

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

Renata Labronici Bertin

**PROSPECÇÃO PARA EXPLORAÇÃO DA ERVA DE SAL  
(*Sarcocornia ambigua* - Amaranthaceae): ANÁLISE  
HISTOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, VALOR  
NUTRICIONAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

**FLORIANÓPOLIS  
2014**



**RENATA LABRONICI BERTIN**

**PROSPECÇÃO PARA EXPLORAÇÃO DA ERVA DE SAL  
(*Sarcocornia ambigua* - *Amaranthaceae*): ANÁLISE  
HISTOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, VALOR  
NUTRICIONAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Fett

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Benathar Ballod Tavares

**FLORIANÓPOLIS**

**2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bertin, Renata Labronici

Prospecção para exploração da erva de sal (*Sarcocornia ambigua* - *Amaranthaceae*): análise histológica, caracterização química, valor nutricional e potencial antioxidante / Renata Labronici Bertin ; orientador, Roseane Pett ; coorientador, Lorena Benathar Ballod Tavares. - Florianópolis, SC, 2014.

152 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. *Sarcocornia ambigua*. 3. Atividade Antioxidante. 4. Compostos Fenólicos. 5. Minerais. I. Pett, Roseane. II. Tavares, Lorena Benathar Ballod. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

## DEDICATÓRIA

*A Deus pela presença constante em minha vida, por me dar saúde e força necessária para superar as dificuldades, por colocar pessoas especiais em meu caminho, e encher a minha vida com experiências maravilhosas.*

*A minha querida e amada mãe, Liliana Maria, por todo amor, carinho, compreensão, incentivo, apoio e fé que me fizeram ir em busca dos meus ideais. Você é meu grande exemplo de vida! Obrigada.*

*Ao meu pai Luís Augusto e a Glória Maria pelo amor, apoio emocional, força e incentivo constantes.*

*Aos meus irmãos, Eduardo Augusto e Fernanda, pelos momentos de felicidade, pela força, paciência, apoio inestimável, e pelo amor compartilhado nesse período.*

*À minha avó Célia (in memoriam), pela constante presença. Obrigada pela alegria e diversão enquanto estivemos juntas.*

*Ao meu amado esposo Anderson, que me ajudou na conquista deste passo, compartilhando incondicionalmente todos os meus momentos, me amando, respeitando, compreendendo minhas ausências, e aceitando minhas escolhas.*

*Ao presente mais precioso de minha vida, meu filho Felipe, por ter me acompanhado, ainda em meu ventre, na reta final do doutorado.*

*A minha querida e amada mãe de coração Geni, pelas orações constantes, pelo amor compartilhado, e pelas palavras carinhosas proferidas nos momentos mais difíceis desta trajetória.*



## AGRADECIMENTOS

*A todos que contribuíram para realização dessa etapa de minha vida, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:*

*À Universidade Regional de Blumenau por ter possibilitado a continuidade do meu processo de capacitação no Curso de Doutorado na Universidade Federal de Santa Catarina.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina por toda a estrutura disponibilizada tanto para minha formação, como o desenvolvimento da pesquisa.*

*Aos professores do Curso de Doutorado pela oportunidade de aprendizado e evolução em minha carreira acadêmica.*

*À minha orientadora Dra. Roseane Fett, agradeço pela oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa, pela sua paciência, compreensão, dedicação e pela grande confiança depositada em minha pesquisa.*

*A minha co-orientadora Dra Lorena Benathar Ballod Tavares (mãe do coração), minha eterna gratidão por ter me incentivado a dar continuidade ao processo de capacitação profissional, pelos ensinamentos compartilhados com sabedoria, compreensão, dedicação, paciência e amizade ao longo de minha permanência na FURB. Com você aprendi a olhar o mundo acadêmico por outra perspectiva.*

*A professora Dra Marisa Santos, pela contribuição com as análises de microscopia, pelos ensinamentos, experiências compartilhadas e pela amizade.*

*Aos professores componentes da banca examinadora, pelas valiosas contribuições que culminaram para o enriquecimento desta pesquisa.*

*Ao professor Dr. Daniel Borges e seu doutorando Jefferson Santos de Gois pela parceria realizada, cedendo o espaço físico de seu laboratório e seus equipamentos para realização de uma parte desta pesquisa.*

*Ao grande mestre Luciano Gonzaga pelos ensinamentos, ideias, contribuições, e por sua dedicação e paciência ao longo da pesquisa. Obrigado por acreditar em mim, e por me mostrar que sempre somos capazes de vencer os desafios que a pesquisa científica nos impõe.*

*À grande amiga e irmã de coração, Graciele Campelo da Silva Borges, pela sincera amizade, pelos ensinamentos e auxílio nos momentos mais difíceis do doutorado, e pela contribuição na elaboração desta pesquisa.*

*Aos amigos do Laboratório de Química de Alimentos (LabQA), Graciele, Heloisa, Mônia, Andressa, Fabiana, Fabíola, Priscila, Ismael, Mayara, Siluana, Isis pela amizade e carinho, por toda ajuda concedida, e pelos momentos de alegrias que compartilhamos.*



*“Desistir?*

*Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça”.*

*Cora Coralina*



BERTIN, R.L. **Prospecção para exploração da erva de sal (*Sarcocornia ambigua* - Amaranthaceae): Análise histológica, caracterização química, valor nutricional e potencial antioxidante.** 2014. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 144p.

## RESUMO

A *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae), apresenta-se na forma de haste suculenta de cor verde e/ou avermelhada, de ampla distribuição nas costas temperadas e tropicais das Américas, porém, com melhor desenvolvimento em regiões de clima temperado e subtropical. No Brasil, não existe uma denominação popular para a *Sarcocornia*, e nem registros do seu uso, contudo, foi introduzida no mercado Europeu como um vegetal fresco “desfolhado” semelhante ao aspargo verde. Na alta gastronomia as plantas jovens e suculentas têm sido utilizadas pelo seu sabor levemente salgado e por seu potencial como alimento funcional devido ao elevado valor nutricional e a variedade de compostos bioativos. Pouca atenção tem sido dada à espécie *S. ambigua* encontrada no Brasil, e devido à falta de informações científicas, referente à composição química, perfil da atividade antioxidante, identificação de compostos bioativos, e efeito terapêutico, o cultivo comercial da planta na região é restrito. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo caracterizar a composição nutricional de duas amostras de *S. ambigua*, oriundas de duas regiões distintas localizadas na Grande Florianópolis, descrever a estrutura anatômica da parte aérea (bainha foliar e caule), por microscopia óptica de fluorescência, bem como, realizar microanálise química por energia dispersiva de raios-X em microscopia eletrônica de varredura (EDX-MEV), avaliar a atividade antioxidante com a identificação/quantificação dos compostos fenólicos majoritários por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC ESI-MS/MS), além de determinar por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) a concentração total de minerais e a fração bioacessível dos mesmos por meio do modelo de digestão *in vitro*. Os resultados revelaram que o conteúdo de cinzas, carboidratos, fibras insolúveis e minerais diferiu entre as amostras. O mineral presente em maior quantidade foi Na, seguido do K, Mg e Ca. Houve predomínio de ácidos graxos polinsaturados, sendo o principal deles o ácido linolênico, seguido do ácido linoleico. Em relação aos resultados obtidos pelo estudo

histológico, os achados possibilitaram interpretações sobre as adaptações destas plantas às peculiaridades do ambiente. Entre as características relacionadas às condições ambientais estressantes, às quais as halófitas estão sujeitas, podem ser destacadas as ceras epicuticulares, o hidrênquima e os cristais. No que se refere à distribuição dos elementos químicos, com uso de EDX-MEV, de um modo geral, as concentrações e a distribuição dos elementos minerais, encontrados nos tecidos vegetais de ambas as amostras de *S. ambigua*, mostraram grande variação. Dentre os 15 compostos fenólicos quantificados no extrato de ambas as amostras por HPLC-ESI-MS/MS, os principais foram os ácidos ferúlico, cafeico, vanílico, ácido *p*-cumárico, kaempferol e galangina. Estes compostos contribuíram para a presença de atividade antioxidante da planta, determinada pelos métodos químicos de DPPH e FRAP. Em relação à bioacessibilidade, dos 14 minerais determinados por ICP-MS a fração bioacessível variou de 3 a 84 %, e ao analisar os resultados em termos de quantidade de mineral bioacessível em relação ao conteúdo total, verificaram-se variações entre os elementos, sugerindo que o conteúdo total de minerais, presente na matriz vegetal nem sempre estará disponível para absorção intestinal. Verificou-se que em referência aos valores de ingestão dietética recomendada (RDA) para minerais, é provável que a ingestão de 2 g/dia de *S. ambigua* não causem efeitos adversos para a saúde, tendo em vista que nenhum dos elementos excedeu os valores de ingestão diária permitida. Os resultados encontrados indicam que a *S. ambigua* pode ser considerada uma fonte vegetal de boa qualidade nutricional para consumo humano, por conter quantidades consideráveis de nutrientes e compostos antioxidantes naturais. Entretanto deve-se considerar que variações em sua composição química existem e provavelmente estão relacionadas aos fatores ambientais os quais esta espécie está submetida bem como, às diferentes técnicas de cultivo utilizadas. Desta forma, mais estudos *in vivo* e *in vitro* devem ser realizados e encorajados, com vistas a aumentar o cultivo da *S. ambigua* no estado de Santa Catarina, bem como de seu consumo pela população, além de gerar dados que poderão nortear o uso da mesma, pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

**Palavras – chave:** *Sarcocornia ambigua*; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos; Minerais; Bioacessibilidade; Histologia vegetal.

## ABSTRACT

*Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) is presented in the form of succulent stems of green and/or reddish, widely distributed in temperate and tropical coasts of the Americas, but with better development in regions of temperate and subtropical climates. In Brazil, there is no popular name for *Sarcoconia*, nor records of their use, however, it was introduced in the European market as a fresh "defoliated" vegetable similar to green asparagus. In high gastronomy, young and succulent plants have been used for its slightly salty taste and for its potential as a functional food due to its high nutritional value and variety of bioactive compounds. Little attention has been given to *S. ambigua* species found in Brazil, and the lack of scientific information concerning the chemical composition profile of antioxidant activity, identification of bioactive compounds and the therapeutic effect, the commercial cultivation of the plant in our region is restricted. In this context, the present study aimed to characterize the nutritional composition of two samples of *S. ambigua* obtained from two distinct regions located in Florianópolis, to describe the anatomical structure of shoots (stem and foliar sheath), by fluorescence microscopy, as well as perform chemical microanalysis by energy dispersive x-ray scanning electron microscopy (SEM-EDX), to evaluate the antioxidant activity with the identification/quantification of the major phenolic compounds by liquid chromatography coupled to high performance mass spectrometry (HPLC ESI-MS/MS), in addition to determining by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) total mineral concentration and its bioaccessible fraction through *in vitro* digestion model. The results reveal that the content of ash, carbohydrate, insoluble fiber and mineral differed between the samples. The mineral in greater quantities was Na, followed by K, Mg and Ca. There was a predominance of polyunsaturated, the main one being linolenic acid, followed by linoleic acid. Regarding the results of the histological study, the findings made possible interpretations of the adaptations of these plants to the peculiarities of the environment. Among the features related to the stressors to which the subject halophytes environmental conditions can be highlighted the epicuticular waxes, and the hydrenchyma and the crystals. As regards the distribution of chemical elements, using SEM-EDX, in general the concentrations and distribution of mineral elements, found in plant tissue of both samples of *S. ambigua* showed a wide variation. Among the 15 quantified phenolic compounds in the extract of both samples by HPLC-ESI-MS/MS, the main of them were ferulic acid, caffeic, vanillic, p-coumaric acids,

kaempferol and galangin. These compounds contributed to antioxidant activity in the presence of the plant, determined by chemical methods DPPH and FRAP. Regarding the bioaccessibility of the 14 minerals determined by ICP-MS to the bioaccessibility fraction ranged from 3 to 84 %, and when analyzes the results in terms of amount of bioaccessible mineral content in relation to total, there were variations between elements, suggesting the total content of minerals present in the vegetable matrix will not always be available for intestinal absorption. It was found that with reference to the values recommended dietary allowance (RDA) for minerals, it is likely that ingestion of 2 g/day of *S. ambigua* cause no adverse effect to health, considering that none of the elements exceed the values of permitted daily intake. The findings indicate that *S. ambigua* may be considered a vegetable source of good nutritional quality for human consumption by containing considered amounts of nutrients and natural antioxidants. However it should be considered that variations in chemical composition exist and probably are related to environmental factors which this species is subjected, as well as the use of different cultivation techniques. Thus, further *in vivo* and *in vitro* studies should be undertaken and encouraged, in order to increase the cultivation of *S. ambigua* in the Santa Catarina state, as well as its consumption by the population, in addition to generating data that will guide its use, by the food and pharmaceutical industries.

**Key words:** *Sarcocornia ambigua*; Antioxidant activity; Phenolic compounds; Minerals; Bioaccessibility; Vegetable histology.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Área de ocorrência natural das espécies <i>Sarcocornia ambigua</i> e <i>Sarcocornia andina</i> na América do Sul.....	34
Figura 2 - Área de ocorrência natural e de cultivo da espécie <i>Sarcocornia ambigua</i> na Ilha de Santa Catarina –SC. ....	35
Figura 3 – Imagem da <i>Sarcocornia ambigua</i> (parte aérea da planta - caule e folha). ....	37
Figura 4 – Estrutura química dos compostos isolados de <i>S. herbacea</i> . .	45
Figura 5 - Representação esquemática de um aparelho de ICP-MS.....	53

### CAPÍTULO 4

Figura 1 - Aspecto geral de <i>Sarcocornia ambigua</i> (esquerda), com detalhe de secção transversal da parte aérea (folha contornando caule), e representação esquemática da estrutura da planta (direita). ....	65
Figura 2 - Secção transversal da parte aérea de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região A). ....	67
Figura 3 - Secção transversal da parte aérea de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região B) .....	68
Figura 4 - Secções transversais da parte aérea de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região A), em microscopia óptica convencional (4a) e de epifluorescência (4b, 4c), evidenciando caule (ca) envolvido por bainha foliar (bf), esta constituída por hidrênquima (hi), parênquima paliçádico (pp) e epiderme (ep). ....	70
Figura 5 - Secções transversais da parte aérea de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região B), em microscopia óptica convencional (5a) e de epifluorescência (5b, 5c), evidenciando caule (ca) envolvido por bainha foliar (bf), esta constituída por hidrênquima (hi), parênquima paliçádico (pp) e epiderme (ep). ....	71
Figura 6 - Espectros derivados de microanálise química (EDX/MEV; 10 kV) nos tecidos da parte aérea de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região A). ....	76
Figura 7 - Espectros derivados de microanálise química (EDX/MEV; 10 kV) nos tecidos da parte aérea de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região B). ....	77





## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Composição centesimal da <i>Salicornia herbacea</i> .....	38
Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre o conteúdo de proteína na parte aérea e raiz de espécies de <i>Salicornia</i> (RM e N) e <i>Sarcocornia</i> (VM e EL) .....	39
Tabela 3 - Composição de aminoácidos da parte aérea (folha e caule) da <i>Salicornia bigelovii</i> Torr. ....	39
Tabela 4 - Conteúdo de minerais da parte aérea (folha e caule) da <i>Salicornia persica</i> e <i>Sarcocornia fruticosa</i> .....	41

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Percentagem média relativa dos elementos químicos detectados, nos tecidos de <i>Sarcocornia ambigua</i> (região A e B), por meio de microanálise com EDX- MEV.....	75
---	----

### CAPÍTULO 3

Table 1 - Operating parameters for analysis in positive MRM mode of the polyphenolic compounds. ....	91
Table 2 - Nutrient composition of <i>Sarcocornia ambigua</i> collected from two different regions in state Santa Catarina, Brazil .....	93
Table 3 - Fatty acids profile (%) from lipid fraction of <i>S. ambigua</i> samples .....	96
Table 4 - Some figures of merit of the method applied. ....	99
Table 5 - Identification and quantification of phenolic compounds in <i>S. ambigua</i> .....	100
Table 6 - Availability of the antioxidant activity (AA) .....	102

### CAPÍTULO 4

Table 1 - Operating parameters of ICP-MS. ....	110
--	-----

Table 2 - Mineral contents recovered from bioaccessibility assay of certified reference material, LOD and LOQ of method. .... 114

Table 3 - Total concentrations, in  $\mu\text{g g}^{-1}$  (except where noted), and the bioaccessible fractions (BF %) of minerals of *S. ambigua* samples (n=3; *t*-student applied for 95% confidence level; *t* = 4.30 for the group of results)..... 115

Table 4 - Bioaccessible fractions of minerals, in  $\mu\text{g g}^{-1}$  (except where noted), and the coverage of Recommended Dietary Allowances – RDAs (in %) related to the daily consumption of 2 g of dried and milled *S. ambigua* samples (herbal salt) (n=3; *t*-student applied for 95% confidence level; *t* = 4.30 for the group of results). ....

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAC</b>	Coeficiente de atividade antioxidante
<b>AAS</b>	Do Inglês - <i>Atomic absorption spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica)
<b>AGE</b>	Ácidos Graxos Essenciais
<b>AI</b>	Do Inglês - <i>Adequate intake</i> (Ingestão adequada)
<b>BGE</b>	Do Inglês - <i>Background electrolyte</i> (Eletrólito de corrida)
<b>CE-OOH</b>	Hidroperóxido de éster de colesterol
<b>CS</b>	Do Inglês - <i>Crude polysaccharides</i>
<b>DAD</b>	Do Inglês - <i>Diode array detector</i> (Detector de arranjo de diodos)
<b>DI</b>	Diâmetro Interno
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>EAG</b>	Equivalentes a ácido gálico
<b>EAR</b>	Do Inglês - <i>Estimated average requirement</i> (Necessidade média estimada)
<b>ET AAS</b>	Do Inglês - <i>Electrothermal atomic absorption spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica)
<b>FAAS</b>	Do Inglês - <i>Flame atomic absorption spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica em chama)
<b>FAME</b>	Do Inglês - <i>Fatty acid methyl ester</i> (Ésteres metílicos de ácido graxo)
<b>FID</b>	Do Inglês - <i>Flame ionization detector</i> (Detector de ionização de chama)
<b>FRAP</b>	Do Inglês - <i>Ferric reducing antioxidant potential</i> (Potencial antioxidante redutor férrico)
<b>GAE</b>	Do Inglês - <i>Gallic acid equivalent</i> (Equivalente em ácido gálico)
<b>HPLC</b>	Do Inglês - <i>High performance liquid chromatography</i> . (Cromatografia líquida de alta eficiência)
<b>ES</b>	Do Inglês - <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i> (Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado)
<b>ICP MS</b>	Do Inglês - <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)

<b>ICP OES</b>	Do Inglês - <i>Inductively coupled plasma optical emission</i> (Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)
<b>IL-1b</b>	Interleucina-1b
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>LCM</b>	Laboratório de camarões marinhos
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MF</b>	Matéria fresca
<b>MMP</b>	Metaloproteinases da Matriz
<b>MUFA</b>	Do Inglês - <i>Monounsaturated fatty acids</i> (Ácidos graxos monoinsaturados)
<b>NMR</b>	Do Inglês: <i>Nuclear magnetic resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>POS</b>	Do Inglês - <i>Purified polysaccharides</i>
<b>PTFE</b>	Poli-tetrafluoretileno
<b>PUFA</b>	Do Inglês - <i>Polyunsaturated fatty acids</i> (Ácidos graxos polinsaturados)
<b>RDA</b>	Do Inglês: <i>Recommended dietary allowance</i> (Ingestão dietética recomendada)
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SFA</b>	Do Inglês - <i>Saturated fatty acids</i> (Ácidos graxos saturados)
<b>t-BOOH</b>	Hidroperóxido de terc-butila
<b>TEAC</b>	Do Inglês - <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox)
<b>TNF-a</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tri(2 piridil)-1,3,5-triazina
<b>UL</b>	Do Inglês - <i>Upper intake level</i> (Nível superior tolerável de ingestão)

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>30</b>
1.1 Considerações gerais sobre halófitas da família Amaranthaceae e seus gêneros.....	30
1.1.1 Aspectos taxonômicos e botânicos da <i>Sarcocornia ambigua</i> ....	33
1.1.2 Composição centesimal das espécies dos gêneros <i>Salicornia</i> e <i>Sarcocornia</i> .....	37
1.1.3 Compostos bioativos e propriedades farmacológicas e funcionais das espécies do gênero <i>Salicornia</i> .....	42
1.2 Métodos utilizados para avaliação da atividade antioxidante.....	47
1.2.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) .....	48
1.2.2 Método do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) .....	49
1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC ESI-MS/MS).....	50
1.4 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) .....	52
1.5 Microscopia em alimentos .....	55
1.5.1 Microscopia de fluorescência.....	56
1.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	57
<b>CAPÍTULO 2 – ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROANÁLISE QUÍMICA DA PARTE AÉREA DE <i>Sarcocornia ambigua</i> (Amaranthaceae)</b> .....	<b>59</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>62</b>
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	<b>64</b>
2.2 Caracterização histológica da parte aérea de <i>S. ambigua</i> por microscopia óptica de fluorescência.....	64
2.3 Análise ultraestrutural e microanálise química da parte aérea de <i>S. ambigua</i> com energia dispersiva de raios-x em microscopia eletrônica de varredura (EDX-MEV).....	65
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	<b>66</b>
<b>4. Conclusão</b> .....	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 3 - NUTRIENT COMPOSITION AND, IDENTIFICATION/QUANTIFICATION OF MAJOR PHENOLIC COMPOUNDS IN <i>Sarcocornia ambigua</i> (Amaranthaceae) USING HPLC-ESI-MS/MS</b> .....	<b>83</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>85</b>

<b>2. Materials and methods</b> .....	<b>86</b>
2.1 Plant material.....	86
2.2 Chemical reagents.....	87
2.3 Sample preparation .....	87
2.4 Chemicals analysis.....	88
2.5 Fatty acids composition.....	88
2.6 Mineral analysis.....	89
2.6.1 Sample preparation .....	89
2.7 Isolation and purification of phenolic compounds .....	90
2.7.1 Identification and quantification of phenolic compounds by HPLC–ESI-MS/MS.....	90
2.8 Procedure to determine antioxidant activity (AA) .....	92
2.8.1 Extract preparation.....	92
2.8.2 DPPH radical scavenging activity assay.....	92
2.8.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.....	92
2.9 Statistical analysis.....	93
<b>3. Results and discussion</b> .....	<b>93</b>
3.1 Chemical analysis .....	93
3.2 Major minerals.....	94
3.3 Fatty acids profile .....	95
3.4 Characterization of phenolic compounds isolated by HPLC-ESI- MS/MS.....	97
3.5 Antioxidant activity (AA).....	101
<b>4. Conclusions</b> .....	<b>103</b>
<b>CAPÍTULO 4 - DETERMINATION OF MINERAL COMPOSITION IN <i>Sarcocornia ambigua</i> (AMARANTHACEAE) USING ICP-MS AND EVALUATION OF BIOACCESSIBILITY USING AN <i>IN VITRO</i> DIGESTION SYSTEM.....</b>	<b>105</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>107</b>
<b>2. Materials and methods</b> .....	<b>109</b>
2.1 Samples .....	109
2.2 Chemicals and reagents.....	109
2.3 Instrumentation .....	109
2.4 Sample preparation .....	110
2.5 Determination of mineral content by ICP-MS .....	110
2.6 Determination of <i>in vitro</i> mineral bioaccessibility after <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion.....	111
2.6.1 Preparation of gastric and intestinal solutions .....	111
2.6.2 Gastrointestinal digestion .....	111
2.6.3 Intestinal digestion.....	112
2.7 Digestion of residues.....	112

2.8	Calculation of bioaccessibility (%) .....	112
2.9	Statistical analysis .....	112
<b>3.</b>	<b>Results and discussion .....</b>	<b>113</b>
3.1	Multielemental analysis .....	113
3.2	Total concentration and the bioaccessible fractions (BF %) of minerals of <i>S. ambigua</i> samples.....	115
3.3	Bioaccessible minerals fractions of <i>S. ambigua</i> samples and its contribution to RDAs .....	117
<b>4.</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>120</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>123</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>125</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>147</b>





## INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o uso de produtos naturais demonstrou ser uma alternativa para tratamento, cura ou prevenção de doenças. Por muitos anos, os produtos de origem vegetal, animal e mineral foram as principais fontes de recurso terapêutico disponível ao homem e, nas últimas décadas, o ser humano tem manifestado interesse crescente pelo seu bem-estar e qualidade de vida (GURIB FAKIM, 2006).

Pelo fato dos produtos de origem vegetal serem fonte valiosa de nutrientes e de outros compostos químicos, principalmente do metabolismo secundário, conhecidos como fitoquímicos, novos estudos têm motivado a comunidade científica a procurar e identificar estas substâncias, as quais apresentam atividade antioxidante com propriedades benéficas para o corpo humano (HEO et al., 2007; FARAH; DONANGELO, 2006; KARAKAYA, 2004).

Sob essa perspectiva, grande interesse vem surgindo no estudo das halófitas dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia*, pelo seu potencial como alimento funcional, devido à presença de diversos nutrientes e compostos bioativos (BUHMANN; PAPENBROCK, 2013; VENTURA et al., 2011; JANG et al., 2007; JEONG et al., 2004; LEE et al., 2002).

Entre os compostos bioativos com propriedades terapêuticas encontradas nessas espécies, merecem destaque os compostos fenólicos. Estes vêm sendo objeto de estudo em função das suas potenciais propriedades antioxidantes, as quais podem resultar em diferentes atividades biológicas como: atividade anti-inflamatória, antineoplásica e antitrombótica (LEE et al., 2007; PARK et al., 2006; LEE et al., 2005; CHA et al., 2004; MIN et al., 2002).

No Brasil, especificamente no estado de Santa Catarina (SC) foi encontrada a ocorrência da espécie *Sarcocornia ambigua* Michx. (sin.: *Salicornia gaudichaudiana* Moq.) no município de Palhoça (SC), na Barra do Aririú (Latitude 27° 40' 54.76" S, Longitude 48° 38' 19.63" O), e no município de Florianópolis, na Praia da Daniela (Latitude 27°26'39" S, Longitude 48°31'26" O).

Pesquisas internacionais realizadas com espécies da família Amaranthaceae pertencentes aos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* (*Salicornia herbacea*; *Salicornia bigelovii*; *Salicornia brachiata*, *Salicornia persica*, *Sarcocornia fruticosa*, *Sarcocornia decussata*), objeto deste estudo, têm sido exploradas em seus aspectos taxonômicos, fitogeográficos, fitoquímicos e também em sua prospecção como cultura comercial (BERTIN et al., 2014; PARIDA; JHA, 2010; STEFFEN et al., 2009; ALONSO; CRESPO, 2008; MARTINS; FERREIRA; VALE,

2008; KADEREIT; MUCINA; FREITAG, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado várias técnicas de cultivo promissoras para a agricultura tradicional, com vistas a melhorar a composição nutricional e o potencial antioxidante, aumentar a produção de biomassa fresca, e prospectar amplamente a cultura biosalina de *Salicornia* e *Sarcocornia* para o consumo (VENTURA; SAGI, 2012; VENTURA et al., 2011; PARIDA; JHA, 2010; COSTA, 2006).

Para fins de consumo humano, a *Salicornia* foi introduzida no mercado Europeu como um vegetal fresco “desfolhado” e semelhante ao aspargo verde. Na Itália e na França, a parte aérea de *S. herbacea* tem sido utilizada como ingrediente no vinagre, e na Coreia é consumida como tempero de legumes e como salada (KIM et al., 2011). Além disso, as plantas jovens e suculentas têm se destacado na alta gastronomia, não só pelo seu sabor salgado, mas por seu elevado valor nutricional.

Atualmente *S. bigelovii* é cultivada especialmente para fins comerciais para atender o mercado de produtos frescos dos Estados Unidos e da Europa (AGAWU, 2012). Entretanto, cabe destacar que pouca atenção tem sido dada a espécie *Sarcocornia ambigua* encontrada no Brasil, e que a escassez de informações científicas tem sido um obstáculo para prospectar o cultivo comercial da planta nesta região.

Diante ao exposto, pelo fato da *S. ambigua* estar sendo recentemente estudada no Brasil, pela diversidade estrutural dos constituintes químicos (vitaminas, minerais e compostos bioativos), complexidade taxonômica, e pela importância alimentícia e medicinal, mais estudos necessitam ser encorajados com vistas a explorar o valor nutricional, funcional e farmacêutico da *S. ambigua*.

Neste contexto, reconhece-se que pouca atenção tem sido dada às espécies encontradas no Brasil. Todavia, Santa Catarina, e em particular Florianópolis, por ser uma região costeira privilegiada, e com potencial para prospectar o cultivo comercial da planta, motivou o desenvolvimento desta pesquisa, a fim de expandir o conhecimento da espécie *S. ambigua*, por meio da caracterização da composição de nutrientes, dos compostos bioativos, do perfil de atividade antioxidante e do conhecimento de suas estruturas anatômicas.

A presente pesquisa é apresentada na forma de capítulos, com os seguintes enfoques:

#### Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

Este capítulo apresenta considerações gerais sobre halófitas da família Amaranthaceae e seus gêneros, os aspectos taxonômicos e botânicos de *S. ambigua*, além da composição centesimal das espécies dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia*. Ademais, apresenta uma revisão

sobre os compostos bioativos, e propriedades farmacológicas e funcionais das mesmas.

Capítulo 2: Análise histológica e microanálise química da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae).

Este capítulo contempla o estudo das estruturas anatômicas da parte aérea (bainha foliar e caule) de duas amostras de *S. ambigua*, por microscopia óptica de fluorescência, bem como, a microanálise química por energia dispersiva de raios-X em microscopia eletrônica de varredura (EDX-MEV).

Capítulo 3: Composição nutricional, identificação/quantificação dos compostos fenólicos majoritários presentes em *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) pelo método HPLC-ESI-MS/MS.

Este capítulo apresenta a composição nutricional com determinação de proteínas, lipídios, carboidratos, fibras, perfil de ácidos graxos e minerais majoritários de duas amostras de *S. ambigua*, oriundas de duas regiões distintas localizadas na Grande Florianópolis, além de apresentar a atividade antioxidante e a identificação/quantificação dos compostos fenólicos majoritários pelo método HPLC-ESI-MS/MS.

Capítulo 4: Determinação da composição mineral presente na *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae), pelo método ICP-MS, e avaliação da bioacessibilidade por meio do sistema de digestão *in vitro*.

O último capítulo deste trabalho apresenta as concentrações dos minerais de interesse nutricional de duas amostras de *S. ambigua*, determinadas por ICP-MS, e a fração bioacessível dos minerais por meio do modelo de digestão *in vitro*, e sua contribuição para atender a ingestão dietética recomendada (Recommended Dietary Allowances – RDAs).

Finalizando, a pesquisa desenvolvida apresenta algumas considerações finais a respeito do objeto de estudo, e perspectivas de trabalhos com vistas à ampliação e construção do conhecimento e, por fim, nos anexos estão expostos os certificados dos trabalhos apresentados em alguns Congressos da Área de Ciência dos Alimentos e da Botânica.



## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Considerações gerais sobre halófitas da família Amaranthaceae e seus gêneros

Plantas halófitas (Grego hal = sal, phyton = planta) ou halofíticas podem ser definidas como plantas superiores vasculares (angiospermas) que apresentam tolerância, e realizam seu ciclo de vida em ambientes com elevada concentração salina (100 a 500 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) (FLOWERS; COLMER, 2008). Por serem organismos altamente evoluídos e especializados, com características morfológicas, anatômicas, fisiológicas bem adaptáveis, geralmente se desenvolvem na região litorânea, onde ocorre uma estreita faixa arenosa entre a zona das marés e as dunas, a qual é frequentemente inundada pela água salgada, pela ação das ondas e pelo vento (BOEGER; GLUZEZAK, 2006).

Devido às condições ambientais estressantes, as quais as halófitas estão sujeitas (baixa disponibilidade de matéria orgânica, submersão periódica, drenagem rápida da água, luz solar direta e intensa, e inundação com água salina), algumas adaptações bioquímicas podem ser utilizadas para sobreviverem ao ambiente hostil, característico dos solos submetidos a efluentes salinos nas regiões costeiras tropicais e subtropicais (BOEGER; GLUZEZAK, 2006; SILVA, 2000).

É importante destacar entre as adaptações, o acúmulo seletivo ou exclusão de íons para que ocorra ajuste osmótico, controle de absorção de íons pelas raízes e transporte às folhas, compartimentalização de íons em nível celular e também na planta integral, mudança na via fotossintética, alteração na estrutura da membrana, e indução de enzimas antioxidantes e hormônios vegetais (AGAWU, 2012; PARIDA; DAS, 2005).

O “stress” salino nas halófitas é provocado fundamentalmente por sais de sódio, em particular pelo cloreto de sódio. Desta forma, as plantas são expostas a este meio, e o equilíbrio osmótico é uma resposta de adaptação fundamental das células vegetais para a sobrevivência, fazendo com que acumulem sais nas suas folhas, em concentrações iguais as da água do mar, sem prejuízo para seu desenvolvimento e crescimento. Em média, mais de 90% do sódio das halófitas encontra-se na porção aérea e, deste total, 80% nas folhas (FLOWERS et al., 1977).

Entretanto, existe um limite para a tolerância à salinidade, que corresponde a um nível no qual o crescimento dessas plantas não será mais possível, e que pode variar desde concentrações muito baixas, a níveis superiores de salinidade da água do mar. A razão fisiológica para a diminuição do crescimento da planta pode estar relacionada com este

aumento de salinidade e/ou ao fato das plantas pertencerem a diferentes grupos taxonômicos e, por isso, possuem diferentes mecanismos de adaptação à salinidade (FLOWERS; COLMER, 2008).

A capacidade das halófitas sobreviverem em presença de grande quantidade de sal é de suma importância para a distribuição ecológica das plantas e para a agricultura, pois amenizam as condições físico-químicas, as trocas na salinidade e geoquímica do sedimento, de modo possibilitar a ocupação de áreas entre-marés antes inóspitas, por espécies menos tolerantes a estresses ambientais (DAVY et al., 2001).

Sob essa perspectiva, o uso de halófitas pode ser uma alternativa para tornar áreas antes improdutivas (solos salinos) em produtivas, podendo se destacar na agricultura como uma nova oportunidade de modelo agrícola (halocultura ou cultura biosalina), além de fornecer um retorno econômico para os produtores, como matéria verde para alimentação de rebanhos, ou mesmo para alimentação humana (YENSEN, 2000; GLEN; BROWN; O'LEARY, 1998).

Recentemente, o cultivo de halófitas tem sido combinado com o cultivo de camarões e peixes marinhos, porquanto os nutrientes oriundos dos efluentes destes cultivos podem servir para irrigar e fertilizar estas plantas. Além disso, estes efluentes reduzem os contaminantes descartados no meio ambiente (COSTA, 2006; PORTO et al., 2006).

Existem segundo Yensen (2000), aproximadamente 10.000 plantas tolerantes ao sal, e aproximadamente 250 espécies de halófitas com potencial de produção agrícola, que podem ser utilizadas em solos salinizados. Entre as halófitas que possuem elevado potencial agrônômico, ou podem se tornar uma importante cultura comercial, destacam-se as espécies dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* pertencentes à família Amaranthaceae (YENSEN; BEDELL, 1993).

A família Amaranthaceae foi estabelecida em 1789 por A. J. Jussieu (SIQUEIRA, 1995), e de acordo com a classificação filogenética e molecular, pertence à ordem Caryophyllales, é constituída por 169 - 180 gêneros, e cerca de 2.360 - 2.500 espécies (JUDD et al., 2002; RIBEIRO et al., 1999). Esta família possui distribuição cosmopolita, exceto nas regiões mais frias do hemisfério Norte, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e África, tendo por característica viver em habitats perturbados, áridos ou salinos, sendo que várias espécies são consideradas pioneiras e crescem principalmente em áreas úmidas com solo areno-argiloso (SOUZA; LORENZI, 2008; JUDD et al., 2002).

Os representantes da família possuem hábito variado, de ocorrência anual ou perene. Predominantemente apresentam-se na forma de ervas,

subarbustos, arbustos lenhosos ou suculentos, raramente de grande dimensão, com nós dos caules que se apresentam intumescidos. As folhas podem ser alternas ou opostas, espiraladas, normalmente inteiras, por vezes suculentas e sem estípulas. Suas flores são muito pequenas, envolvidas por pequenas folhas modificadas (brácteas) com 3 a 5 tépalas de cores pouco íntensas, e suas inflorescências são muito densas, terminais ou axiais (AGUIAR, 2012).

A partir de estudos de filogenia baseados em caracteres moleculares e morfológicos, as famílias Amaranthaceae e Chenopodiaceae consideradas duas famílias distintas passaram a pertencer a uma única família Amaranthaceae (inc. Chenopodiaceae) (SOUZA; LORENZI, 2008; JUDD et al., 2002). No Brasil, são encontradas 145 espécies da família, distribuídas em 19 gêneros, sendo que 71 dessas espécies são advindas de diferentes regiões e biomas brasileiros (MARCHIETTO et al., 2005).

Pesquisas internacionais realizadas com espécies da família Amaranthaceae pertencentes aos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* (*Salicornia herbacea*; *Salicornia bigelovii*; *Salicornia brachiata*, *Salicornia persica*, *Sarcocornia fructicosa*, *Sarcocornia decussata*, *Sarcocornia andina*), objeto desta pesquisa, têm sido exploradas em seus aspectos taxonômicos, fitogeográficos, fitoquímicos, e também em sua prospecção como cultura comercial (PARIDA; JHA, 2010; STEFFEN et al., 2009; ALONSO; CRESPO, 2008; MARTINS; FERREIRA; VALE, 2008; KADEREIT; MUCINA; FREITAG, 2006).

Cabe destacar que existe grande interesse na utilização das plantas dos gêneros *Sarcocornia* e *Salicornia* como fonte de alimento funcional, devido seu elevado valor nutricional que inclui proteínas, carboidratos, fibras, minerais e vitaminas antioxidantes (VENTURA et al., 2011; JANG et al., 2007; JEONG et al., 2004; LEE et al., 2002).

*Salicornia* para fins de consumo humano foi introduzida no mercado Europeu como um vegetal fresco “desfolhado” semelhante ao aspargo verde. Na Itália e na França, a parte aérea de *S. herbacea* tem sido utilizada como ingrediente no vinagre, e na Coreia é consumida como tempero de legumes e como salada (KIM et al., 2011). Além disso, as plantas jovens e suculentas têm se destacado na alta gastronomia, não só pelo seu sabor salgado, mas por seu elevado valor nutricional. Atualmente, a *S. bigelovii* é cultivada especialmente para fins comerciais, para atender o mercado de produtos frescos dos Estados Unidos e da Europa (AGAWU, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado várias técnicas de cultivo promissoras para a agricultura tradicional, com vistas a melhorar a



composição nutricional, o potencial antioxidante, aumentar a produção de biomassa fresca, e prospectar amplamente a cultura biosalina de *Salicornia* e *Sarcocornia*, utilizando, para isso, o cultivo com irrigação da própria água do mar, com diferentes concentrações de soluções salinas ou com efluentes do cultivo do camarão (VENTURA; SAGI, 2012; VENTURA et al., 2011; PARIDA; JHA, 2010; COSTA, 2006).

No Brasil, alguns trabalhos com a espécie *Salicornia gaudichaudiana* foram realizados por Costa e Neves (2006) no município de Rio Grande (RS) para determinar concentrações foliares de “clorofila a”, e dos pigmentos absorventes de radiação UV-B em diferentes condições de exposição à radiação e à salinidade.

Costa (2006) no Ceará na cidade de Aracati (Ceará) verificou a viabilidade do cultivo/domesticação da espécie *Salicornia gaudichaudiana*, a partir da irrigação com efluente da carcinicultura marinha (cultivo do camarão). Em trabalhos mais recentes, Izeppi (2011) avaliou o efeito da densidade de plantio na sobrevivência, desenvolvimento e produção de biomassa da *Sarcocornia ambigua* em canteiros construídos na Estação Marinha de Aquacultura (EMA) no Rio Grande (RS), e D’oca e colaboradores (2012), determinaram a composição de ácidos graxos de sementes de *Sarcocornia ambigua* coletadas em um campo experimental da zona costeira do Rio Grande (RS).

Diante ao exposto, a pesquisa com os gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* (Amaranthaceae) torna-se relevante pela diversidade estrutural dos constituintes químicos (vitaminas, minerais e compostos bioativos), complexidade taxonômica, e pela importância alimentícia e medicinal, com efeitos biológicos e fisiológicos comprovados sobre a saúde, que incluem atividade antioxidante, antineoplásica, anti-inflamatória, antitrombótica e antimicrobiana (LEE et al., 2007; PARK et al., 2006; LEE et al., 2005; CHA et al., 2004; MIN et al., 2002).

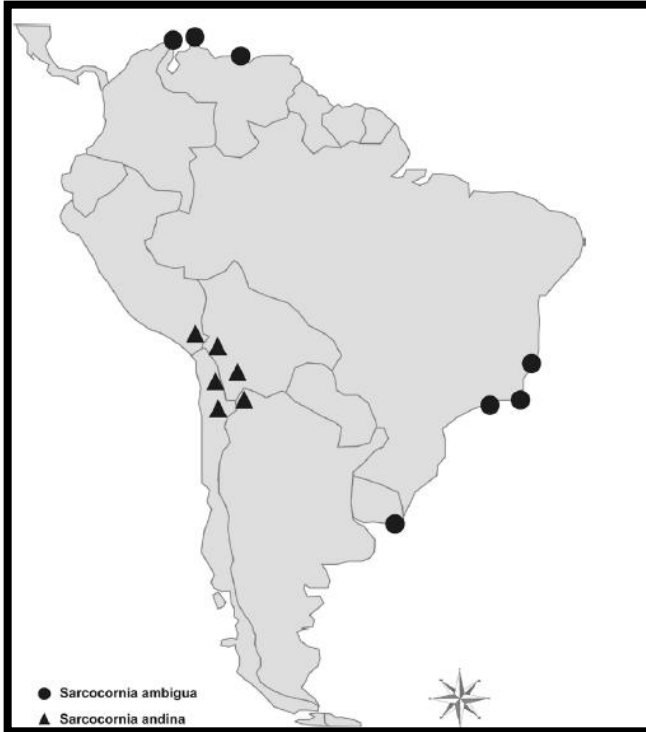
Cabe destacar, que pouca atenção têm sido dada a espécie *Sarcocornia ambigua* encontrada no Brasil, e que a falta de informações científicas, referente à composição química, perfil da atividade antioxidante, identificação de compostos bioativos, e efeito terapêutico para saúde, têm sido um obstáculo para prospectar o cultivo comercial da planta em nossa região.

### **1.1.1 Aspectos taxonômicos e botânicos da *Sarcocornia ambigua***

A espécie perene *Salicornia gaudichaudiana* de ocorrência natural na América do Sul está amplamente distribuída nas costas temperadas e

tropicais do Brasil, Uruguai até o Sul de *Mar del Plata* na Argentina (**Figura 1**). Entretanto, a taxonomia e nomenclatura desta espécie foi atualizada e, atualmente, passou a ser reconhecida como *Sarcocornia ambigua* (sin.: *Salicornia gaudichaudiana*) (Alonso e Crespo, 2008).

**Figura 1** - Área de ocorrência natural das espécies *Sarcocornia ambigua* e *Sarcocornia andina* na América do Sul.



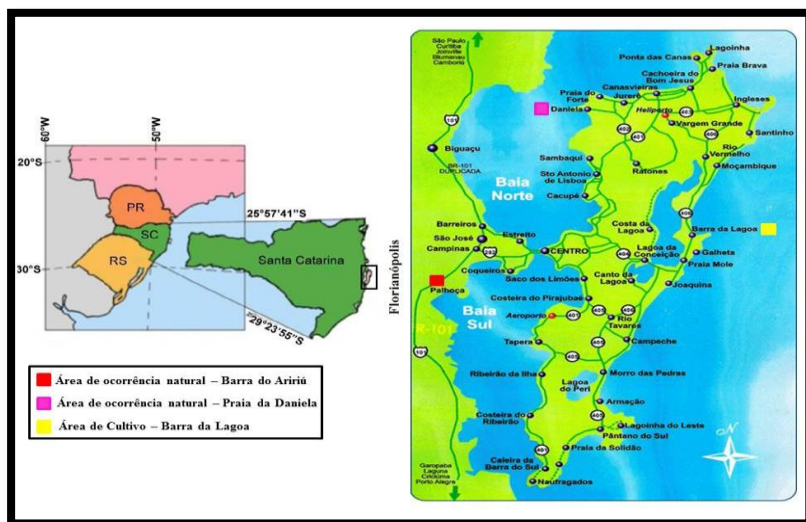
Fonte: Alonso; Crespo (2008).

Embora algumas revisões taxonômicas internacionais não confirmem a ocorrência da *S. ambigua* no estado de Santa Catarina (SC), e tampouco tenham sido levantados dados consistentes sobre os aspectos fitogeográficos da espécie no estado, apenas duas (2) áreas de ocorrência natural foram localizadas na Grande Florianópolis (Figura 2): uma (1) área de ocorrência está situada no município de Palhoça (SC) na Barra do Aririú (Latitude 27° 40' 54.76" S, Longitude 48° 38' 19.63" O), e a outra no município de Florianópolis, na Praia da Daniela (Latitude 27°26'39"

S, Longitude 48°31'26" O).

Além dessas duas áreas de ocorrência, foi encontrado também no município de Florianópolis na Barra da Lagoa (Latitude 27° 34' 33" S, Longitude 48° 26' 33" O) um pequeno “cultivo experimental” de *S. ambigua*, integrado ao cultivo de camarão, no qual as plantas são irrigadas com água do mar, e adubadas com lodo drenado dos decantadores utilizados no cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei*. Este cultivo experimental foi prospectado por uma equipe do Laboratório de Camarões Marinhos - LCM da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (**Figura 2**).

**Figura 2** - Área de ocorrência natural e de cultivo da espécie *Sarcocornia ambigua* na Ilha de Santa Catarina –SC.



Fonte: Adaptado de Silva e Filho (2010).

No Brasil, não existe uma denominação popular para *Salicornia/Sarcocornia*, e nem registros do seu uso, mas na França, Inglaterra, Estados Unidos e Austrália é chamada de “herbe de Saint Pierre”, “samphire”, “glasswort”, “saltwort”, “pickleweed”, “poorman’s asparagus” ou “sea asparagus” (aspargo marinho) (COSTA, 2006), e na Argentina é conhecida popularmente como “jume” (CELSI; MONSERRAT, 2005).

*Sarcocornia ambigua* (**Figura 3**), pertence à classe Embryopsida, subclasse Magnoliidae, à ordem Caryophyllales, à família

Amaranthaceae, a subfamília Salicornioideae, ao gênero *Sarcocornia* e à espécie *Sarcocornia ambigua* (TROPICOS, 2012), que possui ocorrência perene, de ampla distribuição nas costas temperadas e tropicais das Américas, tolera variações climáticas, porém, se desenvolve melhor em regiões de clima temperado e subtropical. Por ter ciclo de vida perene, a *S. ambigua* é capaz de sobreviver por vários anos, propagando-se através de sementes ou por crescimento vegetativo, vez que os caules são capazes de rebrotamento após a poda (COSTA; NEVES, 2006).

Apresenta-se na forma de haste (caule) suculenta com altura máxima de 50 cm, ereta ou decumbente, de forma cilíndrica e segmentada, correspondendo a pares de folhas fusionadas sobre a haste. Podem apresentar hastes de cores verde e avermelhadas, estas últimas devido à presença de betacianina (ALONSO; CRESPO, 2008; COSTA, 2006). As folhas possuem vértice arredondado a subagudo. Possui estruturas florais reduzidas, com inflorescências (150 x 4 mm) dispostas em um ponto terminal no ápice das brácteas. Suas sementes possuem diâmetro de 1,4 x 0,9 mm, e são cobertas em seus bordos por tricomas (50 a 95  $\mu\text{m}$ ). O sistema radicular produz poucas ramificações e tende a ser superficial, muitas vezes penetrando menos de 10 - 20 cm no solo (ALONSO; CRESPO, 2008).

**Figura 3** – Imagem da *Sarcocornia ambigua* (parte aérea da planta - caule e folha).



Fonte: Fotografia de acervo do autor (2012).

### 1.1.2 Composição centesimal das espécies dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia*

As investigações científicas relativas à composição química das halófitas dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* são recentes, e pesquisas têm mostrado que variações podem ocorrer, devido à influência de alguns fatores como: espécie, sazonalidade, localização geográfica de ocorrência, clima, tipo de solo e presença de agentes estressores como luz e frequência/duração de inundação pela água salgada (VENTURA et al., 2011; GHOSH; LU et al., 2010; SCHEEPENS, 2009; CONFORTI et al., 2008; MIN et al., 2002).

Em relação à composição centesimal, Lu e colaboradores (2010) verificaram na parte aérea da *Salicornia bigelovii* Torr, um elevado teor de umidade, representando 88,42% (massa fresca) da composição centesimal da planta, seguido do carboidrato (4,48%), cinzas (4,36%), proteína (1,54%), fibras (0,83%) e, por último, os lipídios totais representando 0,37% da composição da planta.

Resultados semelhantes foram encontrados por Min e colaboradores (2002) ao avaliarem a composição centesimal das diferentes partes da *Salicornia herbacea* (folha, caule e raiz) (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Composição centesimal de *Salicornia herbacea*

<b>Determinações</b>	<b>Folha</b>	<b>Caule</b>	<b>Raiz</b>
Umidade	90,9	73,9	66,2
Proteína Total	1,7	2,0	2,0
Lipídio Total	0,2	0,3	0,3
Cinzas	4,7	6,1	6,2

Legenda: Valores expressos em % de matéria fresca (MF).

Fonte: Min e colaboradores (2002).

No estudo realizado por Ventura et al. (2011) os valores de proteína encontrados são superiores aos citados por Lu et al. (2010) e Min (2002), sendo que na *Salicornia persica* e *Salicornia fruticosa*, o conteúdo de proteína representa 2,53% e 3,59% em massa fresca, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Agawu (2012), o qual avaliou o conteúdo total de proteína da parte aérea e da raiz de dois ecótipos (variedade vegetal geneticamente adaptada) de *Salicornia persica* denominados de RN e N, bem como, de dois ecótipos de *Sarcocornia fruticosa* denominados de VM e EL, cultivadas com diferentes concentrações de NaCl (0 a 500 mmol L<sup>-1</sup>). O autor verificou que, de um modo geral, para todas as espécies, o teor de proteína solúvel foi maior na parte aérea (1,20 a 4,66 mg g<sup>-1</sup> MF), e menor nas raízes (0,22 a 1,64 mg g<sup>-1</sup> MF), e que houve diminuição do conteúdo de proteína de acordo com o aumento da concentração de NaCl (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre o conteúdo de proteína na parte aérea e raiz de espécies de *Salicornia* (RM e N) e *Sarcocornia* (VM e EL)

Partes da Planta	NaCl (mmol L <sup>-1</sup> )	Espécies de <i>Salicornia</i>		Espécies de <i>Sarcocornia</i>	
		RN	N	VM	EL
Parte Aérea	0	2,8 ± 0,12 <sup>c</sup>	3,4 ± 0,19 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,18 <sup>cd</sup>
	100	1,9 ± 0,05 <sup>efg</sup>	2,1 ± 0,04 <sup>efg</sup>	2,3 ± 0,01 <sup>de</sup>	1,7 ± 0,04 <sup>fg</sup>
	200	2,2 ± 0,07 <sup>ef</sup>	1,8 ± 0,16 <sup>efg</sup>	2,4 ± 0,04 <sup>cd</sup>	1,6 ± 0,12 <sup>gh</sup>
	500	2,1 ± 0,09 <sup>efg</sup>	1,7 ± 0,06 <sup>fg</sup>	2,9 ± 0,05 <sup>bc</sup>	1,2 ± 0,09 <sup>h</sup>
Raiz	0	0,8 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,07 <sup>cd</sup>
	100	0,4 ± 0,05 <sup>fg</sup>	0,2 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,8 ± 0,05 <sup>cd</sup>	0,8 ± 0,02 <sup>cd</sup>
	200	0,6 ± 0,05 <sup>def</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>fg</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>ef</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>fg</sup>
	500	0,5 ± 0,06 <sup>ef</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>efg</sup>	0,5 ± 0,04 <sup>def</sup>	0,4 ± 0,05 <sup>fg</sup>

Legenda: Resultados expressos em mg g<sup>-1</sup> de MF

Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa (p < 0,05)

Fonte: Agawu (2012)

Em relação ao conteúdo total e a composição de aminoácidos, Lu e colaboradores (2010) verificaram em *S. bigelovii*, um conteúdo total de 10,86 g kg<sup>-1</sup> MF, e uma composição bem diversificada (**Tabela 3**), com predomínio do ácido glutâmico (1,63 g kg<sup>-1</sup>), asparagina (1,16 g kg<sup>-1</sup>) e leucina (0,94 g kg<sup>-1</sup>).

**Tabela 3** - Composição de aminoácidos da parte aérea (folha e caule) da *Salicornia bigelovii* Torr.

Aminoácidos	Conteúdo	Aminoácidos	Conteúdo
Asparagina	1,16 ± 0,02	Cisteína	0,03 ± 0,00
Ácido Glutâmico	1,63 ± 0,03	Valina	0,59 ± 0,05
Serina	0,68 ± 0,02	Metionina	0,09 ± 0,00
Histidina	0,26 ± 0,01	Fenilalanina	0,55 ± 0,01
Glicina	0,53 ± 0,01	Isoleucina	0,47 ± 0,02
Treonina	0,55 ± 0,01	Leucina	0,94 ± 0,01
Arginina	0,68 ± 0,02	Lisina	0,73 ± 0,01
Alanina	0,69 ± 0,02	Prolina	0,83 ± 0,10
Tirosina	0,44 ± 0,01	<b>Total</b>	10,86

Legenda: Resultados expressos em g kg<sup>-1</sup> de MF

Fonte: Lu e colaboradores (2010)

Resultados semelhantes foram encontrados por Min e colaboradores (2002) ao determinarem o conteúdo de aminoácidos totais que constituem *S. herbacea*. Os autores identificaram 18 aminoácidos que

variaram de acordo com as diferentes partes da planta (folha, caule e raiz), e verificaram maior concentração de aminoácidos na raiz, num total de 156,9 mg g<sup>-1</sup>, com predomínio do ácido glutâmico (183,3 mg g<sup>-1</sup>), seguido da lisina (178,9 mg g<sup>-1</sup>), do ácido aspártico (165,5 mg g<sup>-1</sup>) e leucina (128,4 mg g<sup>-1</sup>), e que o perfil de aminoácidos encontrados se assemelha ao de outros vegetais frescos.

No que se refere ao conteúdo de lipídios encontrados para *S. herbacea* e *S. bigelovii*, mesmo apresentando um conteúdo relativamente baixo, o perfil de ácidos graxos encontrados tanto nas sementes como na parte aérea da planta apresentam uma boa qualidade nutricional. D'Oca et al. (2012) ao avaliarem a composição de ácidos graxos de sementes da *Sarcocornia ambigua* cultivada no Brasil, verificaram que o óleo é composto majoritariamente por ácidos graxos polinsaturados - PUFA (68%) e, entre estes, a predominância é do ácido linoleico (42%), seguido do ácido oléico (18,5%) e linolênico (4%). Os ácidos graxos saturados - SFA representaram 24,9 % do conteúdo total de lipídios encontrado nas sementes, com predomínio do ácido palmítico (20,4%) seguido do ácido esteárico (1,5%). De acordo com os autores o óleo da semente de *S. ambigua* poderia ser recomendado para o consumo animal ou produção de biodiesel.

De acordo com Essaidi e colaboradores (2012) a fração de ácidos graxos extraída do caule (haste) de *S. herbacea* é baixo quando comparado ao conteúdo presente nas sementes. Os autores verificaram a presença majoritária dos ácidos graxos insaturados nas sementes de *S. herbacea* (62%), com predomínio do ácido linoleico e linolênico, e os principais ácidos graxos saturados encontrados foram o ácido palmítico (17,6%), seguido pelo ácido esteárico (9,3%).

Ventura e colaboradores (2011) ao analisarem o perfil de ácidos graxos presentes na *S. persica* e *S. fruticosa*, também verificaram predomínio de ácidos graxos polinsaturados (64,85 a 75,31%), com predominância do ácido linolênico (41 a 48%), seguido pelo ácido linoleico (23,85 a 27,31%) e o principal ácido graxo saturado encontrado foi ácido palmítico (20 a 21,13%). Para os autores, ambas as espécies podem ser consideradas uma fonte alternativa de ácidos graxos polinsaturados para o consumo humano.

Em relação aos teores de minerais presentes no caule (haste) de *S. herbacea*, Essaidi e colaboradores (2012) verificaram, na matéria seca, a presença majoritária de sódio (41,05%), seguido de fósforo (3,8%), potássio (0,30%) e zinco (0,10%).

Ventura et al. (2011), ao avaliarem o cultivo de duas espécies de *S. persica* e *S. fruticosa* irrigadas com diferentes concentrações de



soluções salinas, verificaram que o conteúdo de minerais variou, e encontraram maiores conteúdos no sistema de cultivo que utilizou 100% da irrigação com efluente marinho (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Conteúdo de minerais da parte aérea (folha e caule) da *Salicornia persica* e *Sarcocornia fruticosa*

Planta	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )							
	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>
<i>S. persica</i>	3,03	15,57	1,0	0,47	1,89	0,75	0,53	29,58
<i>S. fruticosa</i>	2,86	14,98	1,23	0,63	2,27	0,44	1,06	28,46

Legenda: Resultados obtidos em MF

Fonte: Adaptado de Ventura et al. (2011).

Lu et al. (2010) ao verificarem o conteúdo de minerais na MF da *S. bigelovii*, também observaram que o mineral presente em maior quantidade foi sódio (9,98 mg g<sup>-1</sup>), seguido de potássio (1,76 mg g<sup>-1</sup>), magnésio (1,18 mg g<sup>-1</sup>) e cálcio (0,62 mg g<sup>-1</sup>). Além destes minerais, os autores quantificaram a presença de fósforo (0,18 mg g<sup>-1</sup>), ferro (0,01 mg g<sup>-1</sup>), zinco (4,05 µg g<sup>-1</sup>), cobre (0,91 µg g<sup>-1</sup>), chumbo (0,02 µg g<sup>-1</sup>) e cromo (< 0,01 µg g<sup>-1</sup>).

Parida e Jha (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de soluções salinas com cloreto de sódio (NaCl de 0 a 600 mmol L<sup>-1</sup>) no cultivo da *S. brachiata* sobre o conteúdo de sódio e potássio. Segundo os autores, o conteúdo de sódio com base na matéria seca (MS) variou de 59,2 a 189,27 mg g<sup>-1</sup>, e de potássio 9,76 a 23,12 mg g<sup>-1</sup>, demonstrando uma relação do sódio diretamente proporcional a concentração de NaCl na água, e inversamente proporcional para o potássio.

Em estudo realizado por Lee, Rhim e Kim (2009) para caracterizar um sal elaborado com *S. herbacea*, os autores verificaram que o mineral com maior solubilização na água destilada e na água marinha, respectivamente, foi o sódio (25,61 e 26,05%), seguido do magnésio (4,73 e 4,51%), potássio (1,25 e 1,33%) e em menor quantidade o cálcio (0,2 e 0,22%).

Min et al. (2002), ao avaliarem o conteúdo de minerais de *S. herbacea* verificaram maior concentração de sódio (13,3 mg g<sup>-1</sup>), potássio (7,41 mg g<sup>-1</sup>) e ferro (0,84 mg g<sup>-1</sup>) na raiz; maior concentração de cálcio (0,23 mg g<sup>-1</sup>) nas folhas, e maior concentração de magnésio (0,54 mg g<sup>-1</sup>) e zinco (0,29 mg g<sup>-1</sup>) no caule. De acordo com Willians et al. (1994), em geral estas espécies tendem a acumular maiores

concentrações de minerais nos caules do que nas folhas, e as variações no conteúdo de minerais são um reflexo dos processos de absorção e translocação desses minerais dentro da planta, e também da biodisponibilidade no solo e na água.

Diante do exposto, é possível verificar que as espécies de *S. herbacea*, *S. bigelovii*, *S. brachiata*, *S. persica*, *S. fruticosa* e *S. ambigua*, possuem quantidade apreciável de macro e micronutrientes, o que demonstra que podem ser utilizadas como fonte vegetal destes elementos.

### 1.1.3 Compostos bioativos e propriedades farmacológicas e funcionais das espécies do gênero *Salicornia*

Atualmente, as espécies do gênero *Salicornia* estão sendo valorizadas pelo seu potencial como alimento funcional, devido suas propriedades antioxidantes, e esta característica se deve ao fato da planta ser fonte de compostos bioativos. Sabe-se que com o aumento da salinidade, ocorre um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem contribuir para a modificação da integridade da membrana celular e, também, para a modificação da atividade de diferentes enzimas. Em resposta a este tipo de dano oxidativo, induzem a síntese das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase), e antioxidantes não enzimáticos (ascorbato, tocoferol, compostos fenólicos), que contribuem para o aumento dos compostos bioativos e consequentemente para o aumento da atividade antioxidante (PARIDA; DAS, 2005).

Entre os compostos bioativos com propriedades terapêuticas encontradas nessas espécies, merecem destaque os compostos fenólicos, que vem sendo objeto de estudo, face as suas propriedades antioxidantes, as quais podem resultar em diferentes atividades biológicas anti-inflamatória, antineoplásica, antitrombótica (LEE et al., 2007; PARK et al., 2006; LEE et al., 2005; CHA et al., 2004; MIN et al., 2002).

Os primeiros estudos citados na literatura para identificação e isolamento de constituintes do extrato de *S. herbacea* foram realizados por Lee e colaboradores (2004), que identificaram por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), a partir do extrato metanólico elaborado com 4 kg de planta desidratada, a presença de  $\beta$ -sitosterol (83 mg), estigmasterol (39 mg) (fitoesteróides), e isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (506 mg). Zhu e Row (2010) ao avaliarem o extrato preparado com as folhas de *S. herbacea* também verificaram a presença do fitoesterol  $\beta$ -sitosterol (0,546 mg g<sup>-1</sup>).

Kong et al. (2008) isolaram do extrato metanólico de *S. herbacea* além da isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, a quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, e verificaram o efeito inibitório destes compostos sobre a atividade das metaloproteinases da matriz (MMP - 2 e MMP - 9). Os resultados encontrados mostraram que ambos compostos em diferentes concentrações (0,5 a 10 mol L<sup>-1</sup>) reduziram a expressão e a atividade das MMP 2 e 9, sugerindo que os flavonoides glicosilados isolados de *S. herbacea* têm ação inibitória, e que possivelmente podem ser utilizados como agentes quimiopreventivos para o câncer.

Em outro estudo realizado por Kong et al. (2009), os autores também identificaram por NMR no extrato metanólico de *S. herbacea*, a isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, e verificaram a citotoxicidade do composto em células de fibrossarcoma humano (HT1080), e o efeito antioxidante pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), hidroxila e o radical alquila. Verificou-se que os três radicais exibiram efeito dose-resposta dependentes, em função da concentração do composto (0,5 a 10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), e que não foram observados efeitos citotóxicos nas células tratadas com diferentes concentrações de isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (0,5 a 10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>). Desta forma, sugeriram que o composto isolado do extrato de *S. herbacea* tem eficácia terapêutica na prevenção do dano celular induzido pelas espécies reativas de oxigênio, e pode ser utilizado como um potente antioxidante natural na prevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (KONG et al., 2009).

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Kim et al. (2009), os quais isolaram do extrato bruto de *S. herbacea* a isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, e verificaram a citotoxicidade e atividade anti-inflamatória em células da linhagem Raw 264,7 pela produção de óxido nítrico (NO), e de mediadores pró-inflamatórios. Também constataram que o tratamento das células com diferentes concentrações de isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (0 a 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) não apresentaram citotoxicidade, e diminuíram a produção de NO e da expressão das citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1B (IL-1b) e óxido nítrico sintase (iNOS). Os resultados sugerem que a isoramnetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo exibiu atividade anti-inflamatória. No entanto, mais estudos precisam ser encorajados tanto *in vitro* como *in vivo* para que se possa explorar o valor nutricional e farmacêutico de *S. herbacea*.

Além destes compostos, Chung et al. (2005) identificaram por NMR, no extrato metanólico de *S. herbacea*, a presença do ácido 3-cafeoil-4-dihidrocafeoilquínico, e avaliaram a atividade antioxidante pelo

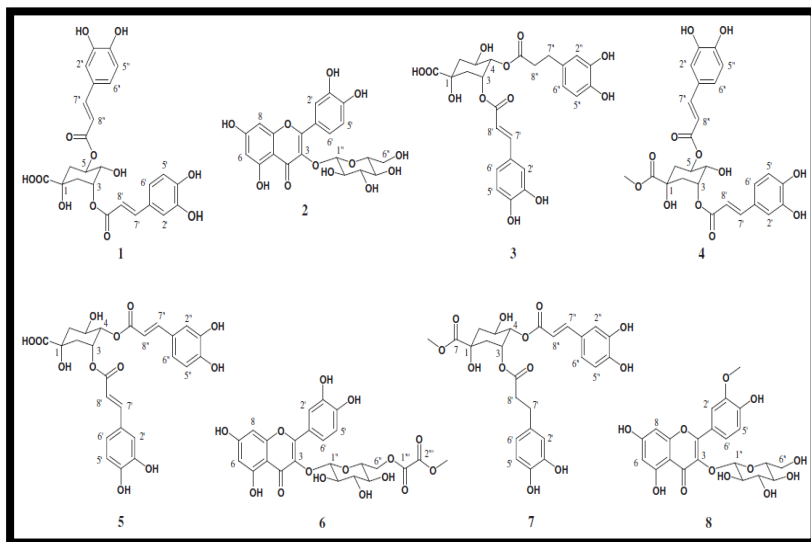
método DPPH, e pela inibição da peroxidação lipídica em células do fígado de ratos. Verificaram que o ácido 3-caffeoil-4-dihydrocaffeoilquímico revelou ter atividade antioxidante ( $EC_{50}$   $5,1 \pm 0,37$   $\mu$ M), e inibição da peroxidação lipídica ( $EC_{50}$   $9,3 \pm 0,43$   $\mu$ M) superior aos valores encontrados para ácido clorogênico, cafeico, ferúlico e  $\alpha$ -tocoferol, demonstrando ser um potente antioxidante natural.

Sung et al. (2009) avaliaram a partir do extrato aquoso de *S. herbacea* o potencial como antioxidante e agente despigmentante da pele. A atividade antioxidante foi avaliada através de kits específicos, e também pelo efeito protetor nos fibroblastos humanos, que foram induzidos ao estresse por hidroperóxido de terc-butila (*t*-BOOH). O poder despigmentante foi avaliado em células de melanoma, com a determinação do conteúdo de melanina e também da atividade inibitória da tirosinase. Os autores verificaram que a capacidade antioxidante do extrato aquoso de *S. herbacea* ( $50$   $\mu$ g  $mL^{-1}$ ) é semelhante ao do ácido ascórbico ( $100$   $\mu$ g  $mL^{-1}$ ), além disso, o extrato exibiu efeito dose-resposta dependente, em função da sua concentração ( $5$  a  $100$   $\mu$ g  $mL^{-1}$ ), e também reduziu a apoptose celular induzida pelo estresse oxidativo. Em relação ao conteúdo de melanina, o extrato aquoso promoveu redução significativa do mesmo, e na concentração de  $100$   $\mu$ g  $mL^{-1}$  inibiu em 54% a atividade de tirosina. Concluíram que o seu extrato aquoso têm ação despigmentante e antioxidante, e pode ser utilizado como um composto alternativo para o clareamento da pele.

Em estudo realizado por Zhu, Li e Row (2011), foram isolados os ácidos protocatecuico ( $0,646$   $mg$   $g^{-1}$ ), cafeico ( $0,511$   $mg$   $g^{-1}$ ) e ferúlico ( $0,378$   $mg$   $g^{-1}$ ) no extrato metanólico de *S. herbacea*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Kim et al. (2011) em estudo utilizando extrato metanólico elaborado com a parte área de *S. herbacea*, isolaram por HPLC e identificaram por NMR, oito compostos antioxidantes (ácidos fenólicos e flavonoides) (**Figura 4**), além de verificarem a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH, e pela inibição da peroxidação lipídica (hidroperóxido de éster de colesterol - CE-OOH) no plasma de ratos.

**Figura 4** – Estrutura química dos compostos isolados de *S. herbacea*.



Legenda: **(1)** - Ácido 3,5-dicafeoilquínico; **(2)** - Quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo; **(3)** - Ácido 3-cafeoil-4-dihidrocafeoilquínico; **(4)** - Metil 3,5-dicafeoilquinato; **(5)** Metil 3,5-dicafeoilquinato; **(6)** – Isoquercitrina-6-O-metiloxalato; **(7)** - Metil 4-cafeoil-3 dihidrocafeoilquinato; **(8)** - Isoramnetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

Fonte: Kim et al. (2011).

Kim et al. (2011) verificaram que os compostos derivados do ácido dicafeoilquínico (1, 3, 4, 5 e 7) e flavonoides glicosilados (2 e 6) revelaram capacidade de sequestro do radical DPPH, e capacidade inibitória na formação de CE-OOH no plasma de ratos, superior ao ácido clorogênico, sugerindo que a atividade antioxidante aumenta proporcionalmente com o número de grupos cafeoil e dihidrocafeoil. Concluíram que os derivados do ácido clorogênico e dos flavonoides glicosilados com estrutura “catecol” na sua forma livre, são potenciais sequestradores de radicais e quelantes de metais, e que *S. herbacea* tem potencial para se tornar um vegetal promotor de saúde, devido à elevada atividade antioxidante dos compostos encontrados na mesma.

Essaidi e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante presente no extrato metanólico de *S. herbacea* pelo método DPPH (*in vitro*), e pelo método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno, e determinaram o conteúdo de fenólicos totais do extrato pelo método espectrofotométrico com reativo de Folin-Ciocalteu, bem como, a identificação por HPLC.

Verificaram que o extrato de *S. herbacea* tem atividade antioxidante com um percentual de inibição do radical DPPH de  $55,3 \pm 2,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $\text{EC}_{50}$ ), e também uma moderada inibição da peroxidação lipídica com um coeficiente de atividade antioxidante (AAC) de  $529,0 \pm 7,5$ . O conteúdo de fenólicos totais encontrado foi de  $53,8 \pm 2,6 \text{ mg GAE g}^{-1}$  (MS), e em relação aos compostos fenólicos encontrados, foi possível identificar a presença de oito ácidos fenólicos (sinápico, clorogênico, ferúlico, cafeico, salicílico, siríngico, p-cumárico e ácido trans-cinâmico) e oito flavonoides (isoramnetina, quercetina, kampferol, miricetina, galangina, hesperidina, acacetina, ramnetina). Desta forma, concluíram que *S. herbacea* possui atividade antioxidante, especialmente pela diversidade de compostos fenólicos, sugerindo seu uso na forma *in natura* como fonte alimentar (ESSAIDI et al., 2012).

Em estudo mais recente realizado por Hwang et al. (2013) os autores isolaram (HPLC) do extrato metanólico de *S. herbacea*, o ácido 3-cafeoil-4-dihidrocafeoilquinico, e verificaram seu efeito sobre a lipogênese hepática induzida pela glicose, em células humanas de hepatocarcinoma (HepG2). Também verificaram que o extrato de *S. herbacea* desempenha um papel potencial na prevenção e tratamento de esteatose hepática por ativação da proteína quinase ativada por monofostado de adenosina (AMPK).

Wang et al. (2013), em estudo utilizando extrato de acetato de etila elaborado com a parte aérea de *S. herbacea*, isolaram por HPLC e identificaram por NMR, 12 compostos antioxidantes (fitol, ácido esteárico, ácido  $\gamma$ -linolênico, (3Z,6Z,9Z)-3,6,9 tricosatrieno, ácido linoleico, estigmasterol, ergosterol, pentadecil ferulato, dioctil ftalato, dibutil ftalato, aldeído vanílico, escopoletina), além de verificarem a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH e pelo potencial antioxidante redutor férrico (FRAP), e atividade antitumoral em células humanas de hepatocarcinoma (HepG2) e de adenocarcinoma de pulmão (A549).

Em relação à atividade antioxidante, os autores verificaram que entre os 12 compostos puros isolados do extrato de *S. herbacea*, o composto 6 (pentadecil ferulato) apresentou maior atividade antioxidante, podendo ser comparado ao ácido ascórbico. Em relação à atividade antiproliferativa, verificaram que o composto 1 (fitol) inibiu seletivamente o crescimento celular das células HepG2, e os compostos 3 e 6, além de inibirem o crescimento das células HepG2, também apresentaram potente ação antiproliferativa das células A549. Concluíram que os compostos isolados de *S. herbacea*, confirmam o potencial desta halófita como uma fonte natural de antioxidante, com

propriedades antiproliferativas de interesse para a indústria farmacêutica e de alimentos (WANG et al., 2013).

Cabe destacar que além dos compostos fenólicos presentes nas espécies dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia*, outros compostos tem sido objeto de estudo, em função das potenciais propriedades antioxidantes, e entre estes, podemos citar o estudo realizado por Ryu, Kim e Lee (2009) que avaliaram a atividade antiproliferativa de polissacarídeos brutos e purificados extraídos de *S. herbacea* sobre células humanas de câncer de cólon (célula de linhagem HT-29). Os autores verificaram que tanto o extrato com polissacarídeos brutos (CS) como o de polissacarídeos purificados (PS) exibiram efeito dose-resposta dependente, em função da concentração (0,5 a 4 mg mL<sup>-1</sup>) sobre a inibição da proliferação celular, sendo que nas concentrações entre 0,5 e 1 mg mL<sup>-1</sup> houve inibição celular de aproximadamente 50%. Em relação a apoptose celular, verificaram que o tratamento das células com CS e PS em 24 horas, aumentou a morte apoptótica total das células para 24,99 e 91,59% respectivamente, em comparação ao controle (13,51%). Assim, concluíram que os polissacarídeos presentes em *S. herbacea* possuem atividade anticancerígena, e apresentam um comportamento similar ao princípio ativo de alguns medicamentos utilizados no tratamento de câncer.

Diante ao exposto, verifica-se que até o momento, os estudos demonstraram que os extratos das espécies do gênero *Salicornia* possuem compostos bioativos com propriedades terapêuticas distintas, sendo constatada a presença principalmente de compostos fenólicos (derivados do ácido clorogênico, flavonoides glicosilados), fitoestrógenos ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol) e polissacarídeos. Entretanto, a espécie *Sarcocornia ambigua* continua praticamente intocada do ponto de vista de estudos fitoquímico.

## 1.2 Métodos utilizados para avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de prever o seu potencial antioxidante antes de ser ingerido, é importante para avaliar a proteção contra sua oxidação e deterioração, as quais podem levar a uma diminuição da qualidade e do valor nutricional (LIMA, 2008).

Cabe destacar que a avaliação da capacidade antioxidante de uma amostra, pode depender da tecnologia e do radical livre gerador ou oxidante utilizado como estratégia de medida. Além disso, pelo fato da atividade antioxidante ser determinada pela mistura de diferentes

antioxidantes presentes nas matrizes com diferentes mecanismos de ação, faz-se necessário combinar mais de um método analítico para determinar, de forma precisa, a atividade antioxidante *in vitro* (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Os métodos encontrados para se avaliar a atividade antioxidante, têm se tornado ferramentas usuais e necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como o grau de maturação, as condições ambientais, etc., e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas (ALVES et al., 2010).

Um método ideal para avaliar a atividade antioxidante de um composto deve ser rápido, reprodutível, requerer pequena quantidade de reagente, e não ser influenciado pelas propriedades físicas do composto. Os métodos que avaliam a atividade antioxidante são classificados em dois grandes grupos: um se baseia na captura de radicais livres, e o outro na oxidação de uma molécula alvo. Entretanto, devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, não existe um método universal simples, por meio do qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes têm gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais, por meio do uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010).

### **1.2.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

O método do radical DPPH, do ponto de vista metodológico tornou-se bastante popular no estudo de antioxidantes naturais, por ser simples, preciso, reprodutível e altamente sensível. O que foi desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand-Williams et al. (1995), está baseado na descoloração de uma solução composta de radical estável de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem doar um átomo de hidrogênio ou transferir elétrons, promovendo a diminuição da absorbância inicial (absorbância máxima na faixa de 515 a 520 nm), a qual será proporcional à



concentração e à atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Uma das vantagens deste método é que o radical livre é estável e está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre, por exemplo, com o método do radical ABTS), além de facilitar seu uso (LIMA, 2008). Apesar do ensaio do DPPH ser um teste rápido, simples e com boa reprodutibilidade dos resultados, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização e interpretação dos resultados, dentre as quais se destacam: o tipo e concentração do composto analisado, a cinética de reação do antioxidante, as características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, afinidade solvente-substrato, e a forma de expressão dos resultados (MOLYNEUX, 2003).

Os resultados obtidos por este método podem ser expressos em percentagem de atividade antioxidante, micromol ( $\mu\text{mol}$ ) de equivalentes do padrão utilizado (Trolox, por exemplo), ou ainda como  $\text{EC}_{50}$ , o qual tem sido muito utilizado, e representa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Esse método foi introduzido por ser de fácil utilização, e preciso para uso em frutas e extratos vegetais, razão pela qual alguns estudos sobre antioxidantes presentes em plantas têm sido realizados usando o método DPPH (PINTO et al., 2008).

### 1.2.2 Método do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP)

O método do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – poder antioxidante de redução do ferro foi inicialmente desenvolvido para quantificar o ácido ascórbico em soro ou plasma, e consiste na capacidade de um antioxidante em reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  (oxidado) em  $\text{Fe}^{2+}$  (BENZIE; STRAIN, 1996). Quando isso ocorre na presença de tripiridiltriiazina (TPTZ) e em condições ácidas (pH 3,6), a redução é acompanhada pela formação de um complexo de intensa cor azul com o  $\text{Fe}^{2+}$ , com uma absorção máxima a 593 nm (APAK et al., 2004). Assim, a capacidade antioxidante pode ser avaliada pelo monitoramento da formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ espectrofotometricamente.

Uma das limitações apresentadas pelo método é o fato de que a curva padrão, só pode ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água como o ácido ascórbico, ácido úrico e/ou Trolox e, geralmente, não se consegue medir todos os antioxidantes presentes em uma matriz (APAK et al., 2004). Outra desvantagem é que não pode detectar compostos que agem por meio da doação de átomos de hidrogênio,

particularmente tiois (glutaciona) e proteínas, o que pode levar a subestimação da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Apesar das limitações, constitui-se em um método rápido, simples e reprodutível, que não requer reagentes caros e equipamentos sofisticados (MOON; SHIBAMOTO, 2009; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). No entanto, cabe destacar que muitos estudos, que avaliam a atividade antioxidante em plantas e em alimentos, não utilizam este método isoladamente, mas, sim, em conjunto com outros ensaios (MOON; SHIBAMOTO, 2009; KATALINIC et al., 2006; LIU et al., 2006).

### **1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC ESI-MS/MS)**

A cromatografia é uma técnica relatada cientificamente há pouco mais de 100 anos por Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919). Trata-se de um método físico-químico de separação que está fundamentado na migração diferencial de componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a estacionária que retém elementos, e a móvel que conduz a mistura por meio de um soluto através da fase estacionária (MALDANER; JARDIM, 2009; LOUGH; WAINER, 1995).

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque em diversas áreas da ciência, devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas por si mesmas, ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (COLLINS, 2009).

As técnicas cromatográficas mais utilizadas podem ser divididas principalmente em cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC), e mais recentemente, a cromatografia líquida de ultra-eficiência (*ultra performance liquid chromatography* - UPLC). Os métodos cromatográficos podem ser utilizados separadamente ou em conjunto, dependendo dos componentes a serem separados ou identificados (COLLINS, 2009; PERES, 2002).

A HPLC tem sido uma das técnicas analíticas de separação mais desenvolvida, difundida e utilizada nos laboratórios de análises químicas e farmacêuticas, devido à capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade (MALDANER; JARDIM,

2009; ARDREY, 2003; KATZ et al., 1998).

Um sistema de HPLC requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel. Assim, essa técnica necessita de um sistema composto por fase móvel, bomba, coluna cromatográfica, detector e sistema de interpretação de dados (DEGANI et al., 1998; PERES, 2002).

Na HPLC a fase móvel deve ter um solvente que dissolva a amostra, sem que haja qualquer interação química entre ambas, e geralmente é composta por solventes orgânicos, ou solventes orgânicos e água. A fase estacionária deve ser compatível com o detector, possuindo polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra (PERES, 2002; KATZ et al., 1998).

A amostra é introduzida na coluna de separação dissolvida em um líquido (solvente), e nos sistemas modernos, uma bomba impulsiona o solvente e, conseqüentemente, o analito, através da coluna de separação até sua chegada ao detector. As bombas e as colunas devem estar preparadas para suportar grandes pressões que variam de  $4 \times 10^7$  Pa, nos sistemas convencionais, ou podem ser maiores como nos sistemas de *fast-HPLC* e/ou UPLC, que suportam cerca de 2 a 3 vezes mais pressão. O fluxo pode ser controlado através da bomba, que permite também a realização de sistemas de gradientes, nos quais é possível utilizar vários solventes, e controlar seu fluxo individualmente, de modo a permitir alterar suas concentrações durante uma corrida (ARDREY, 2003; PERES, 2002).

A coluna cromatográfica deve ser confeccionada de material inerte e resistente a altas pressões. Por fim, os detectores devem apresentar ampla faixa de aplicação, e os mais utilizados são os espectrais (PERES, 2002). Todavia, cabe destacar que, o uso de um determinado tipo de coluna em um processo de fracionamento na cromatografia líquida, muitas vezes não é suficiente para assegurar a completa separação de compostos em misturas complexas, porquanto é necessário associar a cromatografia multidimensional, a qual integra a utilização de técnicas de separação com técnicas de detecção (MÜHLEN et al., 2006).

A cromatografia multidimensional combina técnicas cromatográficas e métodos espectrais, de forma que as vantagens de ambos possam ser aproveitadas, sendo que a cromatografia produz frações puras ou próximas da pureza de substâncias químicas, e a espectrometria produz informações seletivas para identificação destas substâncias usando padrões ou bibliotecas espectrais (PATEL et al., 2010).

O primeiro registro de um acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas data da década de 70, e este acoplamento permitiu aliar algumas vantagens da cromatografia líquida, como alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da técnica de espectrometria de massas, a qual permite obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade (ARDEY, 2003; VÉKEY, 2001).

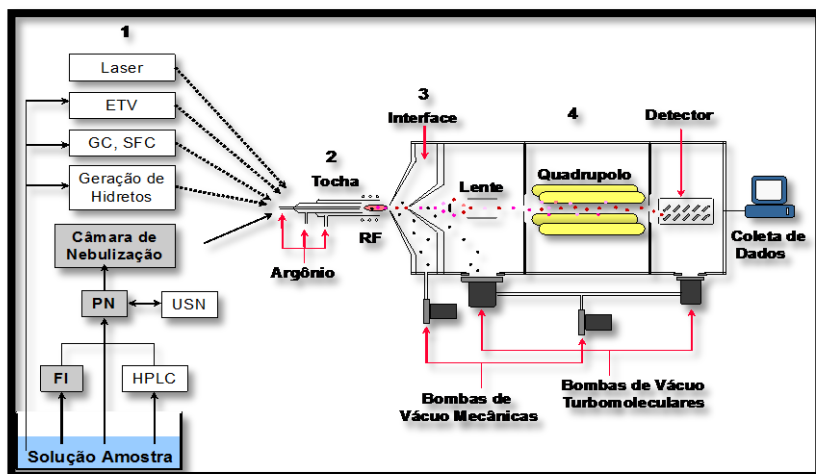
Além disso, outra vantagem associada à união dessas duas técnicas é que pode ser amplamente empregada na detecção de compostos presentes em matrizes complexas em baixa concentração, já que possibilita um aumento na detecção, e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (VÉKEY, 2001).

#### **1.4 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)**

Desde sua introdução no início dos anos 80 (DATE; GRAY, 1989), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado tem rapidamente expandido em termos de número de usuários, aplicações, fabricantes e tipos de instrumentos. Como resultado, a técnica de ICP-MS é utilizada por muitos para análise de rotina, e seu rápido desenvolvimento é o resultado de sua alta sensibilidade, da obtenção de espectros simples e únicos, e da possibilidade de medir a razão isotópica dos elementos (BRENNER; TAYLOR, 1992).

Os aparelhos convencionais de ICP-MS possuem configuração semelhante à ilustrada na **Figura 5**.

**Figura 5** - Representação esquemática de um aparelho de ICP-MS.



Fonte: Dias (2004).

Legenda: As linhas pontilhadas representam a amostra introduzida na forma de vapor, e a linha cheia na forma de aerossol.

O primeiro estágio do instrumento consiste no acessório utilizado para introdução da amostra (1). O método mais usual para introdução de amostras líquidas faz uso de um nebulizador pneumático, que gera o aerossol da amostra para introdução no plasma. A eficiência destes dispositivos é, entretanto, baixa, de maneira que cerca de 1-2% da amostra inicialmente aspirada atinge o plasma. A aspiração da amostra é auxiliada por uma bomba peristáltica, que permite o controle da vazão de aspiração, usualmente de 1 a 2 mL min<sup>-1</sup> (JARVIS et al., 1992; TAYLOR; GARBARINIO, 1992).

No segundo estágio, o aerossol da amostra atinge a tocha (2), onde é gerado o plasma propriamente dito. O plasma indutivamente acoplado é uma descarga sem eletrodo em um gás (usualmente argônio) à pressão atmosférica, mantido por uma energia acoplada a ele por um gerador de rádio-frequência. Uma descarga inicial é aplicada por uma bobina de Tesla, na qual os elétrons são induzidos pelo campo magnético gerado pela bobina de rádio-frequência. A energia elétrica cedida à bobina é convertida em energia cinética dos elétrons. Como o espaço livre que um elétron pode percorrer a pressão atmosférica antes de colidir com um átomo de argônio é de cerca de 10<sup>-3</sup> mm, diversas colisões se sucedem causando a ionização do gás. O plasma torna-se aquecido, podendo atingir temperaturas de 10000 K (JARVIS et al., 1992, TAYLOR;

GARBARINIO, 1992).

A tocha em si consiste de três cilindros de quartzo concêntricos, e o gás proveniente do nebulizador e que é aquecido por irradiação, atravessa o cilindro central, de modo a gerar um canal no centro do plasma. Ao redor do cilindro central ocorre a passagem de um fluxo auxiliar de gás, com a função principal de manter a ponta do tubo central distante do plasma, evitando sua fusão, e entre o segundo e terceiro cilindros ocorre a passagem de uma alta vazão de gás, usualmente 10 a 15 L min<sup>-1</sup>, com a função de resfriar as paredes do cilindro e alimentar o plasma (TAYLOR; GARBARINIO, 1992).

A amostra, após a passagem pelo plasma, é conduzida a uma zona de baixa pressão (2-3 torr) denominada *interface* (3), que tem a função de extrair o gás nele contido, que é representativo da amostra original. Isto é feito por meio de uma série de dispositivos. Inicialmente, a amostra passa por um *cone amostrador*, com um orifício circular de 1,0 mm de diâmetro, e o gás proveniente do plasma entra por uma área seccional com diâmetro duas a três vezes maior, de maneira que uma seção de 1,5 a 3 mm do canal axial é amostrada. A maior parte do gás restante é evacuada por uma bomba. Após o cone amostrador, um segundo cone, denominado *skimmer*, e transmite o feixe de gás para um dispositivo que reduz a presença de fótons (*photon-stop*). O feixe iônico é focalizado para o analisador de massas, por meio de uma lente iônica que possui ainda a função de extrair íons de espécies neutras (DATE; GRAY, 1989).

O analisador de massas mais tradicionalmente utilizado em aparelhos de ICP-MS é o *quadrupolo*, representado na **Figura 5** pelo número 4. Nele encontra-se em uma região de alto-vácuo (10<sup>-5</sup> torr), e consiste de quatro cilindros metálicos revestidos com ouro, em que o campo elétrico é alternado de maneira a selecionar os íons com base em suas razões massa/carga (*m/z*). O campo elétrico em um quadrupolo é um resultado das voltagens decorrentes da combinação de rádio-frequência e corrente direta que é aplicada aos cilindros. A uma dada razão entre rádio-frequência/corrente, apenas íons de uma determinada razão *m/z* conseguem atravessar o quadrupolo e atingir o detector; íons com razão *m/z* inferiores ou superiores têm trajetórias instáveis e são filtrados (BRENNER; TAYLOR, 1992; JARVIS et al., 1992).

Finalizando, os íons são detectados em um dispositivo multiplicador de elétrons, que consiste em um arranjo de dínodos. Quando um íon incide no primeiro dínodo, elétrons são ejetados e colidem com o dínodo seguinte. Os elétrons incidentes nos dínodos são multiplicados, gerando um “efeito cascata”, de maneira que para cada íon incidente cerca de 10<sup>7</sup> elétrons são gerados. O sinal é, portanto, obtido pela geração de uma

corrente elétrica proporcional ao número de íons incidentes no detector (TAYLOR; GARBARINIO, 1992).

Uma das principais vantagens da utilização da técnica de ICP-MS se deve à alta sensibilidade para muitos elementos da tabela periódica, e a possibilidade de realizar análise multielementar, o que faz dela uma técnica que permite análises em menor tempo (BRENNER; TAYLOR, 1992).

Como o ICP-MS é facilmente adaptável à análise multielementar, torna-se um método adequado para caracterização e análise quantitativa de vários elementos de ocorrência em produtos naturais e em materiais complexos em geral. Além disso, os limites de detecção são melhores do que os de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (TSALEV et al., 1995).

O ICP é uma das fontes mais eficientes de ionização, contudo, não é perfeito. Idealmente, apenas os íons atômicos deveriam ser observados, contudo, muitos íons poliatômicos e constituintes da matriz da amostra injetados podem interferir na determinação do analito de interesse (KARUNASAGAR; ARUNACHALAM, 2001).

## **1.5 Microscopia em alimentos**

A microscopia é um recurso apropriado para análise de estrutura de alimentos, por ser somente um método analítico que fornece resultados em forma de imagens. Este recurso é utilizado para examinar alimentos que sofrem processos distintos, visto que possibilita visualizar o comportamento do alimento em termos de morfologia e composição (JOSLYN, 1970).

Segundo Orrego (2002), a microscopia pode proporcionar informações sobre importantes características dos alimentos, tais como: composição química e distribuição de seus componentes; características estruturais; contaminantes e presença de microrganismos.

Sob essa perspectiva, a microscopia de alimentos pode ser conceituada como um método analítico que, baseando-se na observação microscópica, evidencia a ocorrência de fraudes, bem como, de alimentos em mau estado de conservação sanitária (contaminação e sujidades) (FONTES; FONTES, 2005). Além disso, a microscopia de alimentos, objetiva subsidiar o estudo e a identificação de espécies vegetais empregadas na elaboração de produtos alimentícios processados. Trata-se de uma ciência aplicada que emprega conhecimentos de botânica (morfologia, anatomia e taxonomia), de química analítica e de entomologia (JORGE et al., 2009).

O exame microscópico de alimentos apresenta duas importantes características: a rapidez com que pode ser executado e o baixo custo da análise, e entre as principais técnicas de microscopia para utilização em alimentos, destacam-se: a microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica de varredura (FONTES; FONTES, 2005; JOSLYN, 1970).

### **1.5.1 Microscopia de fluorescência**

As primeiras pesquisas realizadas com um microscópio de fluorescência datam de 1904, e foram realizadas pelo cientista alemão August Kohler. A partir deste momento, a técnica evoluiu ao longo das últimas décadas em relação à análise de imagens, e os microscópios de fluorescência tornaram-se mais acessíveis, levando à sua utilização em várias áreas do conhecimento (BASCHONG; LANDMAN, 2006; REICHMAN, 2000).

A microscopia de fluorescência é uma ferramenta analítica que combina as propriedades de aumento de microscopia de luz com a visualização da fluorescência (GITAI, 2009), um fenômeno que envolve a absorção e emissão de uma pequena gama de comprimentos de onda de luz por uma molécula fluorescente conhecida como um fluoróforo, a qual pode ser adicionada ao meio, ou ser expresso naturalmente nas células e tecidos (GITAI, 2009; TABOGA, 2001).

O microscópio de fluorescência é composto por um sistema óptico que utiliza uma luz de mercúrio de alta pressão, cujos picos variam entre 312 e 579 nm. Um dos elementos fundamentais para uma boa visualização da amostra consiste em filtros especiais chamados de filtros de excitação e filtros de barreira (REICHMAN, 2000).

O filtro de excitação localiza-se logo após a saída de luz antes do condensador, e transmite somente os comprimentos de onda da luz de iluminação eficiente, que excitam um corante específico. Por outro lado, o filtro de barreira (também chamado de filtro de emissão) localiza-se entre a objetiva e a ocular, após o objeto, e atenua toda a luz transmitida pelo filtro de excitação, além de transmitir de forma muito eficiente qualquer fluorescência emitida pela amostra. Geralmente, a emissão de fluorescência ocorre em um comprimento de onda superior ao de excitação, o que é denominado de Lei de Stokes (BASCHONG, 2006; TABOGA, 2001).

A microscopia de fluorescência baseia-se na propriedade que alguns corantes possuem de emitir luz fluorescente quando excitados por radiações de certos comprimentos de ondas. Estes corantes são denominados de fluorocromos, e são capazes de se fixarem em lugares



específicos da amostra, induzindo a fluorescência (fluorescência secundária) atribuindo-lhes cores. Entretanto, é possível detectar compostos naturalmente fluorescentes em alguns componentes de origem vegetal e animal, ao serem irradiados com excitação específica (fluorescência primária ou autofluorescência), como a clorofila, lignina de paredes celulares, elastina e colágeno (HEALTH, 2000; TABOGA, 2001).

Em plantas que possuem clorofila, uma pequena parte da radiação absorvida é suficiente para a emissão de fluorescência natural na cor vermelha. Além desta, pode-se observar fluorescência primária na camada de aleurona na cor azul, devido à presença do ácido ferúlico e compostos fenólicos (HAGEN et al., 2006).

Cabe destacar que mesmo sendo uma técnica analítica versátil e de baixo custo, alguns fatores podem afetar a fluorescência das amostras comprometendo as análises, como a decomposição fotoquímica e perda da intensidade com o tempo; a concentração da substância fluorescente; o pH das soluções; a estrutura química da amostra e a polaridade dos solventes utilizados. Além disso, as amostras analisadas por esta técnica não podem ser observadas durante longos períodos de tempo, devido ao desaparecimento da fluorescência (REICHMAN, 2000; FULCHER; IRVING; DE FRANCISCO, 1989).

### **1.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica versátil de caracterização microestrutural de amostras biológicas e não biológicas utilizadas em diversos campos do conhecimento, mais particularmente nas ciências biológicas, ciências da vida, ciências de materiais, geociências dentre outras áreas (GOLDSTEIN et al., 1992). Vem se tornando mais frequente por fornecer informações de detalhe, com aumento muito superior ao da microscopia ótica. O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio óptico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio óptico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 - 50 Ao) - atualmente existem instrumentos com até 1 nm (10 Ao) - enquanto que no óptico é de 0,5  $\mu$ m. Comparado com o MET a vantagem do MEV está na facilidade de preparação das amostras e na elevada profundidade do foco com imagem tridimensional (MUCCILLO, 2009).

Os sinais de maior interesse para a formação da imagem na microscopia eletrônica de varredura são os elétrons secundários e os

retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra, estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra, e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução. Já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição (BOZZOLA; RUSSELL, 1999; GOLDSTEIN et al., 1992).

O MEV tem seu potencial ainda mais desenvolvido com a adaptação na câmara da amostra de detectores de raios-X, permitindo a realização de análise química na amostra em observação. Através da captação pelos detectores e da análise dos raios-X característicos emitidos pela amostra (resultado da interação dos elétrons primários com a superfície), é possível obter informações qualitativas e quantitativas da sua composição na região submicrométrica de incidência do feixe de elétrons.

É importante ressaltar que atualmente quase todos os MEV são equipados com detectores de raios-X, e devido à confiabilidade e principalmente à facilidade de operação, a grande maioria faz uso do detector de energia dispersiva de Raios-X (EDX) (BOZZOLA; RUSSELL, 1999).

A versatilidade da microscopia eletrônica de varredura aliada a microanálise semiquantitativa por EDX possibilitam o aprimoramento nos estudos de células, tecidos e superfícies de diversas micro-estruturas com obtenção de imagens com alta resolução, bem como no aprimoramento do estudo de propriedades de materiais e sua análise química. Como vantagens adicionais deste método pode-se mencionar a facilidade na seleção e preparo das amostras, a rapidez na aquisição dos dados e o baixo custo para análise (HAYAT, 2000; BOZZOLA, 1999).

Cabe destacar que como em toda técnica analítica, o MEV acoplado ao EDX, apresenta suas limitações na identificação de compostos polimorfos, vez que a análise química é semiquantitativa. Além disso, elementos com baixo número atômico ( $< 4$ ), não são identificados pelo EDX, e pelo fato da amostra ser exposta a alto vácuo, o material é bombardeado por um raio de elétrons que pode eventualmente danificar a amostra (HAYAT, 2000).

**CAPÍTULO 2 – ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROANÁLISE  
QUÍMICA DA PARTE AÉREA DE *Sarcocornia ambigua*  
(Amaranthaceae)**

## ANÁLISE HISTOLÓGICA E MICROANÁLISE QUÍMICA DA PARTE AÉREA DE *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae)

### RESUMO

O objetivo foi expandir o conhecimento sobre a *S. ambigua*, através da análise histológica dos elementos anatômicos potencialmente importantes para a sobrevivência dessa planta, bem como a microanálise química dos tecidos vegetais da mesma. As amostras de *S. ambigua* foram coletadas no mês de maio de 2013, em duas regiões distintas localizadas na Grande Florianópolis, no Estado de Santa Catarina (SC) Brasil. A análise histológica de *S. ambigua*, foi realizada por microscopia óptica de fluorescência, e a análise ultraestrutural e microanálise química da parte aérea, foi realizada com energia dispersiva de raios-x em microscopia eletrônica de varredura. A bainha foliar é formada por epiderme (externa e interna), mesofilo e feixes vasculares. A epiderme interna da bainha é pouco evidente, mostrando-se contínua com a epiderme que delimita o caule, a qual apresenta células com paredes espessadas e, muito precocemente, origina uma periderme. Regiões mais basais da planta perdem a bainha, e a periderme caulinar passa a ser o tecido externo de proteção. Entretanto, a epiderme voltada para o exterior mostra células amplas revestidas por cutícula e com evidente deposição de ceras epicuticulares. O parênquima paliçádico está formado por células alongadas e justapostas, sendo o único tecido com ocorrência de clorofila. As secções transversais da bainha foliar, de ambas as amostras de *S. ambigua*, mostraram cor vermelha, com uso de filtros azul e verde, indicando que este é o tecido responsável pela fotossíntese. Além disso, com o uso do filtro verde também verificou-se a presença de cutina na superfície epidérmica e de lignina nos elementos vasculares. A presença de estruturas cristalíferas foi verificada em ambas as amostras de *S. ambigua*, nas células do mesofilo (hidrênquima e parênquima paliçádico). Os resultados sobre a distribuição dos elementos químicos nos tecidos das amostras de *S. ambigua* demonstraram que o elemento encontrado em maior concentração na epiderme e no hidrênquima foi o Ca seguido do K, porém a distribuição destes elementos diferiu entre as amostras. Já na epiderme caulinar o único elemento detectado foi o Ca. Quando realizadas análises pontuais nos cristais presentes nas células do parênquima paliçádico e nas células do hidrênquima, verificou-se a presença de taxas elevadas de Na e K, e baixos teores de Mg. Pode-se concluir que os estudos nessa área ainda são muito limitados, mas

importantes para o conhecimento de novas matérias-primas vegetais. Desta forma, mais pesquisas devem ser realizadas e encorajadas, pois, apesar da complexidade anatômica das halófitas e da diversidade estrutural dos constituintes químicos das mesmas, considerar a heterogeneidade ambiental, as variáveis envolvidas no desenvolvimento e cultivo das plantas (composição mineral do solo, temperatura, estresse biótico e abiótico, qualidade e composição da água para irrigação), permitirá um maior aprofundamento sobre a temática.

**Palavras chave:** *Sarcocornia ambigua*; Halófitas; Microscopia óptica de fluorescência; Microscopia eletrônica de varredura; Histologia vegetal; Microanálise química.

## 1. Introdução

Plantas halófitas (Grego hal = sal, phyton = planta) ou halofíticas podem ser definidas como plantas superiores vasculares (angiospermas) que apresentam tolerância, e realizam seu ciclo de vida em ambientes com elevada concentração salina (100 a 500 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) (FLOWERS; COLMER, 2008). Por serem organismos altamente evoluídos e especializados, com características morfológicas, anatômicas, fisiológicas bem adaptáveis, geralmente se desenvolvem na região litorânea, onde ocorre uma estreita faixa arenosa entre a zona das marés e as dunas, a qual é frequentemente inundada pela água salgada, pela ação das ondas e pelo vento (BOEGER; GLUZEZAK, 2006).

Devido às condições ambientais estressantes, as quais as halófitas estão sujeitas (baixa disponibilidade de matéria orgânica, submersão periódica, drenagem rápida da água, luz solar direta e intensa, e inundação com água salina), algumas adaptações bioquímicas podem ser utilizadas para sobreviverem ao ambiente hostil, característico dos solos submetidos a efluentes salinos nas regiões costeiras tropicais e subtropicais (BOEGER; GLUZEZAK, 2006; SILVA, 2000).

A capacidade das halófitas sobreviverem em presença de grande quantidade de sal é de suma importância para a distribuição ecológica das plantas e para a agricultura, pois amenizam as condições físico-químicas, as trocas na salinidade e geoquímica do sedimento, de modo a possibilitar a ocupação de áreas entre-marés antes inóspitas, por espécies menos tolerantes a estresses ambientais (DAVY et al., 2001).

Sob essa perspectiva, o uso de halófitas pode ser uma alternativa para tornar áreas antes improdutivas (solos salinos) em produtivas, podendo se destacar na agricultura como uma nova oportunidade de modelo agrícola (halocultura ou cultura biosalina), além de fornecer um retorno econômico para os produtores, como matéria verde para alimentação de rebanhos, ou mesmo para alimentação humana (YENSEN, 2000; GLEN; BROWN; O'LEARY, 1998).

Existem segundo Yensen (2000), aproximadamente 10.000 plantas tolerantes ao sal, e aproximadamente 250 espécies de halófitas com potencial de produção agrícola que podem ser utilizadas em solos salinizados. Entre as halófitas que possuem elevado potencial agrônomico, ou podem se tornar uma importante cultura comercial, destacam-se as espécies dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* pertencentes à família *Amaranthaceae* (YENSEN; BEDELL, 1993).

No Brasil, são encontradas 145 espécies da família, distribuídas em 19 gêneros, sendo que, 71 dessas espécies são advindas de diferentes

regiões e biomas brasileiros (MARCHIORETTO et al., 2005). Especificamente no estado de Santa Catarina (SC), embora algumas revisões taxonômicas internacionais não confirmem a ocorrência das espécies dos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* e tampouco tenham sido levantados dados consistentes sobre os aspectos fitogeográficos da espécie em nosso estado a ocorrência da espécie *Sarcocornia ambigua*, foi verificada em duas (2) áreas de ocorrência natural na Grande Florianópolis.

Pesquisas internacionais realizadas com espécies da família *Amaranthaceae* pertencentes aos gêneros *Salicornia* e *Sarcocornia* (*Sarcocornia ambigua*, *Salicornia herbacea*; *Salicornia bigelovii*; *Salicornia brachiata*, *Salicornia persica*, *Sarcocornia fruticosa*, *Sarcocornia decussata*), têm sido exploradas em seus aspectos taxonômicos, fitogeográficos, fitoquímicos, e também em sua prospecção como cultura comercial (BERTIN et al., 2014; PARIDA; JHA, 2010; STEFFEN et al., 2009; ALONSO; CRESPO, 2008; MARTINS; FERREIRA; VALE, 2008; KADEREIT; MUCINA; FREITAG, 2006).

Neste contexto, estudos envolvendo as estratégias de sobrevivência das espécies *Sarcocornia* e *Salicornia* em diferentes ambientes, níveis de salinidade e técnicas de cultivo, têm sido realizados, considerando-se o interesse no reconhecimento de suas estruturas morfo-anatômicas e da composição química e distribuição de seus componentes na estrutura celular, afim de prospectar amplamente a cultura biosalina das mesmas (D'OCA et al., 2012; IZEPPI, 2011; PARIDA; JHA, 2010; COSTA, 2006; PORTO et al., 2006).

No entanto, cabe destacar que não existem trabalhos disponíveis na literatura que tenham explorado a espécie *S. ambigua* (*Amaranthaceae*), em seu aspecto morfológico e anatômico com vistas a melhor compreender sua organização celular, a distribuição dos componentes químicos constituintes da parte aérea e as adaptações que ocorrem nos tecidos vegetais desta espécie, necessários para sua sobrevivência.

Diante ao exposto, reconhecendo que pouca atenção tem sido dada a espécie encontrada na região costeira da Grande Florianópolis, objetivouse com esta pesquisa, expandir o conhecimento sobre a *S. ambigua*, através da análise histológica dos elementos anatômicos potencialmente importantes para a sobrevivência dessa planta bem como, a microanálise química dos tecidos vegetais da mesma.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Coleta das amostras de *S. ambigua*

As amostras de *S. ambigua* foram coletadas no mês de maio de 2013, em duas regiões distintas localizadas na Grande Florianópolis, no Estado de Santa Catarina (SC), Brasil.

A primeira amostra foi coletada em uma marisma de ocorrência natural, localizada no município de Palhoça (SC), na Barra do Aririú (Latitude 27° 40' 54.76" S, Longitude 48° 38' 19.63" O) (região A). A segunda amostra foi obtida no município de Florianópolis (SC), na Barra da Lagoa (Latitude 27° 34' 33" S, Longitude 48° 26' 33" O) (região B), a partir de um pequeno “cultivo experimental” de *S. ambigua* integrado ao cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei*. Este cultivo experimental foi prospectado por uma equipe do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC).

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG/UFSC), em período não superior a 2 horas após a coleta, e mantidas sob-refrigeração a  $5 \pm 2$  °C, até o momento das análises.

As plantas coletadas foram identificadas botanicamente e depositadas no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein do Departamento de Botânica da Universidade Regional de Blumenau (FURB) sob n.º 41346.

### 2.2 Caracterização histológica da parte aérea de *S. ambigua* por microscopia óptica de fluorescência

A análise histológica de *S. ambigua* (**Figura 1**), foi realizada por microscopia óptica de fluorescência, sendo considerada para a análise a porção da parte aérea em que a bainha foliar envolve o caule (regiões basais da parte aérea são destituídas de folhas; a porção de lâmina foliar é muito reduzida).

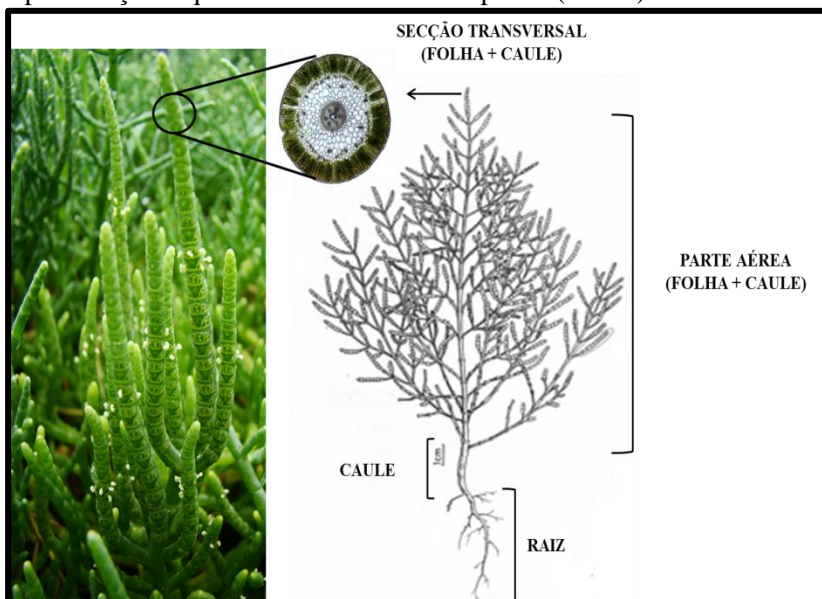
As amostras *in natura* (região A e B) de *S. ambigua* foram seccionadas transversalmente, à mão livre, com lâmina de barbear. As seções foram colocadas entre lâmina e lamínula, com água destilada e analisadas em microscópio Olympus BX41 (Olympus Corp., Tokyo, Japan) com epifluorescência, com filtros para visualização da cor azul U-MWU2 (excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) e da cor verde U-MWB2 (excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm), sendo que as imagens das estruturas foram capturadas com câmera fotográfica digital Q-imaging (3.3 megapixel Q-Color 3C) acoplada ao próprio microscópio e software Q-captures Pro 5.1 (Q-Imaging, Surrey, British Columbia,



Canadá).

Todo o procedimento de análise foi realizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB-II/UFSC).

**Figura 1** - Aspecto geral de *Sarcocornia ambigua* (esquerda), com detalhe de secção transversal da parte aérea (folha contornando caule), e representação esquemática da estrutura da planta (direita).



Fonte: Fotografia de acervo do autor (2012); Adaptado de Silva (2000).

### 2.3 Análise ultraestrutural e microanálise química da parte aérea de *S. ambigua* com energia dispersiva de raios-x em microscopia eletrônica de varredura (EDX-MEV)

Para os estudos ultraestruturais e microanálise química, em EDX-MEV, as amostras da parte aérea (caule e folhas) de *S. ambigua*, foram cortadas em peças com no máximo 2 mm, imediatamente após retirada do solo, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,2, por 2 horas (RUZIN, 1999). Posteriormente, foram lavadas por 3 vezes, na mesma solução tampão, e desidratadas em série etílica crescente (20, 40, 50, 70, 80, 90, 96 e duas vezes em 100° GL - meia hora cada). Após a total desidratação, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico CO<sub>2</sub>, conforme

procedimento proposto por Horridge e Tamm (1969), e em seguida aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face, e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador marca Leica SCD500 (Viena, Áustria), para estudo ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Varredura, Jeol, JSM-6390LV (Tóquio, Japão). Para identificação dos elementos químicos presentes nos tecidos da bainha foliar (epiderme, parênquima paliçádico e hidrênquima) e do caule, foi utilizado detector de raios-X nanotrAce, com Windows Type Norvar, Software Noran System SIX, Spectral Analysis e Spectral Imaging Systems, da Thermo Electron Corporation (Madiso, USA), acoplado ao MEV.

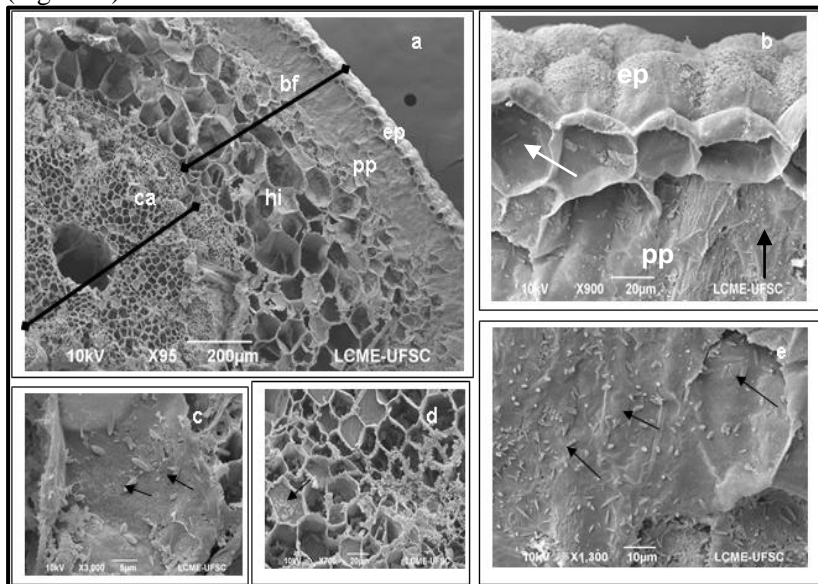
Este procedimento de análise foi realizado pelo Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC).

### 3. Resultados e discussão

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência foram utilizadas para examinar a organização celular da parte aérea de ambas as amostras de *S. ambigua* provindas de dois locais de coleta (região A e B). A parte aérea mostrou a folha constituída por reduzida lâmina foliar e uma bainha que envolve completamente o caule. De acordo com Alonso e Crespo (2008) e Costa (2006), a espécie perene *Salicornia gaudichaudiana*, a qual passou a ser reconhecida como *Sarcocornia ambigua*, apresenta estrutura histológica semelhante à encontrada no presente estudo, na qual a parte aérea, também apresenta pares de folhas fusionadas sobre o caule, demonstrando ser uma característica geral dessa espécie.

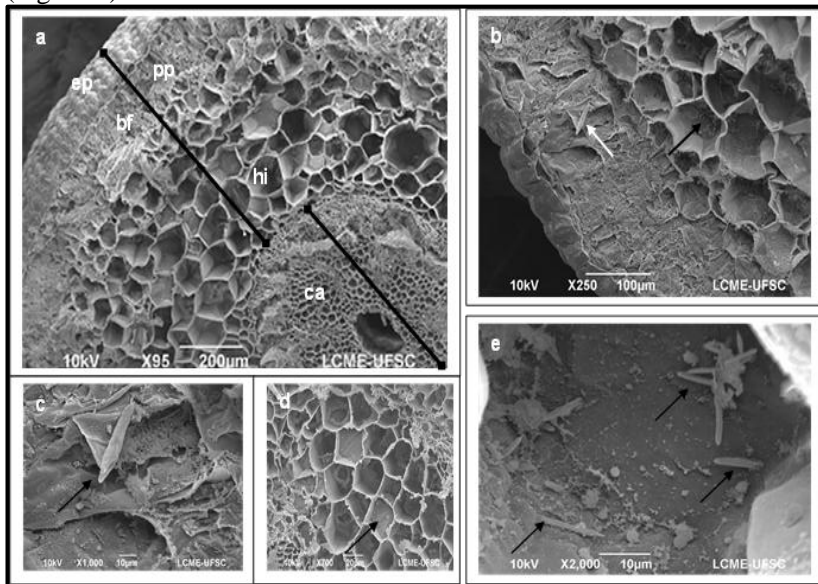
A análise estrutural em MEV possibilitou identificar os tecidos constituintes da parte aérea, assim como detalhes intracelulares (**Figuras 2 e 3**). As secções transversais revelaram que a bainha foliar é formada por epiderme (externa e interna), mesófilo e feixes vasculares (**Figuras 2a e 3a**).

**Figura 2** - Secção transversal da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (região A)



**Legenda:** 2a. Aspecto geral do caule (ca) e da bainha foliar (bf), esta constituída por epiderme (ep), parênquima paliçádico (pp) e hidrênquima (hi). 2b. Detalhe dos tecidos periféricos, com células epidérmicas amplas, deposição de ceras epicuticulares, raros cristais de sal na epiderme (seta branca) e grandes concentrações no parênquima paliçádico (seta preta). 2c. Célula do parênquima paliçádico contendo cristais de sal (setas; microanálise - espectro Fig. 6c). 2d. Detalhe das células do hidrênquima, com presença de cristais de sal (seta). 2e. Cristais nas células do hidrênquima (setas; microanálise - espectro Fig. 6e).

**Figura 3** - Secção transversal da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (região B)



**Legenda:** 3a. Aspecto geral do caule (ca) e da bainha foliar (bf), esta constituída por epiderme (ep), parênquima paliçádico (pp) e hidrênquima (hi). 3b. Detalhe dos tecidos periféricos, com células epidérmicas amplas, deposição de ceras epicuticulares, com raros cristais de sal no parênquima paliçádico (seta branca) e grandes concentrações no hidrênquima (seta preta). 3c. Célula do parênquima paliçádico contendo cristal de sal (seta; microanálise - espectro Fig. 7c). 3d. Detalhe das células do hidrênquima, com presença de cristais de sal (seta). 3e. Cristais nas células do hidrênquima (setas; microanálise - espectro Fig. 7e).

A epiderme interna da bainha é pouco evidente, mostrando-se contínua com a epiderme que delimita o caule, a qual apresenta células com paredes espessadas e, muito precocemente, origina uma periderme. Regiões mais basais da planta perdem a bainha, e a periderme caulinar passa a ser o tecido externo de proteção. Entretanto, a epiderme voltada para o exterior mostra células amplas (**Figura 2b**), revestida por cutícula e com evidente deposição de ceras epicuticulares. A epiderme é revestida externamente pela cutícula, a qual é uma membrana protetora complexa secretada através das paredes externas das células epidérmicas, constituída por quatro elementos essenciais como cutina, ceras, polissacarídeos (pectinas, celulose, hemicelulose) e ligninas (CASTRO et

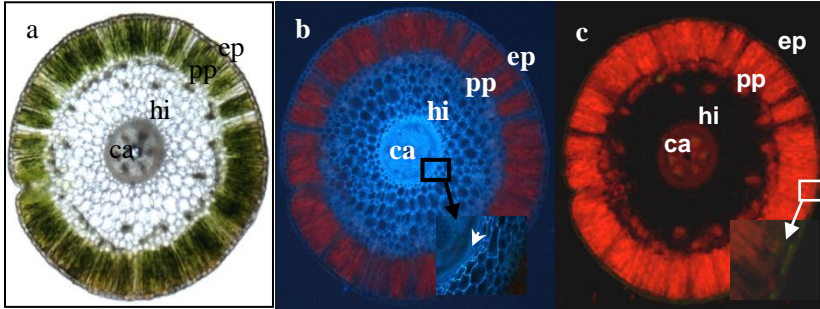
al., 2005). Kozłowski (1997) menciona que, em folhas de plantas que crescem em áreas salinizadas (tolerantes ao sal), as mesmas têm paredes das células epidérmicas e cutícula mais espessas. Cabe destacar que nas espécies de *S. ambigua*, a deposição de ceras epicuticulares e o amplo lume celular representam características relevantes para o equilíbrio hídrico interno, minimizando os efeitos da salinidade do ambiente.

O mesofilo está constituído por parênquima paliçádico, adjacente à epiderme, e hidrênquima, mais internamente (**Figuras 2a e 3a**). Sánchez e Navarro (2004) também já haviam verificado nas estruturas anatômicas da *S. ramosissima*, um mesofilo constituído por amplo hidrênquima e parênquima paliçádico clorofilado.

O parênquima paliçádico está formado por células alongadas e justapostas, sendo o único tecido com ocorrência de clorofila, o que ficou melhor evidenciado através da microscopia de fluorescência (**Figuras 4 e 5**). As secções transversais da bainha foliar, de ambas as amostras de *S. ambigua* mostraram cor vermelha, com uso de filtro azul (excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm; Figuras 4b e 5b) e filtro verde (excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm; **Figuras 4c e 5c**), indicando que este é o tecido responsável pela fotossíntese. Sabe-se que existem alguns componentes de origem vegetal e animal que emitem fluorescência natural ao serem irradiados com excitação específica, tais como clorofila e compostos fenólicos. Em plantas que possuem clorofila, uma pequena parte da radiação absorvida (1 ou 2% do total da luz absorvida) é suficiente para a emissão de fluorescência natural na cor vermelha (HAGEN et al., 2006; MAXWELL; JOHNSON, 2000; HEALTH, 2000; KALÁB; ALLAN-WOJTAS; MILLER, 1998).

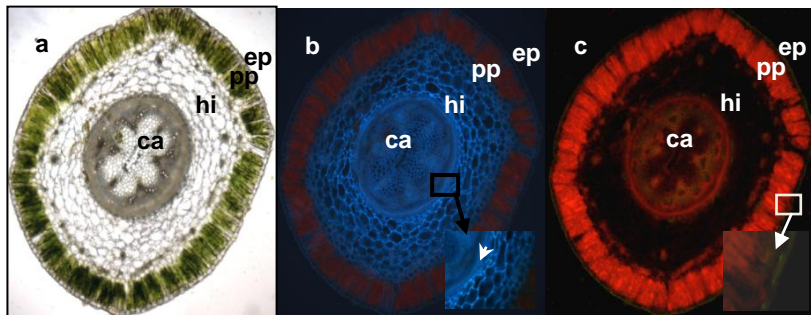
As clorofilas são pigmentos, fundamentais para a sobrevivência vegetal, responsáveis pela cor verde característica da maioria das plantas terrestres e também pela captação de radiação solar, que durante o processo de fotossíntese, é convertida em energia química. A concentração de clorofila nos vegetais varia de acordo com a espécie (SEIFERMAN-HARMS, 1987). Na presente pesquisa, as concentrações foliares de clorofila não foram determinadas, porém estudos realizados com espécies de *S. gaudichaudiana*, *S. bigelovii*, *S. persica* e *S. fruticosa*, detectaram concentrações foliares de clorofila (AGAWU, 2012; LU et al., 2010; COSTA; NEVES, 2006).

**Figura 4** - Secções transversais da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (região A), em microscopia óptica convencional (4a) e de epifluorescência (4b, 4c), evidenciando caule (ca) envolvido por bainha foliar (bf), esta constituída por hidrênquima (hi), parênquima paliçádico (pp) e epiderme (ep).



**Legenda:** 4a. Amostra *in vivo* com cloroplastos mostrando cor verde. 4b. Com uso de filtro azul (excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) evidenciando os cloroplastos na cor vermelha e demais estruturas na cor azul, correspondendo aos tecidos com celulose, hemicelulose e substâncias pécticas; sugere também a presença de compostos fenólicos na epiderme e mesofilo. Detalhe mostra contato da epiderme interna da bainha foliar com a periderme caulinar. 4c. Com uso de filtro verde (excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm), destaque aos tecidos clorofilados, em vermelho, no parênquima paliçádico. Lignina e cutina mostraram cor verde, a primeira restrita aos elementos vasculares e a cutina (detalhe) delimitando a epiderme.

**Figura 5** - Secções transversais da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (região B), em microscopia óptica convencional (5a) e de epifluorescência (5b, 5c), evidenciando caule (ca) envolvido por bainha foliar (bf), esta constituída por hidrênquima (hi), parênquima paliçádico (pp) e epiderme (ep).



**Legenda:** 5a. Amostra *in vivo* com cloroplastos mostrando cor verde. 5b. Com uso de filtro azul (excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm) evidenciando os cloroplastos na cor vermelha e demais estruturas na cor azul, correspondendo aos tecidos com celulose, hemicelulose e substâncias pécicas; sugere também a presença de compostos fenólicos na epiderme e mesofilo. Detalhe mostra contato da epiderme interna da bainha foliar com a periderme caulinar. 5c. Com uso de filtro verde (excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm), destaque aos tecidos clorofilados, em vermelho, no parênquima paliçádico. Lignina e cutina mostraram cor verde, a primeira restrita aos elementos vasculares e a cutina (detalhe) delimitando a epiderme.

A microscopia de fluorescência, com uso de filtro azul (excitação: 330 – 385 nm; emissão: 420 nm), também possibilitou verificar a fluorescência primária ou autofluorescência na bainha foliar das amostras de *S. ambigua*, evidenciada pela cor azul (Figuras 4b e 5b), indicando provavelmente a presença de compostos fenólicos nas células da epiderme e mesofilo. De acordo com Brien e McCully (1981), algumas substâncias como os compostos fenólicos, emitem fluorescência natural ao serem irradiados com excitação específica.

Os compostos fenólicos compreendem um amplo grupo de compostos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais, responsáveis por uma diversidade de funções, sendo que a principal delas é proteger as plantas contra os fatores ambientais relacionados ao estresse abiótico como aqueles associados às mudanças climáticas, temperatura, disponibilidade hídrica, níveis de luz, radiação ultravioleta, altitude, composição atmosférica e deficiência de nutrientes (NETO, 2007; CASTRO et al., 2005).

O hidrênquima é o tecido que ocupa grande proporção na parte aérea (**Figuras 4a e 5a**) e está constituído por células de paredes delgadas e amplos vacúolos, sendo especializadas em armazenar água. Assim, este tecido atua como reservatório hídrico, conferindo uma anatomia caulifoliar suculenta (caráter suculento) em potencial para esta espécie.

A suculência presente nas espécies de *Salicornia* e *Sarcocornia* se deve a uma adaptação fisiológica observada em plantas tolerantes ao sal, no qual as mesmas tentam diluir os sais concentrados em suas folhas com subsequente aumento do teor de água em seu interior, com vistas à regulação do equilíbrio osmótico (JACOBY, 1994; DICKISON, GRIGORE, TOMA; BOSCAIU, 2010).

As análises em microscopia de fluorescência, com o uso do filtro verde (excitação: 460 – 490 nm; emissão: 520 nm), ainda possibilitou constatar que grande parte dos tecidos (epiderme, parênquima paliádico e hidrênquima da bainha foliar e tecidos do caule) apresentou paredes celulares de cor azul (**Figura 4b e 5b**), indicando que estas estão constituídas por celulose, hemicelulose e substâncias pécticas, sendo destituídas de lignina. Com o uso de filtro verde, verificou-se também a presença de cutina na superfície epidérmica (**Figura 4c e 5c - detalhe**) e de lignina nos elementos vasculares. Ambas as substâncias estão caracterizadas pela cor verde.

De acordo com Mauseth (1988) e Evert (2006), usualmente as células epidérmicas e parenquimáticas, apresentam paredes celulares constituídas por celulose, hemicelulose e substâncias pécticas, entretanto não se pode afirmar a presença destes compostos isoladamente, nas referidas amostras, pois análises histoquímicas mais específicas são necessárias.

Em estudo realizado por Sánchez e Navarro (2004), no qual avaliaram as características micromorfológicas e anatômicas de algumas halófitas incluindo a espécie *Salicornia ramosissima*, os autores verificaram a presença de pequenos feixes de fibras no mesofilo, porém não realizaram nenhuma descrição mais aprofundada da composição histoquímica das mesmas. Grigore, Toma e Boscaiu (2010) após realizaram observações anatômicas e ecológicas de algumas halófitas, incluindo as espécies *S. ramosissima* e *S. fruticosa*, também verificaram a presença de paredes espessas e lignificadas em células esclerenquimáticas (feixes de fibras no mesofilo) e em células do xilema de ambas as espécies.

Cabe destacar que devido às condições ambientais estressantes a qual as halófitas estão sujeitas (baixa disponibilidade de matéria



orgânica, submersão periódica, drenagem rápida da água, luz solar direta e intensa, e inundação com água salina), algumas adaptações bioquímicas podem ser utilizadas por estas plantas para sobreviver ao ambiente hostil característico dos solos submetidos a efluentes salinos. Dentre estas adaptações, uma que se destaca é a alteração na estrutura da membrana celular e produção de compostos antioxidantes como os compostos fenólicos (AGAWU, 2012; BOEGER; GLUZEZAK, 2006; PARIDA; DAS, 2005; SILVA, 2000).

A distribuição dos compostos fenólicos em tecidos vegetais normalmente não é uniforme, já que os tecidos mais externos podem apresentar maior concentração de compostos fenólicos comparados aos tecidos de camadas mais internas (NACZK; SHAHIDI, 2006; BENGOCHEA et al., 1997; SIMON et al., 1992). De um modo geral, os taninos se distribuem por todas as regiões e tecidos das plantas, particularmente no córtex, floema e raios medulares, e os flavonoides, se distribuem nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, no tecido parenquimático e no suco celular (COSTA; PROENÇA DA CUNHA, 2000).

Na presente pesquisa, não foram realizados testes histoquímicos para confirmar a natureza química e distribuição dos compostos fenólicos nos tecidos vegetais das amostras avaliadas, e até o presente momento nenhum estudo de caracterização histoquímica dos compostos fenólicos, presente nas espécies de *Sarcocornia* e *Salicornia* foi realizado. Mas pode-se afirmar quimicamente, que há a presença destes compostos na estrutura vegetal de ambas as amostras estudadas de *S. ambigua*, bem como em outras espécies de *Sarcocornia* e *Salicornia*, pois pesquisas recentes realizadas com o objetivo de identificar e isolar os compostos fenólicos presentes nestas espécies, verificaram a presença de ácido clorogênico, sinápico, ferúlico, cafeico, salicílico, siringico, *p*-cumárico e ácido trans-cinâmico, bem como derivados do ácido dicafeoilquínico e outros ácidos fenólicos, tais como escopoletina e pentadecil ácido ferúlico (BERTIN et al., 2014; WANG et al., 2013; ESSAÏDI et al., 2013; ZHU et al., 2010; RHEE et al., 2009; HWANG et al., 2009; CHUNG et al., 2005), em conjunto com alguns flavonoides, como a miricetina, quercetina, kampferol, ramnetina, isoramentina, hesperidina, galangina, acacetina, quercetina, rutina e outros flavonoides glicosilados (BERTIN, et al., 2014; ESSAÏDI et al., 2013; KIM et al., 2011, KIM et al., 2008; LEE et al., 2005).

Outro mecanismo regulatório que pode ser visualizado nas plantas tolerantes ao sal, devido à elevada concentração de sais minerais, na água presente nos vacúolos do mesofilo (hidrênquima), é a formação de

estruturas cristalíferas (cristais) com diferentes composições de minerais e/ou resíduos metabólicos (SÁNCHEZ ANTA; NAVARRO ANDRÉS; 2004).

A presença de estruturas cristalíferas foi verificada em ambas as amostras de *S. ambigua*, nas células do mesofilo (hidrênquima e parênquima paliçádico) (**Figuras 2c-2e; 3c-3e**). No entanto, não foram feitos testes histoquímicos. Para determinar a composição química dos mesmos, as microanálises realizadas por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDX) revelaram a presença de Na, K e Mg nestes cristais, conforme ilustrado na **Tabela 1** (percentagem média) e espectros das concentrações relativas dos elementos químicos detectados (**Figuras 6 e 7**).

Grigore, Toma e Boscaiu (2010) também puderam verificar em células do floema secundário (raiz) da *S. ramosissima*, algumas drusas com cristais, compostos por oxalato de cálcio. Em contrapartida aos achados do presente estudo, Khan, Weber e Hess (1986) e Sánchez Anta e Navarro Andrés (2004), após estudarem as características anatômicas da *S. pacifica* e *S. ramosissima*, não registraram a presença de estruturas cristalíferas nos tecidos vegetais avaliados (parte aérea e raiz).

Sabe-se que, de modo geral, os depósitos cristalíferos evitam a toxicidade das células ou tecidos ao excesso de sal nas plantas tolerantes ao sal, além de auxiliar na defesa das mesmas contra a herbivoria, devido ao fato de serem impalatáveis; também os cristais representam um caráter xeromorfo por refletir irradiação solar (FAHN; CUTTLER, 1992; ARNOTT; WEBB, 2000).

Ainda com relação aos mecanismos fisiológicos adaptativos observados, em muitas halófitas, com vistas à redução do estresse salino, tem-se a exclusão de sódio e cloreto através de estruturas morfológicas denominadas glândulas secretoras de sal e tricomas vesiculares (um tipo particular de glândula salina) (FERNANDES et al., 2010). Essas glândulas são estruturas únicas, presentes na epiderme, mais especificamente na superfície das folhas e consistem de células basais que permitem à planta excretar sal seletivamente, da porção aérea (JACOBY, 1994).

Nas análises das estruturas anatômicas da *S. ambigua* (região A e B), realizadas no presente estudo, não foram encontradas glândulas secretoras de sal, indicando possivelmente que outros mecanismos regulatórios estejam envolvidos no processo de eliminação de sódio pelas folhas destas espécies. Khan, Weber e Hess (1986), Sánchez e Navarro (2004) e Grigore, Toma e Boscaiu (2010) também não verificaram a

presença de glândulas secretoras de sal e tricomas vesiculares nas estruturas anatômicas das espécies *S. pacifica*, *S. ramosissima* e *S. fruticosa*.

De acordo com Yensem (2000), as espécies de *Salicornia* e *Sarcocornia* não se caracterizam por serem plantas excretoras com glândulas secretoras de sal, mas sim por serem plantas acumuladoras que sequestram os sais do solo e armazenam dentro dos vacúolos das células de osmorregulação.

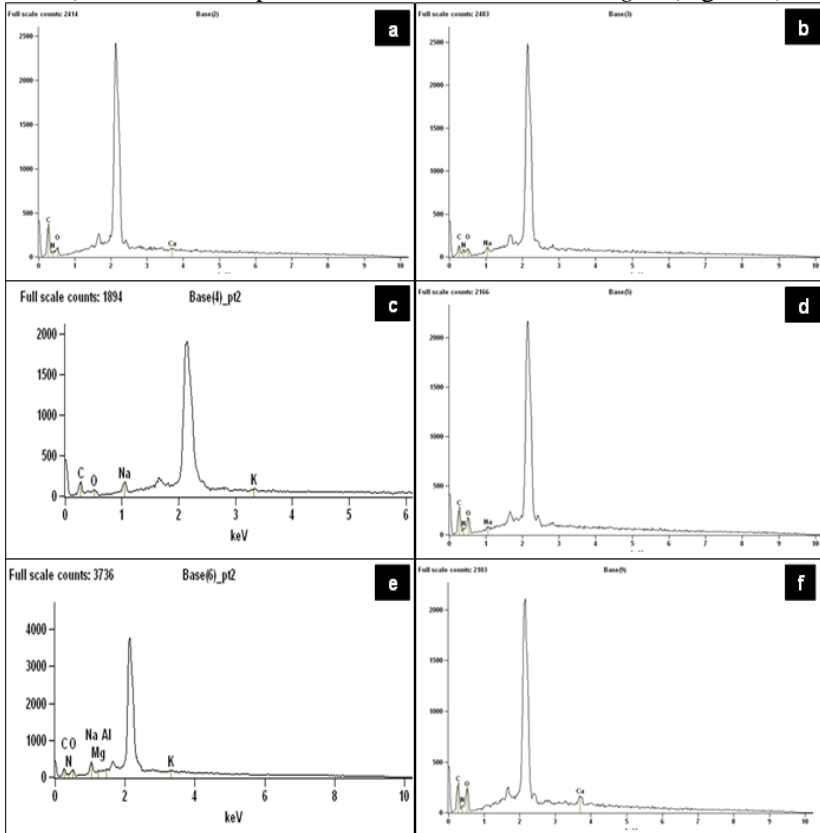
**Tabela 1** - Percentagem média relativa dos elementos químicos detectados, nos tecidos de *Sarcocornia ambigua* (região A e B), por meio de microanálise com EDX- MEV

	<b>Tecido</b>	<b>Na (%)</b>	<b>K (%)</b>	<b>Ca (%)</b>	<b>Mg (%)</b>	<b>C, O, N (%)</b>
<b>Parte aérea de <i>S. ambigua</i> (região A)</b>	Epiderme	N.D.	N.D.	3,5	N.D.	96,50
	Parênquima paliçádico	4,7	N.D.	N.D.	N.D.	95,30
	Cristais P. paliçádico	13,68	8,11	N.D.	N.D.	78,21
	Hidrênquima	N.D.	1,74	N.D.	N.D.	98,26
	Cristais do hidrênquima	11,3	5,61	N.D.	0,31	82,78
	Periderme caulinar	N.D.	N.D.	11,92	N.D.	88,08
<b>Parte aérea de <i>S. ambigua</i> (região B)</b>	Epiderme	2,02	2,21	N.D.	N.D.	95,77
	Parênquima paliçádico	0,77	N.D.	N.D.	N.D.	99,23
	Cristais P.paliçádico	1,0	N.D.	N.D.	N.D.	99,00
	Hidrênquima	N.D.	N.D.	4,11	N.D.	95,89
	Cristais do hidrênquima	14,28	29,71	N.D.	N.D.	56,01
	Periderme caulinar	N.D.	N.D.	9,16	N.D.	90,84

**Legenda:** N.D. - Não detectado.

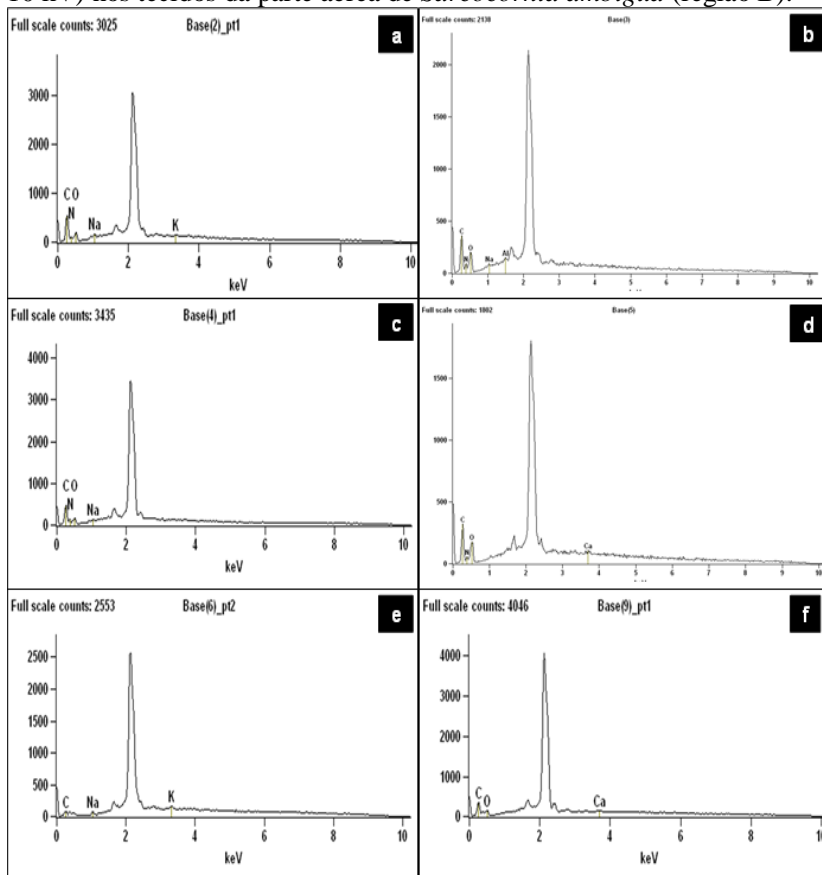
C - carbono; O - oxigênio; N – nitrogênio.

**Figura 6** - Espectros derivados de microanálise química (EDX/MEV; 10 kV) nos tecidos da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (região A).



**Legenda:** 6a-e. Bainha foliar. 6a. Na epiderme. 6b. No parênquima paliádico. 6c. Ponto em cristal na célula do parênquima paliádico. 6d. No hidrênquima. 6e. Ponto em cristal na célula do hidrênquima. 6f. Na periderme do caule.

**Figura 7** - Espectros derivados de microanálise química (EDX/MEV; 10 kV) nos tecidos da parte aérea de *Sarcocornia ambigua* (região B).



**Legenda:** 7a-e. Bainha foliar. 7a. Na epiderme. 7b. No parênquima paliçádico. 7c. Ponto em cristal na célula do parênquima paliçádico. 7d. No hidrênquima. 7e. Ponto em cristal na célula do hidrênquima. 7f. Na periderme do caule.

Os resultados sobre a distribuição dos elementos químicos nos tecidos das amostras de *S. ambigua* (região A e B), com uso de microanálise com energia dispersiva de raios-X, em MEV, são apresentados na **Tabela 1**. Cabe ressaltar que os elementos carbono (C), oxigênio (O) e nitrogênio (N) por apresentarem concentrações elevadas em relação aos demais elementos químicos – 45%, 45% e 1,5% respectivamente (SALISBURY; ROSS, 1992), foram desconsiderados nas interpretações, para que os picos dos demais elementos fossem

ressaltados gráfica e proporcionalmente. Desta forma, apenas 8,5% corresponde aos demais elementos químicos presentes nas diversas estruturas (cristais, células e tecidos) embora alguns possam ocorrer em concentrações mais elevadas, em relação aos percentuais dos elementos básicos constituintes das amostras biológicas. Este é o caso, por exemplo, dos cristais encontrados nas células do hidrênquima, em amostras da região B, que mostraram Na e K com percentual relativo ao total detectado de 43,99%, aproximando-se do percentual dos elementos básicos (56,01%).

Nesta pesquisa, foi considerado o caminho do fluxo dos elementos químicos absorvidos do solo, passando da raiz para o caule, através do sistema vascular e seguindo para os tecidos clorofilados da folha, parênquima paliçádico (**Figuras 6b e 7b**) em *S. ambigua*, no qual ocorrem processos metabólicos culminando com a síntese de compostos orgânicos. Estes compostos, assim como resíduos destes processos, são conduzidos para a epiderme (**Figuras 6a e 7a**), hidrênquima (**Figuras 6d e 7d**) da folha (bainha foliar, na espécie em estudo) e tecidos corticais e de revestimento (**periderme – Figuras 6f e 7f**) do caule.

O elemento encontrado em maior concentração na epiderme e no hidrênquima foi o Ca seguido do K, porém a distribuição destes elementos diferiu entre as amostras. As taxas de Na foram visualizadas na epiderme e no parênquima paliçádico. Já na epiderme caulinar o único elemento detectado foi o Ca. Quando realizadas análises pontuais nos cristais presentes nas células do parênquima paliçádico e nos cristais presentes nas células do hidrênquima, verificou-se a presença de taxas elevadas de Na e K, e baixos teores de Mg (**Tabela 1**).

Cabe destacar que a distribuição dos elementos Na, K, Ca, Mg nos diversos tecidos constituintes da bainha foliar (epiderme, parênquima paliçádico e hidrênquima) e periderme caulinar, parece não seguir um padrão de distribuição entre as amostras e podem não ter sido detectadas, por suas concentrações serem inferiores ao limite de detecção do equipamento utilizado. De acordo com Silva (2000), a distribuição dos minerais nos diferentes tecidos vegetais tende a ser heterogênea, pois o comportamento das plantas de um modo geral varia não só no grau em que absorvem os nutrientes disponíveis no ambiente, mas também no modo como os distribuem e compartimentam em seus órgãos e tecidos.

As variações na absorção dos minerais, bem como a sua acumulação, é dependente de mudanças sazonais e micro-climáticas, embora possa não obedecer a um determinado padrão. Estas variações também podem ser resultado de diferenças na disponibilidade dos minerais no solo (WILLIANS et al., 1994; ERNST, 1990). Diferenças na

idade e estado de crescimento das plantas, podem também explicar variações na concentração dos minerais (REBOREDO, 1985). Por outro lado, as diferenças na absorção dos minerais podem ser devido à área de superfície das raízes assim como à sua capacidade de troca catiónica (GREGER, 1999).

A variação na percentagem e distribuição dos minerais já era esperada e pode ser atribuída à origem de coleta das duas amostras, pois as amostras de *S. ambigua* coletadas da região A, desenvolvem-se em uma marisma natural perto da costa, na presença de inundação constante com a água do mar e as amostras coletadas na região B são cultivadas a partir de um pequeno “cultivo experimental” de *S. ambigua* integrado ao cultivo de camarão no qual as plantas são irrigadas com água do mar e adubadas com lodo drenado dos decantadores utilizados no cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei*.

Em relação aos minerais encontrados em ambas as amostras (Na, K, Ca, Mg), sabe-se que pelo fato dos mesmos se destacarem por serem os mais abundantes, possuem maior mobilidade e serem mais rapidamente assimiláveis pelas plantas, exercem funções específicas no metabolismo das halófitas. Além disso, pelo fato destas plantas viverem em ambientes salinos, o crescimento das mesmas pode ser adversamente afetado por distúrbios relacionados à disponibilidade destes minerais no meio ambiente, bem como pelo próprio mecanismo regulatório de absorção das plantas (CASTRO et al., 2005).

Sobre o sódio, existem muitas controvérsias na literatura quanto à sua classificação, bem como sua essencialidade para as plantas, mas sabe-se que ele estimula o crescimento das mesmas, por meio de uma maior expansão celular (CASTRO et al., 2005).

Na maioria das espécies vegetais a acumulação de sódio obedece a seguinte ordem: raízes, caule, folhas. Sua mobilidade no floema é grande (principalmente nas halófitas) e suas funções não são bem conhecidas. Alguns indícios das funções do sódio são: acúmulo do ácido oxálico, substituição do potássio, abertura estomatal e regulação redutase do nitrato (MALAVOLTA et al., 1989).

Aceita-se de um modo geral que, dependendo da planta, o sódio pode substituir parcialmente o potássio para poupar este elemento. No metabolismo das plantas, o sódio é absorvido ativamente e favorece a absorção de potássio, especialmente quando em presença de baixas concentrações deste, e como o sódio tende a acumular até concentrações mais altas no vacúolo pode-se esperar que substitua o potássio vacuolar quando o suprimento deste é limitado. Deste modo, o sódio substituiria o potássio em sua contribuição ao potencial de soluto e consequentemente

na geração de turgor da célula (BRENNECKE, 2003).

Devido a estas características o sódio torna-se um elemento essencial para as halófitas, pois as mesmas realizam seu ciclo de vida em ambientes com elevada concentração salina (100 a 500 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) (FLOWERS; COLMER, 2008).

Em relação ao potássio, o mesmo exerce um importante papel na regulação osmótica e relações hídricas, além de ser ativador de muitas enzimas do metabolismo vegetal indispensáveis aos processos de fotossíntese e respiração, bem como para formação de amido e proteínas (SILVA, 2000; MARSCHNER, 1995).

O potássio constitui 1% da concentração interna das plantas superiores, considerando todos os elementos essenciais, e é mais abundante nos vacúolos e citoplasma, no qual atinge uma concentração próxima de 100 mmol. Também se encontra na forma livre na seiva dos tecidos condutores, sendo muito móvel nas plantas (GRABOV, 2007; SALISBURY; ROSS, 1992).

Para que as plantas possam ter um suprimento adequado de potássio é necessário que a membrana plasmática das células corticais da raiz tenha uma grande afinidade para o potássio em detrimento do sódio, embora o grau de seletividade possa variar bastante entre as espécies. Isto é particularmente importante nos ambientes salinos, em que as concentrações de sódio no solo são mais elevadas que as do potássio, e podem resultar em desequilíbrio nutricional, entre os quais se destaca a redução de absorção de potássio em função da competição do Na<sup>+</sup> pelo sítio de absorção do K<sup>+</sup> na membrana plasmática (GRABOV, 2007; SILVA, 2000).

O cálcio é um elemento abundante em muitas plantas e desempenha papel vital em termos nutricional e fisiológico no metabolismo das plantas. É essencial na preservação da integridade estrutural e funcional das membranas das plantas, estabiliza a estrutura das paredes celulares, regula o transporte de íons, assim como o controle da ação de troca iônica e atividade enzimática da parede celular. Tendo em vista que o cálcio é facilmente removido dos seus sítios de ligação extracelulares por outros cátions, estas funções podem ser afetadas pela baixa disponibilidade de cálcio (SILVA, 2000; MARSCHNER, 1995; GRATTAN E GRIEVE, 1994).

Apesar do cálcio ser absorvido em grandes quantidades, seu conteúdo nos tecidos vegetais variam entre 0,1 e 7% da matéria seca, a concentração de Ca<sup>2+</sup> livre no citoplasma e nos cloroplastos é baixa (1 µM). A maior parte do cálcio celular está concentrada nos vacúolos e nas paredes celulares, podendo estar na forma solúvel, ou precipitado na



forma de oxalato ou fosfato (CASTRO et al., 2005).

Nos solos salinos, a concentração de cálcio aumenta usualmente com o aumento da concentração de sal. No entanto, simultaneamente, a absorção de cálcio do solo pode diminuir devido à interação iônica, precipitação e aumento da força iônica que reduz a atividade do mesmo. Além disso, a competição iônica específica entre  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  pode ser responsável pela deficiência deste nutriente. Desta forma, nos solos em que o sódio é o íon dominante, pode-se verificar uma redução na absorção dos íons cálcio e potássio pelas plantas e/ou uma deficiente distribuição interna destes elementos, embora em alguns casos verifique-se um aumento do crescimento nestas condições (SILVA, 2000; GRATAN; GRIEVE, 1994).

O magnésio é um elemento muito móvel nas plantas, assim como no interior das células. A maior parte deste elemento encontra-se na forma iônica no vacúolo (CASTRO et al., 2005). As funções do magnésio nas plantas estão relacionadas com a sua capacidade para inter-relacionar com grupos fortemente nucleofílicos (ex: bases nitrogenadas e grupos fosforil) formando ligações que vão desde iônicas até parcialmente covalentes. Por essa propriedade, acaba atuando como um elemento de ligação entre moléculas e ativa processos como a síntese de proteínas e a transferência de grupos fosfato (SILVA, 2000).

O grau de absorção do magnésio pode ser fortemente diminuído pela presença de outros cátions, tais como potássio, cálcio, manganês, bem como pelo íon hidrogênio. A deficiência de magnésio induzida por competição com outros íons é um fenômeno bastante comum, o que pode justificar a baixa percentagem e distribuição deste elemento nas halófitas (CASTRO et al., 2005; SILVA, 2000).

#### **4. Conclusão**

A partir da análise histológica e microanálise química de amostras de *S. ambigua* foi possível conhecer as estruturas que compõem a parte aérea desta planta e a localização de alguns dos seus constituintes químicos.

Os estudos histológicos possibilitaram interpretações sobre as adaptações destas plantas às peculiaridades do ambiente no qual vivem. Entre as características relacionadas às condições ambientais estressantes, às quais as halófitas estão sujeitas, podem ser destacadas as ceras epicuticulares, o hidrênquima e os cristais. A deposição de ceras epicuticulares, juntamente com a espessa cutícula, favorece a reflexão da irradiação solar muito intensa nestes ambientes. O hidrênquima,

constituído por células de paredes delgadas e amplos vacúolos, confere uma anatomia caulifoliar suculenta que assegura a regulação do equilíbrio osmótico, indispensável para as halófitas que estão sujeitas à alta salinidade. Isto foi confirmado pela presença de depósitos cristalíferos no lume celular, os quais evitam a toxicidade das células ou tecidos ao excesso de sal.

Os resultados sobre a distribuição dos elementos químicos, com uso de microanálise de energia dispersiva de raios-X, em MEV, demonstraram que, de um modo geral, as concentrações e a distribuição dos elementos minerais, detectados nos tecidos vegetais de ambas as amostras de *S. ambigua*, mostraram grande variação. Esta variação, certamente está relacionada ao momento fisiológico em que a dinâmica celular destas plantas foi interrompida, bem como, pelas próprias adaptações metabólicas advindas de alguns fatores ambientais aos quais esta espécie está submetida e que podem afetar diretamente a relação entre a concentração dos diversos minerais do solo e a absorção dos mesmos pelas plantas.

Cabe destacar que estudos nessa área ainda são muito limitados, mas importantes para o conhecimento de novas matérias primas vegetais. Desta forma, mais pesquisas devem ser realizadas e encorajadas, pois, apesar da complexidade anatômica das halófitas e da diversidade estrutural dos constituintes químicos das mesmas, considerar a heterogeneidade ambiental, as variáveis envolvidas no desenvolvimento e cultivo das plantas (composição mineral do solo, temperatura, estresse biótico e abiótico, qualidade e composição da água para irrigação), permitirá um maior aprofundamento sobre a temática.

**CAPÍTULO 3 - NUTRIENT COMPOSITION AND,  
IDENTIFICATION/QUANTIFICATION OF MAJOR PHENOLIC  
COMPOUNDS IN *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) USING  
HPLC-ESI-MS/MS**

**Artigo Publicado na Revista Food Research International** - Bertin, R.L., Gonzaga, L.V., Borges, G.S.C., Azevedo, M.S.A., Maltez, H.F., Heller, M., Micke, G.A., Ballod, L.B.B., Fett, R. (2014). Nutrient composition and identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS. Food Research International, 55, 404 – 411.

## **NUTRIENT COMPOSITION AND, IDENTIFICATION/QUANTIFICATION OF MAJOR PHENOLIC COMPOUNDS IN *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) USING HPLC-ESI-MS/MS**

### **ABSTRACT**

The study systematically investigated the nutritional potential of two different growing populations of *Sarcocornia ambigua* (salt-tolerant) in terms of nutrients, bioactive compounds, and antioxidant activities. The results revealed that the moisture content represented the largest single component (88.15% and 88.57%) in the proximate composition of both samples of *S. ambigua*. The mineral present in highest amounts in both samples (on a fresh matter basis) was sodium, followed by potassium, magnesium and then calcium. The antioxidant activity for samples measured by DPPH ranged from 34.64 to 135.83  $\mu\text{mol TEAC } 100\text{g}^{-1}$  and by FRAP from 31.92 to 170.14  $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100\text{g}^{-1}$ . The fifteen phenolic compounds identified in each extract by HPLC-ESI-MS/MS reveal the presence of one coumarin (scopoletin), one phenolic aldehyde (syringaldehyde), eight phenolic acids (p-coumaric, cinnamic, vanillic, ferulic, caffeic, syringic, sinapic, and chlorogenic acids) and five flavonoids (galangin, quercetin, naringin, kaempferol and isoquercetrin). This information can be useful in determining the possible role of the compounds identified which can participate in the prevention of different health disorders. Further studies are needed to evaluate the bioabsorption and bioavailability of the compounds present in *S. ambigua*, as well as the interactions between them, after consumption. In summary, the findings of this study highlight the potential of this halophyte as a valuable source of natural antioxidants and nutrients for use in the food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** *Sarcocornia ambigua*; Halophyte; Phenolic compounds; Antioxidant activity; Mass spectrometry, Minerals.

## 1. Introduction

Plants of the *Sarcocornia* genus (Amaranthaceae) are halophytes (salt-tolerant) that grow in saline areas, usually near the coast and along the shores of salt lakes and marshes (KADEREIT; MUCINA; FREITAG, 2006). The Amaranthaceae family comprises approximately 160 genera and 2,400 species. Five South American species of *Sarcocornia* have been identified and four different morphological types are found in South America and the Mediterranean countries (ALONSO; CRESPO, 2008). In South America the perennial *Salicornia gaudichaudiana* occurs along the entire coast of Brazil and as far south as Mar del Plata in Argentina (SOUZA FILHO; PARADELLA, 2002; COSTA; DAVY, 1992). In Brazil new experimental crops of perennial *Salicornia* and *Sarcocornia* have been grown applying an irrigation system that uses saline effluent from shrimp farms (D'OCA et al., 2012). The taxonomy and nomenclature of the taxonomic description of *S. gaudichaudiana* growing in South America has recently been updated and currently this species is referred to as *Sarcocornia ambigua* Michx. (Alonso & Crespo, 2008).

Different species of the *Salicornia* and *Sarcocornia* genera are suitable for crop production and they have received good acceptance from consumers, who are exclusively interested in the young green plant parts that are sold in the market as 'sapphire' or 'sea asparagus'. The latter name probably reflects the shape of the shoots, which resemble the tops of green asparagus.

The aerial part of *Salicornia herbacea* has been used as a characteristic food by coastal people and as a folk medicine to treat a variety of diseases (KIM et al., 2011; ZHU; ROW, 2010). The *Salicornia* species have been introduced into the European market as a vegetable with leafless shoots resembling green asparagus and, specifically in Italy and France they have been used as an ingredient in vinegar. Also, in Korea they are consumed as a seasoned vegetable, salad and fermented food (KIM et al., 2011).

There is currently considerable interest in these plants since they have been shown to be a promising functional food given their high nutritional value in terms of natural minerals, including Mg, Na, Ca, Fe and K, dietary fiber and many bioactive compounds, such as phytosterols, polysaccharides and phenolic compounds, particularly flavonoids and phenolic acids (VENTURA et al., 2011; JANG et al., 2007).

A number of studies have been carried out on the nutritional and

chemical characterization of the phenolic compounds content and antioxidant activity of different halophytic species (*S. herbacea*, *Salicornia bigelovii*, *Salicornia persica*, *Sarcocornia fruticosa*) that grow in saline areas in several countries (VENTURA et al., 2011; KIM et al., 2011; LU et al., 2010; KIM et al., 2009; KIM; LEE, 2009; RHEE et al., 2009; OH et al., 2007; MIN et al., 2002).

The extraction and analysis of the bioactive compounds in *S. herbacea* have attracted attention. Recent studies have been focused on the isolation of bioactive compounds from the aerial parts of *S. herbacea*, such as flavonoid glycosides (isorhamnetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside and quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside), phenolic acids (caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid, ferulic acid and sinapic acid) and flavonoids (myricetin, quercetin hesperetin, kampferol, rhamnetin and acacetin) in order to elucidate their potential health benefits (ESSAIDI et al., 2013; KIM et al., 2011; KONG et al., 2009).

Previous studies have shown that *S. herbacea* has several biological and physiological effects on health, with properties including antidiabetic (PARK et al., 2006; LEE et al., 2005), antioxidant, anti-inflammatory (LEE et al., 2007; MIN et al., 2002), antithrombus (LEE et al., 2005) and antihyperlipidemic (CHA et al., 2004) activity.

However, little attention has been given to species found in Brazil, and there have been no reports on the characterization of the nutrient composition, bioactive compounds and antioxidant activity profile of *S. ambigua*.

Thus, a detailed study on the proximate composition of *S. ambigua* will contribute to the generation of data that can be used in food composition tables, as well as to provide better dietary guidance. Additionally, the major phenolic compounds in this species were characterized using HPLC-ESI-MS/MS and the “*in vitro*” antioxidant activity was evaluated.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Plant material**

Sampling of the plant material from two different regions of *S. ambigua* in the state of Santa Catarina (SC), Brazil, was conducted in October 2012. The material was collected from two regions; the first located on a natural tideland near the coast in Palhoça (latitude 27° 40' 54.76" S, longitude 48° 38' 19.63" O) (Region A), and the second in Barra da Lagoa, Florianópolis (Latitude 27° 34' 33" S, Longitude 48° 26' 33" O) (Region B) from an experimental crop irrigated once a day with

seawater and fertilized with sludge taken from the settling tanks of a shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farm. The material was botanically identified at the Department of Botany of the Regional University of Blumenau. A voucher specimen was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium at the Regional University of Blumenau (n°. 41346). The plant samples were transported to the Laboratory of Food Chemistry within a maximum of 2 h after collection.

## 2.2 Chemical reagents

The chemical reagents used were 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) and sodium hydroxide purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Gallic acid, was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Hydrochloric acid (HCl), anhydrous ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical S.A (Madrid, Spain). A commercial mixture of fatty acid methyl esters (FAME): 10 mg mL<sup>-1</sup> Grain Fatty Acid Methyl Ester Mix (analytical standard) in methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). A standard multielement ICP III solution purchased from Perkin Elmer (Shelton CT, USA) and Rh stock solution supplied by Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland) were employed. Argon gas with a purity of 99.996% purchased from White Martins (Sao Paulo, Brazil) was used. All reagents were of analytical grade unless otherwise indicated. Distilled and deionized water with a resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm was obtained from a Milli-Q plus system (Millipore, Bedford, USA). The standards of phenolic compounds used in the HPLC-ESI-MS/MS analysis were obtained from Sigma-Aldrich (Sao Paulo, SP, Brazil) and all of them presented purity above 98%. A stock solution of each standard of phenolic compound was prepared by dissolving 10 mg in 10 mL of methanol (1000 mg L<sup>-1</sup>), and then, another working solution was prepared by dilution of these 1000 mg L<sup>-1</sup> stock solution to 10 mg L<sup>-1</sup> also in methanol. All solutions were stored at 4°C in a refrigerator.

## 2.3 Sample preparation

The aerial parts (leaf and stem) of the plants to be studied were washed with deionized water, towel dried and submitted to blanching for 10 min at 85 °C to inactivate the enzymes. Part of each sample was maintained in its natural condition and the other part was dried at 65 °C for 12 h (dry sample – DS). Both samples were stored at a temperature of

-  $20 \pm 0.2$  °C until use. For subsequent analysis the samples were ground sufficiently in an Ika® Werke A11 (Staufen, Germany) food processor. This sample was utilized for analysis of fatty acids and mineral.

## 2.4 Chemicals analysis

General parameters were measured following the methods recommended by the Association of Official Analytical Chemicals (AOAC, 2005): moisture content (925.09) was determined by drying the sample in an oven at 105 °C until constant weight; ash content (923.03) was determined by burning the sample in a muffle furnace at 550 °C for 5 h; total lipids (920.85) were determined according to the Soxhlet extraction methodology; and the crude protein (920.87) content was calculated from the total nitrogen content determined by the Kjeldahl method, using a conversion factor of 6.25. Soluble and insoluble dietary fiber content was determined by the enzymatic-gravimetric method (991.43). Available carbohydrate content was obtained by difference, considering 100 g minus the sum (g) of water, protein, lipids, ash and dietary fiber. The chemical analysis was performed in triplicate with the homogeneous fresh sample, derived from the sampling procedure described above, and all results were expressed as fresh matter (% w/w).

## 2.5 Fatty acids composition

The lipids extracted from the whole plant (DS) by the method described in Section 2.4 were converted to fatty acid methyl esters according to Metcalfe, Shmitz, Pelka (1966) and Hartman and Lago (1973), with some adaptations (0.5 mol L<sup>-1</sup> methanolic sodium hydroxide was used for solubilization and saponification; esterification was performed with 3% ammonium chloride and sulfuric acid in methanol and the n-hexane was used for extraction). Fatty acid methyl esters (FAME) were determined using the AOCS Official Method Ce 1f-96 (2002) with appropriate adaptations to the temperature program for the determination of the fatty acid composition. A gas chromatography system (Agilent Technologies model 7890A) equipped with a flame ionization detector (FID), a split/spitless injector (operating with a split ratio of 1:50) and a capillary column HP-88 (88% cyanopropylaryl 60 m x 0.250 mm ID x 0.20 µm film) was used. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The injector and detector temperatures were 250 °C and 300 °C, respectively. The oven temperature was held at 140 °C for 5 min, ramped at 4 °C/min to 240 °C, and held at 240 °C for 10 min. The gas chromatography peaks for FAME were identified by



comparison with known standards. The results were expressed as the relative percentage of each fatty acid.

## 2.6 Mineral analysis

### 2.6.1 Sample preparation

The concentrations of the major minerals (sodium, potassium, magnesium and calcium) were determined on an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICPMS), Perkin - Elmer SCIEX, model ELAN 6000 (Thornhill, Canada) coupled to a cross-flow nebulizer and a Scott spray chamber. Prior to the determination of the total element concentrations a complete destruction of the organic matrix of homogenized samples is required and during the mineralization process all organic compounds were converted into inorganic elements. In this regard, the samples (0.5 g of DS) were microwave digested (MLS-1200 microwave oven; Milestone, Sorisole, Italy), with 6 mL HNO<sub>3</sub> (65% v/v) (Supra pure, Merck, Darmstadt, Germany) and 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v) (Trace Select Ultra; Sigma–Aldrich) at 250 – 600 W for 25 min in closed vessels.

Digested samples were diluted appropriately with ultra-pure laboratory Milli-Q water (18.2 MΩ cm quality; Millipore SAS), and to correct for non-spectral interferences, 10 μg L<sup>-1</sup> Rh was used as the internal standard for all determinations. The concentrations of the standards used for the external calibration, prepared using stock solution Multi-element Calibration Standard 3 (Perkin Elmer, Inc, Shelton, Ct, USA), ranged between 2.0 and 800 μg L<sup>-1</sup>. In order to verify the trueness of the measurements, certified reference materials of the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, USA) were used to evaluate the analytical methods for all of the elements studied. The certified samples were of apple leaves (SRM no 1515) and pine needles (SRM no 1517a). Each sample, including the certified materials, was digested in triplicate and analysis was carried out once on each digest.

The instrument performance was assessed daily prior to the analysis. Argon (99.996%); White Martins, São Paulo, Brazil) was used as the sample introduction and plasma gas. The instrumental parameters were as follows: RF power, 1200 W; sampler and skimmer cones, Pt; scanning mode, peak hopping; resolution, 0.7 amu; readings per replicate, 50; replicates, 3; sweeps/reading, 20; residence time, 50 s; gas flow rates, main 15.0 L min<sup>-1</sup>, intermediate 1.0 L min<sup>-1</sup> and nebulizer 1.0 L min<sup>-1</sup>; and isotopes <sup>23</sup>Na, <sup>24</sup>Mg, <sup>39</sup>K and <sup>43</sup>Ca.

## 2.7 Isolation and purification of phenolic compounds

The aerial parts of the raw plant material (60 g) were treated with methanol (250 mL) and stored at a temperature of  $10 \pm 0.2$  °C for ten days according Filho and Yunes (1998) with some adaptations. After extraction the extract was filtered through Whatman no. 1 filter paper and then evaporated to give a final volume of 50 mL. The pH of the concentrate obtained was then adjusted to pH 12.0 with  $2.0 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH and the samples were kept in the dark for 12 hours at a temperature of  $25 \pm 2$  °C. The pH was then adjusted to 2.0 with HCl solution and partitioned with ethyl ether three times. The ethereal extracts were combined and then evaporated in a rotary evaporator until complete removal of the solvent. Next, the extracts were dissolved in 2 mL of the MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) mixture, sonicated (1400A ® Unique, Sao Paulo, SP, Brazil) for 2 min at room temperature ( $25 \pm 2$  °C), passed through an SPE column (Strata C18-E /Phenomenex previously conditioned with 5 mL MeOH and 5 mL ultrapure H<sub>2</sub>O) and then eluted with a solution of MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) with the volume adjusted to 10 mL. Upon injection into the HPLC–ESI-MS/MS, the extracts were further diluted with methanol.

### 2.7.1 Identification and quantification of phenolic compounds by HPLC–ESI-MS/MS

The HPLC–ESI-MS/MS analysis was performed on a 1200 high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technologies – Waldbronn, Germany). Separation was performed in a Zorbax Eclipse XDB-C8 column (150 mm, 2.1 mm ID, 3.5 µm particle size). The liquid chromatography analysis was carried out using a mobile phase gradient consisting of acetonitrile:water (95:5) (A) and 0.1% formic acid in water (B) with an initial condition of 15% A. The mobile phase was then linearly increased to 95% A and 5% B over 10 min. This condition was maintained for 5 min, giving a total runtime of 15 min. The initial conditions were returned to 15% A and 85% B and equilibrated for a further 10 min. The column temperature was set at 30 °C, the flow rate was  $250 \text{ µL min}^{-1}$  and the sample injection volume was 5 µL. The HPLC system was coupled to a mass spectrometer system consisting of a hybrid triplequadrupole/linear ion trap mass spectrometer, model API 3200TM (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada). Analyst version 1.5.1 was used for the HPLC–ESI-MS/MS system control and data analysis. The mass spectrometry was tuned in negative and positive modes by infusion of a polypropylene glycol

solution. The experiments were performed using the TurbolonSpray® source (electrospray ionization- ESI) in positive ion mode. The capillary needle was maintained at 5500 V. The MS/MS parameters were as follows: curtain gas, 10 psi; temperature, 400 °C; nebulizer gas, 45 psi; auxiliary gas, 45 psi; and collision gas, medium. Other parameters for the cone and collision energy are listed in Table 1 and these optimal conditions were obtained by the infusion of the standards of phenolic compounds at concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> using methanol as solvent. The polyphenolic compounds were monitored using the scan mode multiple reaction monitoring (MRM).

**Table 1** - Operating parameters for analysis in positive MRM mode of the polyphenolic compounds.

Analytes	DP <sup>a</sup>	EP <sup>a</sup>	CEP <sup>a</sup>	CE <sup>a</sup>	CXP <sup>a</sup>
Vanillic acid	26	5.5	10	17/35	4
Chlorogenic acid	26	2.5	18	17/75	6/4
Caffeic acid	21	5	12	11/37	4
Coumarin	36	8.5	10	31/23	4
p-Coumaric acid	21	7.5	14	11/35	4
4-Methylumbelliferone	31	8	10	45/23	4
Coniferaldehyde	31	4	14	13/31	4
Syringaldehyde	21	3.5	10	19/29	4/10
Scopoletin	51	6	12	25/27	4
Ferulic acid	21	3	12	11/17	4
Syringic acid	21	5	12	11/33	4
Sinapaldehyde	31	3.5	16	45/27	4/8
Sinapic acid	16	7	12	13/35	4
Resveratrol	36	3.5	14	31/19	4
Apigenin	21	4.5	16	13/31	4
Naringenina	41	4	12	27	4
Luteolin	46	4	16	113/89	4/30
Kaempferol	51	4.5	14	39/45	4
Aromadendrin	26	5	12	15/19	4
Hispidulin	46	5	14	23/43	4
Quercetin	51	5	14	73/77	4
Apigenin 7-glucoside	51	7	22	29/45	4
Myricetin	26	4	24	19/33	4
Isoquercetrin	21	4.5	26	21/43	6/4
Naringin	16	5	16	23/57	4
Rutin	21	5	24	29/19	6
Cinnamic acid	21	4.5	12	11/25	4
Galangin	66	3.5	14	69/67	4
Catechin	31	3.5	14	19/17	4
Epicatechin	31	3.5	14	19/17	4

<sup>a</sup> DP - Declustering Potential; EP - Entrance Potential; CEP - Collision Energy Potential; CE - Collision Energy; CXP - Collision Cell Exit Potential.

## 2.8 Procedure to determine antioxidant activity (AA)

### 2.8.1 Extract preparation

The extracts were prepared using 10 g of fresh sample (aerial part) with 25 mL of MeOH in an ultrasonic bath (Unique® 1400A, Sao Paulo, SP, Brazil) at room temperature (25 °C) for 30 min and then centrifuged at 1000 x g for 10 min using a Fanem® centrifuge, model 280R (Fanem, Sao Paulo, SP, Brazil). The supernatants recovered were used to evaluate the antioxidant activity.

### 2.8.2 DPPH radical scavenging activity assay

The antioxidant activity against DPPH was determined according to the method Brand-Willians, Cuvelir, Berset (1995) adapted from Kim et al. (2002). A methanol solution containing 0.01 mmol L<sup>-1</sup> DPPH was prepared fresh daily and stored at 20 °C until use. The ethanol solution of the DPPH radical (2.9 mL) was placed in a glass cuvette and the absorbance at 515 nm in  $t = 0$  ( $t_0$ ) was measured using a Hewlet Packard spectrophotometer, model HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). The extract (100 µL) was then added and the mixture was shaken well and incubated in the dark for 30 min ( $t_{30}$ ) at room temperature (25 °C). The absorbance was taken at 515 nm. Inhibition of DPPH free radicals, in percent terms (I %), was calculated according to the formula:

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (\text{absorbance sample } t=30\text{min} / \text{absorbance control } t = 0\text{min})] \times 100.$$

The antioxidant activity of the samples was expressed as µmol Trolox equivalent antioxidant capacity 100 g<sup>-1</sup> of fresh matter (µmol TEAC 100 g<sup>-1</sup> FM), through a calibration curve Trolox 75–1050 µmol.L<sup>-1</sup>. Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

### 2.8.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The antioxidant capacity was estimated by performing the FRAP assay, following the procedure described in the literature by Benzie and Strain (1996). The extract (200 µL) and 200 µL of FeCl<sub>3</sub> (3 mmol L<sup>-1</sup> in 5 mmol L<sup>-1</sup> citric acid) were mixed in a tube and incubated for 30 min in a water bath at 37 °C. TPTZ solution (3.6 mL) was then added and the mixture was vortexed. After exactly 10 min, the absorbance (620 nm) was read using a Hewlett-Packard spectrophotometer, model HP 8452A

(Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalent antioxidant capacity  $100 \text{ g}^{-1}$  of fresh matter ( $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$  FM), based on a calibration curve (Trolox 75–1050  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Each determination was performed in triplicate and was repeated at least three times.

## 2.9 Statistical analysis

All variables were reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three replicates. The results were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and *t*-test. To evaluate the relationship between the variables evaluated. The data analysis was performed using the software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) and differences between the means were considered statistically significant at the 5% level ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1 Chemical analysis

The nutrient composition and mineral content of *Sarcocornia ambigua* are shown in **Table 2**. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were revealed between the samples in terms of the contents of ash, insoluble dietary fiber, total carbohydrate and most minerals.

**Table 2** - Nutrient composition of *Sarcocornia ambigua* collected from two different regions in state Santa Catarina, Brazil

Proximate Composition	Region A	Region B
Moisture (%)	88.15 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	88.57 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>
Ash (g 100g <sup>-1</sup> )	2.96 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	3.64 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>
Crude Protein (g 100g <sup>-1</sup> )	1.93 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Lipids (g 100g <sup>-1</sup> )	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Soluble dietary fiber (g 100g <sup>-1</sup> )	< 0.5	< 0.5
Insoluble dietary fiber (g 100g <sup>-1</sup> )	2.75 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.97 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Total carbohydrate (g 100g <sup>-1</sup> )	3.55 <sup>a</sup>	3.14 <sup>b</sup>
Major minerals		
Sodium (mg g <sup>-1</sup> )	10.19 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	16.57 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
Potassium (mg g <sup>-1</sup> )	2.90 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	1.81 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Magnesium (mg g <sup>-1</sup> )	0.92 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.30 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Calcium (mg g <sup>-1</sup> )	0.54 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>

Values expressed in fresh matter. Results expressed as mean  $\pm$  SD of triplicates. <sup>a-b</sup> Different superscript letters between samples denote significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

The results revealed that the moisture content represented the largest single component (88.15% and 88.57%) in the proximate composition of both samples of *S. ambigua*. Similar findings have been published for different halophytic species grown in Korea and China, with moisture contents of 88.42 to 90.9% (MIN et al., 2002a; LU et al., 2010). The ash content ranged from 2.96 (sample A) to 3.64% (sample B) on a fresh matter basis. These values are two to three times lower than those reported by Min et al. (2002a) and Lu et al. (2010) for *Salicornia herbacea* and *Salicornia bigelovii* (4.36 to 6.2%). Overall, the large oscillations in the ash content may be related to the content of minerals, which varies widely between species of the genus *Salicornia* and *Sarcocornia* (MIN et al., 2002).

The crude protein content ranged from 1.93% (sample A) to 2.06% (sample B), in agreement with results reported by Min et al. (2002a), Ventura et al. (2011) and Agawu (2012), who observed crude protein contents ranging from 1.7 to 2.0%; 2.0 to 3.59% and 1.20 to 4.66% respectively.

The lipid content was relatively low and ranged from 0.16% to 0.12%. The results were shown to be lower than those obtained in previous studies with *Salicornia europaea* (0.34%) (GUIL et al., 1996), *S. herbacea* (0.20 to 0.30%) (MIN et al., 2002a) and *S. bigelovii* (0.37%) (LU et al., 2010).

The total carbohydrate content ranged from 3.55% (sample A) to 3.14% (sample B), in contrast to the result reported by Lu et al. (2010) (4.48%). The predominant dietary fiber was insoluble and ranged from 2.75% (sample A) to 1.97% (sample B). This content is 2-3 times higher than that reported by Lu et al. (2010) for *S. bigelovii* (0.83%).

Wide variations in the chemical compositions of *Salicornia* and *Sarcocornia* species growing in different geographical locations with different soil conditions (salinity) have been reported (VENTURA et al., 2011; LU et al., 2010; MIN et al., 2002a). This study verifies the data presented in these reports, suggesting that the geographical location in which *S. ambigua* grows and the crop system used affect the chemical composition of the plant material.

### 3.2 Major minerals

The major minerals of *S. ambigua* (on a fresh matter basis) are presented in **Table 2**. The results revealed that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) with wide variability between samples A and B for sodium, potassium and magnesium. In all samples the mineral present in

highest amounts was sodium, followed by potassium, magnesium and then calcium. These results are similar to those reported by Min et al. (2002a), Lee et al. (2009), Rhee et al. (2009), Lu et al. (2010), Parida and Jha (2010) and Ventura et al. (2011), who found that the mineral with the highest concentration in *S. herbacea*, *S. europa*, *S. bigelovii*, *S. brachiata*, *S. persica* and *S. fruticosa* was sodium, followed by potassium, magnesium and then calcium.

The sodium content ranged from 10.19 mg g<sup>-1</sup> (sample A) to 16.57 mg g<sup>-1</sup> (sample B), in agreement with results reported by Min et al. (2002a); Lu et al. (2010) and Ventura et al. (2011), who observed corresponding sodium values of 10.03 mg g<sup>-1</sup>, 9.98 mg g<sup>-1</sup> and 15.57 mg g<sup>-1</sup>, respectively.

The potassium, magnesium and calcium contents ranged between samples from 2.9 to 1.81 mg g<sup>-1</sup>; 0.92 to 1.30 mg g<sup>-1</sup> and 0.54 to 0.53 mg g<sup>-1</sup>, respectively. Similar findings have been published for different halophytic species with potassium, magnesium and calcium contents ranging, respectively, from 1.76 to 2.71 mg g<sup>-1</sup>, 0.87 to 1.23 mg g<sup>-1</sup> and 0.52 to 0.62 mg g<sup>-1</sup> (VENTURA et al., 2011).

In summary, the variation in the mineral content of the *S. ambigua* samples was expected, since the plant by accumulation of organic solutes and mineral ions may vary according to the geographic location, crop system, irrigation water salinity, maturity and harvest conditions (MAGGIO et al., 2011; GRIEVE et al., 2001).

In this context, sodium is the main ion accumulated when plants are irrigated with moderately or hyper-saline water and the amounts of other ions, such as K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, which confer nutritional value to the product, typically decrease with increasing irrigation water salinity, predominately as a result of competition with Na<sup>+</sup> during uptake (FLOWERS; COLMER, 2008).

### 3.3 Fatty acids profile

The results for the fatty acids profile, total saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) of *S. ambigua* grown in the different regions are given in **Table 3**. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were revealed between the samples only for the fatty acids that were not identified.

**Table 3** - Fatty acids profile (%) from lipid fraction of *S. ambigua* samples

Fatty acids	Region A*	Region B*
Lauric (C12:0)	0.45 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>a</sup>
Myristic (C14:0)	0.59 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>
Palmitic (C16:0)	13.20 ± 0.38 <sup>a</sup>	13.65 ± 0.65 <sup>a</sup>
Palmitoleic (C16:1c)	0.65 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.02 <sup>a</sup>
Stearic (C18:0)	1.70 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.18 <sup>a</sup>
Oleic (C18:1c)	3.84 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.92 ± 0.16 <sup>a</sup>
Linoleic (C18:2c)	16.57 ± 0.68 <sup>a</sup>	16.62 ± 0.52 <sup>a</sup>
Linolenic (C18:3c)	44.04 ± 1.20 <sup>a</sup>	44.70 ± 1.20 <sup>a</sup>
Arachidic (C20:0)	0.79 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.02 <sup>a</sup>
Behenic (C22:0)	1.08 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.03 <sup>a</sup>
Others	17.09 ± 0.30 <sup>a</sup>	15.83 ± 1.69 <sup>b</sup>
Total SFA	17.82 <sup>a</sup>	18.27 <sup>a</sup>
Total MUFA	4.49 <sup>a</sup>	4.59 <sup>a</sup>
Total PUFA	60.61 <sup>a</sup>	61.31 <sup>a</sup>

\*Results expressed as percentage.

Results expressed as mean ± SD of triplicates.

<sup>a-b</sup> Different superscript letters between samples denote significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

The fatty acids profile of *S. ambigua* showed a predominance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) ranging from 60.61 to 61.32%, comprising mainly linolenic acid (44.04 to 44.70%) followed by linoleic acid (16.57 to 16.52%). The saturated fatty acids (SFA) represented 17.82 to 18.27% of the total lipid content, with the main constituent being palmitic acid (13.20 to 13.65%), and the monounsaturated fatty acids (MUFA) represented 4.49 % to 4.59% of the total lipid content with the main constituent being oleic acid (3.84 to 3.92%). A similar trend in the fatty acids profile was reported by Ventura et al. (2011) for samples of *Salicornia persica* and *Sarcocornia fructifera*, who observed that the most abundant fatty acid was linolenic acid, which ranged from 41.2 to 48.2% of the total fatty acids content, followed by linoleic acid (23.85 to 27.31%) and palmitic acid (20 to 21.13%).

The findings also showed that the lipid content of *S. ambigua* is relatively low (**Table 2**) and this plant is thus adequate for human consumption as a leafy vegetable, containing a high content of unsaturated fatty acids (65.1% to 65.9%) in its composition. For good nutritional quality, including beneficial health effects, the PUFA/SFA ratios should be higher than 0.45 (GUIL et al., 1996), and in the present study the PUFA/SFA ratios ranged from 3.4 to 3.3.



In summary, the fatty acids profile observed for the samples of *S. ambigua* was as expected since, at the cellular level, in plants irrigated with saline water alterations to the membrane fatty acid composition prevent damage to the cellular membranes (ALLAKHVERDIEV et al., 1999). These alterations can lead to a significant amount of unsaturated fatty acids, mainly linolenic acid and linoleic acid (whose benefits to human health are well known), accumulating in the cellular membranes of the leaves of edible plants species, both halophytes and non-halophytes, with culinary uses (SIMOPOULOS, 2004).

### **3.4 Characterization of phenolic compounds isolated by HPLC-ESI-MS/MS**

Currently, limited published data are available on the composition and/or content of individual phenolic acids and flavonoids in halophytic species (*Salicornia herbacea*, *Salicornia bigelovii*, *Salicornia persica*, *Sarcocornia fruticosa*). In previous studies the phenolic acids and flavonoid contents were extracted and isolated by chromatography and the structural characterization of the isolated compounds was carried out by nuclear magnetic resonance (NMR) (WANG et al., 2013; KIM et al., 2011; KONG et al., 2009; HWANG et al., 2009; KONG et al., 2008).

The fingerprinting of methanol extracts of *S. ambigua* led to the identification and quantification of phenolic acids and flavonoids based on their molecular formula and fragmentation pattern and by comparison of their retention times with those of commercially available standards .

In this procedure the extracts of *S. ambigua* were injected in order to obtain a qualitative profile of the 30 analytes (**Table 1**) included in the method the samples initially presented mass fragmentation corresponding to 22 compounds. However, of these 22 compounds, seven were not confirmed. These compounds showed mass fragmentation similar to umbelliferone, 4-methylumbelliferone, coumarin, coniferaldehyde, sinapaldehyde, catechin and epicatechin but, although the fragmentation profiles were the same, a comparison with the chromatographic column retention times observed for the standards showed considerable differences for these 7 compounds. This may be due to the close structural similarity between some phenolic compounds, such as flavonoids, which have very similar fragmentation patterns.

After identification of the phenolic compounds present in the samples, calibration curves were constructed with 7 points for the 15 different analytes identified. It was determined that the limit of quantification was the lowest point of the curve and the mixture of

standards with the concentration corresponding to this value for each analyte was injected. Thus, the detection limit was obtained by dividing the lower limit of calibration curves by 3.3. The calibration curves were prepared from stock solutions of analytical standards at a concentration of  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  by successive dilution with MeOH:H<sub>2</sub>O 50% (v/v) until the optimal range of application for each analyte. The calibration curves and the samples were injected in duplicate and the parameters for the linearity, coefficient of determination, detection and quantitation limits, as well as, retention times of the compounds are presented in **Table 4**.

**Table 4** - Some figures of merit of the method applied.

Analyte	RT (min)	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	Analytical range (mg/L)	Eq. of the calibration curves	R <sup>2</sup>
<b>Scopoletin</b>	7.19	0.08	0.27	0.27 - 5.32	y = 295474x + 54306	0.9975
<b>Syringaldehyde</b>	7.09	0.11	0.37	0.37 - 7.36	y = 443671x + 267914	0.9944
<b>Galangin</b>	11.32	0.07	0.23	0.23 - 4.55	y = 155647x + 19275	0.9994
<b>Kaempferol</b>	9.72	0.07	0.23	0.23 - 4.50	y = 101076x + 7749.3	0.9973
<b>Quercetin</b>	8.93	0.07	0.24	0.24 - 4.73	y = 35802x - 1838.9	0.9988
<b>Naringin</b>	7.48	0.07	0.24	0.24 - 4.77	y = 36578x + 6018.7	0.9975
<b>Isoquercetin</b>	6.85	0.06	0.20	0.20 - 4.09	y = 254117x + 28205	0.9958
<b>Cinnamic acid</b>	9.61	0.07	0.23	0.23 - 4.59	y = 616682x + 147776	0.9951
<b>p-Coumaric acid</b>	6.90	0.07	0.23	0.23 - 4.64	y = 308540x + 45202	0.9927
<b>Vanillic acid</b>	4.53	0.07	0.23	0.23 - 4.55	y = 176087x + 9858.2	0.9959
<b>Caffeic acid</b>	4.25	0.07	0.24	0.24 - 4.73	y = 209619x + 22547	0.9977
<b>Ferulic acid</b>	7.28	0.07	0.23	0.23 - 4.59	y = 537574x + 69816	0.9953
<b>Syringic acid</b>	4.53	0.08	0.25	0.25 - 5.09	y = 130353x + 9729.8	0.9993
<b>Sinapic acid</b>	7.18	0.07	0.23	0.23 - 4.55	y = 118800x + 120000	0.9896
<b>Chlorogenic acid</b>	2.64	0.07	0.23	0.23 - 4.64	y = 326704x - 979.78	0.9984

**Table 5** summarizes the 15 phenolic compounds identified in each extract, their retention time, protonation  $[M+H]^+$  and phenolic content. The results reveal the presence of one coumarin (scopoletin), one phenolic aldehyde (syringaldehyde), eight phenolic acids (p-coumaric, cinnamic, vanillic, ferulic, caffeic, syringic, sinapic, and chlorogenic acids) and five flavonoids (galangin, quercetin, naringin, kaempferol and isoquercetrin).

**Table 5** - Identification and quantification of phenolic compounds in *S. ambigua*

Phenolic compounds	Experimental mass [M-H] <sup>+</sup> (m/z)	MS/MS (m/z)	Phenolic Content	
			Region A*	Region B*
Scopoletin	193	133/178	<LOQ	<LOQ
Syringaldehyde	183	123/77	<LOQ	<LOQ
Galangin	271	77/69	20.15	50.31
Kaempferol	287	153/121	41.00	<LOD
Quercetin	69	303/69	30.94	<LOD
Naringin	681	273/153	<LOQ	<LOQ
Isoquercetin	465	319/85	15.11	21.95
Cinnamic acid	149	131/103	<LOQ	<LOQ
p-Coumaric acid	165	147/91	56.84	<LOQ
Vanillic acid	169	93/65	63.31	<LOQ
Caffeic acid	181	163/89	318.00	171.04
Ferulic acid	195	177/145	914.44	591.79
Syringic acid	199	155/77	25.18	<LOQ
Sinapic acid	225	207/91	<LOQ	<LOQ
Chlorogenic acid	355	163/89	<LOQ	<LOQ

\*Values expressed  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  fresh matter.

LOQ = limit of quantification; LOD = limit of detection.

The major phenolic acids and flavonoids quantified by HPLC–ESI-MS/MS in the extract of *S. ambigua* samples were ferulic, caffeic, vanillic, p-coumaric acids, kaempferol and galangin (**Table 5**). Ferulic acid was the most abundant phenolic acid in both samples, followed by caffeic acid and the most abundant flavonoid was galangin in both samples. The ferulic acid concentration ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) ranged from 914.4 (sample A) to 591.79 (sample B) and the caffeic acid concentration ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) ranged from 318.0 (sample A) to 171.04 (sample B) on a fresh matter basis. The galangin had a concentration of 20.15  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  in

sample A and  $50.31 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  in sample B, on a fresh matter basis. A similar result was reported for extracts of *S. herbacea* by Oh et al. (2007) and Zhu et al. (2010) who observed that the most abundant phenolic acids were ferulic and caffeic acids.

Previous research conducted on the phenolic composition of *S. herbacea* indicated the presence of chlorogenic, sinapic, ferulic, caffeic, salicylic, syringic, *p* coumaric and trans-cinnamic acids, as well as dicaffeoylquinic acid derivatives and other phenolic acids, such as tungtungmadic acid, scopoletin and pentadecyl ferulate (WANG et al., 2013; ESSAIDI et al., 2013; ZHU et al., 2010; RHEE et al., 2009; HWANG et al., 2009; CHUNG et al., 2005), together with some flavonoids, such as myricetin, quercetin, kaempferol, rhamnetin, isorhamnetin, hesperetin, galangin, acacetin, quercetin-3-b-glucoside, rutin and other flavonoid glucosides (ESSAIDI et al., 2013; KIM et al., 2011; KIM et al., 2008; LEE et al.; 2005).

These results indicate that the content of phenols and flavonoids can vary between different species within the same genus and also between different ecotypes. The authors suggest that the different environmental stress conditions (temperature, salinity, water availability, light intensity, nutrient deficiency, ionic stress), under which halophytes species grow, increase the synthesis of small, non-enzymatic molecules with antioxidant properties, such as ascorbate, glutathione, carotenoid and polyphenolic compounds, in order to decrease the production of reactive oxygen species (ROS) (BUHMANN; PAPPENBROCK, 2013; VENTURA et al., 2013).

According to Buhmann and Pappenbrock (2013), the influence of the growth conditions on the biosynthesis of phenolic compounds can be readily tested by cultivating halophytes under different environmental conditions.

The samples collected from the natural marsh (region A) had a higher number of flavonoids (galangin, kampferol, quercetin and isoquercetina) and phenolic acids (pcoumaric, vanillic, caffeic, ferulic, syringic, sinapic and chlorogenic acid) identified. Ferulic and caffeic acid were the major phenolic compounds in both regions, however, higher concentrations were present in samples collected from the natural marsh. The phenolic profile of the samples under study is reflected in their antioxidant activity, which will be discussed in the next section.

### **3.5 Antioxidant activity (AA)**

The study of the antioxidant activity (AA) of the plant extracts was

focused on the phenolic compounds and the two assays used to assess the AA are based on different radicals and mechanisms of reaction. The results for the content of DPPH and FRAP assays are summarized in **Table 6**.

**Table 6** - Availability of the antioxidant activity (AA)

Region	DPPH* ( $\mu\text{mol TEAC } 100\text{g}^{-1}$ )*	FRAP* ( $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100\text{g}^{-1}$ )*
A	$135.83 \pm 5.00^{\text{a}}$	$170.14 \pm 3.36^{\text{a}}$
B	$34.64 \pm 4.56^{\text{b}}$	$31.92 \pm 5.73^{\text{b}}$

\*Values expressed in fresh matter

All results expressed as mean  $\pm$  SD of triplicates.

TEAC, Trolox equivalent antioxidant activity.

<sup>a-b</sup> Different superscript letters for samples in the same column denote significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ )

These variations were to be expected since many factors affect the phenolic content of plants, such as the presence of other constituents and/or of different types of phenols, time of harvest, growth conditions (soil conditions), temperature, light and frequency and duration of inundation by saline water (GHOSH; SCHEEPENS, 2009).

The evaluation of the antioxidant activity of the *S. ambigua* extracts showed large variations in the results, with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the regions, demonstrating that the growing region influences the phenolic compounds and, consequently, the antioxidant activity. The AA for samples measured by DPPH ranged from 34.64 to 135.83  $\mu\text{mol TEAC } 100 \text{ g}^{-1}$  and by FRAP from 31.92 to 170.14  $\mu\text{mol Fe}^{+2} 100 \text{ g}^{-1}$ .

The percentage inhibition of DPPH radicals was highest for the extracts of region A with  $18.32 \pm 0.70\%$ , followed by the extracts of region B ( $10.26 \pm 1.4\%$ ), with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

In summary, the results show that all samples have relatively high antioxidant and free radical scavenger activity but sample A had the highest antioxidant activity. The variation in the AA described in this study for the samples of *S. ambigua* can be attributed to the origin of the plant material. The sample collected from region A was growing in natural tideland near the coast, in the presence of high salt concentrations in the soil and the sample collected from region B was grown as an experimental crop irrigated once a day with a seawater effluent and fertilized with sludge collected from settling tanks at a shrimp

*Litopennaeus vannamei* farm. There is a general consensus that salt stress reduces gas exchange, thereby limiting the CO<sub>2</sub> supply to the leaf, and that it causes an over-reduction of the photosynthetic electron transport chain leading to the production of ROS. In response to this type of oxidative damage in halophytes (salt-tolerant vegetation) the synthesis of antioxidants is induced (ASHRAF, 2009).

Most studies on plant antioxidants have shown that the production of antioxidants is enhanced in plants in response to salinity to counteract the salt-induced elevated levels of ROS in the cells. However, variations in the production of antioxidants in response to salt stress are evident at the inter-species or intra-species level. The variations in the seawater components, the frequency and duration of inundation by saline water and the salt marsh plants present not only affect the oxygen availability but also influence the production of antioxidants (ASHRAF, 2009; GARRAT et al., 2002).

#### **4. Conclusions**

This paper reports the content of individual phenolic acids and flavonoids in *S. ambigua* for the first time, with 15 phenolic compounds identified in each extract. Ferulic and caffeic acids were the major phenolic acids and galangin, kampferol and quercetin were the major flavonoids quantified in the *S. ambigua* extracts. The results of the current study suggest that the combination of phenolic compounds present in the *S. ambigua* extracts may be responsible for the observed antioxidant activity. This information can be useful in determining the possible role of the compounds identified which can participate in the prevention of different health disorders. Further studies are needed to evaluate the bioabsorption and bioavailability of the compounds present in *S.ambigua*, as well as the interactions between them, after consumption.

However, despite differences in the composition of the plants, the cultivation of this species is viable and can be applied to enhance the production and consequently encourage higher consumption.

In summary, the findings of this study highlight the potential of this halophyte as a valuable source of natural antioxidants and nutrients for use in the food and pharmaceutical industries.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Brazilian government agencies CNPq and CAPES for financial support, the Rural Issues and Agricultural

Research Institute (EPAGRI) of Santa Catarina for support in the execution of this work and for recommending the use of *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) as the subject of this study and to Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges of Federal University of Santa Catarina, Department of Chemistry, Florianopolis, SC for allowing us to use the ICP-MS equipment.



**CAPÍTULO 4 - DETERMINATION OF MINERAL  
COMPOSITION IN *Sarcocornia ambigua* (AMARANTHACEAE)  
USING ICP-MS AND EVALUATION OF BIOACCESSIBILITY  
USING AN *IN VITRO* DIGESTION SYSTEM**

**Artigo Submetido para Revista Food Research International** - Bertin, R.L., Maltez, H.F, Gois, J.S., Borges, D.L.G., Borges, G.S.C., Gonzaga, L.V., Fett, R. (2014). Determination of mineral composition in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using ICP-MS and evaluation of bioaccessibility using an *in vitro* digestion system

**DETERMINATION OF MINERAL COMPOSITION IN  
*Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) USING ICP-MS AND  
EVALUATION OF BIOACCESSIBILITY USING AN *IN VITRO*  
DIGESTION SYSTEM**

**ABSTRACT**

The concentrations of minerals of two different growing populations of *Sarcocornia ambigua* (salt-tolerant) were evaluated using inductively coupled plasma mass spectrometry. The bioaccessibility of these elements was assessed using an *in vitro* digestion system, and the results revealed that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) in the mineral content with wide variability between samples. In all samples, the mineral present in highest amounts was K, followed by Mg and then Ca. However, the bioaccessibility of the minerals was highly variable (3 to 84%). The highest bioaccessibility was determined for Co, followed by V, K, Li, Mg, Cr and Zn. Considering the assessed bioaccessibility, it appears that the ingestion of 2 g of *S. ambigua* (herbal salt) can contribute to RDAs for K to a very small extent, *i.e.*, 0.6 – 0.8% out of 4700 mg of K per day, 0.01 – 0.02% out of 1000 mg of Ca per day and 0.15 – 0.33% out of 11 mg of Zn per day. The intake of Mg, Mn and Cu with 2 g of *S. ambigua* seems to be somewhat higher, *i.e.*, 2.7 – 4.5% of the Mg RDA, 0.4 – 1.8% of the Mn RDA and 0.6 – 1.8% of the Cu RDA. For Cr, plant ingestion can supply to the human body up to 6% of the RDA. Since this is the first time that the minerals bioaccessibility from samples of *S. ambigua* using an *in vitro* digestion model has been examined, and the data relating to concentrations and the bioaccessible fractions of minerals provide the starting point for more complex and elaborate reviews from the nutritional point of view, including the establishment recommended daily dietary intake of this plant.

**Keywords:** *Sarcocornia ambigua*; Bioaccessibility; *In vitro* digestion system; Minerals; Inductively coupled plasma mass spectrometry.

## 1. Introduction

The importance of optimal intake of minerals to maintain a good health is widely recognized (SUBBA RAO et al., 2006). Minerals are of critical importance in the diet, even though they comprise only 4 – 6% of the human body. Major minerals are those required in amounts greater than 100 mg per day and they represent 1% or less of bodyweight and trace minerals are essential in much smaller amounts, less than 100 mg per day, and make up less than 0.01% of bodyweight (OZCAN, 2004). The minerals are involved in numerous biochemical processes and can be defined as a group of substances that are essential for normal metabolism, growth and development, body structure, regulation of cell function, and electrolyte balance in body fluids (GAGNIER, 2008).

Vegetables, especially green leafy vegetables are valuable sources of minerals and trace elements, and diets rich in vegetables are also linked to decreased risk of diseases and their consumption should be encouraged (BERNSTEIN et al., 2002).

*Sarcocornia ambigua* is a plant that belongs to the gender *Amaranthaceae*. These plants are halophytes (salt-tolerant) that grow in saline areas, usually near the coast and along the shores of salt lakes and marshes. In Brazil, new experimental crops of perennial *Sarcocornia* have been grown applying an irrigation system that uses saline effluent from shrimp farms (BERTIN et al., 2014).

The potential use of the aerial part of the *Salicornia* and *Sarcocornia* species as a vegetable source for human consumption is considered promising, given their high nutritional value in terms of natural minerals and trace elements, including Mg, Na, K, Ca, Mn, Fe, Zn and Cr, dietary fiber and bioactive compounds (BERTIN et al 2014; KIM et al., 2011; VENTURA et al., 2011;). The *Salicornia* species have been introduced into the European market as a vegetable with leafless shoots resembling green asparagus and, specifically in Italy and France, they have been used as an ingredient in vinegar. Also, in Korea they are consumed as a seasoned vegetable, salad and fermented food (KIM et al., 2011). Recently, the dried and milled aerial part of *Salicornia brachiata* was patented (German patent DE60208082T2) and offered as a herbal salt, because it contains other mineral salts in high amounts in addition to sodium chloride (BUHMANN; PAPENBROCK, 2013).

Information on the presence of mineral and trace elements in different species of the *Salicornia* and *Sarcocornia* genera refers typically to their total concentrations, usually measured by flame atomic absorption spectrometry (ESSAIDI et al., 2013; LU et al., 2010),

inductively coupled plasma optical emission spectrometry (PARIDA; JHA, 2010) or inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (BERTIN et al, 2014). However, the sole use of these techniques does not provide information about the fraction which can be bioaccessible, *i.e.* the percentage of the ingested amount of the element that can be absorbed during digestion and subsequently transformed into metabolically active species (AZENHA; VASCONCELOS, 2000). Consequently, only a fraction of the mineral and trace elements present in the food matrix (sometimes highly variable depending on the speciation of the elements, on the behavior of organometallic species and complexes in the gastrointestinal tract, and on interactions with the food matrix) is bioaccessible and can be absorbed and utilized by the human body (KHOUZAM et al., 2011).

Despite these limitations, several approaches have been developed to assess the bioaccessibility of essential micronutrients from different food constituents by mimicking the human digestive process (POHL et al., 2012; MOREDA et al., 2011; HUR et al., 2011; KHOUZAM et al., 2011), and most of them use *in vitro* methodologies that were developed as alternatives to *in vivo* studies. These methodologies are considered simple, cheap and may be well correlated with the results derived from experiments involving humans and model animal (HUR et al., 2011).

The term of bioaccessibility has been defined as the fraction of a mineral ingested with food that is released from its matrix in the gastrointestinal tract and has the potential to be absorbed by the intestines during digestion (HE, KE; WANG, 2010). Recently, several studies have evaluated the bioaccessibility of mineral and trace elements in different food matrices such as vegetables (HU et al., 2013), marine molluscs and sea food (LEUFROY et al., 2012; HE et al., 2013), mushrooms (BHATIA et al., 2013), edible plants (ZHENG et al., 2013), medicinal supplements (TOKALIOĞLU et al., 2014) and cheese, bread, fruit and vegetables (KHOUZAM et al., 2011). Plants accumulate minerals according to their requirements; however, the mineral content can be affected by genetic factors, by the soil, the use of fertilizers and weather conditions (SANTOS et al., 2014).

However, there is no data in the literature regarding the bioaccessibility of the mineral profile of *S. ambigua*. To the best of our knowledge, this is the first study specifically focused on the evaluation of the bioaccessible mineral content from *S. ambigua* using an *in vitro* digestion system. Thus, the aims of this work were (i) to determine the concentrations of minerals of nutritional interest in samples of *S. ambigua* collected at different locations, (ii) to evaluate the

bioaccessibility of minerals from samples of *S. ambigua* using an *in vitro* digestion system and (iii) to evaluate the coverage of Recommended Daily Allowances (RDAs) of the elements, related to the daily consumption of *S. ambigua*.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Samples

Sampling of the plant material from two different populations of *Sarcocornia ambigua* in the state of Santa Catarina (SC), Brazil, was conducted in October 2012. The material was collected from two regions; the first is located on a natural tideland near the coast of Palhoça (latitude 27° 40' 54.76" S, longitude 48° 38' 19.63" O) (Region A), and the second is Barra da Lagoa, Florianópolis (Latitude 27° 34' 33" S, Longitude 48° 26' 33" O) (Region B) from an experimental crop irrigated once a day with seawater and fertilized with sludge taken from the settling tanks of a shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farm.

### 2.2 Chemicals and reagents

Hydrochloric acid and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and sodium bicarbonate was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Concentrated nitric acid (65% m/m) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and purified by double sub-boiling distillation in a quartz still (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Germany). A standard multielement ICP III solution purchased from Perkin Elmer (Shelton CT, USA) and Rh and Ca stock solutions supplied by Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland) were used. Argon gas with a purity of 99.996%, acetylene and nitrous oxide were purchased from White Martins (Sao Paulo, Brazil). The digestive enzymes and biological fluids were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All reagents were of analytical grade unless otherwise specified. Deionized water with a resistivity of 18.2 MΩ cm was obtained from a Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, USA).

### 2.3 Instrumentation

Elemental analyses were carried out using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS), Perkin - Elmer SCIEX, model ELAN 6000 (Thornhill, Canada) coupled to a cross-flow nebulizer and a Scott spray chamber. The operating parameters of the ICP-MS instrument are summarized in **Table 1**. The monitored isotopes were <sup>39</sup>K, <sup>43</sup>Ca, <sup>24</sup>Mg, <sup>7</sup>Li, <sup>27</sup>Al, <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>59</sup>Co, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>82</sup>Se, <sup>208</sup>Pb and

<sup>61</sup>Ni.**Table 1 - Operating parameters of ICP-MS.**

Sampling/ skimmer cones	Pt	
RFpower	1100W	
Signal measurement	<i>Peak Hopping</i>	
Autolens	on	
Detector voltage	Pulse 1250 V	Analog: - 2287V
<b>Gas flow rate:</b>		
Main	15.0 L min <sup>-1</sup>	
Auxiliary	1.2 L min <sup>-1</sup>	
Nebulizes	1.0 L min <sup>-1</sup>	
<i>Dwell time</i>	50 ms	

Calcium determination was performed using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer (HR-CS AAS) ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Germany). A nitrous oxide-acetylene flame was used and the measurements were carried out the main resonance line at 422.673 nm for Ca.

## 2.4 Sample preparation

The aerial parts (leaf and stem) of the plants to be studied were washed with deionized water. The samples were dried at 65 °C for 12 h (dry sample – DS) and were stored at a temperature of  $-20 \pm 0.2$  °C until use. Prior to the analyses, the samples were ground in an Ika® Werke A11 (Staufen, Germany) food processor.

## 2.5 Determination of mineral content by ICP-MS

Prior to the determination of the total element concentrations a complete destruction of the matrix of homogenized samples was required. In this regard, the samples (0.5 g of DS) were digested using a microwave oven (MLS-1200; Milestone, Sorisole, Italy), with 6 mL HNO<sub>3</sub> (65% m/m) and 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with applied power varying between 250 and 600 W for 25 min in closed PFA vessels.

The digested samples were diluted appropriately with deionized water. Rhodium (10 µg L<sup>-1</sup>) was used as the internal standard for all determinations. External calibration was carried out using aqueous solutions prepared from a multi-element stock standard solution

containing all analytes. In order to avoid accuracy problems due to polyatomic ion interference, the determination of Ca was performed using flame atomic absorption spectrometry, following external calibration against aqueous standards.

The accuracy of the method was evaluated using two certified reference materials (CRM): apple leaves (SRM 1515) and pine needles (SRM 1575), from NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA). Each certified material was digested following the same protocol adopted for *Sarcocornia ambigua* and analyzed in triplicate.

## **2.6 Determination of *in vitro* mineral bioaccessibility after *in vitro* gastrointestinal digestion**

The evaluation of bioaccessibility of minerals was carried out using an *in vitro* gastrointestinal digestion system, as previously described by Nascimento (2011) and by the United States Pharmacopeia (USP) (US PHARMACOPEIA XXIV & NATIONAL FORMULARY, 2000), with some adaptations in order to avoid interference of some components such as potassium, on the determination of the elements of interest. The protocol used was applied in two sequential phases: gastric and intestinal digestion.

### **2.6.1 Preparation of gastric and intestinal solutions**

Simulated gastric solution was prepared by dissolving 0.32 g of pepsin with 0.7 mL of 12 mol L<sup>-1</sup> HCl, followed by the addition of deionized water up to a final volume of 100 mL. Afterwards, the pH was adjusted to 1.2 by adding an adequate volume of a 0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl solution. Since pepsin activity may decrease over time, a solution was freshly prepared before each experiment (US PHARMACOPEIA XXIV & NATIONAL FORMULARY, 2000).

Preparation of simulated intestinal solution involved the solubilization of 0.2 g of bile salts (glycodeoxycholate 0.08 g, taurodeoxycholate 0.05 g and taurocholate 0.08 g) and 0.5 g of pancreatin in 7.7 mL of 0.2 mol L<sup>-1</sup> NaOH; the volume of the solution was adjusted to 100 mL with deionized water. The pH was adjusted to 6.8 by adding an adequate volume of a 3% (m/v) NaHCO<sub>3</sub> solution.

### **2.6.2 Gastrointestinal digestion**

A portion of 0.2 g of the aerial part of both samples (DS) was placed into a polyethylene tube (50 mL) with 3 mL of the gastric solution

(pH 1.2). Initially, the mixture was shaken vigorously for 1 – 2 min for initial degassing. The mixtures were then held in a thermostatic water bath for 2 h at 37 °C (Fisatom® 550, São Paulo, SP, Brazil) and shaken periodically. This same procedure was also applied to CMR. Each assay was performed in triplicate.

### 2.6.3 Intestinal digestion

In order to simulate the intestinal digestion, the pH of the solution obtained from gastric digestion was adjusted to  $6.8 \pm 0.05$  by dropwise addition of 3% (m/v) NaHCO<sub>3</sub> solution. Then, 3 mL of intestinal solution was added and the mixture was shaken for 1–2 min and incubated in a thermostatic water bath for 2 h at 37 °C, and shaken periodically. At the end of incubation period, the mixtures were centrifuged at 3000 x g for 30 min using a Fanem® centrifuge, model 280R (Fanem, Sao Paulo, SP, Brazil) and the filtrated supernatants were analyzed to determine the elemental concentrations using ICP-MS.

### 2.7 Digestion of residues

In order to check the mass balance, the sample residues were collected and submitted to microwave-assisted digestion as described in Section 2.5

### 2.8 Calculation of bioaccessibility (%)

The percentage (%) of bioaccessibility was defined as the fraction (concentration) of the element released in the simulated digestion process compared to the total concentrations for the same element, and was calculated according to the formula (LEUFROY et al., 2012):

**% bioaccessibility** = (fraction of total element released / total element concentration) x 100.

Procedural blanks were run in parallel. The concentrations of minerals are expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  of the dry material.

### 2.9 Statistical analysis

All variables were reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three replicates. The differences between mineral contents of the samples were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *t*-test to evaluate the relationship between the variables. The analyses were performed using the software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) and differences among means at the 5% level ( $p < 0.05$ ) were



considered statistically significant.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Multielemental analysis

Firstly, a semiquantitative analysis was performed in order to evaluate the minerals present in the plant. Potassium, Ca, Mg, Li, Al, V, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Pb and Ni were detected. The concentrations of these elements were then quantitatively measured.

The calibration curve was linear within the range 2.0 - 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  with a satisfactory coefficient of determination ( $r \geq 0.9999$ ). The limits of detection (LOD) (calculated as  $3s/a$ , where  $a$  is the slope of the calibration curve and  $s$  is the standard deviation of 10 consecutive measurements of the blank solution) were between 0.01 and 13  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Precision, expressed as the relative standard deviation (RSD) of 3 repeated measurements of a multielemental standard solution was within the 0.8 to 9.0% range.

In order to verify the accuracy of the measurements, two botanical CRMs (SRM 1515 and 1575) were analyzed using the same procedure adopted for the 'real' samples. **Table 2** shows the concentration obtained for bioaccessible fractions, mass balance, residue and recovery values obtained for total K, Ca, Mg, Li, Al, V, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Pb and Ni in these CRMs.

The quality of the measurements was additionally verified by checking the mass balance, which was accomplished by the analysis of the residue and the sum of the concentrations measured in the supernatant that resulted from the gastrointestinal digestion process and the residue with that in the total samples. Good recovery values, ranging from 67 to 121%, were obtained for all minerals, which attest the accuracy of the procedure.

**Table 2** - Mineral contents recovered from bioaccessibility assay of certified reference material, LOD and LOQ of method.

Element (LOD - LOQ) (ng g <sup>-1</sup> )	Certified Reference Material SRM n° 1575 (pine needles)					Certified Reference Material SRM n° 1515 (apple leaves)				
	Conc. BF (µg g <sup>-1</sup> )	Residue (µg g <sup>-1</sup> )	MB (µg g <sup>-1</sup> )	Certified (µg g <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Conc. BF (µg g <sup>-1</sup> )	Residue (µg g <sup>-1</sup> )	MB (µg g <sup>-1</sup> )	Certified (µg g <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
<b>K</b> (2-7)	0.304±0.015*	0.06±0.002*	0.36±0.01*	0.37±0.02*	97	1.33±0.012*	0.244±0.002*	1.57±0.013*	1.61±0.02*	98
<b>Ca</b> (7-29)	0.076±0.001*	0.29±0.001*	0.37±0.002*	0.41±0.02*	90	0.167±0.00	0.854±0.001*	1.02±0.101*	1.526±0.015*	67
<b>Mg</b> (0.3-1)	0.069±0.004*	0.04±0.001*	0.109±0.002*	0.12±0.02*	89	0.17±0.003	0.085±0.011*	0.256±0.008	0.271±0.008*	94
<b>Li</b> (0.01-0.03)	<LOD	<LOD	<LOD	N.D.	-	<LOD	<LOD	<LOD	N.D.	-
<b>Al</b> (13 - 43)	213.6±6.9	267.1±6.6	480.7±13.6	545±0.30	88	4.0±0.67	270.2±25.7	274.2±26.1	286±9	96
<b>V</b> (0.02-0.07)	<LOD	<LOD	<LOD	N.D.	-	0.09±0.03	0.17±0.05	0.26±0.09	0.26±0.03	100
<b>Cr</b> (0.2 - 0.8)	<LOD	2.6±0.2	2.6±0.2	2.6±0.02	100	<LOD	<LOD	<LOD	0.3 <sup>b</sup>	-
<b>Mn</b> (0.04-0.1)	365.2±24.8	277.8±17.1	643.1±41.9	675±1.5	95	24.6±0.4	27±3	51.6±2.9	54±3	96
<b>Co</b> (0.01-0.03)	<LOD	0.096±0.01	0.096±0.01	0.1 <sup>b</sup>	97	<LOD	0.1±0.02	0.1±0.02	0.09 <sup>b</sup>	111
<b>Cu</b> (0.03-0.1)	0.68±0.02	2.46±0.3	3.14±0.36	3.0±0.03	105	2.8±0.1	2.63±0.48	5.43±0.57	5.64±0.24	96
<b>Zn</b> (0.07-0.2)	17.1±1.2	46.4±0.6	63.5±1.8	65±10	98	5.6±0.6	7.0±1.2	12.6±1.7	12.5±0.3	101
<b>Se</b> (0.6-2)	<LOD	<LOD	<LOD	N.D.	-	<LOD	<LOD	<LOD	0.050±0.009	-
<b>Pb</b> (0.01-0.03)	0.79±0.06	9.07±0.15	9.87±0.21	10.08±0.05	91	<LOD	0.46±0.08	0.46±0.08	0.470±0.024	98
<b>Ni</b> (0.5-2)	1.44±0.17	2.11±0.01	3.55±0.17	3.5 <sup>b</sup>	102	0.57±0.04	0.54±0.05	1.1±0.1	0.91 ± 0.12	121

Results expressed as mean ± SD of triplicates; BF = bioaccessible fractions; \*Concentration in mg g<sup>-1</sup>; MB: Mass balance; N.D. = not determined; b = Value informed

### 3.2 Total concentration and the bioaccessible fractions (BF %) of minerals of *S. ambigua* samples

The total concentrations for 14 elements in the *S. ambigua* samples are presented in **Table 3**. The results revealed that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) with wide variability between samples A and B. In all samples, the mineral present in highest amounts in the gastrointestinal solutions was K, followed by Mn and then Ca. These results are similar to those reported by Min et al. (2002), Rhee et al. (2009), LU et al. (2010), Parida e Jha (2010) and Ventura et al. (2011), who found that the mineral with the highest concentration in *S. herbacea*, *S. europa*, *S. bigelovii*, *S. brachiata*, *S. persica* and *S. fruticososa* was sodium, followed by potassium, magnesium and then calcium.

**Table 3** - Total concentrations, in  $\mu\text{g g}^{-1}$  (except where noted), and the bioaccessible fractions (BF %) of minerals of *S. ambigua* samples ( $n=3$ ; *t*-student applied for 95% confidence level;  $t = 4.30$  for the group of results).

Element	Region A		Region B	
	Concentration *	BF (%)	Concentration *	BF (%)
K <sup>1</sup>	24 ± 2.4 <sup>a</sup>	80 ± 2	19 ± 0.3 <sup>b</sup>	73 ± 1
Ca <sup>1</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	3 ± 1	4.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	3 ± 1
Mg <sup>1</sup>	8.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	65 ± 2	14 ± 0.2 <sup>a</sup>	66 ± 1
Li	1.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	75 ± 5	2.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	74 ± 2
Al	77 ± 16 <sup>a</sup>	N.D.	33 ± 0.1 <sup>b</sup>	N.D.
V	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	82 ± 10	1.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	66 ± 3
Cr	1.3 ± 2 <sup>a</sup>	62 ± 20	2.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	56 ± 3
Mn	19 ± 1.2 <sup>b</sup>	28 ± 3	52 ± 1.4 <sup>a</sup>	40 ± 0.3
Co	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	84 ± 27	0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>	50 ± 3
Cu	4.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	67 ± 11	13 ± 3.0 <sup>a</sup>	61 ± 14
Zn	27 ± 10 <sup>b</sup>	31 ± 12	41 ± 0.2 <sup>a</sup>	45 ± 4
Se	2.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	32 ± 1	2.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	32 ± 3
Pb	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	N.D.	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	N.D.
Ni	2.0 ± 1.0	N.D.	3.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	N.D.

<sup>1</sup> Values expressed as  $\text{mg g}^{-1}$ ; N.D. = not detected;

\* Concentration value ± 95% confidence interval of the mean value

<sup>a-b</sup> Different superscript letters between samples denote significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

The contents of macro elements, K, Mg and Ca ranged from 19 to 24  $\text{mg g}^{-1}$ ; 8.6 to 14  $\text{mg g}^{-1}$  and 2.6 to 4.0  $\text{mg g}^{-1}$ , respectively. These values were considered statistically different according to the *t*-test ( $p <$

0.05). Similar findings were published for different halophytic species with K and Ca contents ranging, respectively, from 15.30 to 23.56 mg g<sup>-1</sup> and 4.52 to 5.4 mg g<sup>-1</sup> (VENTURA et al., 2011).

Concerning the micro elements (shown in Table 3), Al, Zn and Mn presented the highest concentrations. Low concentrations of Li, V, Cr, Co, Cu, Se, Pb and Ni were detected. For other elements (shown in Table 3), in general higher metal burdens were observed for essential (Cr, Mn, Cu, Zn, Se) rather than non-essential metals (Li, Al, V, Co, Pb, Ni). The Cr, Mn, Zn and Pb contents between samples from 1.3 to 2.0 µg g<sup>-1</sup>; 19 to 52 µg g<sup>-1</sup>, 27 to 41 µg g<sup>-1</sup> and 0.8 to 0.4 µg g<sup>-1</sup> respectively. The results were shown to be lower than those reported by Williams et al. (1994), who observed corresponding values of 2.0 to 3.5 µg g<sup>-1</sup> (Cr); 49 to 64 µg g<sup>-1</sup> (Mn), 57 to 98 µg g<sup>-1</sup> (Zn) and 1.6 to 4.5 µg g<sup>-1</sup> (Pb). The Ni content ranged from 2.0 µg g<sup>-1</sup> to (sample A) to 3.0 µg g<sup>-1</sup> (sample B), in disagreement with results reported by Williams (1994) and Min et al. (2002), who observed corresponding Ni values of 1.7 to 2.7 µg g<sup>-1</sup> and 1.1 µg g<sup>-1</sup>, respectively.

In summary, these results indicate that the mineral content of the *S. ambigua* samples vary between different species within the same genus and also between different ecotypes. The authors suggest that the variations in the mineral content observed in the present study for the samples of *S. ambigua* may be attributed to the origin of the plant material. The sample collected from region A was growing in natural tideland near the coast, in the presence of high salt concentrations in the soil and the sample collected from region B was grown in an experimental crop irrigated once a day with a seawater effluent and fertilized with sludge collected from settling tanks at a shrimp *Litopennaeus vannamei* farm.

It has been show that tidal inundation not only affects oxygen availability but also influences the composition of interstitial waters following the introduction of comparatively high concentrations of sodium, chloride, sulphate, carbonate, bicarbonate ions and other trace elements (Mg, Ca, K, Li, B) in tidal waters. Changes in salinity may have a profound effect on the solubility of certain metals in coastal zones, particularly those trace elements that form strong complexes with chloride ligands (e.g. Cd, Hg, and Zn) (WILLIAMS et al., 1994).

Furthermore, according to Williams et al. (1994), Grieve et al. (2001) and Maggio et al. (2011) variations in the distribution of mineral and trace elements within plants reflect differences in the mineral ion uptake routes, translocation processes within the plant and the bioavailability and speciation of minerals within the soil matrix. The

form of the minerals and trace elements is dependent upon a number of varied but inter-related parameters which may dictate their mobility and consequently their bioavailability. These parameters include pH, redox potential, seasonality, temperature, degree of tidal inundation, soil organic content, etc. and have been thoroughly discussed.

The results obtained for the determination of bioaccessible fractions (BF %) in relation to the total elemental concentrations in *S. ambigua* samples are summarized in **Table 3**. In general, the bioaccessibility of the 14 elements ranged from 3 to 84 %. In all samples the highest bioaccessibility was observed for Co, followed by V, K, Li, Mg, Cr and Zn. Bioaccessibility of Co and V varied among samples ranging from 84 (sample A) to 50 % (sample B) and 82 to 66 % respectively, and the bioaccessibility of K, Li, Mg and Cr were rather uniform, ranging from 80 to 73 %; 75 to 74 %; 65 to 66 % and 62 to 56 % for samples A and B, respectively.

The lowest bioaccessibility percentages were attributed to Al, Pb and Ni, for which concentration values from bioaccessibility assays were found to be below the LOD. For Ca, bioaccessibility was 3.0 %.

Bioaccessibility of a nutrient is the fraction of ingested nutrient that is available for utilization in normal physiological functions and for storage. Factors that influence its availability include chemical state of the nutrient, its release from food matrix, its interactions with other food components, presence of suppressor and other cofactors, formation of stable compounds that are slowly metabolized and so on (PARADA; AGUILERA, 2007).

As could be seen from the data in **Table 3**, the bioaccessibility percentages of minerals varied significantly in the studied samples. This might be due to the composition of *S. ambigua* samples such as quantity and quality of the proteins, chemical form of the elements, nutrient interactions and the presence of compounds such as fibers, polyphenols and phytates that inhibit the bioaccessibility (HUNT, 2003; VITALI et al., 2008). The impact of dietary fibers on mineral availability has been often cited in the literature, and it has been frequently stated that it is difficult to distinguish the impact of dietary fibers themselves from the impact of fiber associated compounds such as phenolic compounds and/or phytic acid (VITALI et al., 2008).

### **3.3 Bioaccessible minerals fractions of *S. ambigua* samples and its contribution to RDAs**

The aerial parts of the *S. ambigua* are considered adequate for

human consumption either as a vegetable or as a herbal salt, given their high nutritional values in terms of dietary fiber, high content of unsaturated fatty acids and the presence of bioactive compounds, such as phenolic compounds, particularly flavonoids and phenolic acids (BERTIN et al., 2014). They are also recognized to contain relatively high amounts of natural minerals and trace elements that may cover the elemental deficiency in the diet (BERTIN et al., 2014; VENTURA et al., 2011; PARIDA; JHA, 2010; LU et al., 2010). For that reason, it is important to quantify and compare the amounts of bioaccessible minerals of *S. ambigua* samples.

When reviewing the results in terms of the amounts of bioaccessible minerals (**Table 4**), the most abundant mineral in the investigated samples was K, with concentrations ranging from 19 mg g<sup>-1</sup> (sample A) to 14 mg g<sup>-1</sup> (sample B), followed by Mg and Ca, with bioaccessible mineral fractions ranging from 56 to 94 mg g<sup>-1</sup> and 0.09 to 0.1 mg g<sup>-1</sup> respectively. When observing these results in terms of the amounts of bioaccessible minerals in relation to the total mineral content (as shown in Table 4), all values in both samples decreased. To illustrate this statement, it can be seen that the bioaccessible fractions of Al, Pb and Ni were below the limit of detection of the applied method. This is a good example of the importance of determining the amounts of soluble mineral fractions because, in some cases, total mineral content does not reflect the amount that is available for intestinal absorption.

According to Sandberg (2002), the presence of fibers and phytates in some legumes and vegetables form insoluble complexes with positively charged proteins and cations of Ca, Cu, Mg, Zn in intestinal pH and, as a consequence, the bioaccessibility of these elements may be reduced.

**Table 4** - Bioaccessible fractions of minerals, in  $\mu\text{g g}^{-1}$  (except where noted), and the coverage of Recommended Dietary Allowances – RDAs (in %) related to the daily consumption of 2 g of dried and milled *S. ambigua* samples (herbal salt) (n=3; *t*-student applied for 95% confidence level; *t* = 4.30 for the group of results).

Element	Region A	Region B	Coverage of RDAs (%)	UL (mg day <sup>-1</sup> )
	Concentration <sup>a</sup>	Concentration <sup>a</sup>		
K <sup>1</sup>	19 ± 2	14 ± 0.02	0.6 - 0.8*	---
Ca <sup>1</sup>	0.09 ± 0,03	0.1 ± 0,04	0.01 – 0.02	2500
Mg <sup>1</sup>	56 ± 1.0	94 ± 0.2	2.7 – 4.5	350
Li	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	---	---
Al	< LOD	< LOD	---	---
V	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.3	---	1.8
Cr	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.3	4.6 – 6.3*	---
Mn	6 ± 0.9	21 ± 0.4	0.4 – 1.8*	11
Co	0.1 ± 0.01	0.04 ± 0.01	---	---
Cu	3 ± 0.3	8.0 ± 0.02	0.6 – 1.8	10.000**
Zn	8 ± 0.2	18 ± 1.5	0.15 – 0.33	40
Se	0.6 ± 0.08	0.7 ± 0.3	2.2 – 2.5	400**
Pb	< LOD	< LOD	---	---
Ni	< LOD	< LOD	---	1.0

<sup>a</sup> Concentration value ± 95% confidence interval of the mean value.

<sup>1</sup> Values expressed as mg g<sup>-1</sup>

LOD = Limit of detection.

RDAs = Recommended Dietary Allowances for adults 31-50 years old: \*K – 4700 mg day<sup>-1</sup> (Adequate Intake –AI); Ca – 1000 mg day<sup>-1</sup>; Mg – 420 mg day<sup>-1</sup>; Li – value not available; Al - value not available; V - Tolerable Upper Intake Level (UL) (1.8 mg day<sup>-1</sup>); \*Cr – 35  $\mu\text{g day}^{-1}$  (Adequate Intake –AI);\* Mn – 2.3 mg day<sup>-1</sup> (Adequate Intake –AI); Co - value not available; Cu – 900  $\mu\text{g day}^{-1}$  (\*\* $\mu\text{g day}^{-1}$ ); Zn – 11 mg day<sup>-1</sup>; Se – 55  $\mu\text{g day}^{-1}$  (\*\* $\mu\text{g day}^{-1}$ ); Pb - value not available; Ni - Tolerable Upper Intake Level (UL) (1.0 mg day<sup>-1</sup>).

Essential trace elements are being recognized as those nutrients that are present at extremely low quantities but that are needed in the diet in order to maintain a proper metabolism of the human body (RASDI; BAKAR; MOHAMAD, 2013). However, high concentrations of these elements, *i.e.* concentrations that exceed the necessary to trigger their biological functions in living organisms are known to be harmful to organisms and to exert toxic effects. Excess trace metallic elements can be readily accumulated in human body and lead to damage in several biological tissues, which include the nervous, immune and endocrine

systems, among others (RUSYNIAK et al., 2010; ZHOU et al., 2014). Therefore, an appropriate intake of mineral and trace elements is a relevant aspect of a healthy diet.

Several mineral safety baseline levels for human consumption have been drawn by the U.S. Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine by setting Dietary Reference Intakes (DRIs) (IOM, 2001), which include the Recommended Dietary Allowances (RDA), the Estimated Average Requirement (EAR), the Adequate Intake (AI), and the Tolerable Upper Intake Level (UL) for essential trace elements. If insufficient scientific evidence is available to set a RDA, an Adequate Intake (AI) is used as a goal for nutrient intake for individuals (LEŚNIEWICZ; JAWORSKA; ŻYRNICK, 2006; ZHENG; CHEN; QIU, 2013). Both the United States and Canada are using the DRIs system, which is intended for the general public and for health-related professionals (ZHOU et al., 2014).

Considering the assessed bioaccessibility of elements, contributions of the intake of *S. ambigua* to the RDA of K, Ca, Mg, Cr, Mn, Cu, Z and Se for adults were also calculated and the results are shown in **Table 4**. It appears that the ingestion of 2 g of *S. ambigua* (herbal salt) can cover RDAs for K to a very small extent, i.e., 0.6 – 0.8 % out of 4700 mg of K per day, 0.01 – 0.02 % out of 1000 mg of Ca per day and 0.15 – 0.33 % out of 11 mg of Zn per day. The intake of Mg, Mn and Cu with the ingestion of 2 g of *S. ambigua* seems to be somewhat higher, i.e., 2.7 – 4.5 % of the Mg RDA, 0.4 – 1.8 % of the Mn RDA and 0.6 – 1.8 % of the Cu RDA. Chromium may be regarded as an extreme case, since the ingestion can supply to the human body up to 6% of the RDA for this element.

The RDA values are not available for Li, Al, V, Co, Pb and Ni, which does not mean that potential adverse effects resulting from high intakes of *S. ambigua* should be ruled out. In the case of V, the bioaccessible fraction does not exceed the value of UL (1 mg/day). For the other elements the UL could not be established.

#### 4. Conclusions

The application of the *in vitro* gastrointestinal digestion system allowed to demonstrate that, for some minerals, only a small fraction of the total quantity present in *S. ambigua* samples is potentially bioaccessible, suggesting that the geographical location in which *S. ambigua* grows and the crop system used affect the mineral composition of the plant. Good accuracy was obtained for all elements based on the



analysis of two CRM, showing that the method is feasible for the determination of the investigated elements in the plant samples.

In reference to RDA values for minerals found in this study, it is likely that the ingestion of 2 g of *S. ambigua* (herbal salt) per day would not cause adverse health effects, since bioaccessibility studies suggest that the values of the daily intake allowed are not exceeded for any of the elements.

In summary, this is also the first time that mineral bioaccessibility from samples of *S. ambigua* using an *in vitro* digestion model has been examined. The data relating total concentrations to the bioaccessible fractions of minerals present in *S. ambigua* samples provide the starting point for more complex and elaborate reviews from the nutritional point of view, in order to establish recommendations for daily dietary intake of this plant.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise histológica, ultraestrutural e microanálise química de *S. ambigua*, possibilitou o estudo da organização celular, a distribuição dos componentes químicos constituintes da parte aérea, e as adaptações que ocorrem nos tecidos vegetais desta espécie, necessários para sua sobrevivência.

Os resultados apresentados em relação à identificação/quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de *S. ambigua* foram promissores, pois com a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC ESI-MS/MS), foi possível identificar 22 compostos fenólicos e quantificar 15, sendo que os principais deles foram: ácido ferúlico, cafeico, vanílico, ácido *p*-cumárico, kaempferol e galangina. Além disso, sugere-se que a combinação dos compostos fenólicos presentes no extrato da *S. ambigua* contribuíram para a atividade antioxidante *in vitro* encontrada na presente pesquisa.

Nesta perspectiva, as informações obtidas são úteis para elucidar o papel dos compostos antioxidantes nas diferentes atividades biológicas e fisiológicas à saúde, já comprovadas em outras pesquisas com espécies do gênero *Sarcocornia* e *Salicornia*. Entretanto, mais estudos *in vivo* precisam ser encorajados, com vistas a explorar o valor funcional e farmacêutico dos compostos antioxidantes presentes na *S. ambigua*.

Do ponto de vista nutricional, a fração lipídica das amostras de *S. ambigua* mesmo apresentando um conteúdo relativamente baixo, o perfil de ácidos graxos encontrado apresenta-se adequado ao consumo alimentar, com alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, ressaltando o teor de ácido linolênico, e menores conteúdos de saturados.

Em relação ao conteúdo de minerais, os resultados demonstraram uma diversidade dos mesmos, porém com grandes variações entre as amostras, que podem ser atribuídas à origem da coleta das plantas, as quais foram obtidas de localizações geográficas diferentes, e com condições ambientais e de cultivo distintas.

No que diz respeito à bioacessibilidade dos minerais, verificaram-se variações entre os elementos, sugerindo que o conteúdo total de minerais, presente na matriz vegetal, nem sempre estará disponível para absorção intestinal.

Os resultados obtidos na presente pesquisa podem contribuir para aumentar o cultivo da espécie em Santa Catarina, bem como de seu consumo pela população, além de nortear o uso da *S. ambigua* pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

Cabe destacar que estudos com *S. ambigua* são limitados, e mais pesquisas devem ser realizadas e encorajadas, a fim de ampliar o conhecimento sobre as estratégias adaptativas de sobrevivência da espécie em diferentes condições de cultivo e localização geográfica, e nortear a sua produção no Estado de Santa Catarina.

Como perspectivas de trabalhos verifica-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o potencial produtivo de *S. ambigua*, para oportunizar a criação de um novo modelo agrícola para áreas improdutivas devido aos solos salinos. Além disso, destaca-se a necessidade de realizar testes *in vivo*, a fim de verificar os seus benefícios para a saúde, assim como a presença ou não de toxicidade.

## REFERÊNCIAS

AGAWU, E.T. **Comparison between *Salicornia* and *Sarcocornia* ecotypes to optimize yield for vegetable production applying highly saline irrigation.** 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Terras Áridas). Ben Gurion Universidade de Negev, Israel, 2012.

AGUIAR, C. **Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente. Sistemática.** 1. ed. Bragança: Instituto Politécnico de Braga. 2012. vol. III, p.2 - 95.

ALLAKHVERDIEV, S. I.; NISHIYAMA, Y.; SUZUKI, I.; MURATA, N. Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5862-5867, 1999.

ALONSO, M.A.; CRESPO, M. B. Taxonomic and nomenclatural notes on South American taxa of *Sarcocornia* (*Chenopodiaceae*). **Annales Botanici Fennici**, v. 45, n. 4, p. 241-254, 2008.

AOAC. Official methods of analysis (18th ed). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 2005

AOCS. Official methods of analysis ce 1f-96: determination of cis – and trans – fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC, 2002

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S.E. Novel total antioxidante capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970-7981, 2004.

ARDREY, R.E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**, 1. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Inc, 2003, p.288.

ARNOTT, L.; WEBB, M. A. Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): implications for crystal stability and function. **International Journal of Plant Sciences**, v. 161, p.133-142, 2000.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 84-93, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the AOAC**. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2005.

AZENHA, M.A.G.O.; VASCONCELOS, M.T.S.D. Assessment of the Pb and Cu *in vitro* availability in wines by means of speciation procedures. **Food and Chemical Toxicology**, 38(10), 899-912, 2000.

BASCHONG, W.; LANDMANN, L. **Fluorescence Microscopy. In: Cell Biology**. 2.ed.; Cambridge University Press, Cambridge, England, 2006, p. 5-17.

BENGOECHEA, M.L.; SANCHO, A.I.; BARTOLOMÉ, B.; ESTRELLA, I.; GÓMEZ-COROVÉS, C.; HERNÁNDEZ, M. T. Phenolic composition of industrially manufactured purées and concentrates from peach and apple fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 45, p. 4071-4075, 1997.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERNSTEIN, M.; NELSON, M., TUCKER; K., LAYNE; J.; JOHNSON, E., NUERNBERGER, A., et al. A home-based nutrition intervention to increase consumption of fruits, vegetables and Calcium-rich foods in community dwelling elders. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, p. 1421-1422, 2002.

BERTIN, R.L.; GONZAGA, L.V.; BORGES, G.S.C.; AZEVEDO, M.S.A.; MALTEZ, H.F.; HELLER, M.; MICKE, G.A.; BALLOD, L.B.B.; FETT, R. Nutrient composition and identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 55, 404 – 411, 2014.

BHATIA, P.; AURELI, F.; D'AMATO, M.; PRAKASH, R.; CAMEOTRA, S.S.; TEJO PRAKASH NAGARAJA, T.P.; CUBADDA, F. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. **Food Chemistry**, v. 140, p. 225–230, 2013.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOEGER; M.R.T.; GLUZEZAK, R.M. Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina, Brasil. **IHERINGIA**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 73-82, jan./dez. 2006.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2.ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1999. 670 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie- LWT**, v. 28, n.1, p.25-30, 1995.

BRENNECKE, K. **Efeitos de doses de sódio e nitrogênio na composição bromatológica, química e digestibilidade in vitro do capim-coastcross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) em duas idades de corte**. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2002.

BRENNER, I. B.; TAYLOR, H. I. A critical review of inductively coupled plasma-mass spectrometry for geoanalysis, geochemistry, and hydrology. Part I. **Analytical Performance, Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 355-367, 1992.

BRIEN, T.P.O.; McCULLY, M.E. **The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods**, Austrália: Termarcarphi Fty Ltda, 1981. 6104p.

BUHMANN, A.; PAPENBROCK, J. An economic point of view of secondary compounds in halophytes. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 8-9, p. 952-967, 2013.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de Fisiologia Vegetal: Teoria e Prática**. Editora Agronômica Ceres, p.650, 2005.

CELSI, C.; MONSERRAT, A.L. **Guia para el reconocimiento de algunas plantas vasculares de las dunas y marismas de la Costa Atlántica Bonaerense**. Buenos Aires: Fundación de Historia Natural Félix De Azara, 2005.

CHA, J.Y. et al. (2004). Hypocholesterolemic effect of yogurt supplemented *Salicornia herbacea* extracts in cholesterol-fed rats. **Journal Life Sciences**, v. 14, p. 747-751, 2004.

CHUNG, Y. C. et al. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 10, p. 1122-1126, 2005.

COLLINS, C.H. **Princípios Básicos de Cromatografia**. In: COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2 ed. 2009, p. 452.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; DELLA LOGGIA, R. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 144-151, 2008.

COSTA, C.S.B.; NEVES, L.S. Respostas cromáticas de *Salicornia gaudichaudiana* moq. (Chenopodiaceae) a diferentes níveis de radiação UV - B e salinidade. **Atlântica**, v.28, n.1, p. 25-31, 2006.

COSTA, C.S.B. *Salicornia*: uma planta que pode ser utilizada no cultivo integrado com o camarão. **Panorama da Aquicultura**, novembro/dezembro, 2006.

COSTA, A.F.; PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3, 2000.

DAVY, A.J.; BISHOP, G.F.; COSTA, C.S.B. Biological Flora of the British Isles \* *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. dolichost*. **Journal of Ecology**, v. 1, p. 681-707, 2001.



DATE, A.R.; GRAY, A.L. **The application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**: Chapman & Hall, New York, 1989, p. 224.

DEGANI, A.L.; CASE, Q. L.; VIERA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, São Paulo, n. 7, p. 21-25, 1998.

DIAS, L.F. **Determinação de metais traço em sedimento por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com introdução da amostra na forma de suspensão**. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis – SC, 2004.

DICKISON, W.C. **Integrative plant anatomy**. Harcourt Academic Press, San Diego, p. 533, 2000.

EVERT, R.F. **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body. Their Structure, Function, and Development**. 3<sup>a</sup> Ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 2006.

D'OCA, M.G.M. et al. Fatty acids composition in seeds of the South American glasswort *Sarcocornia ambigua*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 84, n. 3, p. 245 – 261, 2012.

ERNST, W.H.O. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. *Aquatic Botany*, v.38, p.73-90, 1990.

ESSAIDI, I.; BRAHMI, Z.; SNOUSSI, A.; BEN HAJ KOUBAIER, H.; CASABIANCA, H.; ABE, N.; et al. Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract. **Food Control**, v.32, n 1, p.125-136, 2012.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. Xerophytes. In: Spez (ed.). **Encyclopedia of Plant Anatomy**. Berlin, Gebrüder Borntraeger, p. 87-98. 1992.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic Compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 30, p. 23-36, 2006.

FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; ANDRADE, E.P.; MEDEIROS, S.S. Biossalinidade e produção agrícola. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N.

S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, p. 472, 2010.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99- 105, 1998.

FLOWERS, T.J.; KOYAMA, M.L.; FLOWERS, S.A.; SUDHAKAR, C.; SINGH, K.P.; YEO, A.R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 99-106, 2000.

FLOWERS, T.J.; COLMER, T.D. **Salinity tolerance in halophytes**. New Phytologist. Lancaster, v. 179, p. 945-963, 2008.

FONTES, E.A.F.; FONTES, P.R. **Microscopia de alimentos: fundamentos teóricos**. Viçosa: Editora UFV, 2005. 151 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO/UNESCO. **Irrigation, drainage and salinity: as international source book**. Londres, Hutchinson/FAO/UNESCO, p. 510, 1973.

FULCHER, R.G.; IRVING, D.W.; DE FRANCISCO, A. Fluorescence microscopy: applications in food analysis. In: MUCK, L. **Fluorescence analysis in foods**. New York: Longman Scientific and Technical, cap.9, p.59-106, 1989.

GAGNIER, J. J. Evidence-informed management of chronic low back pain with herbal, vitamin, mineral, and homeopathic supplements. **The Spine Journal**, v. 8, p.70-79, 2008.

GLENN, E.P.; BROWN, J.J.; O'LEARY, J.W. **Irrigating crops with seawater**. New York: Scientific American, 1998. v. 279, p.76-81.

GHOSH, D.; SCHEEPENS, A. Vascular action of polyphenols. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 3, p. 322-331, 2009.

GITAI, Z. New fluorescence microscopy methods for microbiology: sharper, faster, and quantitative. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n.3, p. 341-346, 2009.

GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D.C., FIORI, C.E.; LIFSHIN, E. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists**. Plenum Press, 1992, 673 p.

GRABOV, A. Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporters: Single Family Multiple Functions, **Annals of Botany**, p. 1-7, 2007.

GRATTAN, S.R.; GRIEVE, C.M. **Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments**.cap.9. *In: Handbook of Plant and Crop Stress*. M. Pessarakli (Ed.). Marcel Dekker, Inc. p. 203-226, 1994.

GREGER, M. Metal availability and bioconcentration in plants. *In: Heavy metal stress in plants*. M. Prasad & J. Hagemeyer (Eds.). Springer- Verlag, 1999.

GRIEVE, C.M.; SHANNON, M.C.; POSS, J.A. Mineral nutrition of leafy vegetable crops irrigated with saline drainage water. **Journal of Vegetable Crop Production**, v. 7, p. 37-47, 2001.

GRIGORE M. N., TOMA C., BOSCAIU MONICA. Ecological implications of bulliform cells on halophytes, in salt and water stress natural conditions. **Analele științifice ale Universității "Al. I. Cuza" Iași și Tomul LVI**, fasc. 2, s. II a. Biologie vegetală, 2010.

GUIL, J.L.; TORIJA, M.E.; GIMENEZ, J.J.; RODRIGUEZ, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 719, n. 1, p. 229-235, 1996.

GUNNING, B.E.S.; STEER, M.W. **Plant Cell Biology: structure and function**. USA, Jones and Bartlett Publishers, p. 134, 1996.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday and dugs of tomorrow**. Molecular aspects of Medicine, Oxford, v.27, p.1-93, 2006.

HAGEN, S.F.; SOLHAUG, K.A.; BENGTSSON, G.B.; BORGE, G.I.A.; BILGER, W. Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, p.156-163, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. **Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids**. Laboratory Practice, v. 22, p. 474-476, 1973.

HAYAT, M.A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. 4 ed.** New York: UNR, 2000, 119 p.

HE, M., WANG, W.X. Bioaccessibility of 12 trace elements in marine molluscs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 627–636, 2013.

HE, M.; KE, C.H., WANG, W.X. Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 3517–3523, 2010.

HEO, H.J.; KIM, Y.J.; CHUNG, D.; KIM, DAE-OK. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v. 104, p.87-92, 2007.

HEALTH, M.C. Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interaction. **Annual Review Phytopathology**, v.38, p.443-459, 2000.

HU, M.H.; WUA, F.; WUA, S.; CAO, Z.; LIN, X.; WONGA, M.H. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an in vitro gastrointestinal model. **Chemosphere**, v. 91, p. 455–461, 2013.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 1841-1856, 2005.

HUNT J.R. (2003). Bioavailability of iron, zinc and other trace minerals from vegetarian diet. **American Journal Clinical Nutrition**, v.78, p. S633–639, 2003.

HUR, S.J., LIM, B.O., DECHER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12, 2011.

HWANG, Y.P.; YUN, H.J.; CHUN, H.K.; CHUNG, Y.C.; KIM, H.K.; JEONG, M.H.; YOON, T.R.; JEONG, H.G. Protective mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, n.181, p. 366–376, 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE - IOM. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

IZEPPI, E. M. **Efeitos da densidade de plantio na sobrevivência, desenvolvimento e produção de biomassa da halófitas *Sarcocornia ambigua* (Michx.) Alonso & Crespo.** 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Porto Alegre - RS, 2011.

JACOBY, B. **Mechanisms involved in salt tolerance by plants.** Cap. 5. *In: Handbook of Plant and Crop Stress.* M. Pessarakli (Ed.). Marcel Dekker, Inc. p. 97 - 122, 1994.

JANG, H.S.; KIM, K.R.; CHOI, S.W.; WOO, M.H.; CHOI, J.H. (2007). Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n. 2, p. 119-125, 2007.

JEONG, C.Y.; RYU, J.S.; CHOI, C.K.; JEON, B.S.; PARK, J.W.; SHIN, G.G.; et al. Supplemented effect of *Salicornia herbacea* extract powder on preparation and quality characteristics of fermented milk product. **Journal of Life Sciences**, n. 14, p. 788–793, 2004.

JORGE, L.L.F.; DA SILVA, A.M.; KOSCHTSCHAK, M.R.W.; PEREIRAS, U. Microscopia alimentar – a ciência aplicada à análise de alimentos tecnologicamente processados. **Infarma**, v.21, n.3/4, 2009.

JOSLYN, M.A. **Methods in Food Analysis: Physical, Chemical, and Instrumental Methods of Analysis.** 2 ed. Michigan: National Academy Press, 1970. 845 p.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

KADEREIT, G.; MUCINA, L.; FREITAG, H. Phylogeny of *Salicornioideae* (Chenopodiaceae): diversification, biogeography, and evolutionary trends in leaf and flower morphology. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 617-642, 2006.

KALÁB, M.; ALLAN-WOJTAS, P.; MILLER, S. S. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, 1995.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KARUNASAGAR, D.; ARUNACHALAM, J. Determination of cadmium by formation inductively coupled plasma mass spectrometry-reduction of molybdenum oxide interferences by addition of acetonitrile. **Analytica Chimica Acta**, v. 441, n. 2, p. 291-296, 2001.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 550 – 557, 2006.

KATZ, E.; EKSTEEN, R.; SCHOENMAKERS, P.; MILLER, N. **Chromatography Handbook of HPLC**, 1. ed. Washington: Academic Press., 1998, p.989.

KHOUZAM, R.B.; POHL, P.; RYSZARD LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v. 86, p. 425-428, 2011.

KIM, J.Y.; CHO, J.Y., MA, Y.K.; PARK, K.Y.; LEE, S.H.; HAM, K.S.; MOON, J.H. Dicafeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea L.*) and their antioxidative activity. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 55 62, 2011

KIM, H.J.; LEE, J.H. Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Salicornia herbacea* Powder. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 14, p. 129-133, 2009.

KIM, Y. A.; KONG, C. S.; UM, Y. R.; LIM, S. Y.; YEA, S. S.; SEO, Y. Evaluation of *Salicornia herbacea* as a Potential Antioxidant and Anti Inflammatory Agent. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 3, p. 661-668, 2009.

KONG, C.S.; KIM, Y.A.; KIM, M.M.; PARK, J.S.; KIM, J.A.; KIM, S.K.; SEO, Y. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 7, p. 1742-1748, 2008.

KONG, C.S.; KIM, J.A.; QIAN, Z.J.; KIM, Y.A.; LEE, J.I.; KIM, S.K., et al. Protective effect of isorhamnetin 3-O-beta-D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1914-1920, 2009.

LEE, J.T., JEONG, Y.S., AN, B.J. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. **Korean Journal Herbal**, n. 17, p. 51 – 60, 2002.

LEE, Y.S.; LEE, H.S.; SHIN, K.H.; KIM, B.K.; LEE, S. Constituents of the Halophyte *Salicornia herbacea*. **Archives of Pharmacal Research**, v.27, n. 10, p. 1034-1036, 2004.

LEE, S.H.; RHIN, J.W.; KIM, D.H. Effect of preparation methods on the characteristics of *Salicornia herbacea* salt. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 264-269, 2009.

LEE, W.M.; SUNG, H.J.; JONG, C.; CHO, J.Y.; PARK, H.J.; KIM, S.; RHEE, M.H. Effects of solvent-extracted fractions from *Salicornia herbacea* on anti-oxidative activity and lipopolysaccharide-induced NO production in murine macrophage RAW264.7 cells. **Journal of Experimental Biomedical Sciences**, v. 13, p. 161- 168, 2007.

LEE, Y.S.; Lee, S.; Lee, H.S.; Kim, B-K; Ohuchi, K.; Shin, K.H. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 5, p. 916-918, 2005.

LEŚNIEWICZ, A., JAWORSKA, K., ŻYRNICK, W. Macro and micro-nutrients and their bioavailability in Polish herbal medicaments. **Food Chemistry**, v. 99, p. 670–679, 2006.

LEUFROY, A.; NOËL, L.; BEAUCHEMIN, D.; GUÉRIN, T. Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. **Food Chemistry**, 135, 623–633, 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**, 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo, SP, 2008.

LIMA, L.A. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 26. 1997. Campina Grande. **Manejo e Controle da Salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB/SBEA, p.113-116, 1997.

LIU, H.; QIU, N.; DING, H.; YAO, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, v. 41, p. 363 – 370, 2006.

LOUGH, W.J; WAINER, I.W. **High Performance liquid chromatography: fundamental principle and practice**.1 ed.; CRC Press, *Blackie Academic and Professional*, 1995, p.288.

LU, D.H., ZHANG, M., WANG, S.J., CAI, J.L., ZHOU, X., ZHU, C.P. Nutritional characterization and changes in quality of *Salicornia bigelovii* Torr. during storage. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, 2010.

MAGGIO, A.; DE PASCALE, S.; FAGNANO, M.; BARBIERI, G. Saline agriculture in Mediterranean environments. **Italian Journal of Agronomy**, v. 6, p. 36-43, 2011.

MALAVOLTA, E. **O ABC da adubação**. 4 ed. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 255 p., 1989.



MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra-eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 214-222, 2009.

MARCHIORETTO, M.S.; WINDISCH, P.G.; SIQUEIRA, J. C.. Problemas de conservação das espécies dos gêneros *Froelichia* Moench e *Froelichiella* R. E. Fries (Amaranthaceae) no Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 215-219, 2005.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. (2<sup>a</sup> ed.). Academic Press, 1995.

MAUSETH, J. D. **Plant Anatomy**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, p. 560, 1988.

MARTINS, M.; FERREIRA, A.M.; VALLE, C. Retention na partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Sarcocornia fruticosa* from Portuguese salt marshes. **Ciências Marinhas**, v. 33, n. 3, p. 373-380, 2008.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence: A practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n. 345, p.659 - 668, 2000.

METCALFE, L. D., SCHMITZ, A. A., PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-523, 1966.

MIN, J.G. LEE, D. S., KIM, T. J., PARK, J. H., CHO, T. Y., PARK, D. I. Physiological and functional properties of *Salicornia herbacea* (Tungtungmadi) leaf extracts. **Nutraceutical Food**, v. 7, n. 2, p. 62-264, 2002.

MOREDA-PINEIRO, J.; MOREDA-PINEIRO, A.; ROMARIS-HORTAS, V.; MOSCOSO-PEREZ, C.; LOPEZ-MAHIA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; et al. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, 324–p. 345, 2011.

MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicryl-hidrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkla, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assay for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MUCCILLO, R.C.S.T. **Caracterização e avaliação de amido nativo e modificado de pinhão mediante provas funcionais e térmicas**. 2009. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Porto Alegre – RS, 2009.

MÜHLEN, C.V.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; MARRIOTT, P.J. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 765-775, 2006.

NACZK, M.; SHAIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NASCIMENTO, A.N. **Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju (*Anacardium occidentale*)**. 2011. 151 f. Tese (Tese em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo - SP, 2011.

NAVARRO, F.; SÁNCHEZ ANTA, M.A. Acumulación de sales en varias plantas halófilas de la cuenca del Duero. **Stud. bot.**, v.22, p. 9-16, 2004.

NETO, L.G. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. 2007.254 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto – 2007.

NOVÁKOVÁ, L.; SPÁČIL, Z.; SEIFRTOVÁ, M.; OPLETAL, L.; SOLICH, P. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. **Talanta**, v.80, p. 1970-1979, 2010.

OZCAN, M. Mineral contents of some plants used as condiment in Tukey (2004). **Food Chemistry**, v. 84, p. 437-440, 2004.

OH, J.-H. et al. Antioxidant activities of the ethanol extract of hamcho (*Salicornia herbacea* L.) cake prepared by enzymatic treatment. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 90-98, 2007.

ORREGO, C.E. Microestructura y nanoestructura de alimentos. **Revista Colombiana de Física**, v. 34, n.1, p.214-218, 2002.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a Review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 60, p. 324-34, 2005.

PARIDA, A.K.; JHA, B. Antioxidative defense potential to salinity in the Euhalophyte *Salicornia brachiata*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 137-148, 2010.

PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, p. R21eR32, 2007.

PARK, G.E.; DIETRICH, M.A.; SCHUMAKER, K.S. Increased vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 371, p. 1055-1065, 2002.

PARK, S.H.; KO, S.K.; CHOI, J.G.; CHUNG, S.H. *Salicornia herbacea* prevents high fat diet-induced hyperglycemia and hyperlipidemia in ICR mice. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 3, p. 256-264, 2006.

PATEL, K.M.; PATEL, J.K.; PATEL, M.P.; RAJPUT, G.C.; PATEL, H. A. Introduction to hyphenated techniques and their application in pharmacy. **Pharmaceutical Methods**, Bangalore, v. 1, n. 1, 2010.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PINTO, S.M.; KWON, Y.L.; APOSTOLIDIS, E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.L.; SHETTY, K. Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch) cultivars evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using *in vitro* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 56, n. 12, p. 4386 - 4392, 2008.

POHL, P.; STECKA, H.; GREDA, K.; JAMROZ, P. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v. 134, p. 392-396, 2012.

PORTO, E.R.; AMORIM, M.C.C.; DUTRA, M.T.; PAULINO, R.V.; BRITO, L.T.L.; MATOS, A.N.B. Rendimento da Artriplex mummularia irrigada com efluentes da criação de tilápia em rejeito da dessanilização de água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n. 10, p. 97 - 103, 2006.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290 - 4302, 2005.

RASDI, F.L., BAKAR, N.K., MOHAMAD, S. A Comparative Study of Selected Trace Element Content in Malay and Chinese Traditional Herbal Medicine (THM) Using an Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 3078-93, 2013.

REBOREDA, R.; CAÇADOR, I. Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. **Environmental Pollution**, v.146, p. 147-154, 2007.

REBOREDO, F. **Heavy metal analysis of sediments and live tissues of *Spartina maritima*, from salt marshes of Sado estuary - Portugal.** In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference of Heavy Metals in the Environment. vol. II, p: 330-333, 1985.

RHEE, M.H.; PARK, H.J.; CHO, J.Y. *Salicornia herbacea*: Botanical,

chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.8, p. 548-555, 2009.

RIBEIRO, J.E.L. et al. **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. INPA-DFID. Manaus, 1999. 800 p.

RUSYNIAK, D.E., ARROYO, A., ACCIANI, J., FROBERG, B., KAO, L., FURBEE, B. Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. **Molecular. Clinical and Environmental Toxicology**, v. 100, p. 365–96, 2010.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique & microscopy**. New York, Oxford University Press, 1999.

RYU, D.S.; KIM, S.H.; LEE, D.S. Antiproliferative effect of polysaccharides from *Salicornia herbacea* on induction of G2/M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n. 11, p. 1481-1489, 2009.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. California, Wadsworth Publishing Company, p.682, 1992.

SÁNCHEZ, M.A.; NAVARRO, F. Caracteres micromorfológicos y anatómicos de algunas plantas halófilas de la cuenca del duero (España). **Stud. bot.**, v. 23, p. 43-62, 2004.

SANDBERG, A.S. Bioavailability of minerals in legumes. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 3, p. S281–S285, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. **Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 263-277, 2004.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SILVA, M.; HORN FILHO, N.O. Roteiro geológico-ambiental ao longo da planície costeira da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. **Revista Discente Expressões Geográficas**, n. 107, p. 210–231, 2011.

SILVA, M. A. A. P. **Curso de extensão: métodos de avaliação sensorial dos alimentos.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 2006.

SILVA, R. C. S. N.; MINIM, V. P. R.; SIMIQUELI, A. A.; MORAES, L. E. S.; GOMIDE, A. I.; MINIM, L. A. Optimized Descriptive Profile: a rapid methodology for sensory description. **Food Quality and Preference**, v. 24, p. 190–200, 2012.

SILVA, M. H. A. **Aspectos morfológicos e ecofisiológicos de algumas halófitas do sapal da Ria de Aveiro.** 2000. 181 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Programa de Pós-Graduação de Biologia, Aveiro – POR, 2000.

SIQUEIRA, J.C. **Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. Pesquisas, Botânica.** 1995. n. 45, p.5-21.

SOUZA FILHO, P.W.M.; PARADELLA, W.R. Recognition of the main geobotanical features along the Bragança mangrove coast (Brazilian Amazon Region) from Land-sat TM and Radarsat-1 data. **Wetlands Ecology and Management**, v. 10, p. 123-132, 2002.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática** – Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

SEIFERMAN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiology Plantarum**, v. 69, p.561-568, 1987.

SUBBA RAO, P.V., MANTRI, V.A., GANESAN, K. Mineral composition of edible seaweed *Porphyra vietnamensis*. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 215–218, 2006.

SUNG, J.H.; PARK, S.H.; SEO, D. H.; LEE, J.H.; HONG, S.W.; HONG, S.S. Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 552-556, 2009.

TABOGA, S. R. Microscopia. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001**. Barueri: Manole, cap.2, p. 06–14, 2001.

TAYLOR, H.E.; GARBARINO, J.R. **Analytical Applications of Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry**: Geological Survey, USA, 1992, p. 651 - 676.

SIMON, B. F. de.; PÉREZ-ILZARBE, J.; HERNANDEZ, T.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ESTRELLA, I. Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.40, p. 1531-1535, 1992.

STEFFEN, S.; MUCINA, L.; KADEREIT, G. Three new species of *Sarcocornia* (Chenopodiaceae) from South Africa. **Kew Bulletin**, vol. 64, p.447–459, 2009.

TOKALIOĞLU, S., CLOUGH, R., FOULKES, M., WORSFOLD, P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v. 150, p. 321-327, 2014.

TROPICOS. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, 2012. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/40036645>>. Acesso em: 09 nov. 2012.

TSALEV, D.L.; D'ULIVO, A.; LAMPUGNANI, L.; DI MARCO, M.; ZAMBONI, R. Thermally stabilized iridium on an integrated, carbide-coated platform as a permanent modifier for hydride-forming elements in ET AAS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 10, p. 1003 – 1009, 1995.

TÜRKAN, I., DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 2 – 9, 2009.

US PHARMACOPEIA XXIV & NATIONAL FORMULARY ROCKVILLE: **The United States Pharmacopeial Convention**, v. 19, 2000.

VALDERRAMA, P., MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*).

**Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 21, p. 321-325, 2001.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p.227-236, 2001.

VENTURA, Y.; WUDDINEHA, W.A.; MYRZABAYEVAB, M.; ALIKULOV, Z.; KHOZIN-GOLDBERGA, I.; SHPIGELC, M.; SAMOCHAD, T.M.; SAGIA, M. Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.189–196, 2011.

VENTURA, Y.; SAGI, M. Halophyte crop cultivation: The case for *Salicornia* and *Sarcocornia*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 144-153, 2013.

VITALI, D., VENDRINA DRAGOJEVIC, I., SEBESIC, B. Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea-biscuits: Impact of proteins, phytic acid and polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, p. 62-68, 2008.

ZHENG, F.Y., LI-HUI CHEN, L.H., LI, S.X., YA-QING QIU, Y.Q. Effect of edible plants combination on mineral bioaccessibility and bioavailability, using in vitro digestion and liposome-affinity extraction. **Food Research International**, v. 53, p.174–179, 2013.

ZHOU, Y., GAO, X., WU, C., WU, Y. Bioaccessibility and safety assessment of trace elements from decoction of “Zhebawei” herbal medicines by in vitro digestion method, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.12.007>, 2014.

ZHU, T.; ROW, K.H. Extraction and Determination of  $\beta$ -Sitosterol from *Salicornia herbacea* L. Using Monolithic Cartridge. **Chromatographia**, v. 7, n.11/12, p. 981-85, 2010.



ZHU, T.; LI, S.; ROW, K.H. Molecularly imprinted monolithic material for the extraction of three organic acids from *Salicornia herbacea*. **Journal of Applied Polymer Science**, v.121, p. 1691-1696, 2011.

WANG, X. et al. Pentadecyl ferulate, a potent antioxidant and antiproliferative agent from the halophyte *Salicornia herbacea*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2066-2074, 2013.

WILLIAMS, T.P.; BUBB, J.M.; LESTER, J.N. Metal accumulation within Salt-marsh environments – The occurrence and distribution of trace metals in halophytes. **Chemosphere**, v. 28, n. 6), 1189 – 1199, 1994.

WILLIAMS, T.P.; BUBB, J.M.; LESTER, J.N. Metal accumulation within Salt-marsh environments - A Review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28, n. 5, p. 277-290, 1994.



## **ANEXOS**

**ANEXO A** – Resumo apresentado no 9º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) – “Ciência de Alimentos e Qualidade de Vida: Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade”, novembro de 2011.



**ANEXO B** – Resumo apresentado no 9º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) – “Ciência de Alimentos e Qualidade de Vida: Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade”, novembro de 2011.



ANEXO C - Resumo apresentado no *16th World Congress of Food Science and Technology- IUFoST*, Foz do Iguacu – PR, agosto de 2012.



**IUFoST**  
2012

# Certificate of Appreciation

16<sup>th</sup> IUFoST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that the paper entitled  
**CHEMICAL COMPOSITION OF SARCOCORNIA AMBIGUA (AMARANTHACEAE) FROM BRAZILIAN COASTLINE.**  
 authored by Bertin, R.L.; Borges, G.S.C.; Costa, A.C.O.; Azevedo, M.S.; Maltez, H.F.; Tavares, L.B.B.; Gonzaga, L.V.; Felt, R.  
 was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and Technology** : **“Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology”**, held at Foz do Iguacu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.



Glauca Maria Pastore  
Chair



Della B. Rodriguez-Arriaga  
Scientific Committee Chair



Procedimento aprovado pelo Conselho



LABORATÓRIO



MAIO 2012



IUFoST

886c-0d8f-b1a3-0075-3a21-44f1-e2f06-0e3f

ANEXO D – Resumo apresentado no 12<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Foz do Iguacu – PR, setembro de 2012.

## 12<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry

Foz do Iguacu - Paraná - Brazil  
September, 17<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup>, 2012



## CERTIFICATE

This is to certify that the contribution entitled

**Determination of mineral composition in *Sarcocornia ambigua* plant by inductively coupled plasma mass spectrometry**

Renata Labronice Bertin, Heloisa França Maltez, Jefferson Santos de Gois,  
Luciano Valdemiro Gonzaga, Daniel L.G. Borges, and Roseane Fett

has been presented as Poster at the 12<sup>th</sup> Rio Symposium on Atomic Spectrometry held in Foz do Iguacu, Paraná, Brazil, from September 17<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup>, 2012.

Francisco José Krug  
Chairman

**ANEXO E** – Resumo apresentado no 63º Congresso Nacional de Botânica: Botânica Frente às Mudanças Globais, novembro de 2012.

**JOINVILLE - Santa Catarina - Brasil - 2012**



**63º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA**  
BOTÂNICA FRENTE ÀS MUDANÇAS GLOBAIS

# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho ESTUDOS ANATÔMICOS COM Sarcocornia ambigua (Amaranthaceae), ESPÉCIE COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE E NUTRICIONAL, de autoria de Renata Labronici BERTIN, Graziela Elizabeth GEISLER, Hilaire Moura RODRIGUES, Roseane FETT, Marisa SANTOS, foi apresentado na sessão Pôster, do 63º Congresso Nacional de Botânica, realizado de 11 a 16 de novembro de 2012, em Joinville - SC, Brasil.

  
**Katia R. S. Lourenço Machado**  
 1ª Secretária

  
**Dra. Karrn Esemann de Quadros**  
 Presidente do 63CNBot



