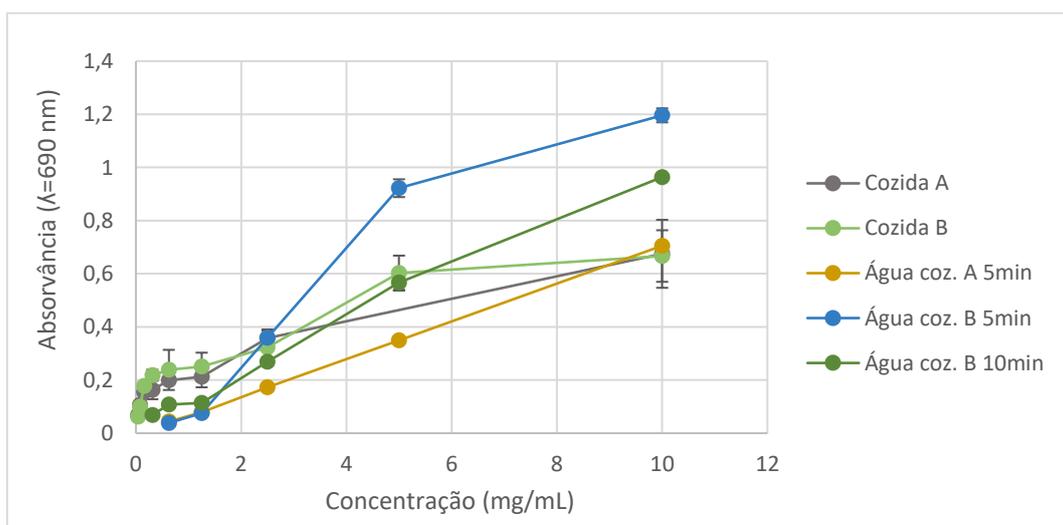


Figura 18. Poder redutor de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas cozidas (A e B) e águas de cozimento de *U. dioica*.

O extrato de água de cozimento A, apresentou pior atividade como já era esperado, já que a amostra A foi a que apresentou pior atividade em folhas frescas e cozidas. Podemos observar também que o tempo de cozimento da amostra B, não influenciou de maneira muito expressiva o poder redutor. No entanto, a amostra com o tempo de 10 minutos foi a que apresentou pior atividade, diferindo neste ponto do ensaio de captação do radical DPPH (onde a amostra Ac. B 10 min apresentou melhor desempenho). Isso pode ser explicado pelo fato dos dois ensaios apresentarem mecanismos diferentes, e alguns compostos bioativos podem ser degradados de maneiras distintas com o tempo de aquecimento.

O terceiro e último método utilizado, foi a inibição da descoloração do β -caroteno. Este método permite avaliar a capacidade que uma determinada substância tem de prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico a 50 °C. A reação pode ser monitorizada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno a 470 nm, com leitura no tempo 0 segundos e 2 horas. Na Tabela 4, onde são apresentados os resultados de EC_{50} obtidos, podemos observar que de uma forma geral os resultados são algo coerentes, para a maioria das amostras. A diferença mais marcante é que, contrariamente aos outros ensaios, as amostras cozidas não perdem a sua capacidade antioxidante de forma drástica se comparadas com as folhas frescas. A água de cozimento B de 10 minutos apresentou melhor atividade, que a água de 5 minutos, de forma idêntica ao obtido no ensaio do radical DPPH. Já as amostras de caules parecem apresentar uma pior atividade comparativamente às folhas, de forma mais evidente do que a observada no ensaio do radical DPPH.

Os resultados obtidos, são coerentes com dados de estudos anteriores. Jan & Singh (2016) reportaram a atividade antioxidante do extracto de acetato de etilo de *Urtiga dioica* demonstrada pela inibição em 76% da peroxidação lipídica da emulsão de ácido linoleico em comparação com a obtida para o α -tocoferol (65%). Resultados muito similares foram também descritos por Sarikurkcu et al. (2017), que obtiveram uma inibição de 63,2% no ensaio de descoloração do β -caroteno ao utilizarem um extrato etanólico de urtiga com a concentração de 2mg/mL. Jan & Singh (2016) referem ainda a realização de experiências com ratos wistar albinos tratados com tetracloreto de carbono (CCl_4) por 60 dias, o que resultou no aumento da peroxidação lipídica e na diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes. O tratamento com *Urtiga dioica* durante 60 dias diminuiu a peroxidação lipídica elevada e também aumentou os níveis reduzidos de enzimas antioxidantes em ratos tratados com CCl_4 . Noutro estudo, também referido por Jan e Singh (2016), ratos saudáveis

wistar foram alimentados com urtiga seca e picada, misturada com comida normal de laboratório. A ressonância de spin eletrônico foi usada para medir o nível de stress oxidativo. Verificou-se que a suplementação de urtigas diminui a concentração de radicais livres no cerebelo, bem como o lóbulo frontal do cérebro do rato e, portanto, foi considerado como um antioxidante efetivo (Jan e Singh, 2016).

Alguns estudos evidenciam a urtiga como um bom antioxidante principalmente no que diz respeito à oxidação lipídica, como descreve Latoch e Stasiak (2015) no estudo que fizeram sobre o efeito do extrato de água de cozimento de *U. dioica* sobre oxidação lipídica e cor de salsicha de porco cozida. Neste trabalho, foram preparadas variantes de salsichas: controlo (sem urtiga), e salsichas com 300 ppm e 600 ppm de extracto de água de urtiga. O estudo demonstrou que a adição do extracto de água de urtiga não afetou o pH, a atividade de água e potencial de oxirredução das salsichas, diminuiu ainda o valor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), isto é, da oxidação lipídica, aumentando a estabilidade de cor das salsichas durante o armazenamento. A qualidade sensorial das amostras com extracto de água adicionado foi superior à das amostras restantes. Este estudo sugere que o extrato de água de urtiga pode ser usado na culinária para reduzir a oxidação lipídica e aumentar a estabilidade da cor de salsichas, demonstrando a aplicabilidade prática de extratos desta planta na indústria agroalimentar.

5.5 Atividade antimicrobiana

O desenvolvimento de resistências contra antibióticos de uso comum por microrganismos patogénicos, tem vindo a estimular a procura de novas substâncias antimicrobianas provenientes de outras fontes, incluindo plantas. As plantas usadas na medicina tradicional contêm uma ampla gama de substâncias que podem ser usadas para tratar doenças crónicas e infecciosas. As substâncias que podem inibir o crescimento de microrganismos ou matá-los são consideradas candidatas ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de várias doenças (Erdog̃rul, 2002).

Os resultados da atividade antimicrobiana face aos diferentes microrganismos em estudo, apresentam-se na tabela 7. As imagens dos testes feitos em placas de petri podem ser visualizadas no anexo I. Os resultados obtidos sugerem, com algumas excepções, que a maioria dos extratos de urtiga, na concentração aplicada (500 µg por disco), não têm efeito inibitório no crescimento da maioria dos microrganismos testados. Uma das excepções foi *P. aeruginosa*, para a qual todos os extratos apresentaram resultados positivos, *B. subtilis* e

S. aureus, sendo que para estas últimas bactérias apenas alguns extratos apresentaram inibição.

Tabela 8. Diâmetro da zona de inibição (mm) obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana face a distintos microrganismos

Inóculo	Branco (MeOH)	Controlo positivo ^a	Folha A	Folha B	Folha C	Caule A	Caule B	Caule C
<i>B. cereus</i>	SI	20	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>B. subtilis</i>	SI	SI	14	SI	7	11	7	SI
<i>C. albicans</i>	SI	13	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>E. coli</i>	SI	12	SI	SI	SI	7	SI	SI
<i>E. faecalis</i>	SI	18	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>K. pneumoniae</i>	SI	30	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>P. aeruginosa</i>	SI	SI	15	24	20	12	12	9
<i>P. mirabilis</i>	SI	21	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>S. aureus</i>	SI	20	SI	SI	SI	10	SI	SI

SI- sem inibição; ^a Penicilina, Canamicina e Nistatina.

Tendo por base a classificação aplicada por Dar et al. (2013) num trabalho semelhante, nomeadamente: inativo (diâmetro da zona de inibição ≤ 7 mm), atividade moderada (diâmetro da zona de inibição ≤ 10 mm), boa atividade (diâmetro da zona de inibição ≤ 15 mm) e excelente atividade (diâmetro da zona de inibição > 15 mm), podemos concluir que apenas o extrato do caule C apresentou atividade moderada contra *P. aeruginosa*, com todos os restantes extratos a evidenciarem boa a excelente atividade. No caso de *B. subtilis* os extratos de folha e de caule A apresentaram boa atividade inibitória; para *S. aureus* apenas o extrato do caule A apresentou uma atividade moderada. Desta forma, a amostra A, no geral, parece demonstrar uma atividade superior às restantes.

Comparativamente com estudos anteriores, alguns sugerem que *U. dioica* possui uma atividade elevada face a diversos microrganismos (Bobis et al., 2015; Modarresi-Chahardehi et al., 2012), ao passo que outros referem resultados mais similares aos obtidos. Tal pode dever-se à metodologia utilizada, uma vez que Bobis et al. (2015) e Modarresi-Chahardehi et al. (2012) utilizam os extratos (hidroalcoólicos e preparados com diversos solventes orgânicos) diretamente nos ensaios. No estudo de Gülçin et al. (2004), foram aplicados 250 μ g de extrato aquoso de urtiga em cada disco, tendo obtido boa atividade (10 mm $<$ halo \leq 15 mm) apenas para *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus eoidermidis*, atividade moderada

(7 mm < halo ≤ 10 mm) para *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *C. albicans*, não tendo, contudo, apresentado poder inibitório face a *P. aeruginosa*. Erdogrul (2002) testou os extratos de *U. dioica* obtidos com acetato de etilo, metanol, clorofórmio ou acetona, face a diversas bactérias, incluindo quatro espécies comuns ao nosso trabalho, não tendo verificado a ocorrência de inibição para nenhuma delas. Dar et al. (2013) testou vários extratos obtidos com solventes diferentes (discos impregnados com 2mg de extrato dissolvido em solução aquosa a 50% de dimetilsulfóxido) tendo verificado a existência de boa atividade contra todas as sete bactérias testadas apenas para os extratos preparados com hexano; os extratos aquosos e metanólicos mostraram-se inativos face a todos os microrganismos avaliados.

Adicionalmente, têm sido realizados estudos com o objetivo de testar os efeitos de extratos aquosos de *U. dioica* no tempo de prateleira de produtos alimentares quando comercializados em embalagem de atmosfera modificada (MAP) (Alp & Aksu, 2010). Num estudo que pretendeu avaliar os efeitos do extracto de água de *U. dioica* liofilizado (LUWE) e de MAP, sobre a qualidade e a vida útil da carne moída, a carne moída foi armazenada como controle aeróbico, e avaliaram-se as ampstras: MAP (80% O₂ + 20% CO₂), MAP + 250 ppm LUWE e MAP + 500 ppm LUWE, todas colocadas a 2 ± 0,5 ° C por 14 dias. MAP e LUWE tiveram efeitos significativos sobre bactérias mesofílicas, psicotrópicas e ácido-láticas, bem como na contagem de *Pseudomonas sp.* dependendo do nível de LUWE, observou-se uma diminuição da contagem de *Pseudomonas* e de bactérias psicrófilas. O tratamento com 500 ppm de LUWE + MAP mostrou ainda os valores mais baixos de TBARS em comparação com outros grupos durante o armazenamento.

CAPÍTULO 6

Conclusões e perspectivas futuras

6. Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, verificou-se que a urtiga é uma planta com elevado teor de humidade, como expectável, apresentando um elevado conteúdo proteico e um valor de gordura relativamente baixo. Mesmo apresentando um valor calórico superior a outros vegetais referidos neste trabalho, ainda assim este valor é relativamente baixo. Os resultados obtidos demonstram que, após a cozedura das folhas de *U. dioica*, não houve perdas expressivas de macronutrientes, em comparação com o que ocorre em alguns vegetais usualmente consumidos cozidos, como a couve e o espinafre. Apesar de presente em baixo teor, a gordura das folhas de urtiga, evidenciou um valor nutricional elevado, dado o seu conteúdo elevado em ácidos gordos polinsaturados, com particular destaque para o ácido essencial α -linoleico. O consumo deste ácido gordo na dieta tem sido associado a diversos efeitos benéficos para a saúde, especialmente a nível cardiovascular. Verificou-se alguma variabilidade no que respeita o perfil em ácidos gordos, o que poderá também estar relacionado com o grau de maturidade das folhas, parâmetro este que não foi controlado neste trabalho. Neste estudo, procedeu-se apenas à quantificação em percentagem relativa dos ácidos gordos identificados. Principalmente, para uma melhor avaliação dos efeitos do cozimento na composição da gordura da urtiga, seria interessante em estudos futuros proceder à quantificação dos compostos utilizando padrões dos mesmos e a adição de um padrão interno (FAME não existente na composição natural da gordura, como por exemplo o C19:0).

No que se refere a sua composição em compostos bioativos, estudaram-se amostras com proveniência distinta e colhidas em diferentes meses, bem como duas partes da planta: as suas folhas (parte edível) e caules. Além de serem ricas em nutrientes, as urtigas demonstraram ter uma boa atividade antioxidante devido aos compostos bioativos presentes na planta. Verificou-se que a concentração de fenóis totais é superior nas folhas comparativamente aos caules. Os resultados obtidos sugerem a existência de influências, quer da data de colheita, quer da localização geográfica na composição de compostos bioativos da folha de urtiga. Contudo, seria necessário a realização de análises num número superior de amostras, colhidas ao longo de anos distintos, para a confirmação de tal hipótese. Contrariamente ao verificado para o valor nutricional, verificou-se ainda que o processo de cozimento afeta negativamente o teor de compostos bioativos na planta, contudo verificando-se a passagem de parte destes para a água de cozimento. Assim, se a planta for consumida em sopas, esta perda, a nível da dieta, não será tão expressiva.

Verificou-se ainda uma maior extração de compostos bioativos para a água de cozimento com o aumento do tempo de cozedura, pelo que os resultados sugerem que, no caso de consumo da planta como vegetal cozido, se deva utilizar tempos de cozimento curtos.

Os alimentos funcionais enriquecidos com ingredientes à base de plantas não são novos no mercado, já que existe uma preocupação crescente na generalidade dos consumidores por consumir alimentos mais saudáveis, sendo que existe uma preferência clara por aditivos à base de plantas em detrimento dos sintéticos. A urtiga, para além de apresentar um teor interessante de compostos bioativos nas suas folhas, a parte edível, apresentou também resultados interessantes para as amostras de caules estudadas. Assim, estes podem potencialmente ser uma fonte de compostos que possam ser utilizados no enriquecimento de outros alimentos convencionais.

No seguimento de alguns estudos já descritos na literatura, como trabalho futuro, seria interessante proceder à incorporação de diferentes extratos da planta, em alimentos propensos a sofrer oxidação lipídica, e estudar as propriedades organoléticas como o aroma, coloração, textura, entre outros. Adicionalmente seria interessante estudar a formulação de diferentes extratos adicionados e comparar as alterações ocorridas durante o armazenamento face às propriedades nutricionais, antioxidantes e de segurança microbiológica dos alimentos.

No que respeita a atividade antimicrobiana das amostras estudadas, verificou-se uma atividade muito elevada face a *P. aeruginosa*. Já para os restantes microrganismos testados, não se verificou um grande efeito inibitórios, com algumas exceções, nomeadamente face a *S. aureus* e *B. subtilis*. Neste caso, interessantemente, foram sempre os extratos da planta A (folhas e/ou caules) que conduziram a melhores resultados. Interessantemente também, de uma maneira geral, a amostra A foi a que apresentou teores mais reduzidos de bioativos e menor potencial antioxidante. Desta forma, seria útil proceder a uma caracterização química mais exaustiva desta planta, uma vez que *P. aeruginosa* é uma bactéria frequentemente associada a infeções nosocomiais e que tem vindo a apresentar um aumento de resistência a antibióticos.

Dado o potencial antioxidante observado, em trabalhos futuros seria ainda importante proceder ao estudo de outros compostos bioativos, nomeadamente Vitaminas C e E, e proceder ao estudo do perfil de compostos fenólicos através de HPLC.

Em suma, este trabalho pretendeu salientar a importância de se conhecer e utilizar plantas selvagens, como a urtiga, na dieta humana. A urtiga é atualmente considerada pela

maioria das pessoas como sendo uma “erva daninha”. Contudo este trabalho demonstrou que esta planta pode ser utilizada como uma alternativa interessante aos vegetais de folha verde mais comuns; mais ainda, sendo de fácil crescimento e sendo encontrada pelo mundo inteiro, a urtiga pode ser uma fonte de proteína em populações de baixos rendimentos e ainda contribuir para o combate à desnutrição em populações carentes.

CAPÍTULO 7

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- Adhikari, B. M., Bajracharya, A. & Shrestha, A. K. (2016). Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) flour with wheat and barley flours. *Food Science & Nutrition*, 4(1), p.119–124.
- Aharoni, A., Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, v.22, n.2, p.239–244.
- Almasi, H., Zandi, M., Beigzadeh, S., Haghju, S. & Mehrnow, N. (2016). Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica Dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: II. Antioxidant activity and release properties. *Journal of Microencapsulation*, 33(5), p.449–459.
- Alp, E. & Aksu, M.I. (2010) Effects of water extract of *Urtica dioica* L. and modified atmosphere packaging on the shelf life of ground beef. *Meat Sci.* 86, p. 468–473.
- Amarowicz R., Pegg R.B. & Kosińska A. (2009): SE-HPLC separation of myosin complex with tannins from bearberries (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) leaves – a short communication. *Czech J. Food Sci.*, 27: p.386–391.
- Angelo, P. M. & Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods - A brief review. *Ver Inst Adolfo Lutz*, 66 (1), p.232-240.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International (1999) 5th ed.; Hortwitz, W., Ed.; The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence: Caithersburg, Maryland.
- Barreira, J.C.M, Ferreira, I. C. F.R., Oliveira, M. B. P. P. & Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry* 107, p.1106-1113.
- Base de Dados Nacional de Nutrientes da USDA, Versão 28 (2016). <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list> (acedido em Julho 2017).
- Belščak-Cvitanović A., Komes D., Dujmović M., Karlović S., Brnčić M. & Ježek D. (2015). Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. *Food Chemistry*, 167, p. 61–70.
- Borges, L. L., Lúcio, T. C., Gil, E. D. S. & Barbosa, E. F. (2011). Uma abordagem sobre Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12), p.1–20.

- Burlingame, B., Mouillé, B. & Charrondièrre, R. (2009). Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *J Food Compos Anal.* 22, p.494-502.
- Carvalho, A. R. de. (2014). *Urtica spp.* Bioatividade e Cultivo. Departamento de Ciências Da Vida, p.1- 127.
- Chrubasik, J. E., Roufogalis, B. D., Wagner, H. & Chrubasik, S. A. (2007). A comprehensive review on nettle effect and efficacy profiles, Part I : Herba urticae. *Phytomedicine*, 14, p.423–435.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. & Clifford, M. N. (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Oxford: Wiley-Blackwell. p.1–24.
- Dar, S. A., Ganai, F. A., Yousuf, A. R., Balkhi, M., Bhat, T. M., & Sharma, P. (2013). Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 51(12), p.170–180.
- Di Sotto, A., Mazzanti, G., Savickiene, N., Staršelskytė, R., Baksenskaite, V., Di Giacomo, S., & Vitalone, A. (2015). Antimutagenic and antioxidant activity of a protein fraction from aerial parts of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 53(6), p. 935–938.
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E. G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., & Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica L.*) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Products*, 68, p.42–49.
- Duarte, M.C.T (2006). Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência*, p.7- 16.
- Duarte-Almeida J.M., Santos R. J., Genovese M. I., Lajolo F.M. (2006). Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema B-Caroteno/Ácido Linoléico E Método De Sequestro De Radicais Dpph•. *Ciência e Tecnologia alimentar*, 26(2), p.446–452.
- Erdogrul, O.T.(2002). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in Folk Medicine *Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Used in*, 40(January).
- Food and Agriculture Organization, 2003. Trade reforms and food security. Rome: FAO.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V. & Oteiza, P. I. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: p.435-445.
- Gil, E. C. (2006). Fitoterapia y reumatismo: principales vías de actación de los principios activos de las plantas medicinales - Ortiga. In *Plantas medicinales para enfermedades reumáticas*, p. 39–52.

- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J. & Rodriguez, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 719, p.229–235.
- Guil-Guerrero, J. L., Reboloso-Fuentes, M. M. & Torija Isasa, M. E. (2003). Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(2), p.111–119.
- Gülçin, I., Kufrevioglu, I., Oktay, M., & Buyukokuroglu, M. (2004). Antioxidant , antimicrobial , antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L .), 90, 205–215.
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), p.213–220.
- Hajhashemi, V., & Klooshani, V. (2013). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Urtica dioica* leaf extract in animal models. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(2), p.193–200.
- Jan, N. K., Zarafshan, K. & Singh, S. (2016). Stinging nettle (*Urtica dioica* L .): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 61(3), p.315-318.
- Jia, Z., Mengcheng, T. & T. Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, V.64, p.555-559.
- aradag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009). “Review of methods to determine antioxidant capacities”. *Food Anal Methods* 2, p.41–66.
- La Voz de Galicia.
http://www.lavozdegalicia.es/noticia/ourense/ourense/2005/07/17/vilamarin-apuesta-comercializar-ortiga-ingrediente-culinario/0003_3907514.htm (acedido em Julho, 2017).
- Laguerre M, López-Giraldo LJ, Lecomte J, Pina M, Villeneuve P. (2007) Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL* 14(5), p. 278–292.
- Liu, R.H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *Advances in Nutrition*, 4, p.384–392.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, p.1-19.

- Menendez-Baceta, G., Aceituno-Mata, L., Tardío, J., Reyes- García, V., & Pardo-de-Santayana, M. (2012). Wild edible plants traditionally gathered in Gorbeialdea (Biscay, Basque Country). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 1329–1347.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Ellinghieri, V. B., La barbera, T. M., Guvenc, A. & Taviano, M. F. (2009). “Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.57, p. 6570–6577.
- Milene Angelo, P. & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1), p.1–9.
- Modarresi-chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-sulaiman, S., & Mousavi, L. (2012). Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*, 60(December), p.1567–1576.
- Murcia, M. A., Vera, A. & Garcia-Carmona, F. (1992). Effect of processing methods on spinach: Proximate composition in fatty acids and soluble protein, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, p.473–476.
- Naves, M. (1998). β -caroteno e câncer beta a - carotene and cancer, 11(1), 99–115.
- Nencu I, Vlase L., Istudor V., I., Mircea T. (2015). Preliminary research regarding the therapeutic uses of *Urtica dioica* / note ii. The dynamics of accumulation of total phenolic compounds and ascorbic acid. *Farmacia*, 61(2), p.276–283.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, p.48–53.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., E.L, L. M., Kaneko, T., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), p.301–307.
- Otles S., Yalcin B. (2012). Review on the application of nanobiosensors in food analysis. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.* 11 (1), p.7-18.
- Pichersky, E.; Gang, (2000) D.R: Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, v.5, n.10, p.439–445.

- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., & Romani, A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, p.9127–9132.
- Portugal de Sabores e Tradições, 2017. <http://ptsabores.com/confraria-da-urtiga/> (acedido em Julho, 2017).
- Pradhan, S., Manivannan, S., & Tamang, J. (2015). Proximate, mineral composition and antioxidant properties of some wild leafy vegetables, 74(March), p.155–159.
- Proença da Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. (F. C. Gulbenkian, 4Ed.) p.1- 670.
- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), p.755–760.
- Rogério, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., da Silva, E. V. G., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G., et al. (2007). Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, 56, p.402–408.
- Rutto, L. K., Xu, Y., Ramirez, E. & Brandt, M. (2013). Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International Journal of Food Science*.
- Santos, R.C. (2010) O valor energético dos alimentos. exemplo de uma determinação experimental, usando calorimetria de combustão. Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências. Vol. 33, No. 1, p.220-224.
- Santos R.D., Gagliardi A.C.M., Xavier H.T., Magnoni C.D., Cassani R., & Lottenberg A.M. (2013). Sociedade Brasileira de Cardiologia. I diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 100, p.1-40.
- Sarikurkcü, C., Targan, S., Ozer, M. S., & Tepe, B. (2017). Fatty acid composition , enzyme inhibitory , and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey. *International Journal of Food Properties*, 20(3), p.560–572.
- Seigler, D. S. (2012). *Plant Secondary Metabolism*.
- Singh, S., Kushwaha, B. P., Nag, S. K., Mishra, A. K., Singh, A., & Anele, U. Y. (2012). In vitro ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*, 178(1–2), p.2–11.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1), 71–81.

- Stanojević, L. P., Stanković, M. Z., Cvetković, D. J., Cakić, M. D., Ilić, D. P., Nikolić, V. D., & Stanojević, J. S. (2016). The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica L.*) leaves. *Separation Science and Technology*, V.51, p.1817-1829.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Metabolitos Secundários e defesa vegetal*. In *Fisiologia vegetal*. Tradução: Eliane Romanato Santarém et al. – 3ed. Porto Alegre: Artmed.
- Taylor, K. (2009). Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica L.* *Journal of Ecology*, 97(6), p.1436–1458.
- Upton, R. (2013). Stinging nettles leaf (*Urtica dioica L.*): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine*, 3(1), p.9–38.

Anexo I: Resultados da atividade antimicrobiana face aos diferentes microrganismos em estudo.

