



Joana Romano Silveira Dias

**Valorização da planta halófito *Salicornia ramosissima*:
nova formulação de bolachas e outros estudos biológicos**

Orientador: Professora Aida Moreira da Silva

Coorientador: Professora Maria João Barroca

Coimbra, 2018



Joana Romano Silveira Dias

**Valorização da planta halófita *Salicornia ramosissima*:
nova formulação de bolachas e outros estudos biológicos**

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de
Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar

Orientadora: Professora Aida Moreira da Silva

Coorientadora: Professora Maria João Barroca

Coimbra, 2018

“If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants”

- Isaac Newton

Aos meus pais.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com o apoio e paciência de várias pessoas que, de forma direta ou indireta, me acompanham todos os dias e estão ao meu lado tanto nas vitórias como nos fracassos.

Começo por agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Maria João Barroca e Professora Doutora Aida Moreira da Silva pelos conhecimentos e conselhos transmitidos durante esta fase final do meu curso.

Queria deixar também o meu agradecimento a toda a comunidade da Escola Superior Agrária de Coimbra, em especial ao Professor Ivo Rodrigues, ao Professor Doutor João Noronha, aos técnicos de laboratório, Sandrine da Ressurreição e Jorge Viegas e à colega de curso Raquel Borges pela disponibilidade, paciência e ajuda durante a execução deste trabalho. Também quero agradecer à Marta Clemente e ao Luís Simões pelas fotos da salicórnia.

A toda a equipa da Unidade de Química - Física Molecular da Universidade de Coimbra, em especial aos investigadores Ana Batista de Carvalho, Adriana Mamede e Daniel Martín por toda a simpatia, paciência, ensinamentos e ajuda na fase experimental totalmente nova para mim que foram as células. Agradeço também à Professora Doutora Ana Margarida Urbano do Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade de Coimbra, por gentilmente ter cedido a linha celular HT-29 utilizada neste trabalho.

À equipa da *DanCake Portugal S.A.*, pela receção calorosa para a elaboração dos ensaios experimentais das bolachas, em especial às Engenheiras Carla Marques, Cátia Vaz e Carina Soares.

A todos os participantes nas provas sensoriais porque, sem eles, uma parte deste trabalho não era possível.

À minha “companheira de guerra”, Liliana Santos, por toda a ajuda e troca de conhecimentos, pela sua disponibilidade permanente, gargalhadas, amizade e carinho

nesta última caminhada do meu curso. Sem ela, os dias no laboratório teriam sido menos interessantes.

Aos amigos de sempre, João Pedro, Rui Ferreira e Antonino Silva e respectivas famílias que sinto como se fossem minhas. À Inês Portilha e ao João Cunha, amigos que este curso me trouxe, por todos os momentos únicos que passámos juntos, mas em especial, pela amizade para a vida. Ao André Fernandes, o “nosso madêrense”, pelas boas conversas, saídas à noite, explicações de matemática e pela sua disponibilidade sem fim para tudo. É com muito orgulho e prazer que posso garantir que vale a pena ter amigos como os meus.

Não podia deixar de agradecer também ao Dr. Luís Marques por ser um bom ouvinte, conselheiro e amigo. Um sincero e sentido obrigado.

À minha família, que sempre contribuiu para a minha formação enquanto pessoa. Obrigado por tudo o que fizeram, fazem e continuarão a fazer por mim. Ao Zé e à Claudia que, apesar de não me conhecerem desde pequena, contribuíram muito nestes últimos anos, para ser uma pessoa melhor.

Ao Nuno... simplesmente por tudo! Muito obrigado por todo o amor e carinho que me dedicas. Pelo apoio, força, paciência, persistência e pela ajuda assídua nesta última etapa. Obrigado por tudo o que passámos e que havemos de passar juntos. À sua família, um obrigado igual.

Por último, aos meus pais. Um obrigado muito especial pelo amor incondicional, dedicação e incentivo em lutar pelo melhor e por nunca desistir, mesmo quando parece impossível. Obrigado por todo o apoio nas decisões mais importantes e por me fazerem acreditar que se eu quiser, eu consigo.

Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Acordo de Parceria Portugal 2020 - Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO 2020), no âmbito do projeto Centro-01-0145-FEDER-023631 SoSValor: Soluções Sustentáveis para a Valorização de Produtos Naturais e Resíduos Industriais de Origem Vegetal, do projeto Centro-01-0145-FEDER-000007 ReNATURE - Valorização dos Recursos Naturais Endógenos da Região Centro e do projeto POCI-01-0145-FEDER-029305 **IDEAS4life - Novos IngreDIEntes Alimentares de Plantas Marítimas**.

Resumo

A *Salicornia ramosissima* J. Woods é uma planta halófito suculenta da família Chenopodiaceae, que cresce naturalmente ao longo das salinas costeiras do oceano. Devido aos potenciais benefícios nutricionais e propriedades funcionais, a salicórnia atualmente está a receber um grande interesse nos mercados dos alimentos e dos produtos farmacêuticos.

Um dos objetivos do estudo apresentado neste relatório foi (1) a formulação de bolachas com substituição do sal comum por “sal verde” – salicórnia liofilizada. O outro objetivo foi (2) determinar as atividades antioxidante e anticancerígena de extratos de *S. ramosissima*.

No estudo (1), foram produzidas bolachas com “sal verde” em substituição do sal comum e avaliado o seu tempo de prateleira durante seis meses. Após este período, através das análises ao teor de humidade, índice de peróxidos e sensoriais, as bolachas mantiveram as suas propriedades químicas e organolépticas.

No estudo (2), o conteúdo fenólico total foi estimado e a capacidade antioxidante foi medida pelo radical livre DPPH. O extrato aquoso de *S. ramosissima* foi testado na linha celular cancerígena HT-29 e a avaliação da proliferação celular e viabilidade celular foi realizada, respetivamente, pela SRB (sulforrodamina B) e MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

Os níveis de capacidade antioxidante e de compostos fenólicos e o seu potencial anticancerígeno no extrato desta halófito, definem esta planta como uma fonte promissora de antioxidantes naturais e de nutracêuticos.

Palavras-chave: *Salicornia ramosissima*, bolachas, tempo de prateleira, atividade antioxidante, proliferação celular e viabilidade celular.

Abstract

The *Salicornia ramosissima* J. Woods is a succulent halophyte plant of the Chenopodiaceae family which grows naturally on salines along the coast. Due to its potential health benefits and functional properties, salicornia is currently receiving great interest in food and pharmaceutical product industries.

One of the objectives of the study done presented in this report was (1) formulation of cookies while substituting common salt with “green salt” - lyophilized salicornia. The other objective was (2) to determine antioxidant and anticancer activity of *S. ramosissima* extracts.

In the first study (1), cookies were produced with “green salt” instead of common salt and its shelf life time was evaluated for six months. After this period, through humidity, peroxide index and sensorial analysis, the cookies kept their chemical and organoleptic properties.

The second study (2), total phenolic content was estimated, and antioxidant capacity was measured by DPPH free radical. Aqueous extract of *S. ramosissima* was tested on HT-29 cancerous cell line, as well as its evaluation of cellular proliferation and cellular viability was done respectively by SRB (sulforhodamine B) and MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

The levels of antioxidant capacity, phenolic content and its anticancer potential present in the extract of this halophyte plant, define this plant as a promising source of natural antioxidants and nutraceuticals.

Keywords: *Salicornia ramosissima*, cookies, shelf life, antioxidant activity, cell proliferation and cell viability.

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	XIII
Índice de Tabelas.....	XV
Abreviaturas.....	XVII
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
2.1. O género <i>Salicornia</i> L. e as suas potencialidades.....	2
2.1.1. Estudos biológicos e fitoquímicos da <i>Salicornia ramosissima</i>	6
2.2. Bolachas e biscoitos.....	8
2.3. Tempo de prateleira.....	9
3. Materiais e métodos.....	11
3.1. Reagentes, materiais e equipamentos.....	11
3.2. Colheita da planta halófito.....	11
3.3. Liofilização.....	11
Parte 1 – Estudo da formulação de bolachas com a substituição de sal comum por “sal verde”.....	13
3.4. Formulação de novas receitas de bolachas com “sal verde”.....	13
3.4.1. Fluxograma de produção.....	15
3.4.1.1. Descrição das etapas.....	16
3.4.2. Composição nutricional.....	17
3.4.2.1. Teor de humidade.....	17
3.4.2.2. Cinza.....	18
3.4.2.3. Gordura bruta.....	18
3.4.2.4. Fibra bruta.....	19
3.4.2.5. Proteína bruta.....	19

3.4.2.6. Hidratos de carbono (extrativos não azotados)	20
3.4.2.7. Cloreto de sódio.....	20
3.4.3. Tempo de prateleira	21
3.4.3.1. Teor de humidade.....	22
3.4.3.2. Índice de peróxidos.....	23
3.4.3.3. Análise sensorial	25
Parte 2 – Estudos fitoquímicos e biológicos de extratos de <i>S. ramosissima</i>	29
3.5. Produção de extratos de <i>S. ramosissima</i>	29
3.5.1. Caracterização dos extratos.....	29
3.5.1.1. Concentração de cloreto de sódio.....	29
3.6. Estudo da capacidade antioxidante	30
3.6.1. Teor em compostos fenólicos.....	30
3.6.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método colorimétrico do DPPH	31
3.7. Estudo ao efeito citotóxico na linha celular HT-29	33
3.7.1. Subcultura das células e preparação do meio de cultura.....	34
3.7.2. Ensaio para avaliação da viabilidade celular e proliferação celular..	35
3.7.2.1. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT.	36
3.7.2.2. Determinação da proliferação celular pelo método colorimétrico da SRB.....	38
3.8. Análise estatística.....	41
4. Resultados e discussão.....	42
Parte 1 - Estudo da formulação de bolachas com a substituição do sal comum por “sal verde”	42
4.1. Formulação de novas receitas de bolachas com “sal verde”	42
4.2. Composição nutricional das bolachas	42
4.3. Tempo de prateleira.....	44

4.3.1. Teor de humidade	45
4.3.2. Índice de peróxidos	45
4.3.3. Análise sensorial	47
Parte 2 - Estudos fitoquímicos e biológicos de extratos de <i>S. ramosissima</i>	50
4.4. Caracterização dos extratos.....	50
4.5. Estudo à capacidade antioxidante	51
4.5.1. Teor em compostos fenólicos	51
4.5.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método colorimétrico do DPPH	52
4.6. Estudo ao efeito citotóxico na linha celular HT-29.....	54
4.6.1. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT.....	54
4.6.2. Determinação da proliferação celular pelo método colorimétrico da SRB	57
5. Conclusões	61
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	63
Bibliografia.....	65
ANEXO A - Lista de reagentes, materiais e equipamentos	75
ANEXO B - Folha de prova triangular	77
ANEXO C - Curvas de calibração do ácido gálico para os diferentes solventes utilizados na análise ao teor em compostos fenólicos.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>S. ramosissima</i> com folhagem verde em Lavos, Figueira da Foz (a); e com folhagem vermelha (Galicia, 2017) (b).	3
Figura 2: Distribuição da espécie <i>S. ramosissima</i> em território nacional (Adaptado de Araújo <i>et al.</i> , 2016). Coordenadas do local de onde foi colhida a salicórnia utilizada neste estudo.....	4
Figura 3: “sal verde” obtido após a liofilização da <i>Salicornia ramosissima</i>	12
Figura 4: Fluxograma de produção das bolachas.	15
Figura 5: Esquema ilustrativo do procedimento da composição nutricional.....	17
Figura 6: Esquema ilustrativo da metodologia usada para o estudo do tempo de prateleira - armazenamento inverso - para três tempos: 0, 3 e 6 meses de armazenamento.	22
Figura 7: Portas de gabinetes para análise sensorial na cozinha experimental de análise sensorial, na ESAC.....	26
Figura 8: Apresentação das amostras para a prova sensorial triangular, junto a uma cabina de prova.	26
Figura 9: Linha celular humana HT-29, testada neste trabalho experimental. Imagem obtida num microscópio ótico composto com uma ampliação de 10x. Retirado de ATCC® HTB-38™ (2018).....	33
Figura 10: Esquema representativo do ensaio de MTT e SRB.	35
Figura 11: Reação de redução do MTT a <i>formazan</i> , pela ação de células viáveis (adaptado de Riss <i>et al.</i> , (2004)).....	37
Figura 12: Estrutura química da aminoxantina (G-BIOSCIENCES®, [s.d.]).....	39
Figura 13: Formulação final: bolachas BPC com o equivalente de 25% de “sal verde” (a); BPC padrão (b).	42

Figura 14: Formulação final: bolachas BC com a substituição total do sal comum por “sal verde” (a); BC padrão (b).	42
Figura 15: Evolução ao longo do tempo de prateleira do teor de humidade a 105°C das bolachas.	45
Figura 16: Evolução ao longo do tempo de prateleira do índice de peróxidos (I.P.) das bolachas. n.d.- não determinado (devido à falta de amostra).	46
Figura 17: Teor em compostos fenólicos nos diversos extratos de <i>S. ramosissima</i>	51
Figura 18: Concentração do extrato SM, SE e SEA para o IC ₅₀ (µg/mL).	53
Figura 19: Efeito citotóxico do extrato de salicórnia e de uma solução de NaCl na linha celular HT-29, às 24, 48 e 72 horas, determinado pelo método do MTT (ponto 3.7.2.1). Os resultados são apresentados em percentagem em relação a culturas controlo (células tratadas com o veículo do composto, DMSO), consideradas 100% (linha tracejada horizontal).	55
Figura 20: Efeito anti-proliferativo do extrato de salicórnia e de uma solução de NaCl na linha celular HT-29. Os ensaios foram realizados pelo método colorimétrico da SRB (ponto 3.7.2.2), após 24, 48 e 72 horas de incubação com os compostos. Os resultados foram expressos em percentagem de retenção da SRB em relação às culturas de células de controlo e foram apresentados num gráfico com a retenção da SRB em função das concentrações de extrato/NaCl aplicadas nos vários tempos de incubação.	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Descrição do painel de provadores na prova que comparava as bolachas com “0 meses <i>versus</i> 3 meses” de armazenamento.....	27
Tabela 2: Descrição do painel de provadores na prova que comparava as bolachas com “0 meses <i>versus</i> 6 meses” de armazenamento.....	28
Tabela 3: Composição nutricional das bolachas em g/100 g matéria bruta ou seca.	43
Tabela 4: Quantidade de cloreto de sódio presente nas bolachas testadas. Os valores são expressos em g/100 g matéria bruta.	44
Tabela 5: Resultados da primeira prova triangular às bolachas BPC e BC.	48
Tabela 6: Resultados da prova triangular do estudo do tempo de prateleira, com 14 provadores. As amostras testadas foram as bolachas BPC e BC, padrão e com “sal verde”, onde se compararam as amostras com 0 meses às com 3 e 6 meses de armazenamento.	49
Tabela 7: Concentração média de cada extrato.	50
Tabela 8: Valores de IC ₅₀ (mg/mL) para os compostos estudados, face à linha HT-29, obtidos através do método do MTT, após 24, 48 e 72 horas de incubação. ...	56
Tabela 9: Valores de IC ₅₀ (mg/mL) para os compostos estudados, face à linha HT-29, obtidos através do método colorimétrico da SRB, após 24, 48 e 72 horas de incubação.....	59

ABREVIATURAS

A549 – Linha celular cancerígena de pulmão humano

BC – Bolachas de Chocolate

BPC – Bolachas com Pepitas de Chocolate

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

e.g. – *exempli gratia* (por exemplo)

FBS – Soro fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

HT-29 – Linha celular adenocarcinoma colorretal humano HT-29

IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% da atividade

i.e. – *id est* (isto é)

meq - miliequivalente

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

m/v – massa por volume

NaCl – Cloreto de Sódio

PBS – Solução tampão de fosfato de sódio, pH 7,4

S. – *Salicornia*

SRB – Sulforrodamina B

v/v – volume por volume

% AA – Percentagem de Atividade Antioxidante

% mb – Percentagem de matéria bruta

% ms – Percentagem de matéria seca

1. INTRODUÇÃO

Atendendo ao crescente interesse pelo bem-estar e um estilo de vida mais saudável, a população em geral, procura cada vez mais, os designados “produtos à base de plantas”.

Mundialmente as plantas estão na base do sistema da medicina tradicional (Newman e Cragg, 2012; Verma e Singh, 2008) e são já a maior fonte de medicamentos e de compostos líderes para produção de fármacos (Newman e Cragg, 2012). Atualmente, o interesse recai também na sua possível introdução na alimentação e, por isso, cada vez mais se procura analisar e estudar plantas com o objetivo de se conhecer os seus constituintes químicos e, principalmente, descobrir novas utilidades.

É neste contexto que se enquadra o estudo da planta *Salicornia ramosissima* J. Woods (*S. ramosissima*), uma espécie do género *Salicornia* L. (Davy, Bishop e Costa, 2001) que engloba diversas espécies com importantes aplicações na medicina tradicional, tais como o tratamento de hipertensão, cefaleias, escorbuto (Wang *et al.*, 2012), diabetes, obesidade, cancro, entre outras (Kim *et al.*, 2012).

A *S. ramosissima* é uma planta halófita (plantas adaptadas a ambientes salinos) que tem sido apresentada como um alimento funcional promissor, dado o seu elevado valor nutricional e o teor em compostos bioativos que conferem propriedades biológicas importantes (Essaidi *et al.*, 2013). Devido aos potenciais benefícios nutricionais e propriedades funcionais, a salicórnia tem vindo a receber um grande interesse nos mercados dos alimentos e dos produtos farmacêuticos. Assim, cresce o interesse no estudo desta espécie e a sua aplicação direta como ingrediente funcional em bolachas.

O presente trabalho foi dividido em duas partes: Parte 1 – Estudo da formulação de bolachas com “sal verde” (salicórnia liofilizada), onde se fez a aplicação direta da planta manipulada tecnologicamente (em substituição do sal comum) em bolachas e Parte 2 – Estudos biológicos de extratos de *S. ramosissima*, onde foi determinada a atividade antioxidante e anticancerígena da planta, ou seja, verificação das suas potencialidades para a sua utilização como alimento funcional.

Assim, um dos objetivos do estudo apresentado neste relatório foi (1) a formulação de bolachas com substituição do sal comum por “sal verde”. O outro objetivo foi (2) determinar as atividades antioxidante e anticancerígena de extratos de *S. ramosissima*.

Este estágio realizou-se na Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), na Unidade de I. & D. "Química-Física Molecular" da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC) e na *DanCake Portugal S.A.*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O género *Salicornia* L. e as suas potencialidades

A salicórnia é uma halófito pertencente à família Chenopodiaceae. Embora as numerosas espécies e micro espécies tenham sido descritas ao longo dos últimos anos na tentativa de representar a variação observada deste género, ainda não existe um tratamento taxonómico satisfatório e, frequentemente, é difícil atribuir informações totalmente corretas dentro das espécies da *Salicornia* L. (Isca et al., 2014a).

A aparência desta planta é, de forma geral, pequena, normalmente com menos de 30 cm de altura, sendo o caule principal e os seus ramos opostos compostos por nós intermédios curtos, cilíndricos e cada um com uma cobertura fotossintética suculenta, conferindo assim uma aparência articulada (Isca et al., 2014).

A halófito *Salicornia ramosissima* J. Woods é uma das espécies pertencente ao género *Salicornia* L. com um ciclo anual. Como muitas das espécies dentro deste género, a *S. ramosissima* é verde, mas a sua folhagem torna-se vermelha na altura do outono (Figura 1). As flores hermafroditas são polinizadas pelo vento e o fruto é pequeno e suculento, contendo apenas uma única semente (Isca et al., 2014).



Figura 1: *S. ramosissima* com folhagem verde em Lavos, Figueira da Foz **(a)**; e com folhagem vermelha (Galicia, 2017) **(b)**.

Uma das possíveis origens desta planta terá sido durante a época do Mioceno, algures entre o Mediterrâneo e a Ásia Central, descendendo da *Sarcocornia perennis*, a qual se terá começado a diversificar nos finais do Plioceno/ inícios do Pleistoceno. Na realidade, do género *Salicornia* L. existem mais de 100 espécies, sendo a *Salicornia herbacea*, *Salicornia bigelovii*, *Salicornia europaea*, *Salicornia prostata*, *Salicornia ramosissima* e a *Salicornia virginica*, aquelas com maior incidência (Isca *et al.*, 2014).

O género *Salicornia* L. desenvolve-se em vários climas, desde temperados a tropicais (Bashan, Moreno e Troyo, 2000). Estas halófitas estão entre as plantas terrestres mais tolerantes ao sal crescendo, preferencialmente, no litoral costeiro, em pântanos e sapais salgados ou salinas temporariamente alagadas. A espécie *S. ramosissima* desenvolve-se na parte oeste da Europa (Jefferies e Gottlieb, 1982), no Mediterrâneo e noroeste de África e pode ser encontrada em todo o litoral da Península Ibérica. A nível nacional a sua distribuição é mais acentuada na Ria de Aveiro, Setúbal e Faro, como se pode verificar pela Figura 2.

2014) podendo ser uma solução para economizar água fresca e transformar terras áridas em terras cultiváveis (Lopes, Cavaleiro e Ramos, 2017). Também como a salicórnia pode ser cultivada em zonas marinhas e regada com água do mar, ela é resistente a doenças agrícolas típicas (Lopes, Cavaleiro e Ramos, 2017). Assim, o cultivo desta planta pode evitar o uso de pesticidas e fertilizantes, podendo satisfazer os requisitos da produção orgânica, com um processo de crescimento “*eco-friendly*” (ecologicamente correto) e sustentável (Lopes, Cavaleiro e Ramos, 2017). Por fim, em países com recursos abundantes no litoral, como é o caso de Portugal, o cultivo de salicórnia poderá ser em larga escala.

Desde os primórdios que a salicórnia tem um conjunto diversificado de aplicações, desde o seu uso como aditivo na fabricação de vidro e sabão (este último devido ao seu alto teor em cinzas), no desengorduramento de tecidos (Davy, Bishop e Costa, 2001; Renard, Champenois e Thibault, 1993) até ao seu uso em dietas para animais e humanos (Ventura *et al.*, 2015).

Ainda sem muitos estudos sobre esta planta, o seu consumo era já de extrema importância e feito de diversas formas. Mudie *et al.* (2005) descreveram que os primeiros povos a consumir uma das suas espécies - *S. rubra* (*S. europaea* subsp. *rubra*) - foram os povos índios, que ferviam em água e deixavam evaporar até obter sal.

Em 1920, tentou-se comercializar (mas sem sucesso) a salicórnia como um legume barato e abundante, mas foi durante a 2ª Guerra Mundial, que a sua venda como “espargo do mar” (conservada em gelo), tomou grandes proporções, onde chegou até a substituir o feijão verde. Mais recentemente, esta foi utilizada na produção de biocombustíveis (Brown *et al.*, 2014) e na fitorremediação (Shpigel *et al.*, 2013; Webb *et al.*, 2013).

Na medicina tradicional, por exemplo, a *S. europaea* era considerada um produto diurético e rico em vitamina C, explicando a sua utilização em navios de viagens de longo curso na luta contra o escorbuto (Wang *et al.*, 2012).

Em Portugal, durante muito tempo, a salicórnia era considerada uma planta invasora das salinas e, só recentemente, despertou o interesse como produto *gourmet* devido ao seu forte sabor salgado e textura crocante (Ventura *et al.*, 2011).

Para além do seu vasto uso na medicina tradicional, a salicórnia tem vindo a ser cada vez mais procurada e utilizada como substituto do sal na culinária. Os caules carnudos deste vegetal são bastante requisitados para cozinhas *gourmet*, não só pelo seu sabor salgado, mas também pelo seu valor nutricional (Ventura *et al.*, 2011).

2.1.1. Estudos biológicos e fitoquímicos da *Salicornia ramosissima*

Vários estudos têm vindo a comprovar que esta halófito tem grande potencial como alimento funcional, devido essencialmente ao seu valor nutricional em termos de minerais naturais, fibra alimentar e muitos compostos bioativos, como os fitoquímicos que conferem propriedades biológicas importantes (Essaidi *et al.*, 2013).

Nestes estudos foram identificados diversos benefícios para a saúde no consumo desta halófito. Extratos de *S. herbacea* exibiram atividades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, apoiando as teorias dos diversos usos tradicionais (Rhee e Park, 2009). Também a sua capacidade anti-proliferativa em células cancerígenas (A549 (Zhao *et al.*, 2014) e HT-29 (Kang *et al.*, 2011; Kim e Lee, 2009)) foi comprovada. Relativamente à espécie da *S. ramosissima*, apesar de ainda serem escassos os estudos quanto à sua capacidade anticancerígena, Ferreira *et al.* (2018) comprovou que havia algum efeito protetor, por parte desta planta, contra a toxicidade aguda testicular em ratinhos.

No que diz respeito ao seu valor nutricional, a salicórnia foi reconhecida como uma das mais promissoras culturas que pode ser interposta na produção de alimentos para humanos e animais. As análises nutricionais a este género mostraram que esta planta contém aminoácidos essenciais, ácidos gordos, vitaminas (A e C, essencialmente), alto teor de fibra dietética e alta diversidade de minerais, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro e iodo (Díaz, Benes e Grattan, 2013; Min *et al.*, 2002).

Em relação à espécie *S. ramosissima*, poucos estudos foram ainda realizados. No entanto, alguns dados interessantes estão a surgir. Barreira *et al.* (2017) examinaram

recentemente pela primeira vez o seu valor nutricional e o seu potencial antioxidante, em amostras recolhidas no sul de Portugal (Algarve), verificando que a planta apresenta atividade antioxidante.

Ainda no estudo de Barreira *et al.* (2017), a composição de ácidos gordos foi examinada e foram encontrados ácidos gordos essenciais, o ácido linoleico (ómega 6 ($\omega 6$)) e o ácido α -linolénico (ómega 3 ($\omega 3$)).

Isca *et al.* (2014b) identificaram vários fitoquímicos importantes, nomeadamente esteróis, ácidos dicarboxílicos e álcoois. A presença destes compostos também aumenta o valor de *S. ramosissima* como um ingrediente funcional, na medida em que estes são bem conhecidos pelos seus efeitos na redução do colesterol (Rudkowska *et al.*, 2008).

O estudo de Barreira *et al.* (2017) comprovou também que a *S. ramosissima* é uma valiosa fonte de minerais essenciais, particularmente de sódio (89,9 mg/g ms), magnésio (9,43 mg/g ms), potássio (8,92 mg/g ms) e cálcio (4,86 mg/g ms). Para além destes, a *S. ramosissima* também provou ser uma excelente fonte de manganês (204 $\mu\text{g/g}$ ms). Contudo, o elevado teor de sódio é um fator a considerar aquando o consumo desta planta, de maneira a não exceder os limites legais para a ingestão de sódio (Barreira *et al.*, 2017).

O alto valor nutricional em termos de minerais da maioria das halófitas, incluindo da *S. ramosissima*, é consequência do ambiente salino em que se desenvolvem e a sua capacidade de acumular minerais (Díaz, Benes e Grattan, 2013). Também foram encontrados, em concentrações mais baixas, metais tóxicos tais como, cromo (5,24 $\mu\text{g/g}$ ms), níquel (2,32 $\mu\text{g/g}$ ms) e chumbo (1,45 $\mu\text{g/g}$ ms). Estes valores estão abaixo do limite estabelecido pela Comissão Europeia (Barreira *et al.*, 2017) porém, isto pode ser uma desvantagem para esta espécie quando cresce em áreas poluídas, podendo acumular concentrações relativamente altas de metais pesados, particularmente nas raízes (Pedro *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2015) investigaram os efeitos do sal de *S. bigelovii* Torr na pressão arterial em ratinhos. Notavelmente, os resultados mostraram que, enquanto o sal

comum induziu hipertensão, o sal de *S. bigelovii* Torr não teve nenhum efeito na tensão arterial, podendo esta espécie ser usada como um substituto do sal.

Nos últimos anos, dadas as promissoras características funcionais da salicórnia, vários estudos surgiram para testar a sua aplicabilidade como ingrediente funcional na indústria alimentar. Esses estudos resultaram em produtos inovadores com características melhoradas, como um vinagre com propriedades antioxidantes e anti fadiga (Cho *et al.*, 2016) ou até mesmo “cubos de peixe” crocantes e reestruturados contendo *S. bigelovii* Torr (Wang *et al.*, 2013). (Kim *et al.*, 2014) introduziram a *S. herbacea* em pó, como substituto parcial do sal (0,75% de NaCl) em salsichas para melhorar as suas propriedades texturais. Os autores deste estudo observaram um aumento no rendimento de cozimento e na estabilidade da emulsão devido ao conteúdo em fibras de *S. herbacea*. No entanto, num estudo subsequente, algumas alterações nas características de cor foram relatadas, possivelmente devido aos pigmentos coloridos nestas halófitas (Kim *et al.*, 2014), podendo isto ser uma limitação do seu uso em alguns alimentos.

É de notar que poucos (ou quase nenhuns) foram os estudos que relataram o uso de *S. ramosissima* como ingrediente funcional. Até à data, apenas foi realizado um estudo, levado a cabo por Lopes, Cavaleiro e Ramos (2017), onde foi substituído o sódio (sal) do pão pelo sódio de *S. ramosissima*. Foram testadas várias estratégias de redução de sal, onde uma delas era a substituição do sal comum do pão pelo sal desta planta.

Apesar de ainda haver poucos estudos sobre a *S. ramosissima*, o cenário é favorável para a sua utilização como ingrediente alimentar, mais concretamente como substituto do sal (Lopes, Cavaleiro e Ramos, 2017), como por exemplo, em bolachas e em biscoitos como foi testado neste estudo.

2.2. Bolachas e biscoitos

A palavra “biscoito” deriva do latim *panis biscoctus* e significa pão (*panis*) duplamente (*bis*) cozido (*coctus*). A classificação de biscoitos e bolachas em diferentes categorias apresenta alguns problemas. O primeiro deles prende-se logo com as

definições de biscoito, bolachas ou bolinhos (em inglês, *biscuits*, *crackers* e *cookies*) que se sobrepõem e possibilita uma certa confusão. Alguns dos fatores que podem influenciar a designação atribuída a diferentes tipos de biscoitos podem ser o local onde nos encontramos, as tradições e os costumes ou até a definição atribuída pela marca que os comercializa (Manley, 2000, 2001).

De uma forma geral, todas as definições se referem a um produto à base de farinha, enriquecido com gordura e açúcar nas mais diversas proporções (Manley, 2000, 2001). Nos primeiros tempos, a sua confeção era muito simples, apenas à base de farinha e água, e a dupla cozedura a que estavam sujeitos conferia aos biscoitos um baixo teor de humidade (desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos) o que fazia com que o seu tempo de prateleira fosse maior. Devido a estas características e ao facto de serem extremamente acessíveis a nível de custos de produção, a partir do século XIV, as bolachas e os biscoitos foram utilizados de forma a aprovisionar as armadas dos navios e embarcações em diversas partes do mundo (Manley, 2000).

Os biscoitos são um exemplo de um produto alimentar que começaram por ser confeccionados em casa. O verdadeiro desafio foi introduzir este produto na indústria, produzi-lo de forma a estar até um ano na prateleira de um supermercado, garantindo ainda um sabor, uma textura e uma aparência semelhante aos caseiros (Manley, 2000).

Apesar de cada vez mais mecanizada, esta indústria está constantemente a sofrer alterações, de forma a aumentar a velocidade e a eficiência da produção, diminuindo a mão-de-obra, os desperdícios do processo e aumentando o tempo de prateleira dos produtos (Manley, 2000).

2.3. Tempo de prateleira

São várias as definições de tempo de prateleira que se pode encontrar na bibliografia. Para *Fu e Labuza* (1993) (Hough, 2010) é o período de tempo para um produto ficar inaceitável sensorial e nutricionalmente ou ainda inseguro para consumo. Outra definição de tempo de prateleira é o período de tempo durante o qual as características sensoriais e o desempenho do produto são conforme o que o fabricante

pretende, ou seja, um produto só está consumível ou aceite durante esse tempo (Hough, 2010). Em suma, tempo de prateleira de um alimento, vulgarmente conhecido por validade, é o período temporal no qual um alimento se mantém seguro para o consumidor, mantendo as características sensoriais, físicas, químicas e funcionais desejadas e cumprindo com as características nutricionais evidenciadas na rotulagem, sob as condições de armazenamento recomendadas (Dias, 2017).

O estudo do tempo de prateleira pode ser estimado por diversas formas e cabe ao fabricante escolher a que se adequa melhor às condições reais de ensaio do seu produto. De entre as várias metodologias para este fim, a que se evidenciou mais adequada para este estudo foi a do armazenamento inverso. A ideia principal do armazenamento inverso é permitir que todas as amostras, mesmo com tempos de armazenamento diferentes, estejam disponíveis no mesmo dia para a sua avaliação sensorial (Hough, 2010).

Assim, uma grande vantagem na utilização desta metodologia, é o facto de possibilitar a avaliação simultânea das amostras com tempos de prateleira diferentes. No caso das análises sensoriais realizadas por provadores não treinados, significa que apenas é necessário recrutá-los numa única ocasião, para avaliar todas as amostras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes, materiais e equipamentos

Os diversos compostos, reagentes e equipamentos utilizados na realização deste trabalho encontram-se listados no anexo A.

3.2. Colheita da planta halófito

Foi realizada a colheita de *S. ramosissima* em julho de 2017. A planta foi colhida manualmente, do seu habitat natural, nos Armazéns de Lavos, Figueira da Foz (coordenadas na Figura 2). Após a sua colheita, esta foi armazenada numa arca de ultracongelação a $-75^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e posteriormente liofilizada.

3.3. Liofilização

Para a conservação da *S. ramosissima* utilizou-se o método de liofilização.

A liofilização consiste num processo onde há a remoção da água e outros solventes do produto congelado pelo processo de sublimação. A sublimação ocorre quando a água no estado sólido é convertida diretamente em vapor de água, sem passar pelo estado líquido (Vanaclocha e Requena, 2003). O processo de liofilização é feito em três etapas principais: 1- congelação do produto; 2- secagem primária, por sublimação do gelo, controlando a pressão de vácuo e o aumento da temperatura e 3- secagem secundária, por evaporação a vácuo da restante água ligada ao alimento (Barbosa-Cánovas e Vega-Mercado, 2000).

A salicórnia foi previamente congelada e conservada a $-75^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e posteriormente liofilizada (temperatura do condensador -98°C e pressão 9,2 Pa). Após este processo, esta foi reduzida a pó de cor verde clara – “sal verde” (Figura 3) e foi

armazenada num saco selado e ao abrigo da luz e da humidade, à temperatura ambiente.



Figura 3: “sal verde” obtido após a liofilização da *Salicornia ramosissima*.

Parte 1 – Estudo da formulação de bolachas com a substituição de sal comum por “sal verde”

3.4. Formulação de novas receitas de bolachas com “sal verde”

No desenvolvimento deste estudo, foram produzidas bolachas com *S. ramosissima* liofilizada (“sal verde”, referido no ponto 3.3) em substituição do sal comum, a partir de receitas originais da *DanCake*. No momento de produção das bolachas o valor do teor de sal da salicórnia liofilizada não era conhecido e, por conseguinte, usou-se como referência o valor 24,21 g de NaCl/100 g de matéria seca que correspondia ao teor obtido através de espectroscopia de absorção atômica para outro lote de salicórnia liofilizada.

Com a ajuda dos responsáveis pelo departamento de desenvolvimento de novos produtos, foram produzidos vários lotes de bolachas enriquecidas com “sal verde” e da receita padrão. Todos os ensaios foram efetuados na fábrica piloto (cozinha experimental da *DanCake*), cujo local é indicado para experiências como as deste estudo, nomeadamente no desenvolvimento de novos produtos. Esta cozinha segue os padrões da linha de produção (com exceção do forno e de alguns equipamentos para a moldagem das bolachas) e, por conseguinte, produziram-se bolachas muito próximas das produzidas em linha.

De modo a proteger o sigilo da empresa, foram dados nomes fictícios aos tipos de bolachas produzidas durante os ensaios e os ingredientes das receitas não foram revelados.

O objetivo destas experiências foi a substituição total do sal comum por “sal verde” em bolachas, de forma a valorizar a espécie *S. ramosissima* e a garantir ou melhorar as características físico-químicas e organolépticas das bolachas. Em todos os ensaios foram feitas formulações padrão (receitas sem alterações) e formulações com alteração do sal comum pela salicórnia liofilizada - “sal verde”.

Numa primeira fase (de teste), experimentou-se fazer duas receitas: as “Bolachas com Pepitas de Chocolate” (BPC) e as “Bolachas de Chocolate” (BC). No caso

das BPC, foram feitos dois ensaios, um com a substituição total do sal comum pelo equivalente em “sal verde” e outro com o equivalente de 50% de “sal verde”. No caso das BC, apenas se fez um ensaio com a substituição total do sal comum por “sal verde”. Após estas formulações, pôde-se constatar que tanto as BPC como as BC, resultaram muito bem em termos de consistência, aspeto visual e sabor.

De maneira a verificar se se notavam diferenças organolépticas entre as novas formulações de bolachas, efetuou-se uma análise sensorial a cada um dos lotes de bolachas e cujos resultados se encontram descritos no ponto 4.3.3.

Numa segunda fase, e tendo por base os resultados preliminares da análise sensorial foram feitos mais dois lotes de bolachas: as bolachas com pepitas de chocolate (BPC), com uma menor quantidade de equivalente de “sal verde”, ou seja 25% da receita padrão e as bolachas de chocolate (BC) com o equivalente de 100% em “sal verde”.

Deste modo e após algumas tentativas de receitas experimentais com “sal verde”, definiram-se como objeto de estudo as bolachas com pepitas de chocolate (BPC), com um equivalente de 25% de “sal verde” e as bolachas de chocolate com o equivalente de 100% em “sal verde” (BC).

3.4.1. Fluxograma de produção

De seguida é apresentado o fluxograma¹ de produção destas duas bolachas (Figura 4), na fábrica piloto.

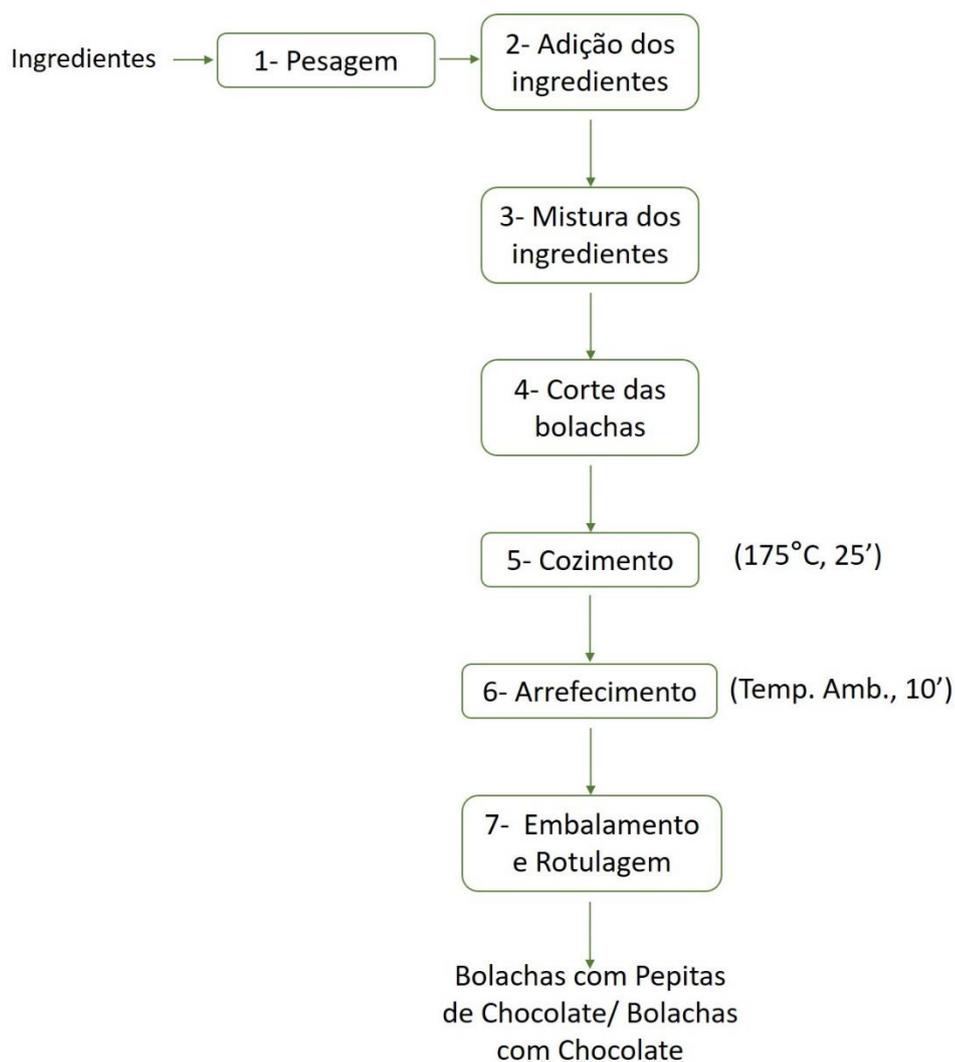


Figura 4: Fluxograma de produção das bolachas.

¹ Ambas as receitas se processaram da mesma maneira, sendo por isso apresentado apenas um fluxograma de produção.

3.4.1.1. Descrição das etapas

Os dois tipos de bolachas foram feitos no mesmo dia. Relativamente ao sal, as receitas padrão apenas continham sal comum e as receitas com “sal verde”, continham apenas “sal verde”. As etapas do fluxograma encontram-se descritas de seguida:

1. Pesagem

A pesagem de todos os ingredientes foi feita numa balança.

2. Adição dos ingredientes

Os ingredientes foram adicionados num recipiente metálico próprio.

3. Mistura dos ingredientes

Misturaram-se todos os ingredientes numa batedeira, até se ter obtido uma massa homogénea.

4. Corte das bolachas

As bolachas BPC foram moldadas com um molde próprio para este fim, enquanto as bolachas BC foram cortadas numa extrusadora de massas com os moldes próprios destas bolachas (figuras de animais e letras).

5. Cozimento

As bolachas foram cozidas num forno, a uma temperatura de 175°C, durante 25 minutos.

6. Arrefecimento

Durante 10 minutos, à temperatura ambiente, as bolachas foram arrefecidas em grelhas de arrefecimento.

7. Embalamento e rotulagem

As bolachas foram embaladas com película de polipropileno impressa.

3.4.2. Composição nutricional

Para a determinação da composição nutricional das bolachas em estudo, foi aplicado o método de Weende, que foi desenvolvido em 1864 na Estação Experimental de Weende, na Alemanha e é vastamente aplicado para a determinação do valor nutricional de alimentos (Dryden, 2008). Conhecido como método de análise centesimal ou proximal, consiste na determinação do teor de humidade, cinza, proteína bruta, fibra bruta, gordura bruta, hidratos de carbono, cloreto de sódio (sal), entre outros. A Figura 5 apresenta, de forma ilustrativa, o esquema de Weende.

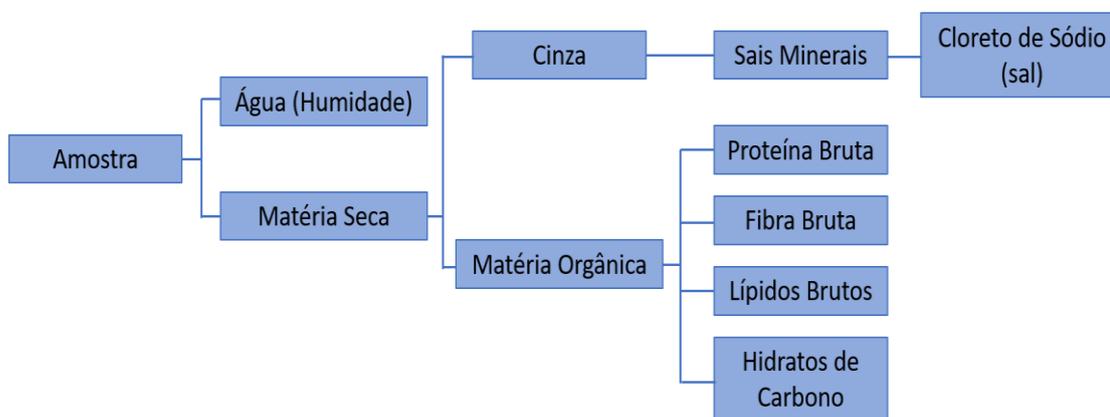


Figura 5: Esquema ilustrativo do procedimento da composição nutricional.

Antes de se proceder às seguintes análises, as bolachas foram trituradas em almofariz.

3.4.2.1. Teor de humidade

Para a determinação do teor de humidade a 105°C (NP 875 (1994)), foram colocados cadinhos a secar a 105°C durante 2 horas e, posteriormente, foram arrefecidos em exsiccador e pesados (P1). Pesaram-se, aproximadamente, 2 g de amostra moída para cada cadinho, registando o peso dos cadinhos mais a amostra (P2). Os cadinhos foram colocados numa estufa, a 105°C, durante 2 horas. Os cadinhos com a amostra seca foram arrefecidos em exsiccador e depois pesados (P3).

O teor da humidade é dado pela equação seguinte (eq. 1):

$$\text{Humidade (\%ms)} = \frac{(P2 - P3)}{(P2 - P1)} \times 100 \quad (1)$$

3.4.2.2. Cinza

Para determinar o teor de cinza (NP 518 (1986)), secaram-se cadinhos a 105°C durante 2 horas, arrefeceram-se em exsiccador e seguidamente foram pesados (P1). Aproximadamente 2 g de amostra previamente seca a 105°C foi colocada nos cadinhos e pesada (cadinho mais amostra) (P2). Durante 2 horas, os cadinhos com a amostra foram colocados numa mufla a 550°C e posteriormente arrefecidos num exsiccador e pesados novamente (P3). H é a humidade em %.

A cinza é dada por (eq. 2 e 3):

$$\text{Cinza (\% ms)} = \frac{(P2 - P3)}{(P2 - P1)} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Cinza (\% mb)} = \frac{\text{Cinza (\%ms)} \times (100 - H)}{100} \quad (3)$$

3.4.2.3. Gordura bruta

A gordura bruta foi determinada segundo a NP 876 (2001), onde foi utilizado o aparelho de *Soxhlet*. Secaram-se balões de fundo redondo na estufa a 105°C durante 2 horas. Findo este tempo, foram arrefecidos em exsiccador e posteriormente pesados (P1). Num cartucho próprio, previamente tarado, colocaram-se aproximadamente 2g de amostra previamente seca a 105°C e registou-se esse valor (P2). Colocou-se o cartucho no extrator de *Soxhlet*. No balão, colocou-se éter di-etílico até 2/3 da sua capacidade. Montou-se o equipamento e procedeu-se à extração durante 16 horas. Após este tempo, tirou-se o balão do extrator de *Soxhlet* e evaporou-se todo o solvente do aparelho, com o auxílio de um evaporador rotativo. De seguida, colocou-se o balão na estufa a 105°C durante 2 horas, arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se (P3).

A gordura bruta é dada pela equação 4 e 5, onde H é a humidade em %:

$$\text{Gordura bruta (\% ms)} = 100 \times \frac{(P_3 - P_1)}{P_2} \quad (4)$$

$$\text{Gordura bruta (\% mb)} = \frac{\text{Gordura bruta (\%ms)} \times (100 - H)}{100} \quad (5)$$

3.4.2.4. Fibra bruta

Para determinar a fibra bruta (NP 1005 (1983)), foram pesadas, aproximadamente, 2 g de amostra previamente seca a 105°C (P1) e colocou-se num copo alto de 800 mL. Acrescentou-se 200 mL de ácido sulfúrico 12,5 g/L e colocou-se o copo num fibrómetro durante 40 minutos. Com o auxílio de uma bomba de vácuo, filtrou-se o conteúdo do copo para um cadinho de placa filtrante. Retirou-se a amostra do cadinho e voltou-se a colocar no copo, com a adição de 250 mL de hidróxido de sódio 12,5 g/L. Colocou-se novamente a solução no fibrómetro durante 40 minutos e efetuou-se novamente a filtração para um cadinho de placa filtrante com o auxílio da bomba de vácuo. Posteriormente colocou-se o cadinho na estufa a 130°C durante 2 horas, arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se (P2). Por último, o cadinho foi colocado na mufla a 550°C durante 2 horas, arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se novamente (P3).

A fibra bruta é dada por (eq. 6):

$$\text{Fibra bruta (\% ms)} = \frac{(P_2 - P_3)}{P_1} \times 100 \quad (6)$$

3.4.2.5. Proteína bruta

Para a determinação da proteína bruta (NP 2030 (1996)), foi utilizado o método de Kjeldhal. Pesou-se, com rigor, 0,5 g de amostra previamente seca a 105°C (P1) e colocou-se num tubo de Kjeldhal. Acrescentou-se 12,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e uma pastilha de catalisador de selénio. Efetuou-se também dois ensaios de controlo, onde se adicionaram os mesmos reagentes, sem adição de amostra. Os tubos de Kjeldhal foram colocados num digestor de Kjeldhal a 400°C, durante 2 horas.

De seguida deixou-se arrefecer na *hotte* e adicionou-se 50 mL de água destilada. Uma solução de 25 mL de ácido bórico com indicador misto foi colocada num balão de *erlenmeyer* e, juntamente com o tubo de Kjeldhal, foram colocados num destilador de tubos Kjeldhal, onde foram adicionados 50 mL de hidróxido de sódio a 40%. Recolheu-se 150 mL de destilado e procedeu-se à titulação com uma solução conhecida de ácido clorídrico 0,168 M. Para os cálculos da proteína bruta foi considerado o fator 6,25 e as equações 7 e 8.

$$\text{Proteína bruta (\%ms)} = \text{fator} \times 100 \times \frac{0,01401 \times [\text{HCl}] \times (V - V_0)}{P1 \times 10} \quad (7)$$

$$\text{Proteína bruta (\%mb)} = \frac{\text{Proteína bruta (\%ms)} \times (100 - H)}{100} \quad (8)$$

Em que, [HCL] é a concentração de ácido clorídrico (M), V é o volume gasto do titulante na titulação da amostra (mL), V_0 é o volume gasto do titulante na titulação do teste de controlo (mL) e H é a humidade (%).

3.4.2.6. Hidratos de carbono (extrativos não azotados)

Entende-se por extrativos não azotados a diferença para 100 dos restantes constituintes (humidade, cinza, gordura bruta, fibra bruta e proteína bruta) e corresponde aproximadamente aos hidratos de carbono.

3.4.2.7. Cloreto de sódio

O teor de cloreto de sódio foi quantificado segundo a NP 1422 (1977). Começou-se por pesar 5 g da amostra bruta (P1) para um cadinho onde se adicionou 20 mL de carbonato de sódio 5% e, de seguida, colocou-se em banho-maria até a solução se evaporar por completo. Colocou-se cadinhos na mufla a 400°C, durante 12 horas, tendo em atenção de não se exceder esse valor de temperatura. Lavou-se e filtrou-se o resíduo para um balão de *erlenmeyer* com água destilada quente e adicionou-se 2 mL

de ácido nítrico concentrado e 10 mL de nitrato de prata 0,1 N, medidos com precisão (V_1). Efetuou-se uma nova filtração do conteúdo para outro balão de *erlenmeyer* e adicionou-se 5 mL de uma solução saturada de sulfato de ferro III e amônio. Titulou-se com uma solução de tiocianato de potássio 0,1 N e registou-se o volume gasto (V_2).

O cloreto de sódio é dado por (eq. 9 e 10):

$$\text{Cloreto de sódio (\%mb)} = \frac{0,5844 \times (V_1 - V_2)}{P1} \quad (9)$$

$$\text{Cloreto de sódio (\%ms)} = \frac{\text{Cloreto de sódio (\%mb)} \times 100}{(100 - H)} \quad (10)$$

3.4.3. Tempo de prateleira

A substituição do sal comum pela *S. ramosissima* liofilizada (“sal verde”) nas bolachas, pode levar a algumas alterações físico-químicas e/ou organolépticas nas bolachas, relativamente ao seu tempo de prateleira. Assim, de forma a verificar se ocorriam essas alterações nas bolachas com a introdução da salicórnia, foi realizado um estudo onde se comparou as bolachas da nova formulação (com “sal verde”) às da receita padrão. O estudo teve a duração de seis meses, embora as bolachas da receita padrão, tenham um tempo de prateleira estimado pela *DanCake* de 12 meses.

Relativamente às análises efetuadas, foram realizadas as que são efetuadas na *DanCacke* para este fim, ou seja, análises químicas ao teor de humidade e ao índice de peróxidos e avaliação sensorial.

As análises químicas e sensoriais realizadas para este estudo têm sempre que ser comparadas com uma amostra no tempo zero sendo, por isso, necessário armazenar uma parte das amostras em condições especiais de forma a parar a sua degradação.

Como já referido, a metodologia aplicada foi a do armazenamento inverso e, neste sentido, foram estabelecidos três tempos de conservação: 0, 3 e 6 meses. As amostras correspondentes aos 0 e 3 meses foram colocadas numa arca de

ultracongelamento a uma temperatura de $-75^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, para que o seu envelhecimento fosse parado, e as amostras correspondentes aos 6 meses de tempo de prateleira foram colocadas numa estufa a $25,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $38,0\% \pm 0,6\%$ de humidade relativa, para simular o seu envelhecimento normal.

Ao fim de 3 meses, algumas amostras foram retiradas da arca e colocadas na estufa e ao fim de 6 meses foram retiradas da arca as bolachas correspondentes ao tempo inicial (0 meses de armazenamento).

Após o tempo total decorrido - 6 meses - todas as amostras foram avaliadas do ponto de vista sensorial e químico. Na Figura 6, ilustra-se a metodologia usada para a determinação do tempo de prateleira através do método do armazenamento inverso.

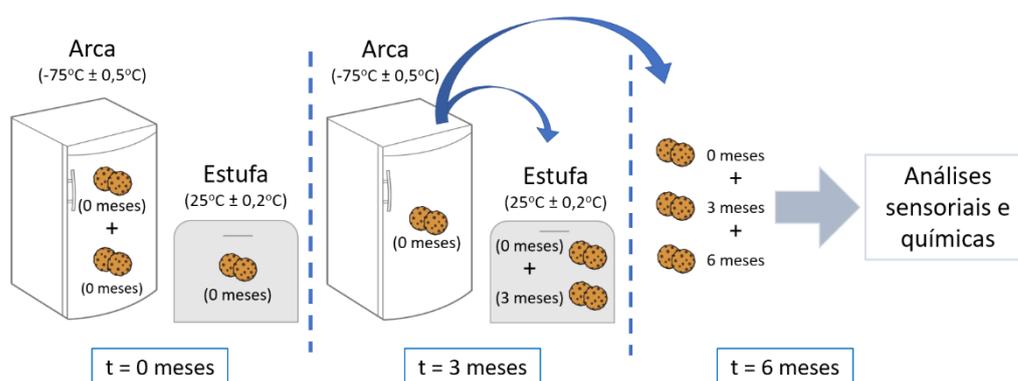


Figura 6: Esquema ilustrativo da metodologia usada para o estudo do tempo de prateleira - armazenamento inverso - para três tempos: 0, 3 e 6 meses de armazenamento.

As análises efetuadas para os diversos tempos de armazenamento das bolachas foram o teor humidade a 105°C , o índice de peróxidos e a análise sensorial.

3.4.3.1. Teor de humidade

Esta é uma análise recorrente a produtos alimentares como as bolachas, que facilmente absorvem humidade do exterior à medida que envelhecem. Assim, de forma a verificar se existiam diferenças entre os vários tipos de receitas aos diversos tempos,

foi efetuada uma análise ao teor de humidade a 105°C às bolachas. A metodologia utilizada para esta análise já foi referida no ponto 3.4.2.1.

3.4.3.2. Índice de peróxidos

As reações de oxidação lipídica que ocorrem durante o armazenamento de produtos alimentares, como as bolachas, são a principal causa de deterioração que afeta a sua qualidade (Calligaris *et al.*, 2007).

Uma vez que as bolachas apresentam um valor de gordura relativamente elevado, o tempo de prateleira do produto pode ficar comprometido. Devido a isto, uma análise habitual a este tipo de produto alimentar, quando se faz um estudo ao tempo de prateleira, é ao índice de peróxidos. O objetivo desta análise é, então, determinar o grau de oxidação dos óleos e gorduras (Nielsen, 2009) ao longo do tempo de prateleira.

Para a sua determinação, foi necessário fazer a extração da gordura das bolachas a frio e em seguida a análise aos peróxidos tendo como base o método modificado de Bligh e Dyer (1959).

1ª Parte - extração a frio (cálculo do teor de gordura)

Neste procedimento, são utilizados reagentes como o clorofórmio e o metanol que permitem a separação da mistura em duas fases: a fase aquosa (no topo) e a fase clorofórmica contendo o lípido (no fundo). As fases são ainda separadas por um funil de separação e após a evaporação do clorofórmio, a gordura pode ser quantificada por peso (Nielsen, 2014).

Numa balança analítica, pesou-se 10 g de amostra. Devido à existência de pouca quantidade de bolacha para as análises físico-químicas, não foram feitos duplicados de extrações. De seguida, num *erlenmeyer* foram adicionados 50 mL de metanol, 25 mL de clorofórmio e, no caso desta amostra, adicionou-se 20 mL de água (a quantidade de água depende da humidade do produto). Após este procedimento, o *erlenmeyer* foi tapado e colocado numa placa de agitação durante 30 minutos. Findo este tempo, foram adicionados mais 25 mL de clorofórmio e 25 mL de uma solução de

sulfato de sódio 1,5%. Colocou-se o *erlenmeyer* tapado novamente na placa de agitação por mais 2 minutos. A solução com a amostra foi transferida para um funil de separação onde se esperou a separação. Assim que se obteve as camadas separadas, recolheu-se para um *erlenmeyer*, a camada inferior (clorofórmio + lípido) através de um funil com papel de filtro, o qual continha uma camada de sulfato de sódio anidro para remover restos de água que pudessem existir.

Desta mistura, retirou-se uma alíquota de 10 mL para uma caixa de petri previamente pesada e colocou-se numa estufa até peso constante, para a quantificação do teor de gordura. A restante mistura, guardou-se no *erlenmeyer*, tapado, ao abrigo da luz e num frigorífico até ao procedimento seguinte – a titulação.

2ª Parte - titulação

Para esta análise, seguiu-se a NP 904/1987. Começou-se por utilizar 10 mL da mistura obtida anteriormente de cada amostra e adicionou-se 15 mL de ácido acético concentrado e 0,25 mL de solução fresca de iodeto de potássio saturado. Tapou-se o *erlenmeyer*, agitou-se e colocou-se num local escuro durante 5 minutos. Após este tempo, adicionaram-se 15 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de amido, que funcionou como indicador.

O iodo libertado foi titulado com uma solução de tiosulfato de sódio a 0,01 N padronizada, com agitação constante. Para esta análise foram feitos duplicados.

Relativamente à mistura obtida na extração de gordura a frio, no caso de algumas bolachas não foi suficiente para a análise dos peróxidos definida pelo método, tendo sido por isso, necessário adaptar a equação de cálculo 11 às quantidades efetivamente utilizadas.

O índice de peróxidos é expresso em meq de oxigénio ativo por kg de óleo presente nas bolachas e é dado pela seguinte equação (eq. 11):

$$I. P. = \frac{(S - B) \times N}{P \frac{A}{10}} \times 1000 \quad (11)$$

Onde, S é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação (mL), B é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), N é a normalidade da solução de tiosulfato de sódio, P é a massa de gordura em 10 mL de mistura obtida na extração de gordura a frio e A é o volume de amostra (mistura) utilizado.

3.4.3.3. Análise sensorial

Segundo o projeto de Norma Portuguesa 4263 (1994) pode-se definir Análise Sensorial ou Exame Organolético como o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos”, sendo aí, organolética definida como o que “qualifica uma propriedade de um produto perceptível pelos órgãos dos sentidos”. No desenvolvimento de produtos ou no controlo da qualidade, a compreensão, determinação e avaliação das características sensoriais dos produtos tornam-se importante em muitas situações (Lyon *et al.*, 1992).

No desenvolvimento deste trabalho, a análise sensorial teve um papel bastante importante na avaliação do estudo do tempo de vida das bolachas.

A análise sensorial escolhida para este fim foi a discriminativa de diferença global - prova triangular. Uma prova triangular é utilizada para determinar diferenças sensoriais entre dois produtos. Ao provador são apresentadas três amostras codificadas, sendo-lhe indicado que uma delas é diferente das outras duas. De seguida, é solicitada a identificação da amostra que é diferente (BS ISO 4120:2004, 2004). A atribuição da codificação das amostras foi de forma aleatória, variando de provador para provador, de modo a prevenir influências (acidentais ou deliberadas) entre provadores.

A primeira prova efetuada teve como objetivo verificar se, introduzindo o “sal verde” nas bolachas, os provadores notavam diferenças. Na prova das bolachas BPC comparou-se as bolachas com a substituição total do sal comum pelo equivalente em “sal verde” às com apenas 50%, de modo a perceber se essa diferença era detetada. Na

prova das bolachas BC, comparou-se as da nova formulação (equivalente de 100% em “sal verde”) às da receita original.

No caso da segunda prova que foi efetuada apenas no fim deste estudo, o seu objetivo foi avaliar o tempo de prateleira das bolachas, comparando as bolachas com 0 meses às com 3 e 6 meses de armazenamento. Verificar, portanto, se haveria alterações ao tempo de prateleira destas bolachas com a introdução do “sal verde”.

As provas realizaram-se na sala de análise sensorial da Escola Superior Agrária de Coimbra (Figura 7).



Figura 7: Portas de gabinetes para análise sensorial na cozinha experimental de análise sensorial, na ESAC.

As amostras foram codificadas por um número de 3 algarismos e servidas num prato como consta na Figura 8. Juntamente com as amostras, foi servido um copo com água, guardanapo e uma folha de prova (anexo B).



Figura 8: Apresentação das amostras para a prova sensorial triangular, junto a uma cabina de prova.

Relativamente à análise sensorial efetuada ao tempo de prateleira, como já referido, esta teve como finalidade avaliar todas as receitas de bolachas a todos os tempos, ou seja, as BC com “sal verde” e padrão e as BPC com “sal verde” e padrão e todas ao tempo inicial, médio e final, dando um total de 12 amostras diferentes. Assim, para as provas que comparavam as bolachas com “0 meses *versus* 3 meses” e “0 meses *versus* 6 meses” de armazenamento foram realizadas em dias diferentes, sendo que as condições das provas foram as mesmas, com exceção do painel de provadores que foi diferente.

Em relação à primeira prova sensorial foi efetuada, em separado, aos diferentes tipos de bolachas: “Bolachas de Chocolate” (BC) e “Bolachas com Pepitas de Chocolate” (BPC). Na prova das bolachas BC estiveram presentes 20 provadores não treinados e na prova das bolachas BPC, 14. Em ambas as provas, 67,6% dos provadores era do sexo feminino e tinham idades compreendidas entre os 18 e os 49 anos, sendo a faixa etária predominante até aos 25 anos.

Na segunda prova sensorial, efetuada ao estudo do tempo de prateleira, o painel de provadores que realizou a prova que comparava as bolachas com “0 meses *versus* 3 meses” de armazenamento encontra-se descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição do painel de provadores na prova que comparava as bolachas com “0 meses *versus* 3 meses” de armazenamento.

Parâmetro	Prova “0 meses <i>versus</i> 3 meses”
Número de provadores	14 (alunos da ESAC)
Idades	18-24 anos
Género maioritário	Masculino (61,9%)
Hábitos de consumo de bolachas:	
▪ Mais do que 5 vezes/ semana	14,3%
▪ 3 a 5 vezes/ semana	23,8%
▪ Até 2 vezes/ semana	57,1%
▪ Não consome habitualmente	4,8%

As características do painel de provadores das bolachas que comparavam “0 meses vs 6 meses”, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição do painel de provadores na prova que comparava as bolachas com “0 meses *versus* 6 meses” de armazenamento.

Parâmetro	Prova “0 meses <i>versus</i> 6 meses”
Número de provadores	14 (alunos da ESAC)
Idades	19-24 anos
Género maioritário	Feminino (83,3%)
Hábitos de consumo de bolachas:	
▪ Mais do que 5 vezes/ semana	11,1%
▪ 3 a 5 vezes/ semana	38,9%
▪ Até 2 vezes/ semana	50,0%
▪ Não consome habitualmente	0,0%

O ideal nestas provas de análise sensorial seria fazer-se com mais provadores, mas isso não foi possível pois o número de amostras era limitado.

Parte 2 – Estudos fitoquímicos e biológicos de extratos de *S. ramosissima*

3.5. Produção de extratos de *S. ramosissima*

Para o estudo da *S. ramosissima* foram feitos quatro extratos e os solventes utilizados foram: metanol, etanol, água ultrapura e uma solução de etanol e água (50% v/v). Num copo de vidro foram pesados 10 g de amostra de *S. ramosissima* e 100 mL de solvente (1:10). Os copos foram colocados em placas de agitação, tapados com folha de alumínio, de forma a evitar a passagem de luz, durante 3 horas. Após este tempo, os extratos foram transferidos para *falcons* e centrifugados a 5000 rpm (3913 x g), durante 10 minutos. Após isto, procedeu-se a uma filtração a vácuo, com papel de filtro, primeiro de 0,45 µm e depois de 0,2 µm.

Após este procedimento, colocou-se os extratos em frascos de vidro com tampa, num frigorífico a 4°C, cobertos com folha de alumínio.

3.5.1. Caracterização dos extratos

Para a determinação da concentração dos extratos de salicórnia em metanol (SM), etanol (SE), água ultrapura (SA) e solução de etanol:água (50% v/v) (SEA), foram pipetados 1 mL de cada extrato para *ependorfs*, previamente pesados. De seguida, estes foram colocados numa estufa a 65°C, de forma a evaporar todo o solvente, até peso constante. Esta temperatura foi escolhida com base na temperatura mínima de ebulição dos solventes utilizados. A experiência foi feita em triplicado para cada extrato. Depois de secarem, retirou-se os *ependorfs* da estufa e colocou-se num exsiccador por 15 minutos, permitindo assim que estes arrefecessem. Após isto, voltou-se a pesá-los.

3.5.1.1. Concentração de cloreto de sódio

Para determinar o teor de cloreto de sódio dos extratos foi utilizado o método de Mohr. Nesta titulação, utilizou-se uma solução de nitrato de prata 0,1 N como titulante e o cromato de potássio como indicador, de cor amarela.

Neste procedimento, pipetou-se 5 mL de extrato para um copo de vidro e, de seguida, 1 mL de cromato de potássio. Procedeu-se à titulação e registou-se o valor do volume. Esta análise foi feita em duplicado e a concentração de cloreto de sódio presente nos extratos é expressa em mg/mL.

3.6. Estudo da capacidade antioxidante

3.6.1. Teor em compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol na molécula. O mais simples é a classe de fenol, constituída por ácido carboxílico, incluindo os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, sendo estes os pilares principais dos ácidos fenólicos (Al-Temimi, 2013). Os compostos fenólicos são conhecidos como bons sequestrantes de radicais e, por isso, desempenham um papel importante na saúde humana, uma vez que são capazes de minimizar os efeitos nocivos do stresse oxidativo (Barreira *et al.*, 2017).

Para a determinação do teor total de fenóis presentes nos diferentes extratos de *S. ramosissima*, foi utilizado o método de Singleton e Rossi (1965) com algumas modificações (Cicco *et al.*, 2009; Vieitez *et al.*, 2018).

Na experiência realizada utilizaram-se os reagentes *Folin-Ciocalteu*, carbonato de sódio e ácido gálico como solução fenólica padrão.

Uma solução padrão de 0,1 mg/mL de ácido gálico em metanol:água (70:30 v/v) foi preparada com metanol e água ultrapura. Para a preparação das soluções de ácido fenólico na determinação da curva padrão foram adicionados entre 10 a 100 µL (10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90 e 100) da solução padrão aos tubos de ensaio e diluídos, até perfazer 100 µL, com metanol, etanol, água ultrapura ou uma solução de etanol:água (50% v/v) (consoante o solvente utilizado para fazer os extratos).

Seguidamente, noutros tubos de ensaio foram adicionados 100 µL de todas as soluções de extrato com concentrações de 1000 µg/mL, de 500 µg/mL e 250 µg/mL e

ainda noutros tubos de ensaio foram adicionados 100 μ L de cada solvente correspondente aos utilizados nos extratos.

Em seguida, adicionou-se 100 μ L do reagente de *Folin-Ciocalteu* a cada tubo: os tubos com soluções de extrato com três concentrações diferentes, as soluções padrão e ainda os brancos. De modo a facilitar a mistura, foi utilizado um *vortex* e após este passo, colocaram-se todos os tubos num banho termo-estático a 40°C, durante 4 minutos.

Findo este tempo, foi adicionado 800 μ L de uma solução a 5% (m/v) de carbonato de sódio aos tubos, misturando-se novamente no *vortex*, retornando após isto, ao banho. A reação foi mantida no escuro. Após 20 minutos, os tubos foram rapidamente arrefecidos em água fria e o teor total de fenólicos foi determinado, medindo-se a absorvência a 750 nm ($\lambda = 750$ nm) num leitor de microplacas, usando-se uma microplaca de 48 poços. Estas determinações foram realizadas em duplicado.

3.6.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método colorimétrico do DPPH

Com o objetivo de se determinar a atividade antioxidante dos extratos de *S. ramosissima*, procedeu-se à análise pelo método de eliminação de radicais livres do DPPH \cdot .

O DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre amplamente utilizado para testar a capacidade antioxidante dos mais variados compostos, incluindo os flavonoides (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995), devido à sua simples e rápida realização (Pisoschi e Negulescu, 2012). A capacidade de captação de radicais livres pode ser determinada medindo a diminuição da absorvência do DPPH \cdot a 515 nm ($\lambda = 515$ nm). Este comprimento de onda é utilizado porque corresponde à absorção máxima do DPPH \cdot na sua forma radical (Al-Temimi, 2013). A reação pode ocorrer pela transferência de um eletrão ou de um átomo de hidrogénio de um composto antioxidante para o radical, formando uma molécula estável – o DPPH-H. Como resultado desta redução do DPPH \cdot a DPPH-H, a cor observada passa de púrpura a amarela (Pisoschi e Negulescu, 2012).

Nesta metodologia (Dias, Machado e Marques, 2011), utilizou-se DPPH[·] e metanol como solvente. Preparou-se uma solução de DPPH[·] de 250 µM em metanol no dia da experiência. De forma a assegurar a completa dissolução do DPPH[·] em metanol, agitou-se a solução com um agitador magnético durante 15 minutos, mantendo-se protegido da luz com folha de alumínio. Depois disto, a solução de DPPH[·] foi armazenada num copo volumétrico, envolvido com folha de alumínio e mantida no frio. Para esta experiência foram utilizadas quatro concentrações para os extratos SM, SE e SEA: 500, 250, 100 e 25 µg/mL. No caso do extrato SA, foram utilizadas as seguintes: 5000, 2500 e 500 µg/mL.

Para a preparação dos controlos negativos, foram pipetados 100 µL do solvente utilizado para fazer os extratos (metanol, etanol, água ultrapura e solução de etanol:água (50% v/v)) para os tubos de ensaio. Nesta preparação, adicionou-se 100 µL de cada um dos extratos, nas quatro concentrações mencionadas. Consecutivamente, adicionou-se 100 µL da solução de DPPH[·] a cada tubo e a mistura homogénea foi assegurada pela utilização de um *vortex* e mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Após 30 minutos de reação, mediou-se a absorvência ($\lambda = 515 \text{ nm}$) num leitor de microplacas utilizando-se uma microplaca de 96 poços. Para cada extrato foi também preparado um branco com 100 µL do extrato e 100 µL do solvente utilizado para preparar a solução de DPPH[·], o metanol. Estas determinações foram realizadas em triplicado.

A percentagem de Atividade Antioxidante (% AA) de cada concentração de extrato foi calculada usando a seguinte equação (eq. 12):

$$\% \text{ AA} = \frac{A_{\text{controlo negativo}} - (A_{\text{extrato}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controlo negativo}}} \times 100 \quad (12)$$

Em que, $A_{\text{controlo negativo}}$ é a absorvência da solução de DPPH diluída com o solvente usado para preparar as soluções de extrato, A_{branco} é a absorvência da solução

de extrato diluída com o solvente usado para preparar a solução de DPPH e $A_{amostra}$ é a absorvência da solução de extrato com a solução de DPPH.

A atividade antioxidante de cada extrato foi definida como a concentração de extrato necessária para diminuir a concentração inicial de radicais livres de DPPH \cdot em 50% (a metade da concentração inibitória mínima ou IC₅₀). Este valor de concentração foi obtido por interpolação e usando análise de regressão linear.

3.7. Estudo ao efeito citotóxico na linha celular HT-29

Para a verificação de um possível efeito citotóxico da salicórnia, foi utilizado o extrato em água e a linha celular do adenocarcinoma colorretal humano HT-29 (Figura 9).

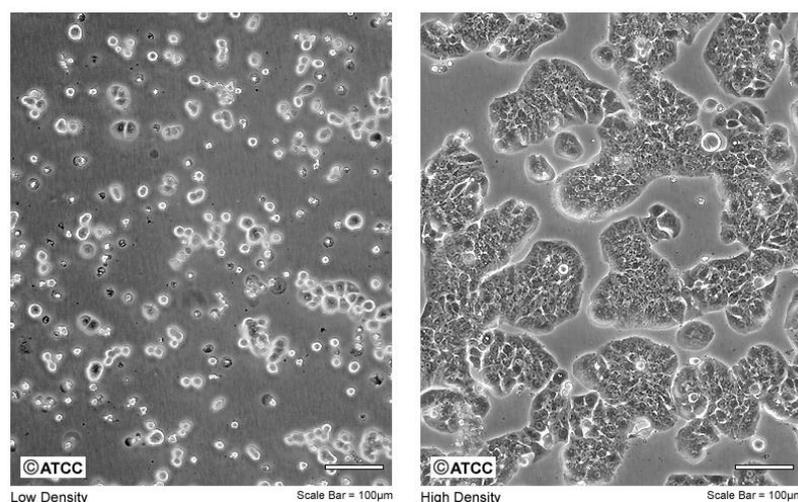


Figura 9: Linha celular humana HT-29, testada neste trabalho experimental. Imagem obtida num microscópio ótico composto com uma ampliação de 10x. Retirado de ATCC® HTB-38™ (2018).

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e para a avaliação da proliferação celular, utilizou-se o método colorimétrico da sulforrodamina B (SRB).

O extrato utilizado foi então o SA (*S. ramosissima* em água ultrapura), de modo a garantir que o solvente utilizado na extração não oferecesse toxicidade às células. Uma vez que a salicórnia é uma planta salgada, ao mesmo tempo que se fez esta análise ao

extrato de salicórnia, foi feito um controlo ao correspondente em sal (NaCl) presente neste extrato, de modo a perceber até que ponto o efeito observado era da própria planta ou do NaCl.

Para verificar a possível relação entre o efeito sobre as células cancerígenas e a dose aplicada de extrato, foram testadas diferentes concentrações de extrato e de uma solução de NaCl equivalente.

A concentração de extrato/NaCl utilizada para esta análise teve em conta o volume de composto em estudo que é habitualmente adicionado aos poços, 10% (v/v) do volume total do poço.

O extrato SA tinha uma concentração inicial de 66,7 mg/mL (ponto 4.4), pelo qual foi necessário efetuar uma diluição, em PBS, para 50,0 mg/mL. Relativamente ao sal, foi preparada uma solução de NaCl com 50,7 mg/mL (quantidade de sal presente no extrato SA, como referido no ponto 4.4) e posteriormente também diluído, em PBS, para 38,0 mg/mL (que é o correspondente em NaCl para a primeira diluição desejada para o extrato de salicórnia – 50,0 mg/mL). Ambas as diluições foram filtradas em condições estéreis com um filtro de seringa de 0,20 µm.

Assim, as concentrações testadas do extrato SA foram: 5,00; 2,50; 1,25; 0,63 e 0,31 mg/mL e de NaCl foram: 3,80; 1,90; 0,95; 0,48 e 0,24 mg/mL. As concentrações do extrato SA usadas, foram escolhidas com base em concentrações já testadas nesta linha celular (Kim e Lee, 2009). Foram ainda testadas, numa fase inicial, concentrações mais baixas, tanto de extrato como de NaCl (10% das concentrações anteriores) mas apenas utilizando o método de MTT, dado ser um método de quantificação mais rápido que o SRB permitindo um *screening* inicial de concentrações.

3.7.1. Subcultura das células e preparação do meio de cultura

As células foram subcultivadas, em frascos de 75 cm², de acordo com as suas características de crescimento, de forma a assegurar que as culturas se encontravam na

fase exponencial de crescimento durante a experiência. Uma vez que esta linha celular é aderente e, por isso, com crescimento em monocamada, foi necessário utilizar meio de dissociação Tripsina 0,05% - EDTA, para proceder à passagem das linhas celulares. As culturas celulares foram mantidas numa incubadora a 37°C, com atmosfera entre 72% e 90% de humidade relativa e 5% de CO₂ e o meio de cultura utilizado foi o *McCoy's 5A*.

Para a preparação do meio de cultura *McCoy's 5A*, este foi suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de bovino (FBS) e 2,20 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), por litro, a pH 7,4. Após isto, o meio foi filtrado com uma unidade de filtração (filtro de 0,20 µm), sob condições estéreis, numa câmara de fluxo laminar e armazenado em refrigeração a 4°C. O FBS foi adicionado apenas após a filtração do meio.

3.7.2. Ensaios para avaliação da viabilidade celular e proliferação celular

De modo a determinar o efeito do extrato SA em células cancerígenas foram utilizados dois métodos colorimétricos: para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e para a avaliação da proliferação celular, utilizou-se o método colorimétrico da sulforrodamina B (SRB). Foram testadas concentrações crescentes de extrato e NaCl até à concentração máxima determinada por MTT e SRB a três tempos de incubação: 24, 48 e 72 horas.

A Figura 10 indica os passos principais dos ensaios de MTT e SRB.

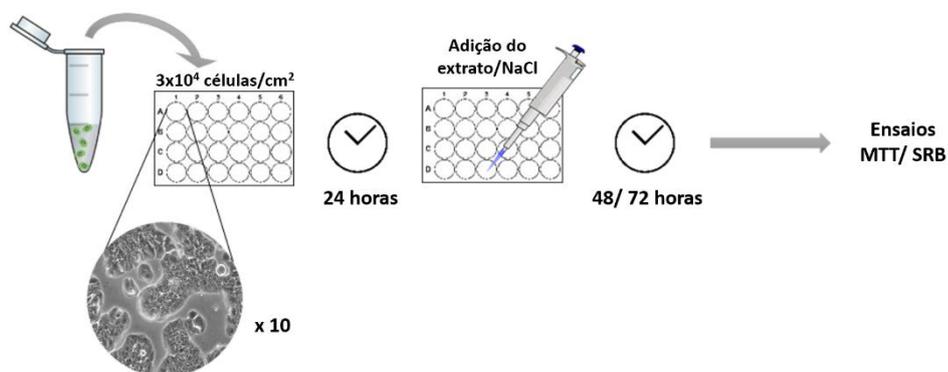


Figura 10: Esquema representativo do ensaio de MTT e SRB.

Para ambos os ensaios de avaliação de citotoxicidade, a linha celular HT-29 foi plaqueada com uma densidade de $3,0 \times 10^4$ células/cm², em placas de 24 poços (com uma área de 1,90 cm²), por adição de 0,75 mL de uma suspensão celular com $7,6 \times 10^4$ células/mL. Após 24 horas da preparação das culturas, foi adicionado a cada poço 10% (v/v) de composto a testar, e as culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. As células foram expostas aos compostos durante 24, 48 e 72 horas após a sua adição, *i.e.*, 48, 72 e 96 horas após a preparação das culturas. Findo este tempo, a viabilidade e a densidade celulares foram determinadas pelo teste do MTT (ponto 3.7.2.1) e pelo método colorimétrico da SRB (ponto 3.7.2.2), respetivamente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos comparados com culturas controlo (*i.e.*, não expostas ao extrato nem a NaCl), sujeitas às mesmas condições e tratamentos.

3.7.2.1. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

O ensaio colorimétrico MTT baseia-se na redução de um sal tetrazólico, o MTT, em cristais de *formazan* insolúveis em soluções aquosas, por ação de células viáveis. Este processo é realizado pelas mitocôndrias presentes nestas células, o que significa que apenas as células viáveis com metabolismo ativo são capazes de converter o MTT no composto *formazan*, como mostra a Figura 11. Quando as células já não estão viáveis perdem a capacidade de converter o MTT em *formazan*, sendo assim possível medir o efeito citotóxico, *in vitro*, do extrato de salicórnia em células cancerígenas.

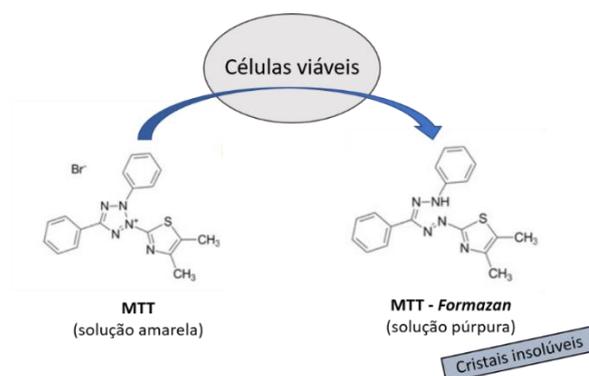


Figura 11: Reação de redução do MTT a *formazan*, pela ação de células viáveis (adaptado de Riss *et al.*, (2004)).

Quando os cristais de *formazan* são dissolvidos em DMSO, obtém-se uma solução de cor púrpura que absorve significativamente a um comprimento de onda de 570 nm ($\lambda = 570$ nm). Isto permite a quantificação dos cristais formados, uma vez que a este comprimento de onda, o MTT que não foi metabolizado (solução de cor amarela) não apresenta absorvência significativa.

A redução do MTT é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para avaliação de viabilidade celular. Esta técnica é particularmente útil em ensaios de citotoxicidade devido à sua especificidade para células viáveis, uma vez que células não viáveis não têm, então, capacidade para reduzir o MTT.

No entanto, apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto de poder haver contaminações, *e.g.* microrganismos, e estes também terem a capacidade de reduzir o MTT. Outra desvantagem desta técnica é o facto da conversão do MTT para cristais de *formazan* depender do estado metabólico das células e do número de mitocôndrias, resultando por vezes em resultados extensamente subestimados (Tonder, Van, Joubert e Cromarty, 2015; Vichai e Kirtikara, 2006).

Para a determinação da viabilidade celular pelo método do MTT na linha celular HT-29, terminado o período de exposição aos compostos (24, 48 e 72 horas) removeu-se o meio das respetivas culturas e adicionou-se, a cada um dos poços, uma solução de MTT 0,50 mg/mL em PBS. Após isto, as placas em análise foram envolvidas em papel de alumínio e incubadas a 37°C durante 3 horas. Decorrido este tempo, aspirou-se a

solução e adicionou-se DMSO a cada poço para dissolver os cristais de *formazan* formados. Os valores de absorvência ($\lambda = 570 \text{ nm}$), foram medidos num espectrofotómetro com leitor de placas multi-poços e os valores de viabilidade celular foram determinados de acordo com a seguinte equação (eq. 13).

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}} - A_{\text{branco}}} \times 100 \quad (13)$$

Onde, A_{amostra} é a absorvência das soluções expostas ao composto testado, à qual foi subtraída a absorvência do branco (DMSO) e A_{controlo} é a absorvência dos controlos, à qual foi subtraída a absorvência do branco.

Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controlo, considerado como sendo sempre 100% e foram apresentados num gráfico com a viabilidade celular em função das concentrações de extrato/NaCl aplicadas nos vários tempos de incubação. Os valores de concentração de extrato para 50% de inibição de células cancerígenas (IC_{50}) foram verificados com recurso ao programa *GraphPad Prism 6.01* para o *Windows* (*GraphPad Software*, EUA).

3.7.2.2. Determinação da proliferação celular pelo método colorimétrico da SRB

O ensaio colorimétrico de proteínas com SRB, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Cancro, dos Estados Unidos da América (National Cancer Institute, USA) foi utilizado neste estudo para determinação da densidade celular e baseia-se na medição do teor de proteína celular (Voigt, [s.d.]).

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) é um dos processos mais utilizados para o rastreio *in vitro* de citotoxicidade. Este método quantifica o número de células através

de marcação do seu conteúdo proteico, tendo a vantagem de permitir estudar células isoladas sem a necessidade de testes em animais (Voigt, [s.d.]).

A SRB tem a capacidade para se ligar a componentes proteicos de células, que foram fixadas em placas de cultura, com 1% ácido acético em metanol (Voigt, [s.d.]).

A SRB é um corante de aminoxantina (Figura 12) com uma cor rosa brilhante e tem dois grupos sulfónicos capazes de se ligarem a resíduos básicos de aminoácidos quando sob condições levemente ácidas. A ligação química formada pode ser quebrada sob condições básicas e, como a ligação de SRB aos aminoácidos é estequiométrica, a quantidade de corante extraída das células coradas é diretamente proporcional à massa celular (*i.e.*, linear com a densidade celular) (Vichai e Kirtikara, 2006; Voigt, [s.d.]).

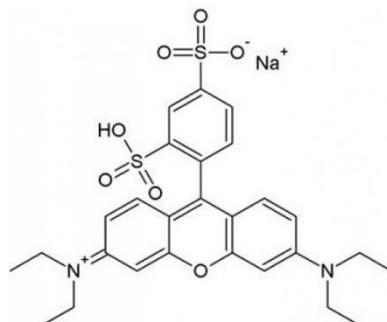


Figura 12: Estrutura química da aminoxantina (G-BIOSCIENCES®, [s.d.]).

Trata-se de um método linear numa gama alargada de densidades celulares, muito sensível e capaz de detetar densidades celulares muito pequenas e, além disso, este método permite testar um grande número de amostras em poucos dias. Outra grande vantagem da utilização deste método é que o mesmo requer equipamento simples e reagentes pouco dispendiosos, sendo, por isso, um teste economicamente viável (Vichai e Kirtikara, 2006).

Para a determinação da proliferação celular pelo método colorimétrico da SRB na linha celular HT-29, para os mesmos períodos de exposição aos compostos (24, 48 e 72 horas) após lavagem com PBS e água ultrapura, fixaram-se as células com 1% de ácido acético em metanol e estas foram deixadas *overnight*, a -4°C .

Após este tempo, a solução de 1% ácido acético em metanol foi removida e as placas foram deixadas a secar à temperatura ambiente. Adicionou-se 500 µL de SRB 0,5 % (m/v) e incubou-se a 37°C por uma hora, de modo a permitir que a SRB se ligasse aos aminoácidos básicos presentes na membrana celular. As placas foram cuidadosamente lavadas com 1% ácido acético até a coloração desaparecer (de modo a remover a SRB não ligada a proteínas) e foram deixadas a secar à temperatura ambiente. Depois deste passo, dissolveu-se a SRB ligada às proteínas em 500 µL de tampão 10 mM Tris (pH 10) e procedeu-se à leitura da placa num espectrofotómetro a uma absorvência de 540 nm ($\lambda = 540 \text{ nm}$) (Papazisis *et al.*, 1997).

A % de proliferação ou crescimento celular, traduzida pela % de retenção de SRB foi calculada pela seguinte equação (eq. 14):

$$\% \text{ de crescimento celular} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{dia 0}}}{A_{\text{controlo negativo}} - A_{\text{dia 0}}} \times 100 \quad (14)$$

Em que, A_{amostra} é a absorvência das soluções expostas ao composto testado, à qual foi subtraída a absorvência do branco (Tris 10 mM), $A_{\text{dia 0}}$ é a absorvência do controlo ($t = 0$ horas, corresponde à densidade celular na ausência dos compostos), à qual foi subtraída a absorvência do branco e $A_{\text{controlo negativo}}$ é a absorvência dos controlos, à qual foi subtraída a absorvência do branco.

A % de inibição do crescimento celular foi calculada pela equação 15:

$$\% \text{ de inibição do crescimento celular} = 100 - \% \text{ de crescimento celular} \quad (15)$$

Os resultados foram expressos em percentagem de retenção da SRB em relação às culturas de células de controlo e foram apresentadas num gráfico com a retenção da SRB em função das concentrações de extrato/NaCl aplicadas nos vários tempos de incubação. Os valores de concentração de extrato, para 50% de inibição do crescimento celular (IC_{50}), foram verificados com recurso ao programa *GraphPad Prism 6.01* para o *Windows* (*GraphPad Software*, EUA).

3.8. Análise estatística

As análises efetuadas para o estudo relativo às bolachas foram executadas em duplicado, devido à escassa quantidade de amostra.

As análises à capacidade antioxidante da planta foram realizadas em duplicado, no caso do teor total de fenóis e em triplicado, na análise com o radical DPPH. Os resultados dos compostos fenólicos são apresentados como média e desvio padrão.

Relativamente às análises ao efeito citotóxico, todos os resultados dos ensaios realizados foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism 6.01* para o *Windows*. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o *One-Way ANOVA*, seguido pelo teste de comparações múltiplas da *Tukey's*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com: * $p < 0,05$ ou # $p < 0,0001$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 1 - Estudo da formulação de bolachas com a substituição do sal comum por “sal verde”

4.1. Formulação de novas receitas de bolachas com “sal verde”

Após diversas fases de teste com diferentes formulações de bolachas, definiu-se como objeto de estudo as bolachas com pepitas de chocolate (BPC), com um equivalente de 25% em “sal verde” em relação à receita padrão (Figura 13) e as bolachas de chocolate (BC) com o equivalente de 100% em “sal verde” - Figura 14.



Figura 13: Formulação final: bolachas BPC com o equivalente de 25% de “sal verde” (a); BPC padrão (b).

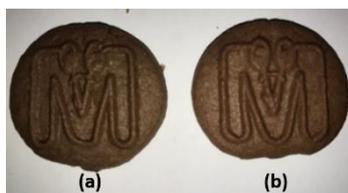


Figura 14: Formulação final: bolachas BC com a substituição total do sal comum por “sal verde” (a); BC padrão (b).

4.2. Composição nutricional das bolachas

Os resultados da composição nutricional das bolachas são apresentados na Tabela 3 e são expressos em g/100 g amostra, relativamente à matéria seca ou matéria bruta (húmida). Comparando os resultados da tabela seguinte com os limites estabelecidos pela *DanCake* para estes dois tipos de bolachas em relação à sua composição nutricional, pode-se afirmar que estas se encontram abaixo do máximo

permitido, com exceção da bolacha BC “sal verde”, na humidade (5,18% e cinza (2,71% ms e 2,57% mb), sendo que os máximos permitidos, nestes dois parâmetros, são 5% e 2,3%, respetivamente. Contudo, este valor superior não é significativo e pode ser justificado pela presença da salicórnia.

Tabela 3: Composição nutricional das bolachas em g/100 g matéria bruta ou seca.

	Amostras							
	BPC padrão		BPC “sal verde”		BC padrão		BC “sal verde”	
	Matéria Seca	Matéria Bruta	Matéria Seca	Matéria Bruta	Matéria Seca	Matéria Bruta	Matéria Seca	Matéria Bruta
Humidade	-	4,05	-	4,41	-	2,31	-	5,18
Cinza	1,65	1,59	1,33	1,27	2,21	2,16	2,71	2,57
Gordura	24,51	23,52	22,73	21,73	16,52	16,14	15,31	14,52
Fibra	2,86	2,74	2,99	2,86	3,34	3,26	6,16	5,85
Proteína	9,39	9,01	9,64	9,22	12,95	12,65	12,35	11,71
E.N.A.	61,60	59,11	63,31	60,51	64,98	63,48	63,46	60,17

E.N.A. – Extrativos não azotados, corresponde aproximadamente ao teor de hidratos de carbono.

Pela análise da Tabela 3, pode-se constatar que os valores da humidade, são ligeiramente superiores nas bolachas com “sal verde” do que nas bolachas da receita padrão. A adição de salicórnia liofilizada nas bolachas favoreceu a absorção de água pelo material sólido da planta e, por conseguinte, o processo de evaporação durante a cozedura tornou-se mais lento. Como o tempo de cozedura foi o mesmo nos dois tipos de bolacha, o teor em água nas bolachas com “sal verde” é superior ao das bolachas padrão.

Tendo em conta que a alteração do sal comum por “sal verde” adicionado às bolachas, afetaria sobretudo a quantidade de sal nas bolachas, procedeu-se à análise de quantificação de cloreto de sódio. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Quantidade de cloreto de sódio presente nas bolachas testadas. Os valores são expressos em g/100 g matéria bruta.

Amostra	Cloreto de sódio (g/100 g mb)
BPC padrão	0,64 ± 0,02
BPC “sal verde”	0,41 ± 0,00
BC padrão	0,66 ± 0,02
BC “sal verde”	1,07 ± 0,01

Na formulação original das bolachas BPC e BC padrão, a percentagem adicionada de sal foi de 0,52% (g/ 100g mb) e 0,49% (g/ 100g mb), respetivamente.

Pela Tabela 4, verifica-se que o valor obtido nesta análise para estas duas bolachas foi superior (0,64% na BPC padrão e 0,66% na BC padrão). Apesar de não se conhecer os outros ingredientes das receitas adicionados nem a sua quantidade, constata-se que estes são uma fonte residual de cloreto de sódio.

Relativamente às BC “sal verde”, uma vez que estas têm o equivalente de 100% de sal em “sal verde”, a quantidade de cloreto de sódio deveria ser próxima de 0,66%. Uma vez que este valor é superior, pode-se concluir que a salicórnia usada neste estudo, é mais salgada do que o valor que se usou como referência (ponto 3.4).

O mesmo acontece com as BPC “sal verde”, que têm apenas 25% de “sal verde” do equivalente em sal, mas que, pelo valor obtido (0,41%), não se verificou essa diminuição proporcional.

Contudo, todas as bolachas apresentaram valores abaixo do limite máximo estipulado pela *DanCake*, relativamente ao teor em cloreto de sódio, para estas bolachas.

4.3. Tempo de prateleira

Para o estudo do tempo de prateleira das bolachas (aos 0, 3 e 6 meses) foram efetuadas as seguintes análises: teor de humidade a 105°C, índice de peróxidos e análise sensorial.

4.3.1. Teor de humidade

A análise do conteúdo em água foi efetuada para as quatro formulações de bolachas e os resultados apresentam-se na Figura 15.

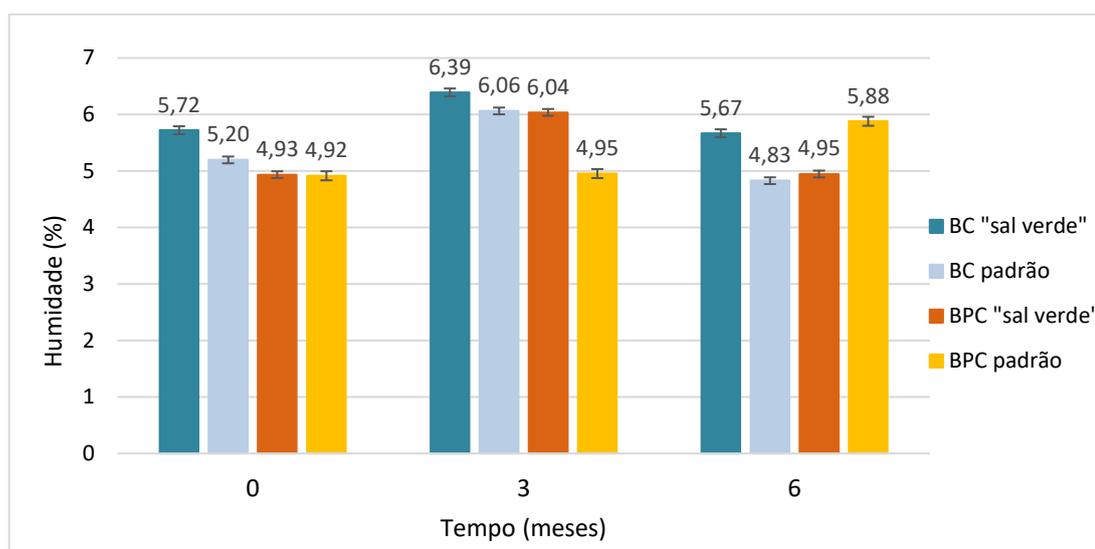


Figura 15: Evolução ao longo do tempo de prateleira do teor de humidade a 105°C das bolachas.

De uma forma geral, os valores são ligeiramente superiores ou muito próximos dos estipulados pela *DanCake* para este parâmetro de 5%.

4.3.2. Índice de peróxidos

Outra análise efetuada para o estudo do tempo de prateleira das bolachas foi o índice de peróxidos. Como já referido, esta análise permite determinar o grau de oxidação da gordura das bolachas ao longo do tempo. Na Figura 16 apresenta-se a evolução ao longo do tempo de prateleira do índice de peróxidos de cada uma das amostras de bolachas.

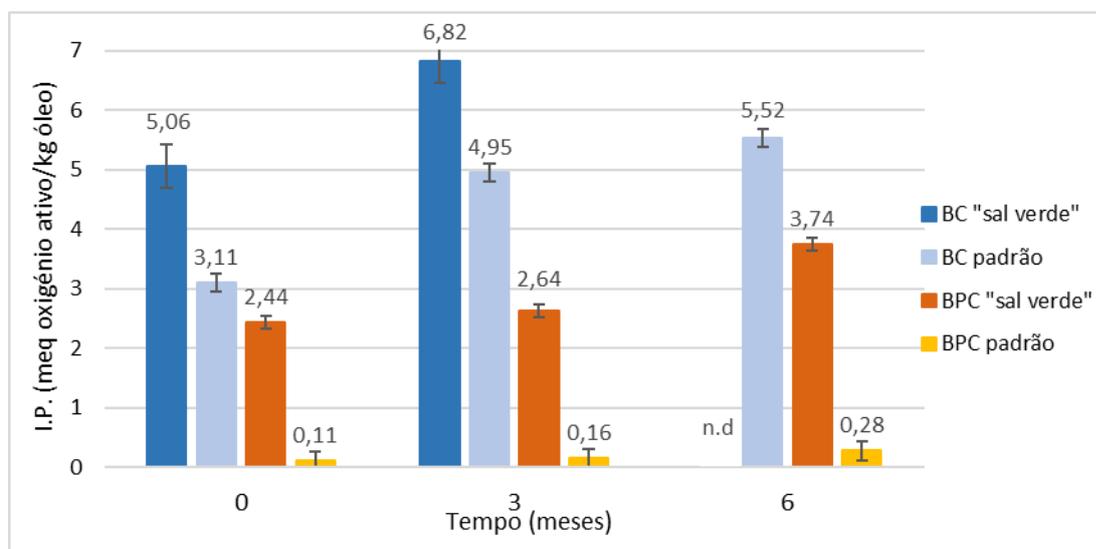


Figura 16: Evolução ao longo do tempo de prateleira do índice de peróxidos (I.P.) das bolachas. n.d.- não determinado (devido à falta de amostra).

Uma vez que não existe legislação específica para valores de peróxidos em bolachas, os valores considerados limites são os estabelecidos pelo DL n.º 106/2005 de 29 de junho para óleos e gorduras. Os valores são expressos em meq oxigénio ativo/kg de óleo e para gorduras e óleos virgens, poderá ser, no máximo, de 15 e para gorduras e óleos refinados sem antioxidantes poderá ser, no máximo, 10. Estes valores são indicativos de que o produto mantém as propriedades organoléticas aceitáveis.

Da análise da Figura 16 pode-se concluir que, para todas as amostras, o índice de peróxidos apresenta sempre valores muito baixos, estando assim dentro dos limites legislados. Comparando as amostras por tempo de prateleira, de uma forma geral, os valores aumentam ao longo do tempo. Este comportamento pode dever-se aos lípidos presentes nas gorduras, ao se deteriorarem por reações químicas com o oxigénio (trocas entre a embalagem e o meio ambiente), formando assim os produtos de oxidação primária.

Como referido no ponto 3.4.1.1, o produto acabado foi embalado em embalagens opacas de polipropileno que, apesar de ser uma escolha adequada para a conservação deste tipo de produtos, nomeadamente na proteção contra a luz solar, esta não é totalmente eficaz como barreira ao oxigénio e ao vapor de água presente no meio

ambiente, sendo por isso um fator que pode contribuir para a formação de peróxidos com o passar do tempo.

Independentemente do tipo de bolacha, o valor de índice de peróxidos observado foi inferior ao estipulado pela legislação portuguesa (10 ou 15 meq oxigénio ativo/kg de óleo).

4.3.3. Análise sensorial

Existem dois modos possíveis de recolha de dados das provas sensoriais. No primeiro modo o provador é obrigado a escolher uma das amostras, mesmo que não consiga identificar diferenças entre as amostras - escolha forçada. No segundo modo é dada a opção ao provador de declarar que não encontrou diferença entre as amostras. O modo de tratamento de dados depende do método escolhido para a recolha de dados (NBR 12995/1993, 1993). Nestas provas foi utilizado o método de escolha forçada.

Como já referido, a primeira prova efetuada teve como objetivo verificar se os provadores notavam diferenças entre as bolachas com a introdução do “sal verde”. Na prova das bolachas BPC comparou-se as bolachas com a substituição total do sal comum pelo equivalente em “sal verde” (BPC “100% sal verde”) às com apenas 50% (BPC “50% sal verde”), e na prova das bolachas BC, comparou-se as da nova formulação (equivalente de 100% em “sal verde”) às da receita padrão.

A segunda prova, foi efetuada apenas no fim deste estudo e o seu objetivo foi avaliar o tempo de prateleira das bolachas, comparando as bolachas com 0, 3 e 6 meses de armazenamento. Neste caso, pretendeu-se avaliar se a introdução do “sal verde” promoveu alterações organoléticas no tempo de prateleira das bolachas.

Os resultados da primeira prova sensorial constam na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da primeira prova triangular às bolachas BPC e BC.

Produto	Número de provadores	Número de respostas certas	Conclusão
BPC “100% sal verde” vs BPC “50% sal verde”	14	1	Não detetou*
BC padrão vs BC “sal verde”	20	11	Detetou**

*Para um nível de significância de 5%, com n = 14, o número mínimo de respostas certas é 9.

**Para um nível de significância de 5%, com n = 20, o número mínimo de respostas certas é 11.

No caso das bolachas BPC, com um painel com 14 provadores e tendo por base a tabela de valores críticos, o número mínimo de respostas certas no teste triangular para se concluir que existem diferenças entre as amostras, para um nível de significância de 5% é de 9. Uma vez que se obteve apenas 1 resposta certa, pode-se concluir que este painel de provadores não foi capaz de identificar corretamente a amostra diferente.

Relativamente às bolachas BC, com um painel com 20 provadores, o número mínimo de respostas certas no teste triangular para se concluir que as amostras eram diferentes, é de 11, para um nível de significância de 5%. Uma vez que o número de respostas certas foi 11, concluiu-se que este painel de provadores foi capaz de identificar corretamente a amostra diferente.

Com base nos resultados da análise sensorial, as receitas para o estudo do tempo de prateleira foram reformuladas.

Em relação à prova sensorial feita para o estudo do tempo de prateleira, onde se comparou as bolachas com tempo 0 às com 3 e 6 meses de prateleira, com um painel de 14 provadores, obteve-se os seguintes resultados (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados da prova triangular do estudo do tempo de prateleira, com 14 provadores. As amostras testadas foram as bolachas BPC e BC, padrão e com “sal verde”, onde se compararam as amostras com 0 meses às com 3 e 6 meses de armazenamento.

Produto	Número de respostas certas	Conclusão*
“0 meses vs 3 meses”		
BPC padrão	8	Não detetou
BPC “sal verde”	8	Não detetou
BC padrão	3	Não detetou
BC “sal verde”	7	Não detetou
“0 meses vs 6 meses”		
BPC padrão	5	Não detetou
BPC “sal verde”	4	Não detetou
BC padrão	5	Não detetou
BC “sal verde”	5	Não detetou

*Para um nível de significância de 5%, com $n = 14$, o número mínimo de respostas certas é 9.

Verificando a tabela de valores críticos, para um painel com 14 provadores, para um nível de significância de 5%, o número mínimo de respostas corretas no teste triangular é 9. Como se pode verificar, todos os resultados foram inferiores a 9, constatando-se assim, que este painel de provadores não foi capaz de detetar diferenças entre as amostras aos 0, 3 e 6 meses de tempo de prateleira.

Os resultados preliminares indicam que até aos 6 meses de armazenamento não foram detetadas diferenças, pelo que se pode concluir que o produto, do ponto de vista sensorial, tem um tempo de vida de pelo menos 6 meses.

Parte 2 - Estudos fitoquímicos e biológicos de extratos de *S. ramosissima*

4.4. Caracterização dos extratos

Para determinar a concentração dos extratos de *S. ramosissima* liofilizada usou-se o procedimento descrito em 3.5.1. Os resultados são apresentados na Tabela 7 em mg/mL.

Tabela 7: Concentração média de cada extrato.

Extratos	Concentração (mg/mL)
Metanol (SM)	25,2 ± 0,47
Etanol (SE)	9,10 ± 0,29
Água ultrapura (SA)	66,7 ± 3,87
Etanol:Água ultrapura (50% v/v) (SEA)	72,2 ± 6,28

Observando a Tabela 7, verifica-se que o solvente utilizado pode influenciar a extração de compostos da salicornia.

Após estes resultados, procedeu-se à determinação de cloreto de sódio (NaCl) presente em cada extrato. Uma vez que o método de Mohr é quase sempre restrito à determinação de cloretos em soluções aquosas (Willian Toito Suarez, Elen Romao Sartori, 2013), apenas foi determinada a concentração de cloreto de sódio dos extratos em soluções aquosas. Assim, o extrato em água (SA) apresentou uma concentração de NaCl de 50,7 mg/mL e, embora o extrato em etanol e água (SEA), tenha uma percentagem de etanol, apresentou uma concentração de NaCl muito próxima, de 52,4 mg/mL. A titulação de NaCl nos outros dois extratos (SM e SE) não foi então possível determinar devido à fraca solubilidade do NaCl em solventes orgânicos, como o metanol e o etanol (Li *et al.*, 2010).

4.5. Estudo à capacidade antioxidante

4.5.1. Teor em compostos fenólicos

Na determinação do teor de fenólicos totais dos extratos de *S. ramosissima* liofilizada utilizando o método de Singleton e Rossi (1965) com algumas modificações, foram elaboradas as curvas de calibração para os vários solventes usados no processo de extração (metanol, etanol, água ultrapura e solução etanol:água (50% v/v)) (anexo C).

A partir das curvas de calibração determinou-se a concentração de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro de extrato (mg EAG/mL extrato) de cada um dos extratos (SM, SE, SA e SEA). Os resultados apresentados são a média do teor de compostos fenólicos obtidos para as concentrações de 1000 e 500 µg/mL.

O teor em compostos fenólicos nos extratos foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g extrato seco) e os resultados são mostrados na Figura 17 (Dias *et al.*, 2018; Barroca *et al.*, 2018).

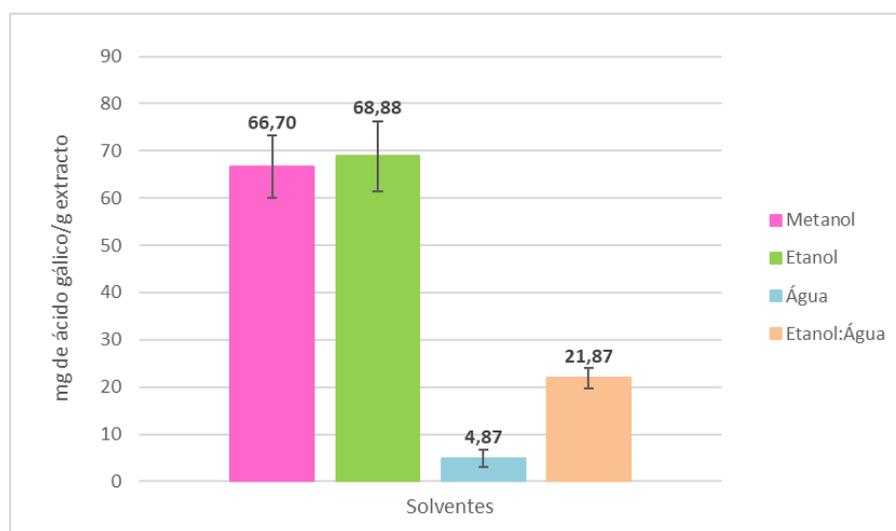


Figura 17: Teor em compostos fenólicos nos diversos extratos de *S. ramosissima*.

Independentemente do tipo de solvente, a *S. ramosissima* tem compostos fenólicos na sua constituição. O extrato em etanol (SE) foi o que apresentou um valor

mais elevado (68,88 mg EAG/g extrato seco), seguindo-se do extrato em metanol (66,70 mg EAG/g extrato seco), com uma diferença pouco significativa. Os extratos em água (4,87 mg EAG/g extrato seco) e em etanol:água (21,87 mg EAG/g extrato seco) apresentaram valores mais baixos que os anteriores. Estes resultados podem dever-se à solubilidade dos compostos presentes na salicórnia nos solventes utilizados. Assim, pode-se concluir que o solvente utilizado tem efeito sobre a extração dos compostos fenólicos presentes nos extratos. Para este tipo de plantas, a água como solvente não é eficiente na solubilização dos compostos fenólicos, sendo o etanol e o metanol os mais eficazes.

Os resultados obtidos para o teor total de fenóis foram superiores aos referidos por Barreira *et al.* (2017), para o extrato etanólico de *S. ramosissima* (33 mg EAG/g extrato seco). Estas diferenças podem estar relacionadas com o tempo e as condições de extração utilizadas em cada ensaio, bem como o local de onde foi recolhida esta salicórnia.

4.5.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método colorimétrico do DPPH

Para determinar o potencial da atividade antioxidante dos extratos de *S. ramosissima*, foi utilizado o método de eliminação de radicais livres do DPPH. Para cada extrato, foi calculada a atividade antioxidante com valores de IC₅₀. A Figura 18 apresenta apenas os valores do IC₅₀ para os extratos SM, SE e SEA (Dias *et al.*, 2018; Barroca *et al.*, 2018).

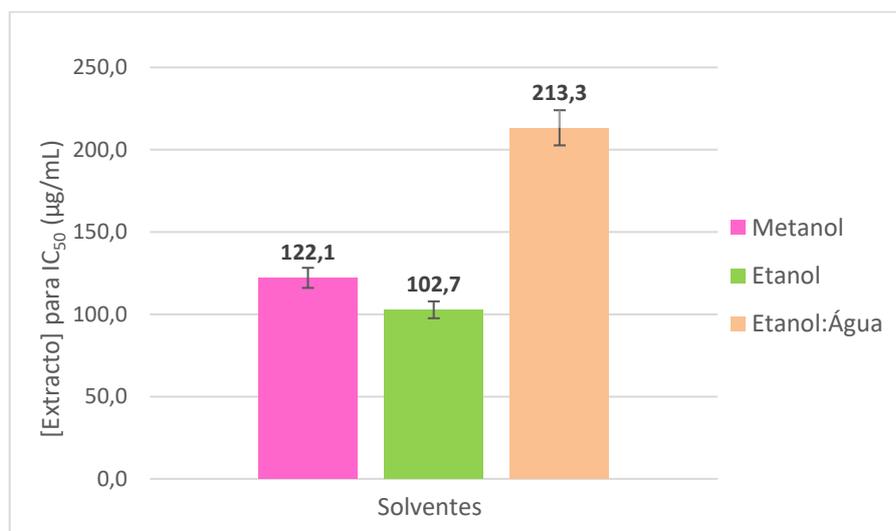


Figura 18: Concentração do extrato SM, SE e SEA para o IC₅₀ (µg/mL).

Os resultados sugerem que a *S. ramosissima* apresenta capacidade em sequestrar radicais DPPH, *i.e.*, capacidade antioxidante. Os extratos SE e SM, indicam uma elevada capacidade antioxidante.

Relativamente ao extrato em água, foi necessário testar concentrações mais elevadas, obtendo-se o IC₅₀ de 4247,1 µg/mL. Este elevado valor de IC₅₀, corrobora os resultados anteriores dos compostos fenólicos.

Mais uma vez, verifica-se que os resultados variam dependendo dos compostos contidos no extrato que, por sua vez, varia de acordo com o solvente e as condições de extração utilizadas (Barreira *et al.*, 2017).

Como os compostos fenólicos têm sido descritos como poderosos antioxidantes, a alta capacidade em sequestrar radicais DPPH, poderá estar ligada ao alto teor de fenólicos encontrados em *S. ramosissima* (Barreira *et al.*, 2017).

Também no estudo de Barreira *et al.* (2017), o potencial antioxidante do extrato etanólico de *S. ramosissima* foi avaliado com base na atividade sequestradora do radical DPPH. Os resultados mostraram que esta planta elimina moderadamente o radical DPPH com um valor de IC₅₀ de 5690 µg/mL. Estas diferenças de resultados (para o extrato etanólico do presente estudo) podem ser justificadas pelas condições de extração utilizadas e pelo procedimento usado por Barreira *et al.* (2017), onde os

resultados são expressos em função do BHT (antioxidante sintético hidroxitolueno butilado).

4.6. Estudo ao efeito citotóxico na linha celular HT-29

O efeito citotóxico do extrato aquoso da salicórnia e da solução aquosa de NaCl, na viabilidade e proliferação celular foi avaliado na linha celular HT-29. O extrato foi utilizado, após a diluição em PBS, a 50,0 mg/mL e a solução de NaCl foi também diluída, em PBS, de 50,7 mg/mL a 38,0 mg/mL.

4.6.1. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

Os resultados obtidos para o efeito citotóxico do extrato aquoso de salicórnia e da solução aquosa de NaCl, na redução da viabilidade celular são apresentados na Figura 19 (Dias *et al.*, 2018; Barroca *et al.*, 2018).

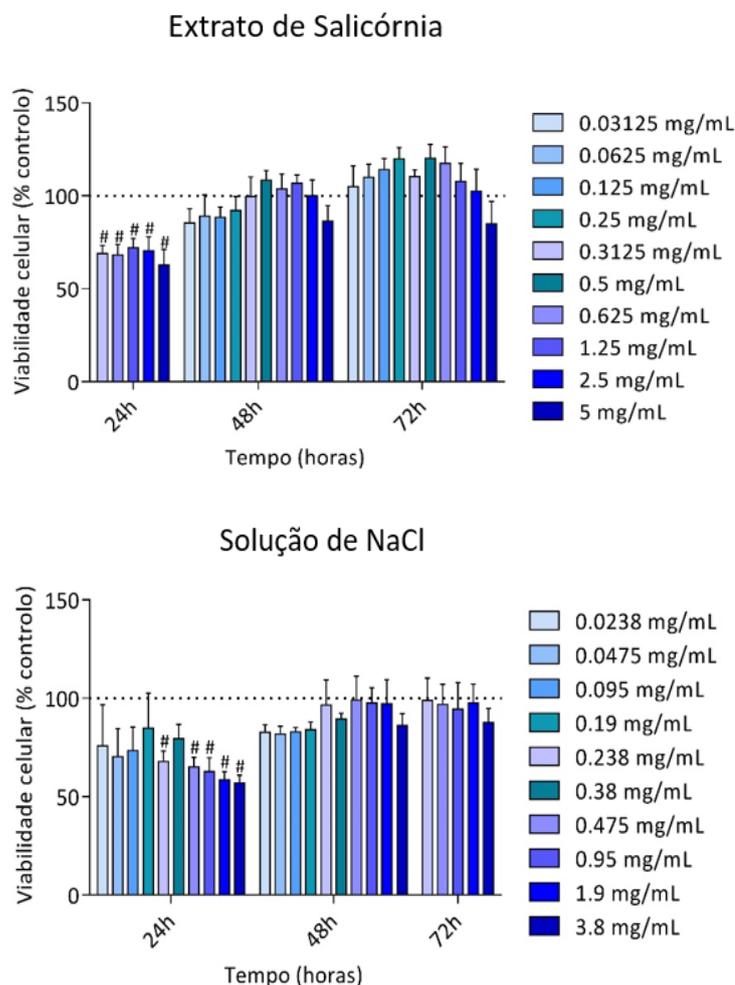


Figura 19: Efeito citotóxico do extrato de salicórnia e de uma solução de NaCl na linha celular HT-29, às 24, 48 e 72 horas, determinado pelo método do MTT (ponto 3.7.2.1). Os resultados são apresentados em percentagem em relação a culturas controlo (células tratadas com o veículo do composto, DMSO), consideradas 100% (linha tracejada horizontal).

Relativamente à Figura 19, consegue-se verificar que o efeito depende da dose administrada de extrato/ NaCl e do tempo de incubação (24, 48 e 72 horas).

No caso do extrato de salicórnia apenas se verificou efeito citotóxico para a concentração mais elevada – 5,00 mg/mL. No entanto, pode-se verificar que após as 24h da administração, há uma diminuição na viabilidade celular entre 30 e 40% para todas as concentrações administradas. Porém, as células mostram sinais de recuperação após 48 horas de incubação e após 72 horas, verifica-se uma recuperação total da viabilidade

celular para todas as concentrações, excetuando para a concentração mais elevada, 5,00 mg/mL.

No caso da solução de NaCl, os resultados são semelhantes, pois para as 24 horas, para todas as concentrações testadas, verifica-se uma redução significativa da viabilidade celular (entre os 20 e os 40%). Após 48 horas, nota-se uma recuperação ligeira das células e às 72 horas, há uma recuperação significativa da viabilidade celular, para as concentrações mais elevadas de NaCl, com exceção da mais elevada, 3,80 mg/mL.

Comparando agora os resultados obtidos pela administração de extrato de salicórnia e pela administração da solução de NaCl, pode-se considerar que há algum efeito protetor por parte do sal, para concentrações mais elevadas e que ao fim de 72 horas começa a ser o efeito do extrato que prevalece na morte celular.

Relativamente ao valor de IC₅₀, este foi calculado, quando possível, tanto para o extrato de salicórnia como para a solução de NaCl, de forma a perceber qual a concentração de extrato e de NaCl que será necessária para diminuir a viabilidade celular em 50%. Os valores são apresentados na Tabela 8, para tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ (mg/mL) para os compostos estudados, face à linha HT-29, obtidos através do método do MTT, após 24, 48 e 72 horas de incubação.

		IC ₅₀ (mg/mL)		
Composto	Tempo (h)	24	48	72
	Extrato de salicórnia		n.a.	n.a.
Solução de NaCl		n.a.	9,74	34,9

n.a. – não aplicável (não se atinge uma diminuição de viabilidade de 50%).

Como se pode verificar pela tabela, relativamente ao extrato, não foi possível determinar o IC₅₀ por não ser possível ajustar uma curva ao gráfico. Isto pode dever-se a erros do operador relacionados com a manipulação ou ao número insuficiente de

ensaios. De modo a ser possível determinar com precisão o IC₅₀ do extrato seria necessário realizar um maior número de ensaios.

Em relação à solução de NaCl, para as 48 e 72 horas, esta apresenta efeito citotóxico sobre a linha celular testada, sendo mais efetivo após 48 horas de exposição, pois a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% é menor (IC₅₀ de 9,74 mg/mL).

4.6.2. Determinação da proliferação celular pelo método colorimétrico da SRB

Os resultados obtidos pelo efeito do extrato aquoso de salicórnia e da solução de NaCl, para a densidade celular, estão apresentados na Figura 20 (Dias *et al.*, 2018; Barroca *et al.*, 2018).

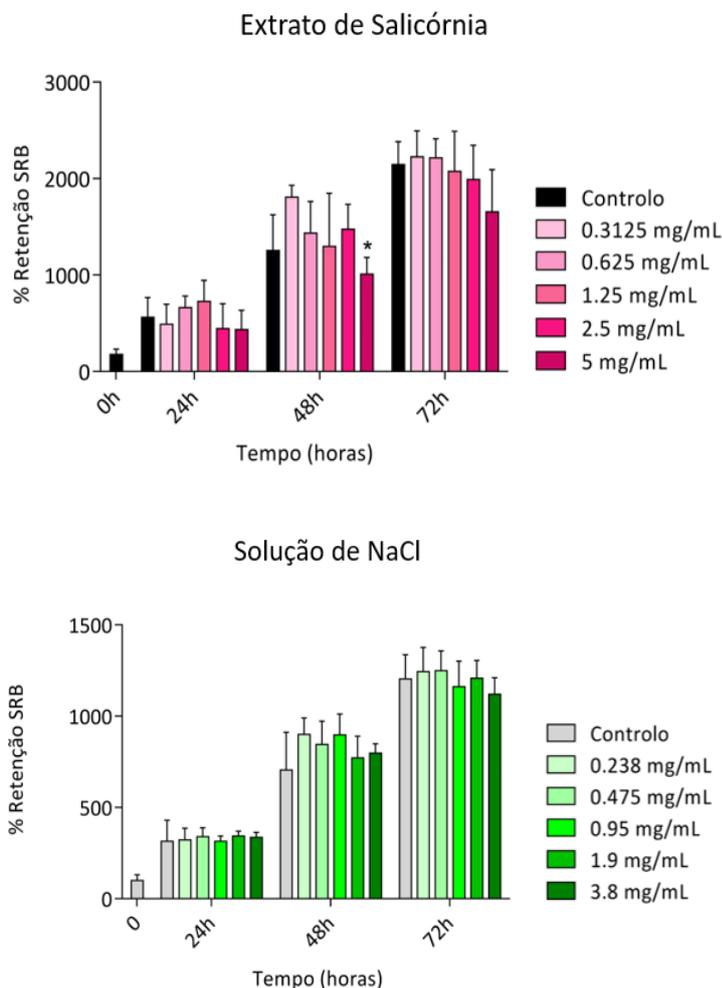


Figura 20: Efeito anti-proliferativo do extrato de salicórnia e de uma solução de NaCl na linha celular HT-29. Os ensaios foram realizados pelo método colorimétrico da SRB (ponto 3.7.2.2), após 24, 48 e 72 horas de incubação com os compostos. Os resultados foram expressos em percentagem de retenção da SRB em relação às culturas de células de controlo e foram apresentados num gráfico com a retenção da SRB em função das concentrações de extrato/NaCl aplicadas nos vários tempos de incubação.

A partir dos resultados apresentados na Figura 20 é possível verificar, para o extrato de salicórnia, após as 24 horas, uma ligeira diminuição da densidade celular, para as concentrações 0,31, 2,50 e 5,00 mg/mL. Após 48 horas de incubação, apenas a concentração mais elevada (5,00 mg/mL), apresenta algum efeito anti-proliferativo e após 72 horas de incubação, para as duas concentrações mais elevadas (5,00 e 2,50

mg/mL), observou-se diminuição da densidade celular. Todos estes resultados corroboram os resultados do MTT para estas concentrações.

No caso da solução de NaCl, verificou-se um aumento na densidade celular para todos os períodos de incubação. No entanto, comparando os resultados do SRB com os do MTT, para as 24 horas, as células já não estão viáveis apesar de a membrana se encontrar intacta, o que significa que o NaCl tem efeito na redução da viabilidade celular de células cancerígenas HT-29. Após as 48 horas, novamente apesar de não se verificar uma diminuição da densidade celular, através do método do MTT observa-se uma diminuição da viabilidade celular o que significa que as células já não estão funcionais apesar de apresentarem a membrana intacta. Após 72 horas de incubação, verifica-se um ligeiro efeito anti-proliferativo, para a concentração mais elevada de NaCl (3,80 mg/mL), embora este não seja significativo, o que corrobora os resultados obtidos pelo método do MTT.

Tabela 9: Valores de IC₅₀ (mg/mL) para os compostos estudados, face à linha HT-29, obtidos através do método colorimétrico da SRB, após 24, 48 e 72 horas de incubação.

		IC ₅₀ (mg/mL)		
		24	48	72
Composto	Tempo (h)			
	Extrato de salicórnia	6,19	n.a.	8,60
	Solução de NaCl	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. – não aplicável (não se atinge uma diminuição de viabilidade de 50%).

A Tabela 9 apresenta os valores de IC₅₀, concentração que reproduz 50% de efeito, para o extrato e para a solução de NaCl. Verifica-se que, para o extrato de salicórnia às 72 horas é necessária uma maior quantidade de extrato (maior concentração - IC₅₀ de 8,60 mg/mL) para produzir o mesmo efeito que às 24 horas (IC₅₀ de 6,19 mg/mL). No caso da solução de NaCl, não foi possível determinar o IC₅₀ por não ser possível ajustar uma curva ao gráfico. Como referido anteriormente, isto pode dever-se a erros do operador relacionados com a manipulação ou ao número insuficiente de

ensaios. Seria necessário realizar um maior número de ensaios de modo a determinar com maior exatidão o IC₅₀ do NaCl.

Observando os resultados obtidos, pelos dois métodos e para os dois compostos administrados, pode-se verificar que ambos apresentam um efeito citotóxico mais acentuado para a concentração mais elevada. Contudo, comparando o efeito do extrato com o efeito do NaCl verifica-se que, após as 72 horas de administração, mesmo para a concentração mais elevada, deixa de ser relevante o efeito citotóxico do NaCl. Pode-se afirmar que, para este período de incubação, começa a ser o efeito do extrato o mais relevante na citotoxicidade das células HT-29.

Pode-se ainda concluir que a combinação do efeito do extrato com o sal presente nele, promovem um efeito citotóxico sobre as células cancerígenas HT-29, para as concentrações testadas.

Verificando outros estudos levados a cabo por Kang *et al.* (2011) e Kim e Lee (2009) para testar o efeito citotóxico com extratos de *S. herbacea*, à mesma linha celular (HT-29), constatou-se que a salicórnia inibiu a proliferação e até estimulou a apoptose das células cancerígenas. Os resultados obtidos no estudo à espécie *S. ramosissima* vieram comprovar que a salicórnia é uma promissora fonte dietética para aplicação medicinal.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolveram-se com sucesso bolachas com pepitas de chocolate e de chocolate, substituindo o sal comum (cloreto de sódio) por salicórnica liofilizada - “sal verde”.

No estudo do tempo de prateleira das bolachas em que foram avaliados o teor de humidade e o índice de peróxidos, concluiu-se que as ligeiras alterações da humidade e do índice de peróxidos foram idênticas para as bolachas padrão e para as enriquecidas com “sal verde”. Posteriormente, nas análises sensoriais, os provadores não foram capazes de identificar nenhuma alteração organolética nas bolachas com “sal verde”, pelo que se pode concluir que o produto, do ponto de vista sensorial, tem um tempo de vida de, pelo menos, seis meses.

Da formulação das bolachas, para além destes resultados positivos, verificou-se também que havia uma alteração ligeira da cor das bolachas para verde, o que poderá trazer uma vantagem na utilização desta planta como um corante alimentar natural.

Relativamente aos extratos de *S. ramosissima*, estes revelaram ter atividade antioxidante. Dos extratos analisados, constatou-se que os solventes etanol e metanol são os mais eficazes na extração de compostos com atividade antioxidante.

A espécie *S. ramosissima* apresentou também um efeito citotóxico na linha celular testada, adenocarcinoma colorretal humano HT-29, havendo uma diminuição da proliferação celular e viabilidade celular, verificada pelos ensaios de SRB e MTT, respetivamente.

Os resultados obtidos com os ensaios efetuados permitem inferir que a utilização da planta halófita *S. ramosissima* J. Woods poderá ser em duas vertentes, como ingrediente alimentar ou como uma fonte de fitoquímicos, que poderão ter usos terapêuticos, com efeitos benéficos para a saúde humana.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No futuro seria interessante testar outros produtos alimentares onde o sal tem um papel bastante importante, como por exemplo, nos produtos de charcutaria, de maneira a perceber como estes seriam afetados com a introdução da salicórnia. Seria também interessante fazer mais ensaios de citotoxicidade da *S. ramosissima*, de forma a comprovar os resultados obtidos neste trabalho.

Também a combinação do extrato desta planta com fármacos, normalmente usados no tratamento de cancro, poderia ser abordada para verificar o potencial da planta como tratamento complementar para esta doença.

BIBLIOGRAFIA

- AL-TEMIMI, Ammar - **Determination of Antioxidant Activity in Different Kinds of Plants In Vivo and In Vitro by Using Diverse Technical Methods**. Journal of Nutrition & Food Sciences. ISSN 21559600. 3:1 (2013) 1–6. doi: 10.4172/2155-9600.1000184.
- ATCC® HTB-38™ - **HT-29: Homo sapiens colon colorectal adenocarcinoma** [Em linha], atual. 2018. [Consult. 11 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=pt#characteristics>.
- BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo; VEGA-MERCADO, Humberto - **Deshidratación de alimentos**. Espanha: Editorial Acribia, S.A., 2000. ISBN 84-200-0918-0.
- BARREIRA, Luísa; RESEK, Eva; RODRIGUES, Maria João; ROCHA, Maria Isabel; PEREIRA, Hugo; BANDARRA, Narcisa; SILVA, Manuela Moreira DA; VARELA, João; CUSTÓDIO, Luísa - **Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits?**. Journal of Food Composition and Analysis. ISSN 08891575. 59 (2017) 35–42. doi: 10.1016/j.jfca.2017.02.003.
- BARROCA, Maria João M. C.; CARVALHO, Ana Batista de; DIAS, Joana Romano; SILVA, Aida Moreira da - **Antioxidant and Cytotoxic effects of *Salicornia ramosissima* Extracts in Cancer Cells**. In 2nd Conference Food Bioactives & Health, 26-28 setembro, 2018: Lisboa; Poster 1st award by MDPI Journal Diseases.
- BASHAN, Y.; MORENO, M.; TROYO, E. - **Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp.** Biology and Fertility of Soils. ISSN 01782762. 32:4 (2000) 265–272. doi: 10.1007/s003740000246.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. - **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. ISSN 0008-4166. 37:8 (1959) 911–917. doi: dx.doi.org/10.1139/cjm2014-0700.
- BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. - **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. Food Sci. Technol. ISSN 00236438. 28 (1995) 25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

- BROWN, J. Jed; CYBULSKA, Iwona; CHATURVEDI, Tanmay; THOMSEN, Mette H. - **Sabkha Ecosystems: Volume IV: Cash Crop Halophyte and Biodiversity Conservation**. 47 (2014). doi: 10.1007/978-94-007-7411-7.
- BS ISO 4120:2004: **Sensory analysis - methodology - Triangle test**. Uni of Science & Technology User, University of Science & Tech. (2004).
- CALLIGARIS, Sonia; MANZOCCO, Lara; KRAVINA, Giuditta; NICOLI, Maria Cristina - **Shelf-life modeling of bakery products by using oxidation indices**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. ISSN 00218561. 55:5 (2007) 2004–2009. doi: 10.1021/jf063004h.
- CHO, Hyun Dong; LEE, Ju Hye; JEONG, Ji Hye; KIM, Jae Yong; YEE, Sung Tae; PARK, Seok Kyu; LEE, Mi Kyung; SEO, Kwon Il - **Production of novel vinegar having antioxidant and anti-fatigue activities from *Salicornia herbacea* L.** Journal of the Science of Food and Agriculture. ISSN 10970010. 96:4 (2016) 1085–1092. doi: 10.1002/jsfa.7180.
- CICCO, Nunzia; LANORTE, Maria T.; PARAGGIO, Margherita; VIGGIANO, Mariassunta; LATTANZIO, Vincenzo - **A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts**. Microchemical Journal. ISSN 0026265X. 91:1 (2009) 107–110. doi: 10.1016/j.microc.2008.08.011.
- DAVY, A. J.; BISHOP, G. F.; COSTA, C. S. B. - ***Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. obscura* P.W. Ball & Tutin, *S. nitens* P.W. Ball & Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball & Tutin and *S. dolichostachya* Moss)**. Journal of Ecology. ISSN 00220477. 89:4 (2001) 681–707. doi: 10.1046/j.0022-0477.2001.00607.x.
- Decreto-Lei nº 106/2005 de 29 de junho. **Diário da República – I Série A**. Lisboa: Ministério da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas.
- DEVARAJ, Sridevi; LEONARD, Scott; TRABER, Maret G.; JIALAL, Ishwarlal - **Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome**. Free Radical Biology and Medicine. ISSN 08915849. 44:6

- (2008) 1203–1208. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.018.
- DIAS, Joana Romano; CARVALHO, Ana Batista de; BARROCA, Maria João M. C.; SILVA, Aida Moreira da - **Antioxidant and Cytotoxic effects of *Salicornia ramosissima* Extracts in Cancer Cells**. In 1st International Meeting on Innovation & Development in the Food Sector, 5 junho, 2018: Instituto Politécnico de Viseu.
- DIAS, Joaquim - **Determinação da Vida de Prateleira nos Alimentos - Hipersuper - Hipersuper** [Em linha], atual. 2017. [Consult. 17 fev. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.hipersuper.pt/2007/01/19/Determina_o_da_Vida_de_Prateleir/>.
- DIAS, M. M.; MACHADO, N. F. L.; MARQUES, M. P. M. - **Dietary chromones as antioxidant agents-the structural variable**. Food and Function. ISSN 20426496. 2:10 (2011) 595–602. doi: 10.1039/c1fo10098j.
- DÍAZ, F. J.; BENES, S. E.; GRATTAN, S. R. - **Field performance of halophytic species under irrigation with saline drainage water in the San Joaquin Valley of California**. Agricultural Water Management. ISSN 03783774. 118 (2013) 59–69. doi: 10.1016/j.agwat.2012.11.017.
- DRYDEN, Gordon McL. - **Animal Nutrition Science**. 1ª Edição ed. Cambridge : CABI, 2008. ISBN 9781845934125.
- ESSAIDI, Ismahen; BRAHMI, Zeineb; SNOUSSI, Ahmed; HAJ KOUBAIER, Hayat BEN; CASABIANCA, Hervé; ABE, Naoki; OMRI, Abdelfatteh EL; CHAABOUNI, Mohamed Moncef; BOUZOUITA, Nabiha - **Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract**. Food Control. ISSN 09567135. 32:1 (2013) 125–133. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.006.
- FERREIRA, Daniela; ISCA, Vera M. S.; LEAL, Pedro; SECA, Ana M. L.; SILVA, Helena; LOURDES PEREIRA, Maria DE; SILVA, Artur M. S.; PINTO, Diana C. G. A. - ***Salicornia ramosissima*: Secondary metabolites and protective effect against acute testicular toxicity**. Arabian Journal of Chemistry. ISSN 18785352. 11:1 (2018) 70–80. doi: 10.1016/j.arabjc.2016.04.012.
- FLOWERS, Timothy J.; COLMER, Timothy D. - **Plant salt tolerance: Adaptations in**

- halophytes**. *Annals of Botany*. ISSN 10958290. 115:3 (2015) 327–331. doi: 10.1093/aob/mcu267.
- G-BIOSCIENCES® - **CYTOSCAN™ SRB CYTOTOXICITY ASSAY** [Em linha] [Consult. 20 mai. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-SRB-Cytotoxicity-Assay>.
- GALICIA, Flora De - **Jardim Botânico UTAD | Multimedia 35085** [Em linha], atual. 2017. [Consult. 19 jul. 2018]. Disponível em WWW:<URL:https://jb.utad.pt/multimedia/35085>.
- HOUGH, Guillermo - **Sensory shelf life estimation of food products**. Taylor and Francis Group, 2010. ISBN 9781420092912.
- HUPEL, Mélanie; LECOINTRE, Camille; MEUDEC, Anna; POUPART, Nathalie; GALL, Erwan Ar - **Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima***. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. ISSN 00220981. 401:1–2 (2011) 36–47. doi: 10.1016/j.jembe.2011.03.004.
- ISCA, Vera M. S.; SECA, Ana M. L.; PINTO, Diana C. G. A.; SILVA, Artur M. S. - **An Overview of *Salicornia* Genus: The Phytochemical and Pharmacological Profile**. *Natural Products: Research Reviews Vol. 2*. 2 (2014a) 145–176.
- ISCA, Vera M. S.; SECA, Ana M. L.; PINTO, Diana C. G. A.; SILVA, Helena; SILVA, Artur M. S. - **Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima***. *Food Chemistry*. ISSN 18737072. 165 (2014b) 330–336. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.117.
- JEFFERIES, R. L.; GOTTLIEB, L. D. - **Genetic Differentiation of the Microspecies *Salicornia Europaea* L. (Sensu Stricto) and *S. Ramosissima*, J. Woods**. *New Phytologist*. ISSN 14698137. 92:1 (1982) 123–129. doi: 10.1111/j.1469-8137.1982.tb03368.x.
- KANG, Smee; KIM, Daram; LEE, Bo Hyun; KIM, Mi Ri; HONG, Jungil; CHIANG, Maehee - **Antioxidant properties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea*) seed extracts on human intestinal cells**. *Food Science and Biotechnology*. ISSN 12267708. 20:1 (2011) 115–122. doi: 10.1007/s10068-011-

0016-7.

- KIM, Hyun Wook; HWANG, Ko Eun; SONG, Dong Heon; KIM, Yong Jae; HAM, Youn Kyung; YEO, In Jun; JEONG, Tae Jun; CHOI, Yun Sang; KIM, Cheon Jei - **Effects of red and green glassworts (*salicornia herbacea* L.) on physicochemical and textural properties of reduced-salt cooked sausages**. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. ISSN 12258563. 34:3 (2014) 378–386. doi: 10.5851/kosfa.2014.34.3.378.
- KIM, Seon-Hee; LEE, Dong-Seok - **Anti-Proliferative Effect of Polysaccharides from *Salicornia herbacea* on Induction of G2 / M Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells**. Journal of Microbiology and Biotechnology. ISSN 10177825. 19:July (2009) 1482–1489. doi: 10.4014/jmb.0902.0063.
- KIM, You Ah; KONG, Chang Suk; LEE, Jung Im; KIM, Hojun; PARK, Hee Yeon; LEE, Hyi Seung; LEE, Chulhyun; SEO, Youngwan - **Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea***. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. ISSN 0960894X. 22:13 (2012) 4318–4322. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.05.017.
- LI, Miyi; CONSTANTINESCU, Dana; WANG, Lisheng; MOHS, André; GMEHLING, Juürgen - **Solubilities of NaCl, KCl, LiCl, and LiBr in methanol, ethanol, acetone, and mixed solvents and correlation using the Liguac model**. Industrial and Engineering Chemistry Research. ISSN 08885885. 49:10 (2010) 4981–4988. doi: 10.1021/ie100027c.
- LOPES, Maria; CAVALEIRO, Carlos; RAMOS, Fernando - **Sodium Reduction in Bread: A Role for Glasswort (*Salicornia ramosissima* J. Woods)**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. ISSN 15414337. 16:5 (2017) 1056–1071. doi: 10.1111/1541-4337.12277.
- LYON, David H.; FRANCOMBE, Mariko A.; HASDELL, Terry A.; LAWSON, Ken. - **Guidelines for Sensory Analysis in Food Product Development and Quality Control**. [S.l.] Springer US, 1992. ISBN 9781461358251.
- MANLEY, Duncan - Technology of biscuits, crackers and cookies. Em . 3ª edição ed.

- Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2000. ISBN 1 85573 532 6
- MANLEY, Duncan - **Biscuit, cracker and cookie recipes for the food industry**. 1st. ed. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2001. ISBN 1 85573 543 1.
- MIN, Gin-Ji; LEE, Doo-Seog; KIM, Tae-Jin; PARK, Jeong-Heum; CHO, Tae-Yong; PARK, Dong-In - **Chemical composition of *Salicornia herbacea* L.** J Food Sci Nutr. . ISSN 2287-1098. 7:1 (2002) 105–107. doi: 10.3746/jfn.2002.7.1.105.
- MUDIE, Petra J.; GREER, Sheila; BRAKEL, Judith; DICKSON, James H.; SCHINKEL, Clara; PETERSON-WELSH, Ruth; STEVENS, Margaret; TURNER, Nancy J.; SHADOW, Mary; WASHINGTON, Rosalie - **Forensic palynology and ethnobotany of *Salicornia* species (Chenopodiaceae) in northwest Canada and Alaska**. Canadian Journal of Botany. ISSN 0008-4026. 83 (2005) 111–123. doi: 10.1139/b04-159.
- MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; PIERNIK, A. - **Ecology, Distribution and Ecophysiology of *Salicornia Europaea* L.** ISBN 978-94-007-7410-0. 47 (2014). doi: 10.1007/978-94-007-7411-7.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, Gordon M. - **Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years**. Journal of Natural Products. ISSN 01633864. 75:3 (2012) 311–335. doi: 10.1021/np200906s.Natural.
- NIELSEN, S. Suzanne - **Food Analysis Laboratory Manual**. 2ª edição ed. [S.l.] : Springer Science+Business Media, 2009. ISBN 9780123693976.
- NIELSEN, Suzanne S. - **Food Analysis**. 4ª edição ed. [S.l.] Springer Science+Business Media, 2014. ISBN 978-1-4419-1477-4.
- NP 518. 1986, Cereais e leguminosas. **Determinação do teor de cinza. Processo de incineração a 550°C**. Lisboa: IPQ. 3ª edição.
- NP 875. 1994, Alimentos para animais. **Determinação do teor de humidade**. Lisboa: IPQ. 3ª edição.
- NP 876. 2001, Alimentos para animais. **Determinação do teor de matéria gorda**. Lisboa: IPQ. 3ª edição
- Norma Portuguesa NP 904 (1987). **Gorduras e óleos comestíveis: determinação do índice de peróxidos**. CT39 (IQA). Lisboa: IPQ.

-
- NP 1005. 1983, Cereais e leguminosas. **Determinação do teor em celulose bruta**. Lisboa: IPQ.
- NP 1422. 1977, Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. **Determinação do teor de cloretos. Processo de referência**. Lisboa: IPQ.
- NP 2030. 1996, Alimentos para animais. **Determinação do teor de proteína bruta**. Lisboa: IPQ.
- P.V.ARAÚJO, A.CARAPETO, J.NEIVA, U.SCHWARZER, L.LOPES, R.FARIA, F.CLAMOTE, P.GOMES, Et Al. - **Salicornia ramosissima J.Woods - mapa de distribuição** [Em linha], atual. jan. 2016. [Consult. 19 fev. 2018]. Disponível em WWW:<URL:http://www.flora-on.pt/#wSalicornia+ramosissima>.
- PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTSARIS, A. H. - **Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay**. Journal of Immunological Methods. ISSN 00221759. 208:2 (1997) 151–158. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00137-3.
- PEDRO, Carmen A.; SANTOS, Márcia S. S.; FERREIRA, Susana M. F.; GONÇALVES, Sílvia C. - **The influence of cadmium contamination and salinity on the survival, growth and phytoremediation capacity of the saltmarsh plant Salicornia ramosissima**. Marine Environmental Research. ISSN 18790291. 92 (2013) 197–205. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.09.018.
- PISOSCHI, Aurelia Magdalena; NEGULESCU, Gheorghe Petre - **Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review**. Biochemistry & Analytical Biochemistry. ISSN 21611009. 01:01 (2012) 1–10. doi: 10.4172/2161-1009.1000106.
- REITER, Elke; JIANG, Qing; CHRISTEN, Stephan - **Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol**. Molecular Aspects of Medicine. ISSN 00982997. 28:5–6 (2007) 668–691. doi: 10.1016/j.mam.2007.01.003.
- RENARD, C. M. G. C.; CHAMPENOIS, Y.; THIBAUT, J. F. - **Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of glasswort, Salicornia ramosissima**. Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 22:4 (1993) 239–245. doi: 10.1016/0144-8617(93)90126-O.
-

- RHEE, Mh; PARK, Hj - **Salicornia herbacea: botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant**. Journal of Medicinal Plants. ISSN 1996-0875. 3:8 (2009) 548–555.
- RISS, Terry L.; MORAVEC, Richard A.; NILES, Andrew L.; DUELLMAN, Sarah; BENINK, Hélène A.; WORZELLA, Tracy J.; MINOR, Lisa - **Cell Viability Assays**. [S.l.] : Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004
- RUDKOWSKA, Iwona; ABUMWEIS, Suhad S.; JONES, Peter J. H.; NICOLLE, Catherine - **Cholesterol-Lowering Efficacy of Plant Sterols in Low-Fat Yogurt Consumed as a Snack or with a Meal**. Journal of the American College of Nutrition. ISSN 15411087. 27:5 (2008) 588–595. doi: 10.1080/07315724.2008.10719742.
- SHPIGEL, M.; BEN-EZRA, D.; SHAULI, L.; SAGI, M.; VENTURA, Y.; SAMOCHA, T.; LEE, J. J. - **Constructed wetland with Salicornia as a biofilter for mariculture effluents**. Aquaculture. ISSN 00448486. 412–413 (2013) 52–63. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.06.038.
- SILVA, Helena; CALDEIRA, Gustavo; FREITAS, Helena - **Salicornia ramosissima population dynamics and tolerance of salinity**. 2006. doi: 10.1007/s11284-006-0008-x.
- TÉCNICAS, ABNT-Associação Brasileira De Normas - **NBR 12995/1993 - Teste triangular em análise sensorial dos alimentos e bebidas**. 1993. 1–5.
- TONDER, Alet VAN; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan - **Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays**. BMC Research Notes. ISSN 17560500. 8:1 (2015) 1–10. doi: 10.1186/s13104-015-1000-8.
- VANACLOCHA, Ana Casp; REQUENA, José Abril - **Procesos de conservación de alimentos**. 2ª Edição ed. Madrid : Grupo Mundi-Prensa, 2003. ISBN 8489922969.
- VENTURA, Yvonne; WUDDINEH, Wegi A.; MYRZABAYEVA, Malika; ALIKULOV, Zerekbay; KHOZIN-GOLDBERG, Inna; SHPIGEL, Muki; SAMOCHA, Tzachi M.; SAGI, Moshe - **Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual Salicornia and perennial Sarcocornia halophytes as leafy vegetable crops**. Scientia Horticulturae. ISSN 03044238. 128:3 (2011) 189–196. doi:

- 10.1016/j.scienta.2011.02.001.
- VENTURA, Yvonne; ESHEL, Amram; PASTERNAK, Dov; SAGI, Moshe - **The development of halophyte-based agriculture: Past and present**. *Annals of Botany*. ISSN 10958290. 115:3 (2015) 529–540. doi: 10.1093/aob/mcu173.
- VERMA, Sheetal; SINGH, S. P. - **Current and future status of herbal medicines**. *Veterinary World*. ISSN 09728988. 1:11 (2008) 347–350. doi: 10.5455/vetworld.2008.347-350.
- VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim - **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening**. *Nature Protocols*. ISSN 17542189. 1:3 (2006) 1112–1116. doi: 10.1038/nprot.2006.179.
- VIEITEZ, I.; MACEIRAS, L.; JACHMANIÁN, I.; ALBORÉS, S. - **Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology**. *Journal of Supercritical Fluids*. ISSN 08968446. 133 (2018) 58–64. doi: 10.1016/j.supflu.2017.09.025.
- VOIGT, Wieland - **Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity**. *Chemosensitivity*. ISSN 1543-1894. 110 ([s.d.]) 039–048. doi: 10.1385/1-59259-869-2:039.
- WANG, Lingyu; ZHANG, Min; MUJUMDAR, Arun S.; WANG, Yingqiang; ZHU, Chengpei - **Restructured crispy fish cubes containing *Salicornia bigelovii* Torr. developed with microwave vacuum drying**. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. ISSN 10498850. 22:3 (2013) 226–240. doi: 10.1080/10498850.2011.641672.
- WANG, Qi Zhi; LIU, Xiao Feng; SHAN, Yu; GUAN, Fu Qin; CHEN, Yu; WANG, Xiang Yun; WANG, Ming; FENG, Xu - **Two new norriterpenoid saponins from *Salicornia bigelovii* Torr. and their cytotoxic activity**. *Fitoterapia*. ISSN 0367326X. 83:4 (2012) 742–749. doi: 10.1016/j.fitote.2012.02.013.
- WEBB, J. M.; QUINTÃ, R.; PAPADIMITRIOU, S.; NORMAN, L.; RIGBY, M.; THOMAS, D. N.; VAY, L. LE - **The effect of halophyte planting density on the efficiency of constructed wetlands for the treatment of wastewater from marine aquaculture**. *Ecological Engineering*. ISSN 09258574. 61 (2013) 145–153. doi: 10.1016/j.ecoleng.2013.09.058.
- WILLIAN TOITO SUAREZ, ELEN ROMAO SARTORI, Orlando Fatibello-Filho - **Alguns**

aspectos conceituais e práticos do método de Mohr na determinação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas. ISSN 16765451. 34:1 (2013) 23–30. doi: 10.5433/1679-0375.2013v34n1p23.

ZHANG, Shumeng; WEI, Mingqian; CAO, Chunjie; JU, Yaoyao; DENG, Yanqun; YE, Tianwen; XIA, Zufeng; CHEN, Meizhen - **Effect and mechanism of *Salicornia bigelovii* Torr. plant salt on blood pressure in SD rats.** Food and Function. ISSN 2042650X. 6:3 (2015) 920–926. doi: 10.1039/c4fo00800f.

ZHAO, Yuhui; WANG, Xiaomin; WANG, Hui; LIU, Tianxing; XIN, Zhihong - **Two new noroleanane-type triterpene saponins from the methanol extract of *Salicornia herbacea*.** Food Chemistry. ISSN 18737072. 151 (2014) 101–109. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.030.

ANEXO A - LISTA DE REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Produto	Laboratório
Ácido acético glacial (CH ₃ COOH)	Pronalab
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico (HCL)	Sigma-Aldrich
Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅ , ≥ 97,5%)	Sigma-Aldrich
Ácido nítrico (HNO ₃)	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Amónio (NH ₄ ⁺)	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich
Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT, ≥ 97,5%)	Sigma-Aldrich
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	José M. Vaz Pereira S.A.
Cloreto de potássio (KCl)	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma-Aldrich
Clorofórmio (CHCl ₃)	Sigma-Aldrich
Cromato de potássio (K ₂ CrO ₄)	Sigma-Aldrich
Dimetil-sulfóxido (DMSO, ≥ 99,9%)	Sigma-Aldrich
Etanol (C ₂ H ₆ O, ≥ 96%)	Chem-Lab
Éter di-etílico ((C ₂ H ₅) ₂ O)	José Manuel Gomes dos Santos, LDA
Folin-Ciocalteu	Panreac
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck
Iodeto de potássio (KI)	Sigma-Aldrich
Meio de cultura <i>McCoy's 5A</i>	Sigma-Aldrich
Membrana de filtração 0,2 µm e 0,45 µm	frilabo
Metanol (CH ₃ OH, ≥ 99%)	Sigma-Aldrich
Nitrato de prata 0,1 N (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich
Placas (24, 48 e 96 poços) e frascos de cultura 75 cm ²	Orange Scientific
Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·, 95%)	Sigma-Aldrich
Seringa de filtração 0,2 µm e 0,45 µm	Minisart®
Solução Azul de Tripano (0,4%)	Sigma-Aldrich
Solução tampão de fosfato de sódio pH 7,4 (PBS)	Sigma-Aldrich
Soro Fetal Bovino (FBS)	Gibco

Sulfato de ferro III ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)	Sigma-Aldrich
Sulfato de sódio 1,5% (Na_2SO_4)	Sigma-Aldrich
Sulforrodamina B (SRB)	Sigma-Aldrich
Tampão 10 mM Tris (pH 10)	Pational Diagnostic
Tiocianato de potássio 0,1 N (KSCN)	Sigma-Aldrich
Tiosulfato de sódio 0,01 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Sigma-Aldrich
Tripsina 0,05%	Sigma-Aldrich

Equipamentos	Marca	Modelo
Agitador “Vortex”	IKA	MS2 Minishaker
Aparelho de purificação de água ultrapura	TKA	GenPure
Arca de ultracongelamento	Thermo Fisher Scientific (Asheville)	ULT1786-4-V41
Banho de ultra-sons com aquecimento	Fungilab	Ultrasonic cleaner
Banho termostático analógico, sem agitação	Clifton	NE 1B-14
Câmara de cultura com fluxo laminar vertical	BioWizard	Kojair
Centrifugadora com refrigeração	MPW	MPW-350R
Destilador de tubos de Kjeldahl	VELP Scientifica	UDK 129
Digestor de Kjeldahl	VELP Scientifica	DK 20
Espectrofotômetro de Visível/UV (com <i>software</i> Gen 5)	BioTek	μ Quant MQX200
Evaporador rotativo	BUCHI	Rotavapor R II
Extrator de <i>Soxhlet</i>	behr Labor-Technik™	-
Fibrômetro	Labconco	-
Incubadora	Sanyo	-
Liofilizador de bancada	SCANVAC	CoolSafe™
Microscópio ótico invertido	Olympus	CKX41
Mufla	Induzir	-
Programa <i>Graphpad Prism 6.01</i> para o <i>Windows</i>	<i>GraphPad Software</i>	-

ANEXO B - FOLHA DE PROVA TRIANGULAR

Projeto SOSVALOR

Cabina: _____

Nome: _____

Idade: _____ anos.

Género: F M

Habilitações literárias: _____

Costuma comer bolachas? sim. não.

Quantas vezes consome bolachas, em média, por semana?

- mais de 5 vezes.
- 3 a 5 vezes.
- até 2 vezes.
- nunca.

Apresenta algum tipo de intolerância?

- não.
- glúten
- lactose
- frutos secos
- outros. Quais? _____

Obrigado pela sua colaboração! 😊

Projeto SOSVALOR

Cabina: _____

Nome: _____

Instruções:

Tem à sua frente 3 bolachas com os códigos _____ .
Por favor, verifique se estão corretos.

Agora prove as amostras da esquerda para a direita.

Indique qual das amostras é diferente _____

Comentários:

Obrigado pela sua colaboração! ☺

ANEXO C - CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO PARA OS DIFERENTES SOLVENTES UTILIZADOS NA ANÁLISE AO TEOR EM COMPOSTOS FENÓLICOS

