

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Plantas Halófitas: Extração de Bioativos

Ana Beatriz Vinagre Carvalho

Dissertação orientada pela Doutora Naiara Fernández e coorientada pela Professora
Doutora Maria Rosário Bronze

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2022

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Plantas Halófitas: Extração de Bioativos

Ana Beatriz Vinagre Carvalho

Dissertação orientada pela Doutora Naiara Fernández e coorientada pela Professora
Doutora Maria Rosário Bronze

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2022

Resumo

As plantas halófitas são plantas tolerantes à salinidade, comestíveis e que se encontram por todo o mundo, inclusive em Portugal, ao longo da costa. Estas plantas possuem na sua constituição compostos fenólicos, que são antioxidantes naturais, e que têm sido apontados como responsáveis por alguns dos efeitos benéficos para a saúde do ser humano. Existem diversas espécies de plantas halófitas, no entanto, a mais conhecida e comercializada é a *Salicornia ramosíssima*.

Dada a utilização cada vez mais importante deste tipo de plantas, justifica-se um estudo aprofundado sobre a sua composição e possíveis benefícios para a saúde. Para aumentar este conhecimento, há necessidade de otimizar metodologias de extração e análise que permitam ter uma informação detalhada sobre a composição destas plantas.

Esta dissertação teve como principal objetivo extrair compostos bioativos de plantas halófitas, mais concretamente de *S. ramosíssima* e caracterizar a sua composição química e bioatividade.

Inicialmente realizou-se a caracterização da planta, onde foi possível identificar os compostos voláteis responsáveis pelo aroma das plantas presentes na sua composição, estudar o seu perfil lipídico e identificar e quantificar pigmentos e compostos fenólicos. Através desta caracterização verificou-se que a amostra, relativamente a compostos voláteis, possui maioritariamente álcoois (25%) e alcanos (27%), tendo também na sua composição compostos como o mentol (9.55%) e a cânfora (2.90%). Ao extrair o conteúdo lipídico da amostra foi possível identificar e quantificar os diferentes ácidos gordos presentes, sendo os maioritários o ácido alfa-linoleico (C18:3, 34%), o ácido linoleico (C18:2, 17%) e o ácido palmítico (C16, 21%). Possui carotenoides e clorofilas na sua composição. Relativamente a compostos fenólicos, foi possível identificar mais de 10 tipos diferentes, mas os maioritariamente presentes na planta são o ácido clorogénico e o quercetina-3-glucósido.

Testaram-se depois diferentes técnicas de modo a extrair compostos bioativos utilizando-se técnicas convencionais – Soxhlet - e alternativas, como a extração por fluidos supercríticos, extração assistida por ultrassons e extração assistida por microondas. Com o auxílio de um programa estatístico, o MODDE, foi possível otimizar esta última extração. Ao comparar os resultados obtidos, concluiu-se que a extração assistida por microondas é o melhor método de extração uma vez que não consome muito tempo e energia, é um método relativamente simples e obtêm-se valores elevados de

rendimento mássico e conteúdo fenólico total, 56.69% e 30.76 mg GAE/g extrato, respetivamente.

Em suma, esta dissertação permitiu caracterizar a composição da *Salicornia ramosissima* e otimizar métodos de extração considerados “amigos do ambiente” para compostos bioativos.

Palavras-chave: plantas halófitas, métodos de extração, compostos fenólicos, conteúdo fenólico total, atividade antioxidante

Abstract

Halophyte plants are salinity tolerant plants, edible and found all over the world, including in Portugal, along the coast. These plants have in their constitution phenolic compounds, which are natural antioxidants, and which have been pointed out as responsible for some of the beneficial effects for the health of human being. There are several species of halophyte plants, however, the best known and marketed is *the Salicornia ramosissima*.

Given the increasingly important use of this type of plants, an in-depth study on its composition and possible health benefits is warranted. To increase this knowledge, there is a need to optimize extraction and analysis methodologies that allow to obtain detailed information about the composition of these plants.

The main objective of this dissertation is to extract bioactive compounds from halophyte plants, more specifically from *S. ramosissima* and characterizing its chemical composition and bioactivity.

Initially the plant was characterized, where it was possible to identify the volatile compounds responsible for the aroma of plants present in its composition, study its lipid profile and identify and quantify pigments and phenolic compounds. Through this characterization it was found that, relatively to volatile compounds, the sample has mainly alcohols (25%), alkanes (27%), menthol (9.55%) and camphor (2.90%). By extracting the lipid content from the sample, it was possible to identify and quantify the different fatty acids present, with the majority being alpha-linoleic acid (C18:3, 34%), linoleic acid (C18:2, 17%) and palmitic acid (C16, 21%). It has carotenoids and chlorophylls in its composition. For phenolic compounds, it was possible to identify more than 10 different types, but the majority present in the plant is chlorogenic acid and quercetin-3-glucoside.

Were then tested different techniques to extract bioactive compounds using conventional techniques – Soxhlet - and alternatives, such as supercritical fluid extraction, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction. With a statistical program, MODDE, it was possible to optimize this last extraction. When comparing the results obtained, it was concluded that microwave-assisted extraction is the best extraction method since it does not consume much time and energy, it is a relatively simple method and there were obtained high values of mass yield and total phenolic content, 56.69 % and 30.76 mg GAE/g extract, respectively.

In conclusion, this dissertation allowed to characterize the composition of *Salicornia ramosissima* and optimize extraction methods considered "environmentally friendly" for bioactive compounds.

Keywords: halophyte plants, extraction methods, phenolic compounds, total phenolic content, antioxidant activity

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Naiara Fernández, por toda a dedicação, disponibilidade e preocupação que demonstrou ao longo deste último ano, sendo incansável no que toca a esclarecimento de dúvidas, ajudando-me assim, a ultrapassar os vários obstáculos que surgiram ao longo desta dissertação. Agradeço imenso todo o conhecimento que me transmitiu. À minha coorientadora e professora, Professora Doutora Maria Rosário Bronze, por todo o conhecimento que me transmitiu e toda a ajuda durante a realização deste trabalho. Às duas, um grande obrigada.

Às equipas do iBET e da FFUL que permitiram a concretização de todo o trabalho experimental, em particular à Doutora Teresa Serra, à Ana Bárbara Pereira, à Leonor Costa, ao António Ferreira, à Elsa Mecha, à Juliana Oliveira e à Andreia Silva.

À Doutora Ana Partidário, do INIAV, pela disponibilidade do equipamento de GC-FID para a análise de ácidos gordos.

À empresa RiaFresh pelo fornecimento da planta halófito.

Ao grupo NBNPT, particularmente à Carolina, à Ana, à Maha, ao Miguel, ao João, ao Agostinho e à minha “colega de gabinete”, Inês, um obrigada muito especial, não só por toda a ajuda e apoio prestado durante este ano na plataforma, mas também por todas as horas de almoço e pausas de café bem passadas.

Um enorme obrigada a todos os meus amigos e colegas de mestrado. Sem vocês não teria conseguido – ou pelo menos teria sido muito mais difícil. À Beatriz, à Sofia e à Joana, obrigada pela companhia, por todas as horas a fazer trabalhos de grupo e por toda a ajuda nestes últimos dois anos.

À Catarina, à Daria, à Inês e à Sofia, um obrigada enorme por estarem sempre lá, por todo o carinho e motivação e por colocarem sempre um sorriso na minha cara.

Aos amigos de sempre, não tenho sequer palavras para vos agradecer por tudo o que fizeram por mim ao longo de todos estes anos. Obrigada, mesmo, do fundo do coração.

Por fim, um enorme obrigada aos meus pais, à minha irmã e à minha avó, sem eles nada disto teria sido possível. Obrigada pelo apoio incondicional, não só nestes últimos anos mas desde sempre. Obrigada por me deixarem seguir os meus sonhos, mesmo que isso implique estar longe de casa durante grande parte do tempo. Foi graças a eles que consegui conquistar tudo o que conquistei até hoje. A eles, o meu maior obrigada.

Índice

Resumo	III
Abstract.....	V
Agradecimentos	VII
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XV
Abreviaturas.....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1. Plantas Halófitas	1
1.2. Salicórnia	2
<i>S. ramosissima</i>	3
Compostos Fenólicos	4
1.3. Metodologias de Extração.....	7
1.3.1. Extração Convencional: Soxhlet	7
1.3.2. Extração com metodologias sustentáveis: UAE, MAE, SFE.....	8
1.4. Metodologias de análise.....	13
1.4.1. Teor de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu)	13
1.4.2. Identificação da Composição fenólica (HPLC-DAD e HPLC-MS)	14
1.4.3. Análise de compostos voláteis (SPME-GC-MS)	15
1.4.4. Capacidade antioxidante: ORAC	16
1.5. Enquadramento do trabalho	17
2. Parte Experimental	18
2.1. Equipamentos e Materiais.....	18
2.1.1. Amostras.....	18
2.1.2. Reagentes e Solventes	19
2.2. Caracterização da amostra	19
2.2.1. Identificação de compostos voláteis.....	19
2.2.2. Extração lípidos e ácidos gordos	20
2.2.3. Extração de pigmentos	22
2.2.4. Extração Soxhlet	25
2.3. Extrações alternativas de compostos bioativos.....	25
2.3.1. Extração por Fluidos Supercríticos (SFE).....	25
2.3.2. Extração Assistida por Ultrassons.....	26

2.3.3. Extração Assistida por Microondas.....	26
2.4. Métodos de análise.....	27
2.4.1. Cromatografia em Camada Fina (TLC)	27
2.4.2. Análise do Conteúdo Fenólico Total (TPC).....	27
2.4.3. Análise da Capacidade Antioxidante (ORAC).....	28
2.4.4. Identificação e quantificação composição fenólica (HPLC-DAD e HPLC-DAD-ESI-MS)	28
3. Apresentação e Discussão dos resultados.....	30
3.1. Caracterização da amostra	30
3.1.1. Identificação de compostos voláteis.....	30
3.1.2. Extração lipídica e quantificação de ácidos gordos	31
3.1.3. Determinação e quantificação de pigmentos.....	35
3.1.4. Extração convencional sólido-líquido (Soxhlet)	37
3.2. Extrações alternativas de compostos bioativos.....	41
3.2.1. Extração por Fluidos Supercríticos (SFE).....	41
3.2.2. Extração Assistida por Ultrassons	44
3.2.3. Extração Assistida por Microondas.....	48
3.2. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes extrações.....	61
4. Conclusão	63
5. Bibliografia.....	65
6. Anexos.....	79

Índice de figuras

Figura 1.1 - Planta Salicornia, no seu habitat natural. Fonte: Jornal Médico (disponível em https://www.jornalmedico.pt/atualidade/34836-sal-planta-salicornia-pode-ser-alternativa-mais-saudavel.html)	2
Figura 1.2 - Esquema da extração com Soxhlet (19).....	8
Figura 1.3 - Diagrama de um banho de ultrassons usado numa extração. (24).....	9
Figura 1.4 - Diagrama de um microondas utilizado em extrações (31).	11
Figura 1.5 - Componentes de um sistema Thar SFE-500F-2-C50 (35).....	12
Figura 1.6 - Curva do ensaio por ORAC.	17
Figura 2.1 - Planta Salicórnia liofilizada e triturada, dividida entre as partículas de tamanho superior e inferior a 250 µm.	18
Figura 2.2 - Extração lipídica através do método Bligh & Dyer.....	20
Figura 2.3 - Extrato lipídico seco.	21
Figura 2.4 - Processo de derivatização dos lípidos extraídos. (a– saponificação; b– metilação; c– separação de fases.).....	21
Figura 2.5 - Extrato de carotenoides obtido pré e pós evaporação de solvente.....	23
Figura 2.6 - Extração Soxhlet da planta salicórnia.	25
Figura 3.1 - Cromatograma obtido por SPME-GC-MS de uma amostra de Salicórnia. 30	
Figura 3.2 - Categorias de compostos encontrados na amostra.....	31
Figura 3.3 - Cromatograma de GC-FID para a identificação de ácidos gordos na amostra com partículas superiores a 250 µm (a) e para a amostra com partículas de tamanho inferior a 250 µm (b).	32
Figura 3.4 – Sobreposição dos cromatogramas do extrato de pigmentos e dos padrões de carotenoides, e respetiva aproximação. (450 nm) (a – luteína; b – zeaxantina; c – β-caroteno; 1 – pico relativo à luteína; 2 – pico relativo ao β-caroteno.).....	35
Figura 3.5 - Sobreposição do cromatograma do extrato com o cromatograma dos padrões de clorofila. (410 nm) (a – clorofila a; b – clorofila b; c – clorofila c2; 1 – pico relativo à clorofila b; 2 – pico relativo à clorofila a).	36
Figura 3.6 - Extrato obtido por Soxhlet.	37
Figura 3.7 - Cromatografia em camada fina realizada ao extrato obtido. (a – distância percorrida pelo solvente; b – distância percorrida pelos analitos).....	38
Figura 3.8 - Sobreposição do cromatograma do extrato Soxhlet e da mistura de padrões de compostos fenólicos A (280 nm) (a – ácido gálico; b – ácido protocatecuico; c – ácido	

clorogénico; d – ácido cafeico; e – quercetina-3-glucósido; 1 – ácido neoclorogénico; 2 – galocatequina; 3 – ácido clorogénico; 4 – ácido p-cumaroilquínico; 5 – derivado de ácido ferúlico; 6 – quercetina-3-glucósido; 7 – ácido 3,4-dicafeoilquínico; 8 – ácido 4,5-dicafeoilquínico; 9 – ácido cafeoilhidrocafeoilquínico).....	39
Figura 3.9 - Extrato obtido através da extração por fluidos supercríticos sem co-solvente.	41
Figura 3.10 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato de SFE e dos padrões de carotenoides e respetivas aproximações (b e c) (450 nm) (a – luteína; b – zeaxantina; c – β -caroteno; 1 – pico relativo à luteína; 2 – pico relativo ao β -caroteno).....	42
Figura 3.11 - Sobreposição do cromatograma do extrato SFE com os cromatogramas dos padrões de clorofilas e respetiva aproximação (b) (410 nm) (a – clorofila a; b – clorofila b; c – clorofila c2; 1 – pico relativo à clorofila b; 2 – pico relativo à clorofila a).....	43
Figura 3.12 - Extrato obtido através de uma extração assistida por ultrassons.	44
Figura 3.13 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de compostos fenólicos A (280 nm) (a – ácido gálico; b – ácido protocatecuico; c – ácido clorogénico; d – ácido cafeico; e – quercetina-3-glucósido; 1 – ácido neoclorogénico; 2 – galocatequina; 3 – ácido clorogénico; 4 – ácido ferúlico; 5 – glucósido de ácido ferúlico; 6 – derivado de ácido p-cumárico; 7 – ácido p-cumaroilquínico; 8 – derivado de ácido ferúlico; 9 – quercetina-3-glucósido; 10 – ácido 3,4-dicafeoilquínico; 11 – ácido 3,5-dicafeoilquínico; 12 – ácido 4,5-dicafeoilquínico; 13 – ácido cafeoilhidrocafeoilquínico).....	45
Figura 3.14 - Sobreposição do cromatograma do extrato UAE e dos cromatograma da mistura de padrões B (a) e C (b) (210 nm, modo negativo). (1 – ácido neoclorogénico; 2 – ácido clorogénico; 3 – derivado de ácido ferúlico; 4 – derivado de quercetina; 5 – ácido 3,5-dicafeoilquínico; 6 – ácido 4,5-dicafeoilquínico; 7 – derivado de quercetina).....	47
Figura 3.15 - Gráfico relativo ao estudo estatístico realizado (teste t) para os valores preliminares da extração por microondas. Os resultados estão expressos em média \pm DP (n=3) para cada uma das condições diferentes, em mg GAE/g extrato. Foi efetuada uma comparação múltipla entre as diferentes condições, sendo que os pares de condições estatisticamente significativos para o teste de Tukey são ac e bc ($p \leq 0,05$).....	49
Figura 3.16 - Extratos obtidos por extração assistida por microondas, durante o desenho de experiências. (a – extrato condições R11; b – extrato condições R12; c – extrato condições R13).	50

Figura 3.17 - Gráfico com os valores de rendimento, TPC e ORAC de todas as experiências do DOE.....	51
Figura 3.18 - Gráfico de correlação entre os valores obtidos de TPC e de ORAC.	52
Figura 3.19 - Gráficos dos resultados do DOE, para as três respostas, com a percentagem de etanol constante, em função do tempo e da temperatura.	53
Figura 3.20 - Gráficos dos resultados do DOE, para as três respostas, com a temperatura constante, em função do tempo e da percentagem de etanol.....	54
Figura 3.21 - Gráficos dos resultados do DOE, para as três respostas, com o tempo de extração constante, em função da percentagem de etanol e da temperatura.	54
Figura 3.22 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de compostos fenólicos A (280 nm) (a – ácido gálico; b – ácido protocatecuico; c – ácido clorogénico; d – ácido cafeico; e – quercetina-3-glucósido).....	58
Figura 3.23 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de carotenoides e respetiva aproximação (450 nm) (a – luteína; b – zeaxantina; c – apocarotenal; d – β -caroteno)	59
Figura 3.24 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de clorofilas (a) e respetiva aproximação (b) (410 nm) (a – clorofila a; b – clorofila b).	60

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Estruturas químicas dos compostos fenólicos.	5
Tabela 1.2 - Vantagens e desvantagens dos métodos usados.	13
Tabela 2.1 - Valores dos picos de absorção máxima dos padrões de carotenoides, a 450 nm.	23
Tabela 2.2 - Valores de máximos de absorção a 410 nm dos padrões clorofila a e clorofila b.	24
Tabela 3.1 - Valores de rendimento de extração.	31
Tabela 3.2 - Valores de concentração e % de área para cada um dos ácidos gordos presentes em ambas as amostras, com tamanho superior e inferior a 250 μm	34
Tabela 3.3 - Rendimento mássico e concentrações dos diferentes pigmentos identificados no extrato.	37
Tabela 3.4 - Rendimento mássico e respectivos valores de TPC e ORAC para o extrato de Soxhlet.	38
Tabela 3.5 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma obtido pela análise do extrato de Soxhlet. Respetivos tempos de retenção, comprimentos de onda máximos de absorção e valores de concentração.	39
Tabela 3.6 - Dados de rendimento mássico e concentração de pigmentos obtidos ao analisar o extrato de SFE.	44
Tabela 3.7 - Valores de rendimento e teor de conteúdo fenólico total do extrato UAE.	45
Tabela 3.8 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma, respetivos valores de tempo de retenção, comprimentos de onda máximos de absorção e concentrações.	45
Tabela 3.9 - Identificação, através de análise LC-MS, dos compostos encontrados no extrato.	48
Tabela 3.10 – Condições do desenho de experiências.	50
Tabela 3.11 - Condições usadas nas extrações e comparação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo MODDE.	56
Tabela 3.12 - Valores de erro relativo (%) entre os dados experimentais e os dados previstos.	57
Tabela 3.13 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma obtido pela análise do extrato otimizado de MAE. Respetivos tempos de retenção, comprimentos de onda máximos de absorção e valores de concentração.	58

Tabela 3.14 - Dados de rendimento mássico, TPC, ORAC e concentrações de carotenoides e clorofilas relativos às extrações otimizadas de MAE.....	61
Tabela 3.15 – Condições experimentais das diferentes extrações e respetivos dos valores de rendimento mássico e TPC obtidos.	62

Abreviaturas

$\mu\text{mol TEAC/mg}$	Capacidade antioxidante equivalente de Trolox por extrato
ABPR	Regulador de Pressão Automático
AG	Ácidos Gordos
BHT	Hidroxitolueno burilado
DOE	Desenho de experiências
FAME	Ésteres Metilados de Ácidos Gordos
FC	Folin-Ciocalteu
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de arranjo de díodos
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa
MAE	Extração Assistida por Microondas
mg GAE/g extrato	Equivalentes de ácido gálico por extrato
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
ORAC	Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados
PBS	Tampão fosfato salino (Phosphate-buffered saline)
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFA	Ácidos gordos saturados
SFE	Extração com Fluidos Supercríticos

TFC	Conteúdo total de flavonóides
TLC	Cromatografia em camada fina
TPC	Conteúdo fenólico total
UAE	Extração Assistida por Ultrassons
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

1. Introdução

1.1. Plantas Halófitas

O termo “halófita” surge da junção das palavras *Halos* e *Phyto*, que significam sal e planta, respetivamente.

As plantas halófitas são tolerantes à salinidade e são, por isso, capazes de completar o seu ciclo de vida num substrato com uma concentração elevada de cloreto de sódio (NaCl). São comestíveis e representam 1% da flora mundial, uma vez que 99% das plantas são bastante sensíveis ao sal – plantas glicófitas (1). É possível encontrar este tipo de plantas em vários pontos do mundo e em Portugal, encontram-se naturalmente ao longo da costa, em locais com boa drenagem das águas, como por exemplo, as salinas (2).

As plantas halófitas podem separar-se em grupos, consoante a sua tolerância à salinidade dos solos (1):

- obrigatórias: necessitam de sal, como a *Salicornia spp.* ou *Sarcocornia spp.*;
- preferenciais: preferem ambientes salinos, como a *Juncus maritimus*;
- de subsistência: toleram ambientes salinos, como a *Juncus acutus*;

O excesso de sal é um dos principais fatores que limitam o crescimento e a produtividade das plantas, no entanto, as plantas halófitas possuem mecanismos evoluídos nas raízes, no caule e nas folhas que as torna diferentes. As células que se encontram nas camadas exteriores são basicamente impermeáveis ao sal (NaCl), por outro lado, no interior da planta, existe uma camada que força a passagem da água por entre as células, filtrando grande parte do NaCl. Estes iões – Na⁺ e Cl⁻ – encontram-se armazenados no vacúolo central da planta. Para manter o equilíbrio iónico neste compartimento, dá-se um aumento da síntese de metabolitos osmoticamente ativos, no entanto, por consequência, acumulam-se nas folhas diferentes açúcares de modo a responder ao stress salino. Este stress leva também ao aumento da formação das espécies reativas de oxigénio (ROS), o que pode destabilizar a atividade enzimática ou a integridade das células membranares. Para responder ao dano oxidativo, as plantas halófitas induzem a síntese de enzimas e compostos antioxidantes, como polifenóis, carotenoides, como o β-caroteno e ácido ascórbico (3,4).

Este tipo de plantas é usado desde há muitos anos como alimento e para fins medicinais. O uso destas plantas é bastante vantajoso pois possuem um elevado valor de proteínas e fibra, adaptam-se facilmente a regiões costeiras áridas e podem ser usadas

para vegetar solos salinos. Podem também ser cultivadas em solos não tão propícios para a agricultura como solos impermeáveis e com elevado nível de sal (2).

Existem centenas de plantas halófitas, no entanto, neste trabalho irá dar-se destaque à *Salicornia spp.*

1.2. Salicórnia

A salicórnia é uma das principais plantas halófitas (1). Pertence à família *Chenopodiaceae* – e existem mais de 150 espécies, sendo que as mais comuns são: *Salicornia herbacea* (também conhecida como *S. europaea*), *Salicornia maritima*, *Salicornia bigelovii*, *Salicornia fruticosa* e *Salicornia ramosissima* (5,6). Taxonomicamente são bastante parecidas, o que dificulta a distinção entre as diferentes espécies de salicórnia.

É possível encontrar esta planta em vários continentes – América do norte, Europa, Ásia e África do Sul – uma vez que suporta diferentes tipos de clima. Em Portugal, pode encontrar-se *Salicornia spp.*, mais especificamente a *Salicornia ramosissima*, nas regiões do Sapal (Algarve), Murtosa (Aveiro) e na Figueira da Foz (5,6). Cresce espontaneamente nas zonas salinas ao longo da costa ou em áreas com solos pobres e, por isso, foi considerada uma planta invasiva durante muito tempo (7,8).

A salicórnia é uma planta anual, ou seja, germina, floresce e morre em um ano. Possui pequenas folhas verdes, em forma de escama, com caules esponjosos, flores e frutos impercetíveis (*Figura 1.1*)(7).



Figura 1.1 - Planta *Salicornia*, no seu habitat natural. Fonte: Jornal Médico (disponível em <https://www.jornalmedico.pt/actualidade/34836-sal-planta-salicornia-pode-ser-alternativa-mais-saudavel.html>)

As folhas da planta são verdes durante a primavera e o verão, tornando-se verde-amarelado, laranja e rosa avermelhada à medida que chega à estação outonal. O ciclo de vida da *Salicórnia* termina no inverno, com as suas folhas com uma cor roxa (6). Atingem, normalmente, uma altura entre os 10-40 centímetros.

Sendo uma planta halófito é capaz de tolerar elevados níveis de salinidade e sobrevive também a períodos de secas severas. Além disso, é bastante resistente a doenças e pestes. Estas características tornam-na numa das mais importantes plantas do futuro (7).

A planta salicórnia começou a ser usada há muitos anos na Ásia, principalmente na área da medicina tradicional. De seguida, passou também a utilizar-se para fins industriais – usada como aditivo na indústria do sabão e do vidro (devido à presença de substâncias químicas alcalinas na sua constituição) –, terapêuticos, pois é considerada um produto diurético e rico em vitamina C, e alimentares, como complemento da dieta, podendo ser consumida em saladas ou como pickles. Tem sido também bastante procurada para cozinhas *gourmet*, não só pelo seu sabor salgado, mas por possuir um elevado nível de minerais, vitamina C e β -caroteno (3). Ultimamente, a sua importância tem vindo a aumentar uma vez que pode ser usada como um substituto do sal. Devido a este fator, já existe a possibilidade de a comprar em supermercados, como uma especiaria.

As sementes da salicórnia são bastantes relevantes pois fornecem um óleo vegetal de elevada qualidade, uma vez que é maioritariamente constituído por ácidos gordos polinsaturados, como por exemplo o ácido linoleico. Podem, além disso, ser também usadas na área da cosmética (1).

O perfil nutricional da planta é bastante complexo pois é rica em fibras dietéticas, vitaminas, ácidos gordos insaturados, aminoácidos essenciais, fitoesteróis e flavonóides (9). A nível mineral, é possível encontrar na salicornia maioritariamente sódio, iodo, fosfato, cálcio, fósforo, magnésio, manganês, zinco e ferro. Esta possui uma elevada capacidade de reter minerais proveniente do ambiente (7,10).

Devido a estas características, está provado que a salicórnia possui benefícios para vários problemas de saúde como a obesidade, hipertensão, asma, cancro, inflamações, diabetes, hepatites e gastroenterites (1,6).

Neste estudo, a espécie de *Salicornia* utilizada é a *S. ramosissima*.

S. ramosissima

Como supramencionado, esta é uma variante da *S. europaea*, sendo possível encontrá-la em Portugal, na zona da Ria de Aveiro. Em estudos prévios foi possível identificar e quantificar 57 compostos desta espécie, através de cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa (GC-MS). Estes são maioritariamente ácidos carboxílicos – ácidos gordos saturados –, álcoois de cadeia longa, esteróis e famílias aromáticas (11).

O ácido gordo e o álcool de cadeia longa mais abundantes na *S. ramosíssima* são o ácido palmítico e o tetracosanol, respetivamente. Por outro lado, em espécies como a *S. europaea* e *S. bigelovii*, o ácido gordo mais relevante é o ácido linoleico. Este facto deve-se a diferenças entre as espécies e as zonas morfológicas onde são cultivadas, assim como a características ambientais. A salicórnia ramosíssima possui uma fração lipofílica com baixo valor de ácidos gordos insaturados, comparativamente a outras espécies da *Salicornia spp* (11).

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são um dos principais constituintes das plantas halófitas, em particular da salicórnia. São metabolitos secundários das plantas derivados da via metabólica do chiquimato, originando fenilpropanóides, e da via do ácido acético, dando origem aos fenóis simples (12). Estão associados não só à sua qualidade nutricional e sensorial como são considerados fonte de antioxidantes naturais (13). São sintetizados, pela planta, como resposta a pressões ecológicas e fisiológicas e, como tal, têm como função proteger a planta da radiação ultravioleta, atrair polinizadores e dispersar sementes, defender a planta de ataques de herbívoros, insetos ou outras plantas ou patogénicos, pigmentar a planta e regular o seu desenvolvimento (14,15). A capacidade que os compostos fenólicos possuem de estabilizar e deslocar eletrões desemparelhados, assim como os seus efeitos antioxidantes estão relacionados com várias propriedades promotoras de saúde, através de seis modos principais de ação (15):

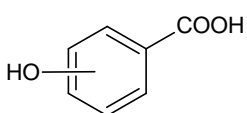
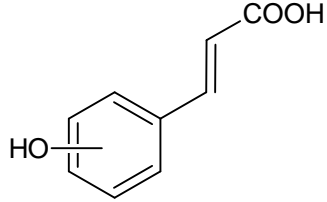
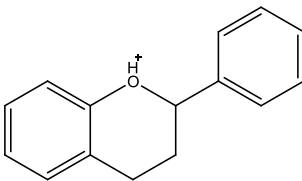
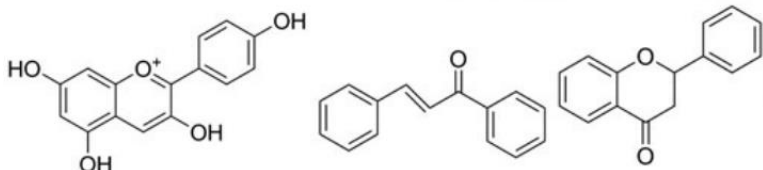
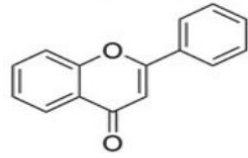
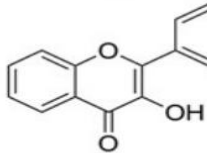
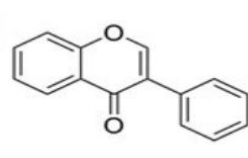
- Quebra de reações em cadeia oxidativa ao eliminar ROS;
- Eliminação de pró-oxidantes;
- Reciclagem de outros antioxidantes;
- Modulação da atividade enzimática;
- Modificação das vias de transdução de sinal;
- Diminuição da fluidez das membranas para restringir especificamente a difusão de ROS.

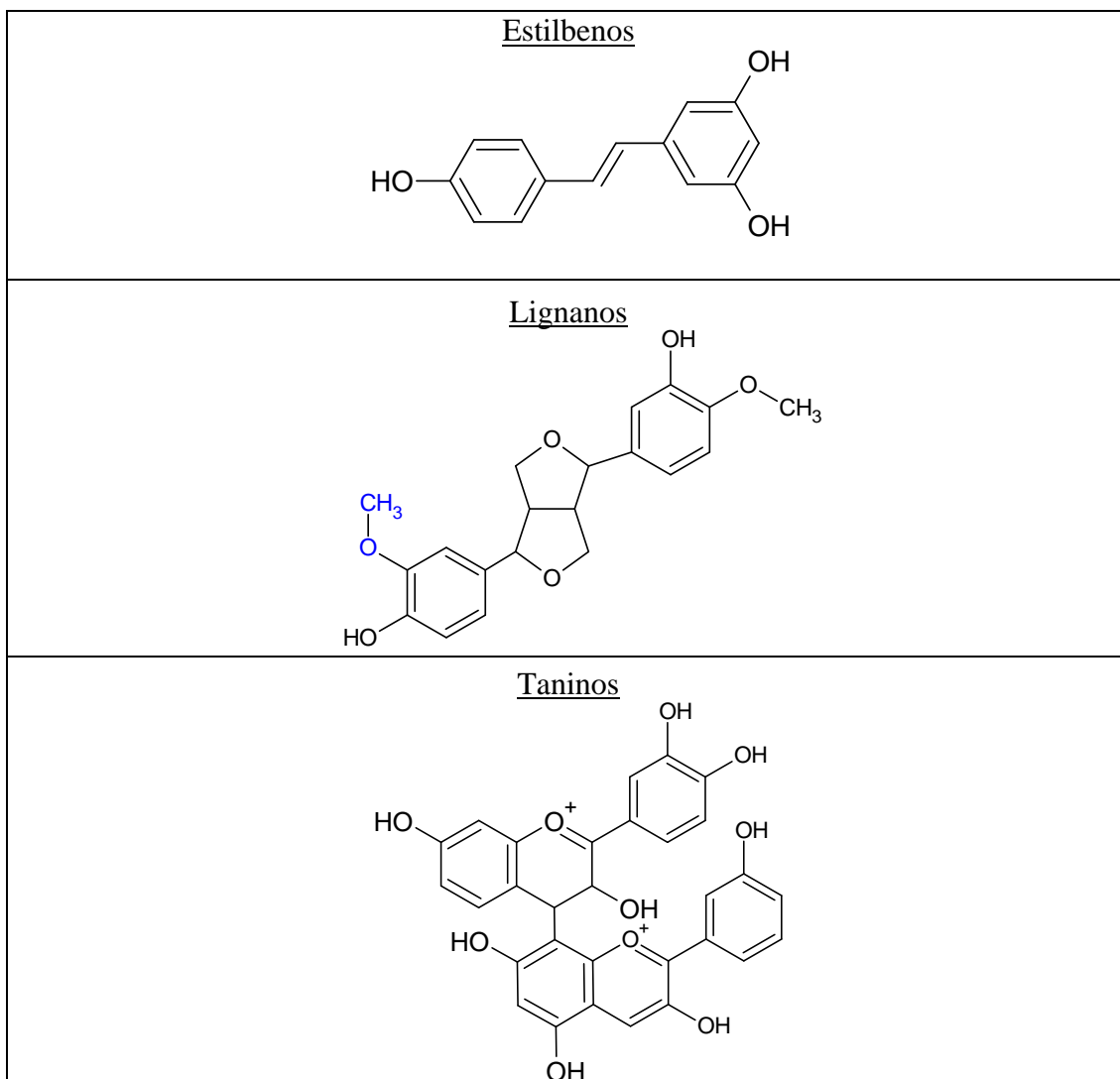
A sua estrutura consiste em pelo menos um grupo hidrocarboneto aromático, ou seja, um anel aromático, ligado a um ou mais grupos hidroxilo, podendo ser polimerizado ou não (12,15). Esta estrutura permite a interação destes compostos com outras biomoléculas importantes (16). Atualmente são conhecidos mais de 8000 compostos fenólicos diferentes podendo ser classificados como fenóis simples – ácidos fenólicos,

álcoois fenólicos - ou polifenóis – cumarinas, flavonóides, lignanos, estilbenos e taninos. Estes diferem no número de anéis aromáticos na molécula (*Tabela 1.1*) (12,14,16).

Nos alimentos, são comumente associados a qualidades sensoriais e nutricionais, mas destacando sempre a sua atividade antioxidante. Esta foi reconhecida há muito tempo, no entanto a investigação relativamente ao uso de substâncias naturais ou alimentos com compostos fenólicos antioxidantes continua a ser um grande interesse na indústria alimentar (13). Estão também associadas a estas propriedades anti-inflamatórias, anticancerígena, antimutagénica, antialérgica, anticoagulantes, antivirais e antimicrobianas (12,17).

Tabela 1.1 - Estruturas químicas dos compostos fenólicos.

Fenóis Simples		
<u>Ácidos Hidroxibenzóicos</u> 	<u>Ácido Hidroxicinâmicos</u> 	
Polifenóis		
<u>Flavonóides</u> 		
<u>Que podem ainda dividir-se nas seguintes subclasses:</u>		
		
Chalconas		
 Flavonas	 Flavonóis	 Isoflavonóides



A intensidade da capacidade antioxidante varia de acordo com a estrutura do composto, nomeadamente do número e posição dos grupos hidroxilo, da presença de duplas ligações, do tipo de grupos substituintes no anel e do grau de glicosilação (15).

A parte da planta estudada influencia também os resultados, pois apesar destes compostos se encontrarem em todos os órgãos, geralmente encontram-se mais concentrados nas partes aéreas. Este facto pode dever-se à exposição solar e ao calor (15).

Os extratos fenólicos podem ser usados diretamente na matriz alimentar como antioxidantes, substituindo compostos sintéticos, ou podem ser utilizados no desenvolvimento de membranas e revestimentos, usados para selar os produtos embalados, preservando a sua qualidade microbiológica. Quando aplicados no alimento, o nível de TPC (conteúdo fenólico total) e TFC (conteúdo total de flavonóides) aumenta significativamente, aumentando por consequência o seu potencial antioxidante podendo ocorrer, no entanto, uma ligeira alteração de cor (12,15).

Devido a todas estas características, o interesse em compostos fenólicos tem vindo a crescer ao longo dos anos, de modo a ser possível formular e otimizar técnicas de extração cada vez mais sustentáveis, que extraiam com sucesso estes compostos de modo que possam ser usados na indústria alimentar, farmacêutica e de cosmética (12).

Ao longo deste trabalho prático serão usadas metodologias de extração convencionais e sustentáveis – Extração Sólido-Líquido Soxhlet, Extração Assistida por Ultrassons (UAE), Extração Assistida por Microondas (MAE) e Extração com o auxílio de Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE) –, técnicas de análise e caracterização química, como o método de Folin-Ciocalteu, método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Arranjo de díodos (HPLC-DAD), Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrómetro de massa (GC-MS), Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada ao espectrómetro de massa (HPLC-MS) e Cromatografia em Camada Fina (em inglês *Thin Layer Chromatography* - TLC).

1.3. Metodologias de Extração

1.3.1. Extração Convencional: Soxhlet

A extração sólido-líquido Soxhlet é uma extração convencional que se caracteriza pela remoção do analito de uma matriz sólida utilizando um solvente orgânico capaz de dissolver o analito em questão (18).

Para uma extração deste tipo é necessária uma manta de aquecimento, um balão de destilação, o extrator Soxhlet, um condensador de refluxo – que permite a condensação do solvente e o seu refluxo, e um cartucho, onde é colocada a amostra. Este cartucho é depois introduzido no Soxhlet (*Figura 1.2*) (19).

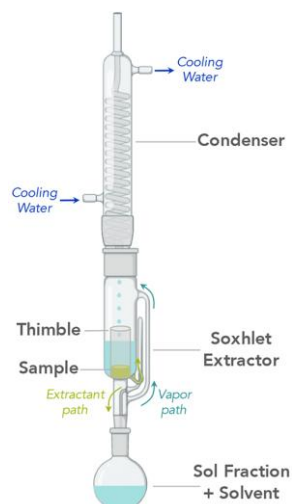


Figura 1.2 - Esquema da extração com Soxhlet (19).

Coloca-se o solvente no balão de destilação, colocado sobre uma manta de aquecimento, e dá-se início ao refluxo. Ao atingir a temperatura de ebulição do solvente, o seu vapor atravessa toda a montagem e, devido ao condensador e, conseqüentemente, ao líquido de refrigeração, arrefece, condensa e desce até à câmara central do Soxhlet, onde se encontra o cartucho. O líquido vai-se acumulando, dissolvendo alguma da amostra. Quando a câmara se encontra quase preenchida pelo líquido, este é aspirado pelo sifão e descarregado de novo no balão de destilação, já com os analitos extraídos, onde se encontra mais solvente de extração. Esta operação repete-se várias vezes, até se dar por concluída a extração. Deste modo, a amostra fica várias vezes em contacto com porções de solvente frescas, aumentando a eficiência da técnica. Depois de terminada a extração, devido às grandes quantidades de solvente usadas, é necessário concentrar o extrato, ou seja, evaporar o solvente do balão de destilação (20,21).

A eficiência desta extração varia consoante diferentes condições, como o solvente usado, a concentração, o pH e a temperatura (18).

Esta técnica é automática e de alta eficiência, no entanto a quantidade de solventes utilizada é relativamente elevada, assim como o tempo de extração, levando ao consumo de muita energia. Há a possibilidade de se dar degradação térmica da amostra devido à elevada temperatura usada durante todo o processo (18,21).

1.3.2. Extração com metodologias sustentáveis: UAE, MAE, SFE

Extração Assistida por Ultrassons (UAE)

A extração assistida por ultrassons, também conhecida como sonicação, produz ondas sonoras, normalmente com frequências acima dos 20 kHz – ultrassons. Estas

propagam-se pelo meio através de compressões e rarefações. A elevadas frequências, estes mecanismos levam a um fenómeno denominado cavitação, onde as bolhas se formam, crescem e, devido à elevada pressão e temperatura, colapsam. A implosão destas gera micro-turbulência, colisões inter partículas a alta velocidade e agitação de partículas microporosas. Todos estes fenómenos aceleram a difusão e aumentam significativamente as transferências de massa (17,22). Devido ao espaço limitado para as bolhas expandirem, a maioria das bolhas colapsa assimetricamente nos vasos. As fissuras que então se desenvolvem nas paredes celulares levam a um aumento da permeabilidade dos tecidos da planta, facilitando tanto a entrada do solvente como a saída dos extratos (23).

A radiação ultrassónica facilita a extração de compostos orgânicos e inorgânicos de matrizes sólidas, usando solventes líquidos em condições controladas de temperatura e num determinado intervalo de tempo (14).

Para extrair compostos fenólicos há dois modos de utilização dos ultrassons:

- sistema estático: extração em circuito fechado, onde não se dá transferência contínua de solvente;
- sistema dinâmico: é fornecido novo solvente continuamente, permitindo uma adsorção mais eficiente dos analitos (14).

Estes podem ainda ser aplicados diretamente através de um sistema de sondagem, ou indiretamente, num banho de água (17). Neste caso, será usado um sistema estático, num banho de água, como está demonstrado na *Figura 1.3* (24).

Este método de extração é considerado um dos mais simples, menos dispendioso e rápido, tendo ainda a vantagem de se poder aplicar a compostos instáveis e termolábeis (14,21).

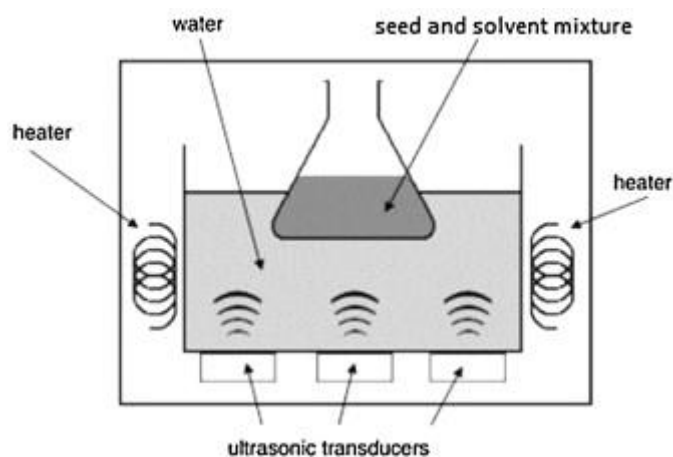


Figura 1.3 - Diagrama de um banho de ultrassons usado numa extração. (24)

Extração assistida por Microondas (MAE)

A Extração Assistida por Microondas (MAE) combina a utilização de energia microondas e a extração por solventes convencional. Consiste na ruptura ou alteração da estrutura das células ao serem aplicadas ondas eletromagnéticas com uma gama de frequências entre os 0.3 e 300 GHz na amostra e baseia-se nos mecanismos de condução iônica e rotação de dipolo. Estes ocorrem maioritariamente em simultâneo, tanto no solvente como na amostra, transformando energia microondas em calor (25,26).

A condução iónica refere-se à migração eletroforética de iões e eletrões, gerando um campo elétrico. Esta migração causa colisões entre iões da amostra e moléculas do meio envolvente, uma vez que a direção dos iões varia consoante o campo elétrico, provocando uma libertação de energia. A rotação de dipolo é referente ao movimento que as moléculas polares efetuam ao tentarem realinhar-se com o campo elétrico. Estas movimentações, assim como as colisões intermoleculares, provocam vibrações, que originam também a libertação de energia. A energia libertada por estes mecanismos encontra-se em forma de calor e portanto leva a um aquecimento da amostra. Este aquecimento provoca a evaporação da humidade presente na matriz, aumentando a pressão intracelular até se dar a ruptura da célula vegetal. Deste modo, a penetração do solvente é maior, facilitando a extração de compostos e aumentando o rendimento (25–28).

MAE é uma técnica fácil de executar e com reduzido tempo de extração. Possui um baixo custo de investimento para obtenção do equipamento, comparativamente a outros usados ao longo desta dissertação, e o rendimento de extração é superior ao obtido através de métodos convencionais. É também um método mais seletivo, que gere menos resíduos e utiliza pouca quantidade de solventes, sendo por isso considerado um método “verde”. No entanto, possui a desvantagem de ser necessário um procedimento de separação – filtração ou centrifugação – para os extratos obtidos. Um outro efeito secundário desta extração é a transformação da energia em calor, aumentando a temperatura da amostra, podendo danificar a atividade e estrutura dos compostos termolábeis (10,21,27,29,30).

Um equipamento de microondas possui quatro componentes principais: o gerador de microondas – magnetron -, o guia de ondas, que permite a propagação destas, o recipiente que contém a amostra e o circulador, que permite a circulação das microondas apenas para a frente (*Figura 1.4*) (27,31).

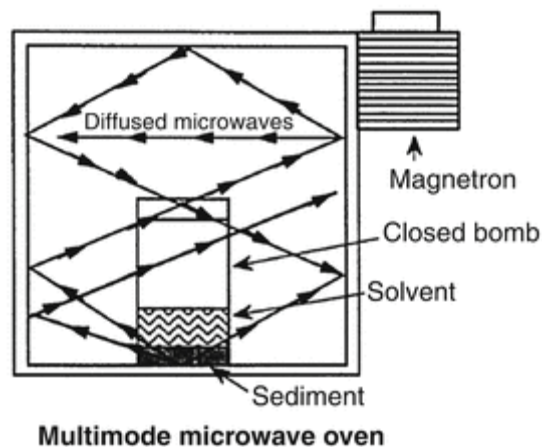


Figura 1.4 - Diagrama de um microondas utilizado em extrações (31).

Neste caso, esta técnica será usada para a extração de compostos fenólicos. Como referido anteriormente, compostos fenólicos são moléculas polares e, como tal, o solvente usado é também polar. O uso de solventes polares é crucial uma vez que têm de ser ionizados. Utiliza-se, frequentemente, a água, pois aumenta a constante dielétrica do solvente e, conseqüentemente, aumenta a absorção da energia de microondas. Posto isso, a temperatura no interior da amostra aumenta originando a rutura de células e a conseqüente libertação dos compostos antioxidantes (28,32).

Extração de Fluido Supercrítico (SFE)

Extração de Fluido Supercrítico é o processo de separar um componente de uma determinada matriz, usando fluidos supercríticos como solvente de extração (33).

Um fluido encontra-se no estado supercrítico quando a temperatura e a pressão do fluido são elevadas, acima do seu ponto crítico (14). Deste modo, contém propriedades físicas intermediárias entre o líquido e o gás (34). O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO_2), uma vez que é quimicamente estável, não é inflamável, não é tóxico, é inodoro, inerte e possui um baixo custo. No entanto, devido à sua perfeita simetria, é apolar, e, como tal, não é possível utilizá-lo em extrações de compostos fenólicos polares. Assim, é necessário adicionar-se um co-solvente polar. Os mais utilizados são o metanol, acetona, água e, principalmente, o etanol (14,33).

O equipamento de SFE (*Figura 1.5*) é constituído por um fornecedor de solvente, um banho de refrigeração, uma bomba – que mantém a pressão e o fluxo -, um permutador de calor, uma célula de extração, com uma manta de aquecimento envolvente - de modo manter a temperatura estável -, a ABPR (Regulador de Pressão automático), e um dispositivo de recolha. Se o processo envolver co-solventes existe também um fornecedor

e uma bomba para este. Nestes casos, depois do vaso de extração, existem vasos coletores (35).

Sendo o CO₂ um fluido supercrítico, este encontra-se sempre num estado líquido/gasoso. Ao passar no refrigerador, condensa, passando totalmente ao estado líquido, sendo assim possível bombeá-lo. Segue para o permutador de calor onde passa de novo a gás e, caso seja necessário, se mistura com o co-solvente. Encaminham-se ambos para o vaso de extração. A ABPR controla a pressão e a temperatura de todo o sistema e impede que, ao diminuir o volume de CO₂ presente no vaso, a pressão se altere. Saindo do vaso, a mistura passa por um recipiente frio onde a nossa matéria-prima fica retida e se separa do CO₂. Este é libertado para a atmosfera e, o co-solvente ainda presente na nossa amostra será evaporado (36).

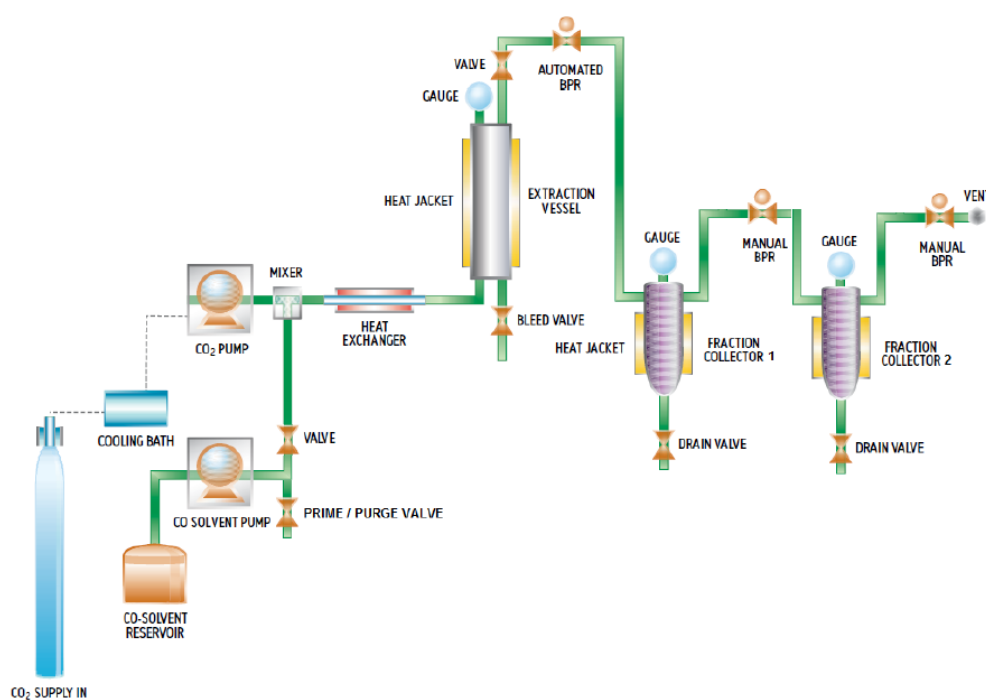


Figura 1.5 - Componentes de um sistema Thar SFE-500F-2-C50 (35).

SFE é uma técnica vantajosa pois possui uma elevada seletividade, um reduzido tempo de extração e uma baixa possibilidade de contaminação da amostra através do solvente. A principal vantagem é o facto de, em alguns casos, ser possível evitar a degradação térmica dos compostos extraídos, assim como a sua decomposição, pois a extração é realizada a uma baixa temperatura e na ausência de oxigénio e luz (33,37).

Esta é uma técnica de extração “amiga do ambiente”, e como referido anteriormente pode ser uma boa alternativa a métodos de extração tradicionais que envolvam solventes.

Na *Tabela 1.2* estão descritas as vantagens e as desvantagens de cada um dos métodos utilizados ao longo deste trabalho.

Tabela 1.2 - Vantagens e desvantagens dos métodos usados.

Método	Vantagens	Desvantagens
Soxhlet	Método automático de alta eficiência.	Provável degradação térmica devido à elevada temperatura e elevado tempo de extração. Uso de solventes orgânicos.
UAE	Elevada eficiência de extração, uso de pouco solvente e energia, reduzida temperatura e tempo de extração. Método considerado bastante simples e pouco dispendioso.	Não aplicável a matrizes complexas, pouco controlo no valor da temperatura do banho ao longo da extração e baixa eficiência relativamente às transferências de energia.
MAE	Método simples com um reduzido tempo de extração e um maior rendimento, baixa degradação térmica, pouca quantidade de solvente usado.	Necessário equipamento específico e de elevado custo, baixa seletividade.
SFE	Possibilidade de dissolver uma grande variedade de produtos naturais. Método bastante seletivo, com um reduzido tempo de extração e baixa probabilidade de contaminação.	Necessário equipamento específico, de elevado custo e manuseamento complexo.

1.4. Metodologias de análise

1.4.1. Teor de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu)

Os compostos fenólicos são considerados as moléculas com maior potencial para neutralizar radicais livres e, como tal, a sua quantificação é uma prática bastante comum. O método de Folin-Ciocalteu é um dos métodos colorimétricos mais antigos para quantificar fenóis numa amostra (38,39). O reagente usado nesta técnica – reagente Folin-Ciocalteu (FC) – é constituído por ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Este reage com fenóis e substâncias redutoras não fenólicas, que dissociam um protão, levando à formação do anião fenolato. Por sua vez, este reduz o reagente FC formando óxido de tungsténio e de molibdénio, W_8O_{23} e Mo_8O_{23} , respetivamente. Estes óxidos apresentam coloração azul, proporcional à concentração de substâncias redutoras ou fenólicas, e são detetáveis por espectrofotómetro a um comprimento de onda de 765 nm, podendo por isso ser quantificados. A reação dá-se em meio alcalino, uma vez que é adicionada uma solução saturada de carbonato de

sódio. Para elaborar a reta de calibração, utiliza-se ácido gálico sendo os resultados obtidos expressos em equivalentes de ácido gálico por extrato (mg GAE/g extrato) (40).

Atualmente, o método de Folin-Ciocalteu é um dos mais utilizados para avaliar indiretamente o potencial antioxidante de uma determinada amostra, ao quantificar os compostos fenólicos totais em extratos derivados de plantas, alimentos e bebidas, no entanto não é específico para grupos fenólicos e, por isso, podem existir interferências na análise, provenientes de outras substâncias redutoras como proteínas e açúcares redutores (40,41).

1.4.2. Identificação da Composição fenólica (HPLC-DAD e HPLC-MS)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas analíticas mais versáteis. É uma técnica cromatográfica e, como tal, é usada para separar compostos químicos em solução, sendo possível identificar e quantificar os componentes da mistura, tendo como base a interação dos componentes entre duas fases, a fase estacionária e a fase móvel (42). Os componentes são dissolvidos num solvente e forçados a passar pela coluna, a uma pressão elevada. Os compostos da amostra interagem de maneira diferente com a fase estacionária e saem da coluna em momentos diferentes, originando diversos picos (43).

Os componentes do HPLC são os reservatórios dos solventes, a bomba, o injetor, a coluna e o detetor. Neste caso, utilizaram-se dois detetores, o detetor de arranjo de díodos (DAD) e o detetor de massa (MS). O primeiro permite a obtenção de espectros dos compostos da amostra em diferentes comprimentos de onda sendo uma das configurações dos detetores de ultravioleta-visível (UV-Vis). A técnica HPLC-DAD pode ser usada para determinar a pureza de um analito. É um método simples, sensível e preciso (44,45). Esta técnica permite uma boa separação dos compostos fenólicos que podemos encontrar em extratos de salicórnia e, por isso, é considerada a melhor técnica para os separar, identificar e quantificar. Geralmente, nestes casos, utiliza-se uma coluna de fase reversa C18, um detetor de arranjo de díodos e solventes polares orgânicos acidificados. O intervalo de comprimentos de onda recomendado para a deteção de compostos fenólicos é entre os 220 e os 600 nm, mais especificamente os valores 280, 310, 340, 450 e 510 nm, já descritos na literatura como os mais usados para a identificação de compostos fenólicos (14,46,47).

Por outro lado, o HPLC-MS combina a separação de compostos da técnica convencional HPLC com as capacidades de deteção de um espectrómetro de massa. Uma

das principais limitações do detetor de díodos é a sua incapacidade de fornecer uma identificação evidente dos componentes de uma mistura, mesmo que se encontrem devidamente separados. A identificação baseia-se usualmente na comparação dos tempos de retenção por comparação de padrões externos. Com esta metodologia, combina-se a capacidade de separação da cromatografia líquida e a capacidade de identificação do espectrómetro de massa, conseguindo uma identificação precisa dos compostos, uma vez que os espectros de massa dos diferentes compostos são únicos – mesmo que as características de retenção sejam semelhantes (48).

Um equipamento de HPLC-MS tem na sua constituição os constituintes de um HPLC, mas, neste caso, acoplados a um espectrómetro de massa, uma vez que o detetor usado é um detetor de massa. Inicialmente, a amostra é separada por cromatografia líquida e para serem analisados no espectrómetro de massa, os compostos devem estar na fase gasosa, o que não acontece neste caso. Para tal, são vaporizados. Ao sair da coluna do cromatógrafo líquido, a amostra percorre um capilar nebulizador juntamente com um fluxo de gás azoto (N_2). O forte campo elétrico que se encontra à saída do capilar, combinado com o fluxo de N_2 , cria um fino aerossol de partículas carregadas. À medida que o solvente evapora, devido a um aquecimento que se dá num dos capilares, as iões são separados das gotículas e são direcionados para o analisador e de seguida para o detetor. No espectro de massa estará representada a relação entre a intensidade do sinal e o valor de m/z (42,43). Este método é bastante sensível e seletivo, sendo capaz de identificar os diferentes compostos presentes (14,49).

1.4.3. Análise de compostos voláteis (SPME-GC-MS)

De modo a analisar os compostos voláteis presentes na planta, recorreu-se à técnica de SPME-GC-MS, que consiste na microextração em fase sólida (SPME) dos compostos, seguida da sua separação e análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrómetro de massa (GC-MS).

SPME é uma técnica de extração e pré-concentração dos analitos que não utiliza solventes. Os analitos são absorvidos do *headspace* da amostra para uma fibra de sílica fundida, revestida com a fase estacionária, que está alojada na base de uma seringa com uma agulha metálica fixa. Essa fibra é depois inserida diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso (42).

A cromatografia gasosa (GC) é outra técnica utilizada na separação, identificação e quantificação de compostos voláteis. Esta é também uma técnica cromatográfica, assim

como o HPLC, no entanto, neste caso, a fase móvel tem de ser obrigatoriamente um gás, e a fase estacionária pode ser líquida ou sólida (43). Para ser possível a realização desta técnica, os compostos na amostra têm de ser voláteis ou semi-voláteis, sendo esta uma das principais preocupações relativamente a este método. Assim, em alguns casos, pode ser necessário mais um passo aquando da preparação da amostra, a derivatização, onde se dará a volatilização dos compostos fenólicos. Nesta etapa, utilizam-se reagentes como o cloroformato de metilo e etilo, diazometano e sulfóxido de dimetilo em combinação com o iodeto de metilo, formando éteres ou ésteres metil ou etil de fenólicos (14).

Os componentes de um cromatógrafo gasoso são o reservatório do gás, o seu regulador de fluxo, o injetor, à entrada do forno, e a coluna cromatográfica dentro deste último. Temos também o detetor e o computador, onde os dados serão analisados.

Ao ser injetada, a amostra é imediatamente vaporizada, antes sequer de chegar à coluna. Na coluna, é arrastada pela fase móvel e os seus componentes vão sendo separados em direção a um detetor, com base na razão m/z de cada um dos compostos. A fase móvel apenas transporta a amostra, não interage com os diferentes compostos (43).

Normalmente, o detetor mais comum é o de ionização de chama (FID), no entanto, a espetrometria de massa (MS) tem vindo a ser cada vez mais utilizada, pois oferece mais seletividade e sensibilidade (14).

1.4.4. Capacidade antioxidante: ORAC

O método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity* ou capacidade de absorção de radicais oxigenados) mede a capacidade antioxidante *in vitro*. Este método baseia-se na transferência de átomos de hidrogénio e nas propriedades fluorescentes da fluoresceína. Ao longo do tempo, mede a diminuição da emissão de fluorescência (50).

Ao reagir com o oxigénio atmosférico, o AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida)] gera um radical peroxilo mais estável, que oxida a fluoresceína resultando num decaimento do sinal de fluorescência emitido. Na presença de compostos antioxidantes, o radical peroxilo atrai o átomo de hidrogénio destes, evitando assim a oxidação da fluoresceína. A nossa amostra, contendo compostos antioxidantes, protege a fluoresceína. Graficamente, obtém-se uma curva com o decaimento de emissão de fluorescência da fluoresceína. Ao ser protegida pelo nosso composto antioxidante, a curva permanece estável durante mais tempo e só depois decai (*Figura 1.6*) (51).

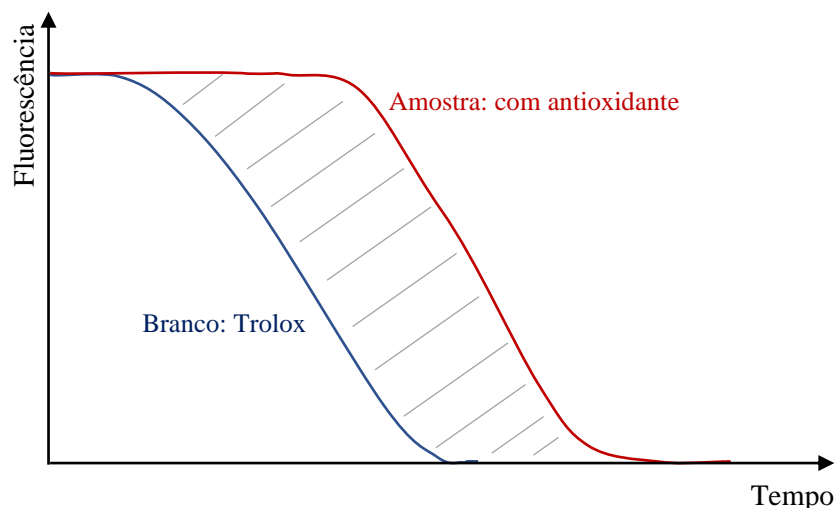


Figura 1.6 - Curva do ensaio por ORAC.

Usando como padrão o antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), de concentrações conhecidas, é possível gerar uma curva-padrão e, conseqüentemente, calcular a atividade ORAC da amostra, expressa em capacidade antioxidante equivalente de Trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato) (52).

1.5. Enquadramento do trabalho

Dada a utilização cada vez mais importante deste tipo de plantas, justifica-se um estudo mais aprofundado sobre a sua composição e possíveis benefícios para a saúde. Para aumentar este conhecimento, há necessidade de otimizar metodologias de extração e análise que permitam ter uma informação sobre a real composição destas plantas, o que pode justificar a aplicação de metodologias menos convencionais, mas que por outro lado estejam mais próximas do conceito de “Química Verde” e tenham viabilidade de aplicação a nível industrial.

As plantas halófitas fazem parte de uma área de trabalho importante no iBET, tendo sido iniciado um projeto interno que permite apoiar trabalhos realizados no âmbito de um projeto da FCT em curso (53,54).

Dito isto, os objetivos desta dissertação são caracterizar a composição da planta e otimizar diferentes métodos de extração de compostos bioativos, em particular os compostos fenólicos.

2. Parte Experimental

2.1. Equipamentos e Materiais

2.1.1. Amostras

A planta usada, *Salicornia ramosissima*, foi doada pela *RiaFresh* e entregue no verão de 2021. Assim que recebida foi liofilizada durante 24h (liofilizador *ScanVac, Coolsafe 95/55-80, LaboGene*, Dinamarca) e armazenada no exsiccador. Este processo consiste no ato de congelar materiais a uma temperatura abaixo da temperatura mais baixa atingida no processo de congelação da solução, removendo a humidade do material por sublimação. O produto é primeiramente congelado e, como tal, a água muda do estado líquido para o estado sólido. De seguida, altera-se a pressão e é fornecida energia para transformar o gelo sólido num estado gasoso, sem passar pela fase líquida. Durante este processo, a degradação dos compostos bioativos é reduzida. O processo ocorre todo sob vácuo (55,56). Comparativamente a outros, os produtos liofilizados possuem uma melhor qualidade. Esta tecnologia permite reter nutrientes e reduzir a desnaturação e a perda de sabor (55). É o método indicado para secar produtos que contenham na sua constituição compostos termicamente sensíveis e que sofrem oxidação, uma vez que este processo se dá a baixas temperaturas e sobre vácuo. Tem como desvantagens o facto de ser um processo demorado e dispendioso (57).

Para a preparação das amostras para as diferentes extracções, a planta foi ainda triturada usando uma picadora *Sammic CKE-8* e peneirada com uma peneira mecânica, *Retsch AS200*. Assim, foi feita a divisão entre as partículas de tamanho superior e inferior a 250 μm . (Figura 2.1) O tamanho de partícula usado está especificado em cada método.

Para a pesagem das amostras utilizou-se sempre uma balança analítica (KERN 770).



Figura 2.1 - Planta *Salicornia* liofilizada e triturada, dividida entre as partículas de tamanho superior e inferior a 250 μm .

2.1.2. Reagentes e Solventes

O metanol (MeOH, $\geq 99.8\%$), o hidróxido de sódio (NaOH) e a acetona (C₃H₆O) foram adquiridos na Thermo Fisher. O trifluoreto de boro (BF₃), o reagente de Folin Ciocalteu, o PBS (solução tampão de fosfato salino), a fluoresceína (C₂₀H₁₂O₅), o AAPH (C₈H₁₈N₆·2HCl) e o Trolox (C₁₄H₁₈O₄) foram obtidos através da Sigma-Aldrich. O etanol absoluto (EtOH, p.a.), o hexano (C₆H₁₄) e o tolueno (C₇H₈) foram comprados através da Carlo Erba. O clorofórmio (CHCl₃) adquiriu-se na Biochem Chemopharma, o isooctano (C₈H₁₈) na Riedel-de-Haën, o BHT (C₁₅H₂₄O) na BDH, o carbonato de sódio (Na₂CO₃) na Merck e o ácido fórmico (CH₂O₂, 99-100%) na VWR Chemicals.

2.2. Caraterização da amostra

2.2.1. Identificação de compostos voláteis

A identificação de compostos voláteis foi realizada com base no procedimento descrito por Oliveira-Alves et al. (53).

Uma vez que a planta se encontrava liofilizada, foi possível analisar diretamente e, como tal, pesou-se aproximadamente 0.5 g da amostra (partículas > 250 μ m) diretamente para o *vial* de GC-MS. O *vial* usado foi de *headspace* de 20 mL (La-Pha-Pack®, Langerwehe, Alemanha) coberto com um septo de silicone PTFE branco (Specanalitica, Carcavelos, Portugal). As condições de microextração de fase sólida (SPME) consistiram numa temperatura de extração de 40°C durante 40 minutos, a uma velocidade de rotação de 250 rpm, uma agitação de 10 s e tempo de dessorção de 3 min a 250°C. Foi utilizada uma fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/Car/PDMS) (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, EUA). As análises foram elaboradas num GCMS QP2010 Plus (Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com amostrador automático AOC-5000 Shimadzu. Para a separação dos compostos voláteis foi usada uma coluna capilar *Sapiens-5-MS* (Teknokroma, Barcelona, Espanha), com dimensões de 30 m, 0.25 mm e 0.25 μ m. O injetor e o detetor encontravam-se à temperatura de 250°C. O modo de injeção usado foi *splitless* durante um minuto e meio. O gás de arraste usado foi hélio de alta pureza ($\geq 99.999\%$) a um fluxo de 2.00 mL/min. A temperatura do forno da coluna foi mantida a uma temperatura inicial de 40°C por 5 minutos, aumentando até aos 170°C a uma velocidade de 5°C por minuto e, de seguida, até aos 230°C a uma velocidade de 30°C por minuto. Manteve-se nesta temperatura durante cerca de 4 minutos. O espetrómetro de massa, assim como a fonte de iões, encontravam-se a uma temperatura de 250°C. Os espetros de massa foram adquiridos no modo de eletroionização (EI), a 70 eV numa escala

de m/z entre 29-300, com uma velocidade de *scan* de 588 scans por segundo. A identificação dos compostos foi possível devido à utilização de bibliotecas de espectros de massa – WILEY229, NIST147, W12N20_REP, W12N20_MAIN_4 e W12N20_MAIN_3. A área relativa de cada composto foi calculada em relação ao somatório das áreas dos picos individuais identificados.

2.2.2. Extração lípidos e ácidos gordos

A extração de lípidos foi realizada com base no método Bligh & Dyer (58), no entanto com ligeiras modificações. Este é considerado um dos métodos mais usado para a extração de conteúdo lipídico (59). Esta extração realizou-se duas vezes, a primeira usando as partículas > 250 μm da amostra, e a segunda usando a planta moída, partículas < 250 μm , de modo a ser possível comparar o rendimento da extração usando a matriz de duas maneiras diferentes.



Figura 2.2 - Extração lipídica através do método Bligh & Dyer.

Adicionaram-se 10 mL de clorofórmio e 6 mL de metanol a cerca 200 mg da amostra. Agitou-se em vortex (WiseMix VM-10, Wertheim, Alemanha), por aproximadamente 15 segundos. Incubou-se a solução em gelo durante 3 horas. De seguida, centrifugou-se por 5 minutos. Separou-se o sobrenadante da matéria depositada e repetiu-se o procedimento para esses resíduos, de modo a melhorar a eficiência de extração. A última extração foi incubada durante a noite (~15 horas). Juntaram-se os sobrenadantes. Adicionou-se 4 mL de água com o sobrenadante, agitou-se no vortex e levou-se à centrífuga por 5 min. Agitou-se no vortex e transferiu-se para uma ampola de decantação, onde se deu a separação entre as fases aquosa (metanol e água) e orgânica (clorofórmio). O metanol tem mais afinidade com a água, tendo tendência para permanecer na fase aquosa. (Figura 2.2) Recuperou-se a fase inferior – clorofórmio

contendo lípidos – e evaporou-se este no rotavapor (Buchi R-210, Suíça). De modo a proteger o nosso composto durante o armazenamento, secou-se ainda sob corrente de azoto. (*Figura 2.3*)



Figura 2.3 - Extrato lipídico seco.

Os extratos lipídicos foram armazenados a -20°C até se dar o processo de derivatização.

O processo de derivatização de lípidos usado encontra-se já implementado no laboratório NBNPT. Consiste na adição de um padrão interno, o ácido gordo livre C17, à amostra. Seguiram-se os passos de saponificação (*Figura 2.4a*) e metilação (*Figura 2.4b*), nos quais se adicionou 1 mL de NaOH (metanólico, 0.5 M) e 1 mL de BF_3 (metanólico, 14%), respetivamente. Depois de cada adição deixou-se a amostra em banho-maria a 60°C , durante 30 minutos. Por último, adicionou-se 1 mL da solução de isooctano contendo BHT ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) e levou-se ao vortex por cerca de 2 minutos. O BHT é utilizado para garantir a estabilidade da amostra ao longo da reação, nomeadamente a oxidação dos ácidos gordos. Foi então possível observar uma separação de fases, sendo recolhidos para análise $500\ \mu\text{L}$ da fase superior. (*Figura 2.4c*) Os extratos derivatizados foram armazenados, protegidos da luz, até ser possível realizar a sua análise.

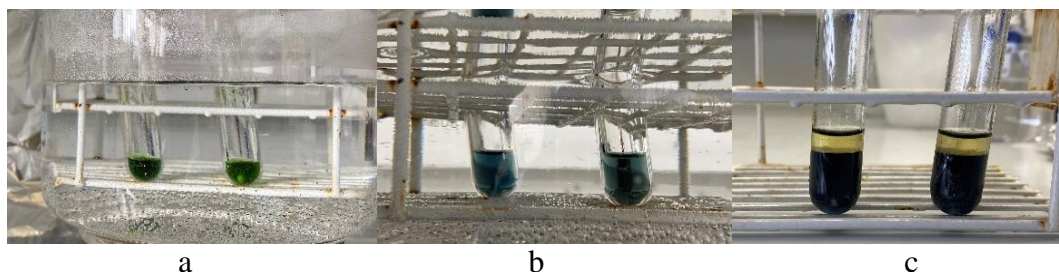


Figura 2.4 - Processo de derivatização dos lípidos extraídos. (a– saponificação; b– metilação; c– separação de fases.)

As análises GC-FID foram efetuadas utilizando um cromatógrafo gasoso *TermoQuest Trace GC 2000* (INSTRUMENTOS CE, Ltd.) acoplado a um detector de ionização de chama (FID). Para separar os componentes da amostra utilizou-se uma coluna capilar J&W DB-23 (Agilent Technologies, Inc.), 60m × id.0.25mm e 0.25µm de espessura da fase. O programa de temperatura do forno começou a 150°C e aumentou até 220°C, a uma velocidade de 5°C/min. A temperatura manteve-se a 220°C durante 60 minutos. A temperatura do injetor foi de 220°C e a do detector foi de 280°C. O hélio foi utilizado como gás portador, a uma pressão constante de 70 KPa. Injetaram-se 2µL de amostra no modo *split*. Os ésteres de metilo de ácidos gordos (FAMES) foram identificados por comparação dos tempos relativos de retenção obtidos nas amostras com os obtidos numa mistura padrão de 52 FAMES (Nuchek, USA). A análise foi feita em duplicados, para cada tipo de amostra.

A concentração de cada um dos ácidos gordos foi calculada de acordo com a *Equação 1*. Esta relaciona o valor da área de cada um dos ácidos com o conteúdo total de ácidos gordos na amostra (60).

Equação 1 - Cálculo do teor de ácidos gordos.

$$\mu\text{g AG}/\text{mg lípidos} = \frac{\text{Área AG}}{\text{Área padrão interno}} \times \frac{x \mu\text{g padrão interno}}{y \text{mg lípidos}}$$

2.2.3. Extração de pigmentos

O procedimento usado para a extração de pigmentos foi elaborado com base num procedimento descrito por Antunes et al. (61) para a extração de carotenoides.

Homogeneizou-se cerca de 1 g de amostra (partículas > 250 µm) com 20 mL de acetona:etanol (1:1), contendo 200 mg/L de BHT. Filtrou-se e lavou-se, de seguida, com 2x10 mL do solvente supramencionado. Transferiu-se o líquido filtrado - extrato - para uma ampola de decantação. Adicionou-se 10 mL de hexano e agitou-se vigorosamente. Depois de 15 minutos, adicionou-se 10 mL de água milliQ, agitou-se novamente e, em 30 minutos, deu-se a separação entre as fases aquosa, constituída pela acetona, o etanol e a água, e a orgânica – hexano. Esta separação dá-se devido à polaridade dos solventes, uma vez que o hexano é uma molécula apolar e os restantes são moléculas polares e, como tal, miscíveis entre si. Recuperou-se a fase superior – hexano contendo os carotenoides – e evaporou-se o restante solvente no rotavapor. (*Figura 2.5*) A extração foi realizada em duplicados.



Figura 2.5 - Extrato de carotenoides obtido pré e pós evaporação de solvente.

Os carotenoides foram quantificados utilizando um Thermo Dionex UltiMate (Thermo Fisher Scientific, EUA), equipado com um amostrador automático, bomba e detetor de arranjo de díodos (DAD) (Thermo Dionex DAD-300). A coluna usada foi uma Vydac C18 TP54, 250x4.6 mm, 5 μ m (Avantor® Hichrom, Reino Unido). O detetor estava programado para analisar os comprimentos de onda no intervalo entre 190 e 680 nm, monitorizando apenas os de interesse à análise de carotenoides em específico, 450 e 600 nm. A temperatura do amostrador automático era de 10°C, enquanto a da coluna se manteve nos 25°C. O volume de injeção foi de 20 μ L. O eluente utilizado foi o metanol 100%. O fluxo foi de 1.00 mL/min., durante os 40 minutos de tempo total de corrida. A identificação foi feita com base nos tempos de retenção de cada composto. Esta foi confirmada com a comparação dos comprimentos de onda máximos de absorção. (Tabela 2.1)

Tabela 2.1 - Valores dos picos de absorção máxima dos padrões de carotenoides, a 450 nm.

Padrões	t _r (min.)	Máx. de absorção a 450 nm
Luteína	5.15	268; 444; 472
Zeaxantina	5.74	276; 450; 476
β -caroteno	11.17	275; 450; 476

Para quantificar os carotenoides, utilizaram-se padrões de luteína e zeaxantina, a uma concentração de 20 mg/L e β -caroteno, a 6.25 mg/L, uma vez que eram os únicos padrões de carotenoides disponíveis. Foram feitas retas de calibração para cada um dos padrões usados, relacionando a área de cada pico com a concentração, de modo a quantificar cada um destes no extrato. (Equação 2, Equação 3)

Equação 2 - Reta de calibração para o padrão de luteína.

$$y = 5.2384x + 2.6442 (R^2=0.9969).$$

Equação 3 - Reta de calibração para o padrão de β -caroteno.

$$y = 11.603x - 0.8186 (R^2=0.9997)$$

Segundo pesquisa bibliográfica, estes serão os carotenoides maioritariamente presentes na salicórnia (61–64).

Analisou-se também a presença de clorofilas no extrato. O equipamento usado para identificar e quantificar as clorofilas é o mesmo que o usado para quantificar carotenoides, no entanto a coluna usada foi Waters® RP-18, 150 x 3.9 mm, 4 μ m (Waters, Irlanda), a uma temperatura de 30°C. O detetor estava também programado para analisar os comprimentos de onda entre 190 e 680 nm, mas, neste caso, os comprimentos de onda de interesse são 410 e 440 nm, como supramencionado. A temperatura do amostrador automático e o volume de injeção são idênticos aos anteriores. A fase móvel consistia no eluente A, no eluente B e no eluente C, a uma taxa de fluxo de 0.70 mL/min. O primeiro constituído por metanol:acetato de amónia 0.5M (80:20), o segundo em acetonitrilo:água (90:10) e o terceiro em acetato de etilo. O programa de gradiente usado foi: 0-3 min., 100% A; 3-14 min., 100% B; 14-16 min., 50% B e 50% C; 16-22.5min., 50% A e 50% C; 22.5-30 min., 20% A, 80% C; 30-32 min., 100% C; 32-33 min., 80% A e 20% C; 32-33 min., 100% A. O tempo total de corrida foi de 45 minutos. Para a identificação das clorofilas utilizou-se uma mistura de padrões com a clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *c2*. A identificação foi feita com base nos seus tempos de retenção, sendo sempre confirmada através dos valores de comprimento de onda máximos de absorção. (Tabela 2.2)

Tabela 2.2 - Valores de máximos de absorção a 410 nm dos padrões clorofila *a* e clorofila *b*.

Padrões	t_r (min.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Clorofila <i>a</i>	15.32	413; 430; 665
Clorofila <i>b</i>	14.09	457; 645
Clorofila <i>c2</i>	4.88	446

As equações das retas de calibração efetuadas para cada um dos padrões de clorofilas (Equação 4, Equação 5), foram usadas para a quantificação destes compostos no extrato.

Equação 4 - Equação da reta de calibração para o padrão de clorofila *a*.

$$y = 7.278x - 0.101 (R^2=0.9997)$$

Equação 5 - Equação da reta de calibração para o padrão de clorofila *b*.

$$y = 11.103x + 0.075 (R^2=0.994)$$

2.2.4. Extração Soxhlet

A extração de polifenóis foi efetuada usando uma extração convencional sólido-líquido, com base nos procedimentos descritos em Dinakaran et al. (65).

Adicionaram-se cerca de 10 g de amostra (partículas < 250 µm) num cartucho a 300 mL da mistura de solventes (água:etanol, 50:50 v/v), e deu-se início à extração, que durou cerca de 3 horas. (Figura 2.6) O extrato obtido foi filtrado com o auxílio de um funil de Büchner, seguindo para o evaporador rotativo de maneira a ser possível obter um extrato seco. O resíduo obtido foi armazenado até ser analisado. A extração foi realizada em triplicado.

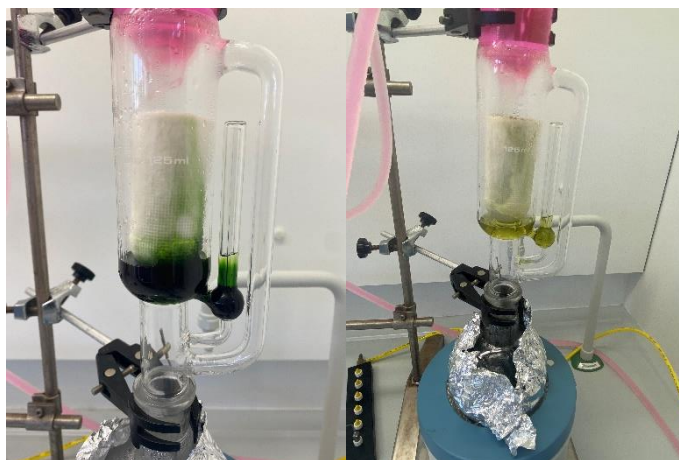


Figura 2.6 - Extração Soxhlet da planta salicornia.

2.3. Extrações alternativas de compostos bioativos

2.3.1. Extração por Fluidos Supercríticos (SFE)

Depois de elaborada uma pesquisa bibliográfica relativamente à extração de compostos fenólicos da salicornia, e de outras plantas halófitas, utilizando CO₂ como fluido supercrítico, foi possível selecionar condições experimentais para a extração referida. Assim, com base na literatura (33,66–73), realizaram-se extrações com e sem co-solvente, a uma temperatura de 60°C e uma pressão de 150 bar. O fluxo de CO₂ foi 5 g/min. durante cerca de 2 horas, enquanto se recolheram frações de 20 em 20 minutos

para se complementar a análise. Nos ensaios em que foi utilizado etanol como co-solvente o fluxo total foi 10 g/min., sendo que 40% deste correspondia ao co-solvente. Uma vez que o rendimento da extração sem co-solvente foi muito pequeno, havendo uma elevada perda de amostra, apenas se realizou um ensaio desta extração.

Os extratos obtidos foram concentrados no evaporador rotativo e, de seguida, analisados por HPLC-DAD para a deteção de carotenoides e clorofilas, com o mesmo método de análise descrito previamente.

2.3.2. Extração Assistida por Ultrassons

A extração dos compostos fenólicos foi efetuada usando uma extração por ultrassons, com base num procedimento feito por Oliveira-Alves et al. (53).

Pesou-se cerca de 2 gramas de amostra (partículas < 250 µm) e adicionou-se a 100 mL de uma solução etanol:água (80:20 v/v). Levou-se ao vortex durante cerca de 10 segundos e depois foi imediatamente transferida para o banho de ultrassons a 40 kHz e 220 W durante 60 minutos, a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. (ArgoLab DU-32, Itália) De seguida, a amostra foi centrifugada a 4500 rpm durante cerca de 15 minutos e o sobrenadante foi removido. (Gyrozen 1580R, Gimpo, Coreia) Este foi evaporado num evaporador rotativo, sob pressão baixa. O resíduo obtido foi armazenado até ser analisado. As extrações foram realizadas em duplicado.

2.3.3. Extração Assistida por Microondas

Através de diferentes estudos publicados, quer para a salicornia (10), quer para outras halófitas (16,32,74–88), selecionaram-se alguns valores experimentais para a temperatura (70-90°C), o tempo de extração (5-10 minutos) e a percentagem de etanol (0-100%).

Realizaram-se quatro extrações, duas à temperatura de 70°C, durante 5 e 10 minutos, e duas à temperatura de 90°C, também com os mesmos tempos de extração. Todas as extrações foram realizadas com 100% água. Tendo em conta os valores de TPC obtidos com estas extrações, efetuou-se um desenho de experiências com valores de temperatura a variar entre os 80°C e os 120°C, tempos de extração a variar entre os 5 e 20 minutos e a percentagem de etanol entre os 0 e os 100%. Para cada extração pesou-se cerca de 0.3 g de amostra (partículas < 250 µm) e dissolveu-se em 10 mL de água, água:etanol (50:50 v/v) ou etanol, consoante as condições da experiência. Colocou-se a mistura no microondas (CEM Discover SP-D), com agitação a nível médio, uma pressão de 493 e uma energia de 300W. De seguida, o extrato foi filtrado com o auxílio de um

funil de Büchner e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. O resíduo obtido foi armazenado a 4°C até ser analisado. Previamente à sua análise pelo método de Folin-Ciocalteu foi ainda dissolvido numa solução de água:etanol (50:50 v/v) e filtrado através de uma membrana 0.22 mm PDVF.

Depois de obtidos os resultados, e de selecionadas as condições da extração, elaborou-se um Desenho de Experiências (DOE) com o auxílio do programa MODDE, que facultou os diferentes parâmetros para cada uma das extrações.

2.4. Métodos de análise

2.4.1. Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A TLC foi realizada numa placa 4x10 cm revestida com camadas de 0.2 mm de gel de sílica contendo indicadores de fluorescência UV 254 nm (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Dissolveu-se uma pequena quantidade do extrato obtido pela técnica de Soxhlet em 200 µL de metanol. Aplicou-se uma pequena gota de cada extrato, a 1 cm umas das outras, a 1 cm da borda inferior da placa, e colocou-se a placa na câmara. Esta tinha já no seu interior uma mistura de eluentes de tolueno:acetona:ác.fórmico (9:9:2) há cerca de 30 minutos, para que o seu vapor preenchesse toda a câmara. Manteve-se a placa no seu interior durante 30 minutos. Depois de removida e de secar totalmente à temperatura ambiente (25°C), colocou-se debaixo de uma luz UV (65). Para calcular o fator de retenção (R_f) foi utilizada a *Equação 6*.

Equação 6 - Equação usada para o cálculo do fator de retenção (R_f).

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

2.4.2. Análise do Conteúdo Fenólico Total (TPC)

O conteúdo fenólico total dos extratos foi determinado seguindo o método Folin-Ciocalteu (53,89). Adicionou-se 237 µL de água destilada, 3 µL do analito dissolvido em uma mistura de água:etanol (50:50 v/v), 15 µL de reagente Folin Ciocalteu e 45 µL de uma solução saturada de Na₂CO₃ a uma microplaca de 96 poços e agitou-se, à temperatura ambiente, durante 2 minutos (Labnet Orbit 300). Esta foi de seguida incubada durante 30 minutos, a cerca de 40°C e mediu-se a absorvância a 765 nm, num espectrofotómetro de microplacas (BioTek, Epoch 2) com o *software* de análise de dados Gen5 3.02. Utilizou-se uma solução de ácido gálico (1000 mg/L) para preparar a curva de calibração e, como

tal, os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálico por g de extrato (mg GAE/g extrato).

2.4.3. Análise da Capacidade Antioxidante (ORAC)

Para analisar os extratos obtidos relativamente à sua capacidade antioxidante, realizou-se o método ORAC (51,53,90). Prepararam-se soluções a partir dos extratos, adicionando o solvente PBS (solução tampão fosfato-salino, pH 7.4) – solvente usado como branco nesta técnica – e, como tal, obtiveram-se soluções de diferentes concentrações.

Este método consiste na adição de 25 μ L da solução de extrato preparada a 150 μ L de solução de fluoresceína, numa microplaca de 96 poços. Esta é de seguida inserida num fluorímetro (FL800 Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) e incubada durante 10 min., a 37°C. Depois destes 10 minutos são adicionados automaticamente 25 μ L da solução de AAPH previamente preparada e armazenada em gelo. A leitura realiza-se durante 40 minutos, sendo o *software* usado para a análise dos dados o BioTEK Gen 5. Utilizou-se uma solução de Trolox (5000 μ M) para preparar a curva de calibração e, deste modo, os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente Trolox por g de extrato (μ mol TEAC/g extrato).

2.4.4. Identificação e quantificação composição fenólica (HPLC-DAD e HPLC-DAD-ESI-MS)

Para caracterizar a composição fenólica presente nos extratos estes foram analisados por HPLC-DAD e HPLC-DAD-ESI-MS.

Os compostos fenólicos foram detetados e quantificados utilizando um UHPLC Vanquish (Thermo Fisher Scientific, EUA), equipado com um amostrador automático, bomba e detetor de arranjo de díodos (DAD) (Thermo Dionex DAD-300). A coluna usada na separação cromatográfica foi uma Luna C18 de fase reversa (Luna 5 μ m C18(2) 100 Å, 250 x 4 mm; Phenomenex) e a pré-coluna uma Manu-cart RP-18, a 35°C. O detetor estava programado para analisar entre os comprimentos de onda entre 190 e 680 nm. A deteção foi monitorizada usando quatro canais individuais, 280, 320, 360 e 520 nm. Foram selecionados estes valores de comprimento de onda pois encontram-se já descritos na literatura como sendo os comprimentos de onda mais utilizados para identificar este tipo de compostos (46,47). A temperatura do amostrador automático foi fixada em 12°C e o volume de injeção foi 20 μ L. A fase móvel consistia no eluente A e no eluente B, a

uma taxa de fluxo de 0.30 mL/min. O primeiro constituído por água:ácido fórmico (99.5%:0.5%) e o segundo em acetonitrilo (100%). O programa de gradiente usado foi: 0-10 min., 95% A; 10-30 min. de 95 a 82% A; 30-44 min. de 82 a 64% A; 44-64 min. a 64% A; 64-90 min. de 64 a 10% A; 90-100 min. a 10% A; 100-101 min. de 10 a 95% A; 101-120 min., retornou-se às condições iniciais. Para identificar e quantificar os compostos fenólicos utilizou-se uma mistura de padrões de compostos fenólicos (mistura A) e respectivas retas de calibração. (*Anexo 6.2*) O sistema de aquisição de dados foi o Chromeleon versão 7.0 (Waltham, MA, EUA) para DAD.

Para confirmar a identificação realizada analisaram-se os extratos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. O cromatógrafo usado foi sistema HPLC Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um desgaseificador de solventes, um amostrador automático e um forno de coluna, acoplados a um detetor de arranjo de díodos (DAD) – detetor Waters 2996 (Waters, Milford, MA, EUA). Na separação dos compostos foi usada uma pré-coluna 100RP-18.5 mm e uma coluna C18 de fase reversa (LiCrospher 100RP-18.250 x 4 mm; 5 mm) num forno termostático a 35°C. A fase móvel consistia num eluente A constituído por água e ácido fórmico (99.5%:0.5%) e num eluente B – acetonitrilo:ácido fórmico (99.5%:0.5%). O fluxo usado foi 0.30 mL/min.. Os solventes foram filtrados através de uma membrana 0.22 mm PVDF (Millipore, Billerica, MA, EUA) previamente à análise. O programa de eluição foi o seguinte: 0-10 min., 99%-95% A; 10-30 min., 95-82% A; 30-44 min., 82-64% A; 44-64 min., 64% A; 64-90 min., 64-10% A; 90-100, 10% A; 100-101 min., 10-95% A; 101-120 min., 95% A; retorno às condições iniciais, ou seja, 99% A. O volume de injeção usado foi 20 µL. O detetor estava programado para o intervalo de comprimentos de onda entre 200-650 nm. Na deteção de espectrometria de massa tandem usou-se uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), a 120°C. Aplicou-se uma voltagem capilar de 2.5 kV e uma voltagem de cone de 30V. Os compostos foram ionizados no modo negativo e positivo, sendo o gás de colisão usado o argon de elevada pureza (Ar). O nitrogénio de elevada pureza (N₂) foi usado como gás de secagem e gás nebulizador. Para obter, tratar e processar os resultados utilizou-se o *software* MassLynx (versão 4.1 Waters Corporation, Milford, EUA). A identificação dos compostos foi feita com base na comparação entre os tempos de retenção do extrato e os tempos de retenção dos compostos nas misturas de padrões B e C. Os compostos presentes em cada uma das misturas estão descritos no *Anexo 6.3* e no *Anexo 6.4*. Esta identificação foi confirmada através dos espetros de massa de cada composto.

3. Apresentação e Discussão dos resultados

3.1. Caracterização da amostra

A amostra foi caracterizada efetuando-se uma identificação dos compostos voláteis, quantificação do conteúdo lipídico nomeadamente ácidos gordos, identificação e quantificação de pigmentos e compostos fenólicos.

3.1.1. Identificação de compostos voláteis

O perfil de compostos voláteis foi analisado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. (*Figura 3.1*) Recolheram-se dados como o tempo de retenção (t_r), a área dos picos e a percentagem de área do pico relativamente aos restantes picos presentes no cromatograma. Os picos foram identificados de acordo com bibliotecas existentes, encontrando-se atribuídos na tabela situada nos anexos (*Anexo 6.1*). Esta é apenas uma possível identificação uma vez que para se ter a identificação exata é necessária a comparação com o padrão de todos os compostos detetados, o que não foi possível.

Dentro dos picos com maior relevância encontram-se o mentol (pico 30; 9.55%), o fenchone (pico 19; 6.28%) e a cânfora (pico 25; 2.90%), terpenos bastante comuns em matrizes naturais. Estão também presentes outros como o limoneno (pico 12; 0.31%), borneol (pico 29; 0.11%) e verbena (pico 32; 0.38%). A presença destes compostos químicos é bastante importante pois possibilita a identificação de diferentes aromas nas plantas. Estes resultados estão de acordo com os previamente descritos na literatura. (53,91)

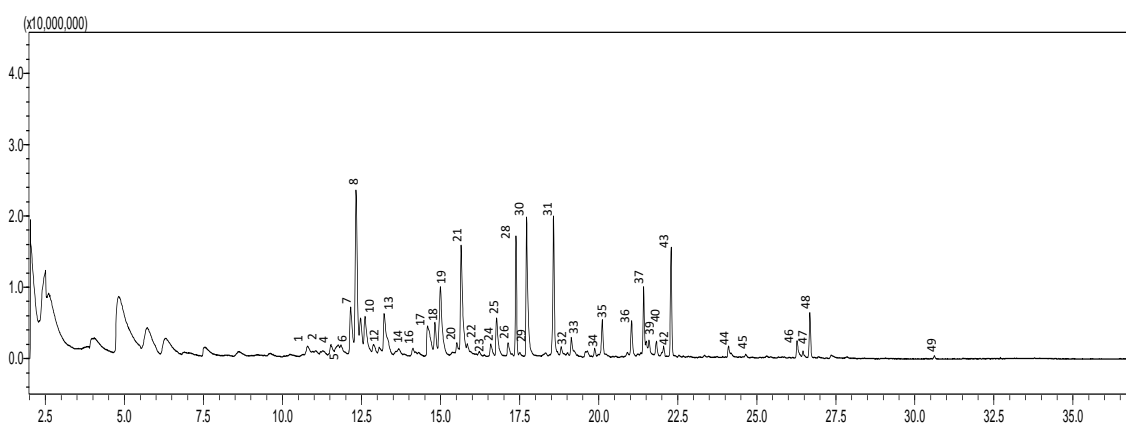


Figura 3.1 - Cromatograma obtido por SPME-GC-MS de uma amostra de Salicórnia.

Tem também de se fazer referência à presença de álcoois e alcanos, em particular o 3,4-dimetilciclohexanol (pico 21; 8.17%) e o tridecano (pico 31; 8.13%), respetivamente.

Foram identificados compostos de variadas classes químicas, sendo as mais relevantes os alcanos, alcenos, álcoois e terpenos e as menos relevantes os furanos, aldeídos e hidrocarbonetos. A *Figura 3.2* resume todas as classes de compostos presentes na amostra.

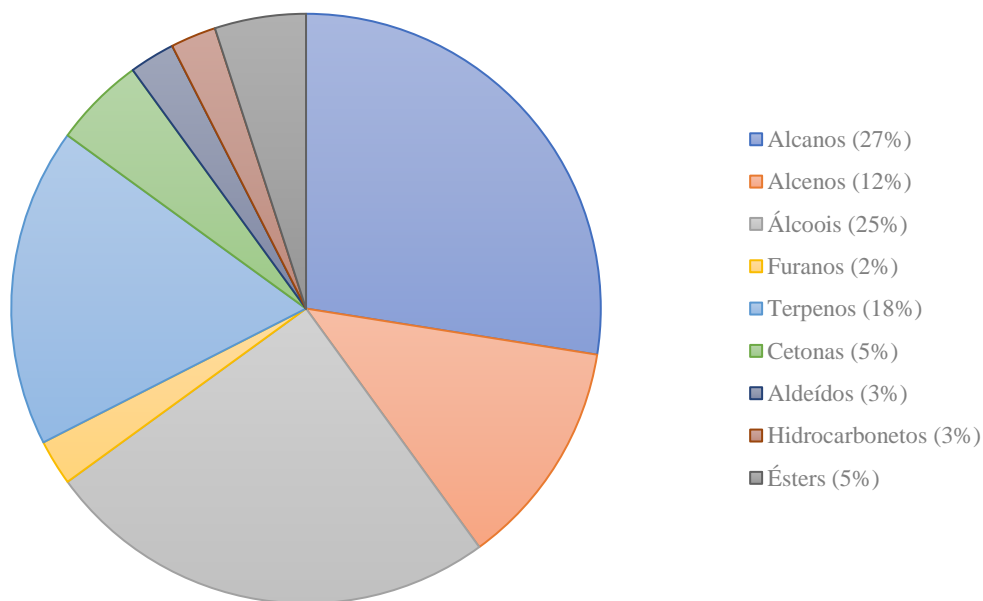


Figura 3.2 - Categorias de compostos encontrados na amostra.

3.1.2. Extração lipídica e quantificação de ácidos gordos

Para a extração de lípidos utilizou-se o método Bligh & Dyer e obteve-se um rendimento médio de 3.88 ± 0.64 %, para a amostra com um tamanho de partículas superior a $250 \mu\text{m}$, e 8.42 ± 1.39 % para a amostra com partículas de tamanho inferior a $250 \mu\text{m}$. (*Tabela 3.1*) O rendimento mássico é superior para partículas mais pequenas uma vez que a área de superfície é maior e, existindo mais contacto com o solvente dá-se uma maior transferência de massa.

Tabela 3.1 - Valores de rendimento de extração.

	Rendimento (%)
Amostra com partículas de tamanho $> 250 \mu\text{m}$	3.88 ± 0.64
Amostra com partículas de tamanho $< 250 \mu\text{m}$	8.42 ± 1.39

Depois de efetuada a extração dos lípidos e de estes serem derivatizados, foi possível analisar o perfil de ácidos gordos da amostra. Para tal, realizou-se uma análise por GC-FID, obtendo-se os seguintes cromatogramas. (Figura 3.3(a e b))

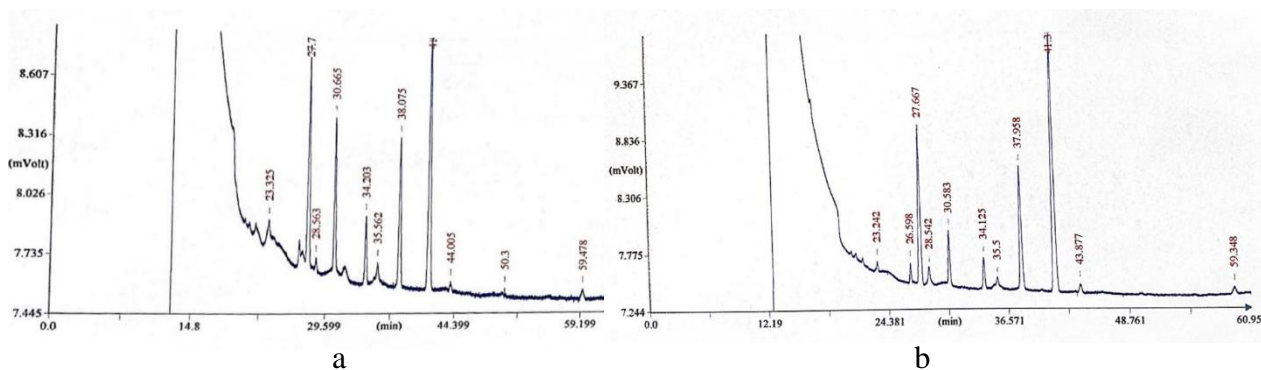


Figura 3.3 - Cromatograma de GC-FID para a identificação de ácidos gordos na amostra com partículas superiores a 250 μm (a) e para a amostra com partículas de tamanho inferior a 250 μm (b).

O padrão interno usado no processo de derivatização foi o ácido margárico (C17) e, como tal, é possível observá-lo no cromatograma acima com os tempos de retenção de 30.67 na *Figura 3.3a* e 30.58 minutos na *Figura 3.3b*. Os restantes picos foram também atribuídos, por comparação dos tempos de retenção de uma mistura de FAMES standard analisada nas mesmas condições, e encontram-se descritos na Tabela 3.2. Para uma melhor análise dos dados, foi também calculada a % de área de cada pico, em relação aos restantes picos no cromatograma.

Os ácidos gordos são classificados como saturados ou insaturados, tendo em conta a presença ou não de ligações duplas entre átomos de carbono. Os que não possuem ligações duplas denominam-se ácidos gordos saturados (SFA). Os que possuem apenas uma ligação dupla são ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e os que possuem várias são os polinsaturados (PUFA) (92). Neste caso, é possível observar na *Tabela 3.2* que o conteúdo de ácidos gordos presente na salicornia se resume em 52.02% de ácidos gordos polinsaturados, 45.52% de ácidos gordos saturados e 2.46% de ácidos gordos monoinsaturados. Detetaram-se ácidos gordos com variados comprimentos de cadeias, entre os 14 e os 22 átomos de carbono (C14-C22). Os ácidos gordos maioritariamente presentes na salicórnica são o ácido alfa-linoleico (C18:3, 34%), o ácido linoleico (C18:2, 17%) e o ácido palmítico (C16, 21%). Todos estes dados encontram-se de acordo com os descritos anteriormente, na literatura (53,93–95).

Usualmente, as plantas halófitas possuem uma maior concentração de ácidos gordos saturados comparativamente aos insaturados, no entanto, esta condição varia consoante a espécie da planta, a altura do ano em que é colhida e a parte da planta analisada. Segundo alguns estudos, a presença de MUFAs é mais abundante nas sementes da planta do que nos restantes órgãos, como as folhas, o que justifica a baixa percentagem destes comparativamente aos ácidos gordos polinsaturados (93).

A presença de SFA contribui para o elevado risco de doença cardíaca coronária, enquanto os MUFAs e os PUFAs reduzem este risco. Por sua vez, os ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 possuem propriedades anti-inflamatórias, anti-bacteriais, antioxidantes – uma vez que reduzem o stress oxidativo – e hepatoprotetivas.

Neste caso, os ácidos mais presentes na planta em questão, ácido alfa-linoleico (C18:3), o ácido linoleico (C18:2), são considerados ácidos ómega-3 e ómega-6, respetivamente, possuindo portanto estas propriedades. São usualmente encontrados em plantas, e são designados PUFAs essenciais, uma vez que o ser humano apenas os pode obter através da alimentação, pois é incapaz de os sintetizar. Além das propriedades acima descritas, o ácido linoleico é também conhecido por possuir capacidade antifúngica e por inibir a progressão carcinogénica e de aterosclerose (29,93,96).

Foi também identificado, na análise à amostra com partículas de tamanho superior a 250 μm , um dos ácidos gordos menos comuns, o ácido eicosadienoico (C20:2), numa concentração relativamente baixa – 1.62 μg AG/mg lípidos (96).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), para uma dieta ser considerada equilibrada, a razão entre o valor de PUFAs e SFAs deve ser superior a 0.4, da mesma maneira que a razão entre os ácidos ómega-6 e os ácidos ómega-3 deve ser inferior a 4 (96). Através dos cálculos realizados pode concluir-se que a salicornia se encontra de acordo com as orientações da OMS e da FAO, uma vez que PUFAs/SFAs para a amostra com partículas de tamanho superior a 250 μm é 1.14 e para a amostra com partículas de tamanho inferior a 250 μm é 1.80 e ω -6/ ω -3 é 0.52 e 0.44 para a amostra com partículas de tamanho superior a 250 μm e com partículas de tamanho inferior a 250 μm , respetivamente.

Devido à presença de todos estes ácidos gordos, das suas propriedades conhecidas e as razões calculadas entre PUFAs/SFAs e ω -6/ ω -3, a *Salicornia* pode ser considerada uma planta bastante promissora como alimento funcional ou suplemento alimentar, sendo benéfica a sua incorporação na dieta humana (95,96).

Tabela 3.2 - Valores de concentração e % de área para cada um dos ácidos gordos presentes em ambas as amostras, com tamanho superior e inferior a 250 µm.

Nome do composto	Amostra com partículas de tamanho superior a 250 µm			Amostra com partículas de tamanho inferior a 250 µm		
	t _r (min.)	Concentração (µg AG/mg lípidos)	% Área (% Área total de FAMES)	t _r (min.)	Concentração (µg AG/mg lípidos)	% Área (% Área total de FAMES)
Ácido mirístico (C14)	23.33	4.50	1.96	23.24	3.24	0.61
Ácido palmítico (C16)	27.72	48.02	20.93	27.67	111.86	21.17
Ácido margárico (C17)	30.67	31.25	13.62	30.58	27.78	5.26
Ácido esteárico (C18)	34.20	14.79	6.45	34.13	21.39	4.05
Ácido araquídico (C20)	44.01	2.37	1.03	43.88	3.22	0.61
Ácido beénico (C22)	59.48	3.50	1.53	59.35	7.38	1.40
Σ SFA	XXXX	104.42	45.52	XXXX	174.86	33.01
Ácido palmitoleico (C16:1)	28.56	2.19	0.95	28.54	15.59	2.95
Ácido oleico (C18:1)	35.56	3.46	1.51	35.50	15.08	2.86
Σ MUFA	XXXX	5.65	2.46	XXXX	30.67	5.81
Ácido linoleico (C18:2)	38.08	39.33	17.14	37.96	95.63	18.10
Ácido alfa-linoleico (C18:3)	41.50	78.41	34.18	41.38	219.47	41.54
Ácido eicosadienoico (C20:2)	50.30	1.62	0.71	—	—	—
Σ PUFA	XXXX	119.35	52.02	XXXX	315.10	59.65
Σ PUFA/Σ SFA	XXXX		1.14	XXXX		1.80
ω-6/ω-3	XXXX		0.52	XXXX		0.44

3.1.3. Determinação e quantificação de pigmentos

Para extrair os pigmentos da salicórnia efetuou-se uma extração por solventes, já realizada anteriormente em Antunes et al. (61), para a extração de carotenoides da salicórnia e obteve-se um rendimento de $1.99 \pm 0.47\%$. (Tabela 3.3)

Para identificar e quantificar os extratos obtidos foram sujeitos a uma análise por HPLC, com detetor de DAD, a um comprimento de onda de 450 nm. Para a identificação dos carotenoides na amostra, comparou-se o cromatograma obtido com um cromatograma de uma mistura de padrões de luteína e zeaxantina e também com o padrão de β -caroteno. (Figura 3.4) Assim, concluiu-se que na salicórnia apenas se encontra presente a luteína e o β -caroteno, pois são os únicos padrões que têm correspondência com picos da amostra (pico 1: $t_r \sim 4.5$ min. e pico 2: $t_r \sim 11$ min., respetivamente). Para confirmar esta identificação, uma vez que os tempos de retenção são ligeiramente diferentes, compararam-se os valores máximos de absorção. (Anexo 6.5 e Anexo 6.6)

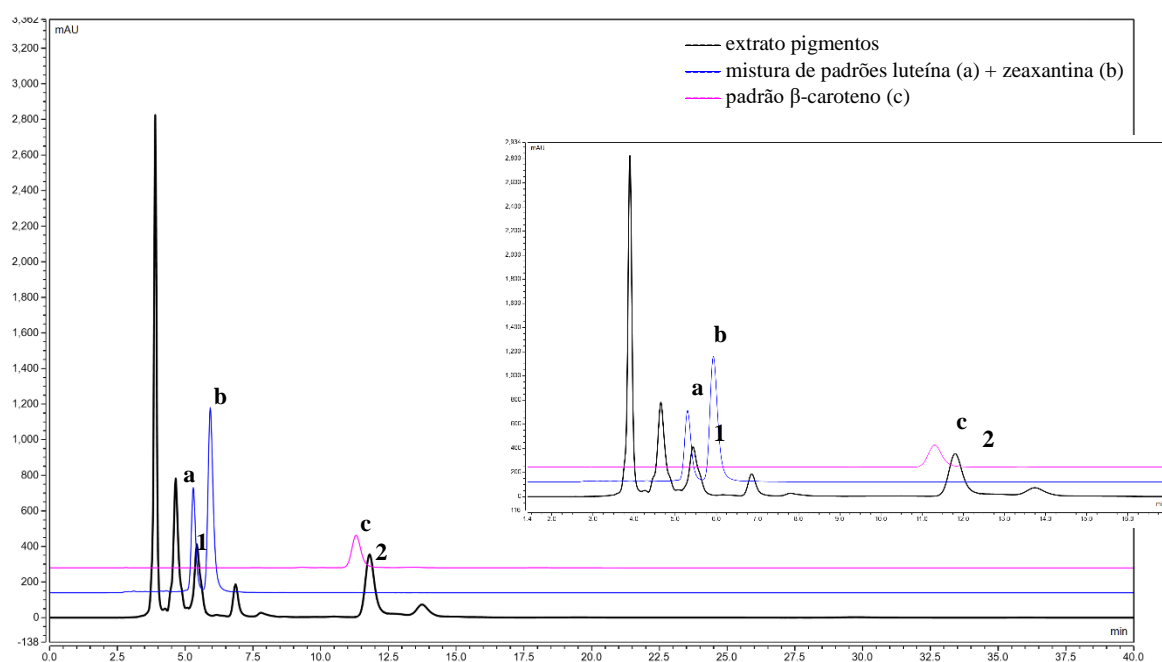


Figura 3.4 – Sobreposição dos cromatogramas do extrato de pigmentos e dos padrões de carotenoides, e respetiva aproximação. (450 nm) (a – luteína; b – zeaxantina; c – β -caroteno; 1 – pico relativo à luteína; 2 – pico relativo ao β -caroteno.)

Para a quantificação dos carotenoides identificados teve-se em conta a área de cada um dos picos do extrato e obtiveram-se valores de 13.59 ± 5.09 mg/L para a luteína e 13.47 ± 2.84 mg/L para o β -caroteno. Estes valores podem ser também apresentados como 1.36 mg composto/g extrato ou 0.03 mg composto/g matéria-prima e 1.35 mg composto/g extrato ou 0.03 mg composto/g matéria-prima, respetivamente. (Tabela 3.3)

Ao longo deste trabalho, para a quantificação de compostos foram sempre tidas em conta as diluições ao longo do procedimento.

Analisou-se também a presença de clorofilas no extrato. A identificação destas realizou-se com base nos tempos de retenção e nos cromatogramas correspondentes aos respetivos padrões – clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *c2* – no comprimento de onda de 410 nm. A zona característica de absorção das clorofilas é entre os 400-450 nm e os 650 nm (97–99).

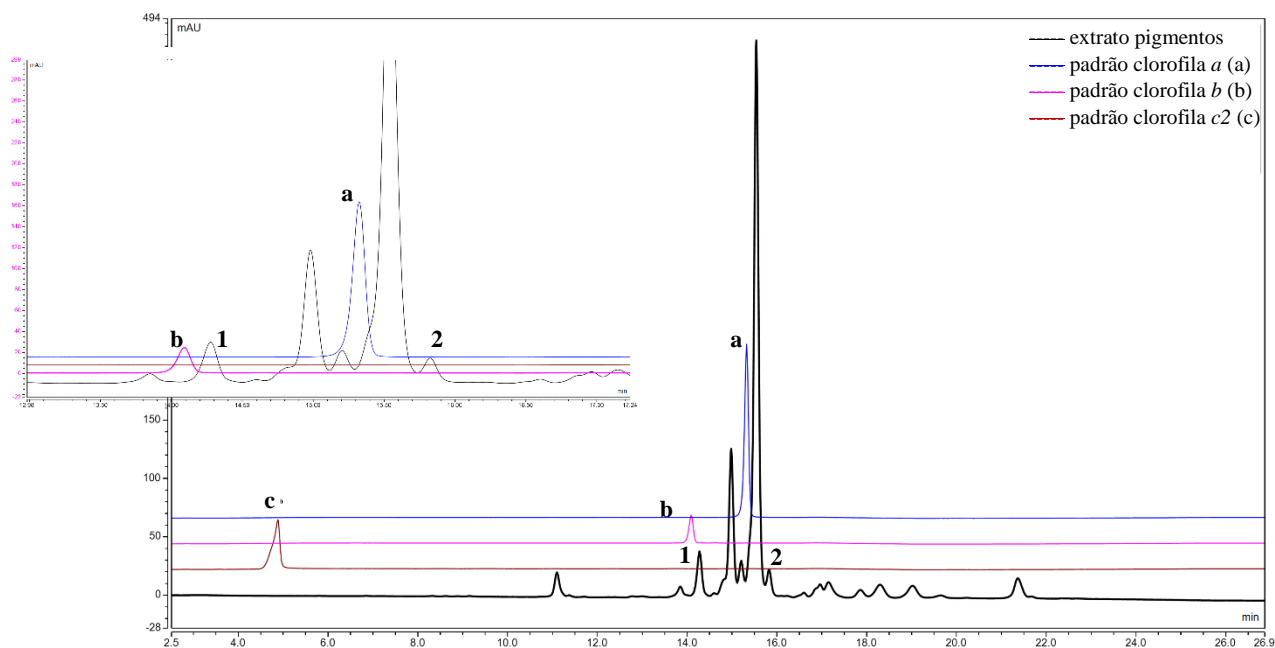


Figura 3.5 - Sobreposição do cromatograma do extrato com o cromatograma dos padrões de clorofila. (410 nm) (a – clorofila *a*; b – clorofila *b*; c – clorofila *c2*; 1 – pico relativo à clorofila *b*; 2 – pico relativo à clorofila *a*).

Através da sobreposição do cromatograma dos padrões ao cromatograma da amostra, conclui-se que tanto a clorofila *a* como a clorofila *b* se podem encontrar na salicórnia, uma vez que os tempos de retenção se encontram entre os da amostra. (Figura 3.5)

Sendo que os valores de tempo de retenção não são idênticos, recorre-se à comparação dos valores dos comprimentos de onda máximos de absorção. (Tabela 2.2, Anexo 6.7 e Anexo 6.8) Verifica-se que os máximos referentes à clorofila *a* são muito semelhantes aos comprimentos de onda máximos de absorção do pico 2 da amostra (413, 431 e 666 nm). Nenhum dos picos tem comprimentos de onda máximos de absorção em comum com a clorofila *b*, no entanto como esta se encontra também enquadrada entre picos considerou-se que esta está presente na amostra, mas uma vez que a sua concentração na amostra é bastante superior à sua concentração no padrão, o tempo de

retenção não é idêntico. A clorofila b corresponderá então ao pico 1. Por outro lado, conclui-se que a clorofila c2 não se encontra no extrato.

Assim, tendo em conta as áreas dos picos do extrato, obtiveram-se valores de concentração de 6.27 mg/L para a clorofila *a* e 75.88 mg/L para a clorofila *b*, (0.63 mg composto/g extrato e 0.01 mg composto/g matéria-prima para a clorofila *a* e 7.59 mg composto/g extrato e 0.15 mg composto/g matéria-prima para a clorofila *b*). É de referir que o valor de concentração da clorofila *a* pode estar ligeiramente alterado, uma vez que os picos da amostra não se encontravam 100% separados.

Na *Tabela 3.3* encontra-se um resumo dos dados adquiridos relativamente à extração de pigmentos da planta.

Tabela 3.3 - Rendimento mássico e concentrações dos diferentes pigmentos identificados no extrato.

Rendimento (%)	Concentração carotenoides (mg composto/g extrato)	Concentração clorofilas (mg composto/g extrato)
1.99 ± 0.47	Luteína – 1.36 β-caroteno – 1.35	clorofila <i>a</i> – 0.63 clorofila <i>b</i> – 7.59

3.1.4. Extração convencional sólido-líquido (Soxhlet)

Ao realizar uma extração convencional Soxhlet usando etanol:água como solvente obteve-se um rendimento mássico médio de 41.82 ± 7.34 %. (*Figura 3.6*) (*Tabela 3.4*)



Figura 3.6 - Extrato obtido por Soxhlet.

Realizou-se uma cromatografia em camada fina, de modo a obter informação qualitativa do tipo de compostos que podem estar presentes no extrato. (*Figura 3.7*) O solvente usado foi uma mistura de tolueno:acetona:ác.fórmico (9:9:2) e este percorreu uma distância de 7.2 cm na placa. Uma vez que a distância percorrida pelos analitos é 5 cm, através da *Equação 6* obteve-se um valor de R_f de 0.69.

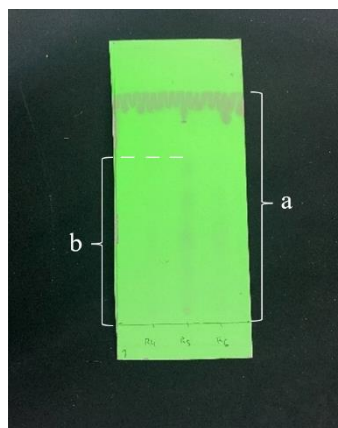


Figura 3.7 - Cromatografia em camada fina realizada ao extrato obtido. (a – distância percorrida pelo solvente; b – distância percorrida pelos analitos)

No artigo de referência às condições usadas (65), foram usados padrões e calculados os seus valores de Rf, (Rf ácido gálico: 0.57; Rf quercetina: 0.66). Assim, comparando o valor de Rf obtido com a amostra com os valores de Rf dos padrões, pode concluir-se que no extrato está presente a quercetina, ou algum dos seus derivados.

Os extratos foram de seguida analisados de modo a determinar o teor em conteúdo fenólico total, pelo método de Folin-Ciocalteu, obtendo-se um resultado de 29.44 ± 0.0016 mg GAE/g extrato, considerando sempre a concentração da amostra. Este valor é muito superior ao descrito na literatura (100), 8.90 mg GAE/g extrato. Tendo em conta que o método de Folin-Ciocalteu não é específico para compostos fenólicos, é possível assumir que ocorreu interferência de outras substâncias redutoras também presentes na amostra, como proteínas ou açúcares redutores (40) (Tabela 3.4).

Efetuuou-se também uma análise ORAC, de maneira a determinar a capacidade antioxidante do extrato e obteve-se um resultado de 466.33 ± 0.021 $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato. Este valor é também superior aos descritos na literatura, em análises de extratos obtidos por outras técnicas, o que sugere que utilizando este método de extração, os compostos-alvo não são apenas compostos fenólicos mas também outros compostos com atividade antioxidante. (Tabela 3.4)

Tabela 3.4 - Rendimento mássico e respetivos valores de TPC e ORAC para o extrato de Soxhlet.

Rendimento (%)	TPC (mg GAE/g extrato)	ORAC ($\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato)
41.82 ± 7.34	29.44 ± 0.0016	466.33 ± 0.021

De seguida, o extrato foi analisado por cromatografia líquida de modo a identificar e quantificar compostos fenólicos. Juntamente com esta foi analisada uma mistura de padrões de compostos fenólicos A (*Anexo 6.2*).

Assim, e comparando o cromatograma obtido (*Figura 3.8*) com os tempos de retenção descritos em Oliveira-Alves et al. (53), foi possível identificar os compostos fenólicos da amostra. (*Tabela 3.5*)

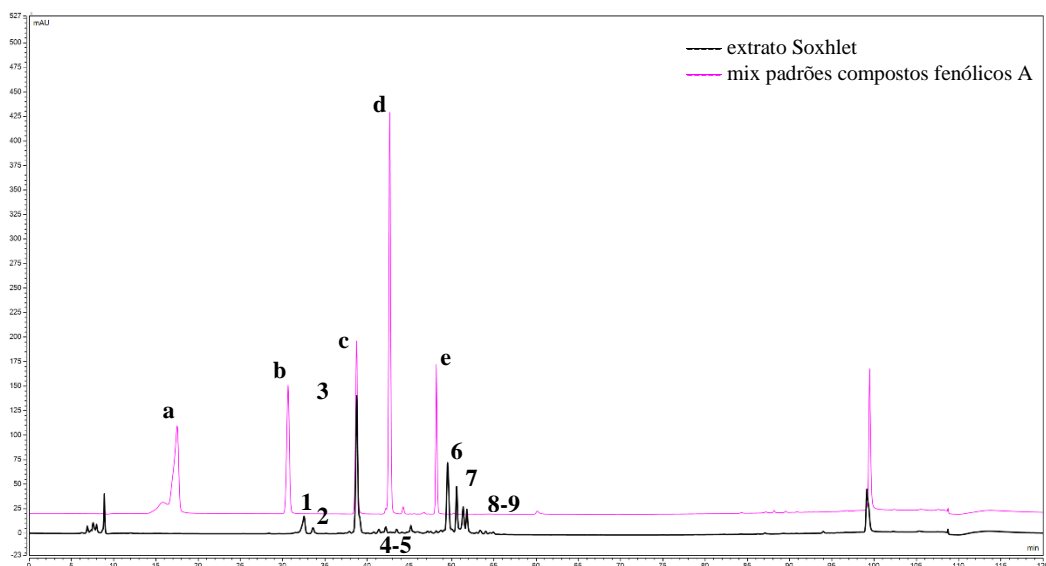


Figura 3.8 - Sobreposição do cromatograma do extrato Soxhlet e da mistura de padrões de compostos fenólicos A (280 nm) (a – ácido gálico; b – ácido protocatecuico; c – ácido clorogénico; d – ácido cafeico; e – quercetina-3-glucósido; 1 – ácido neoclorogénico; 2 – galocatequina; 3 – ácido clorogénico; 4 – ácido p-cumaroilquínico; 5 – derivado de ácido ferúlico; 6 – quercetina-3-glucósido; 7 – ácido 3,4-dicafeoilquínico; 8 – ácido 4,5-dicafeoilquínico; 9 – ácido cafeoilhidrocafeoilquínico).

Os compostos identificados e quantificados no extrato estão resumidos na *Tabela 3.5*.

Tabela 3.5 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma obtido pela análise do extrato de Soxhlet. Respetivos tempos de retenção, comprimentos de onda máximos de absorção e valores de concentração.

Pico	Compostos fenólicos	t_r (min.)	$\lambda_{máx}$ (nm)	Concentração extrato (mg composto/g extrato)	Concentração matéria-prima (mg composto/g matéria-prima)
1	Ácido neoclorogénico**	32.53	325	0.60	0.30
2	Galocatequina*	33.60	278	0.07	0.04
3	Ácido clorogénico	38.77	326	3.65	1.81
4	Ácido p-cumaroilquínico*	42.19	319	0.04	0.02
5	Derivado de ácido ferúlico*	45.17	325	0.03	0.02

6	Quercetina (quercetina-3-glucósido)	49.52	327	3.10	1.53
7	Ácido 3,4-dicafeoilquínico*	50.59	328	0.54	0.27
8	Ácido 4,5-dicafeoilquínico*	51.36	328	0.41	0.20
9	Ácido cafeoilhidrocafeoilquínico*	51.80	329	0.28	0.14

*calculados em equivalentes de ácido gálico **calculados em equivalentes de ácido clorogénico

Foram identificados, através da comparação com os tempos de retenção dos padrões e da literatura (53,54), 9 compostos fenólicos, entre os quais 7 ácidos hidroxicinâmicos – ácido clorogénico, ácido ferúlico e ácido ρ -cumárico, por exemplo - e 2 polifenóis – galocatequina e quercetina.

Os ácidos hidroxicinâmicos são a maior classe de compostos fenólicos. São considerados compostos aromáticos e a sua estrutura tem como base uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3) (101,102). O ácido clorogénico, obtido por esterificação do ácido cafeico e do ácido quínico, tem potencial anti-inflamatório, antidiabético, antiviral e antioxidante. Encontra-se em muitas espécies de plantas. Um dos seus isómeros é o ácido neoclorogénico, que é também incorporado em matrizes alimentares por possuir as mesmas características (101,103,104). A galocatequina é um composto fenólico que se pode também encontrar no chá verde. Possui propriedades antioxidantes, previna o aparecimento de cancro, melhora a saúde cardiovascular, facilita a perda de peso, protege a pele de danos por radiação, entre outras (105). O ácido ferúlico, também encontrado na amostra, possui propriedades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias e absorventes de radiação ultravioleta. Ao longo dos anos foram reportados vários estudos relativamente aos derivados deste ácido, cujo objetivo é possuírem uma atividade antioxidante similar ou mais forte, uma melhor estabilidade e uma menor toxicidade. É possível encontrá-lo em variadas espécies de plantas e é muito usado na medicina chinesa tradicional (101,106). O ácido ρ -cumárico é um ácido fenólico sintetizado principalmente a partir da tirosina e da fenilalanina. É através deste que são sintetizados ácidos como o cafeico e clorogénico, entre outros. Possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias e despigmentantes, utilizadas na área industrial, biomédica e da cosmética. O ácido cafeico é um dos ácidos fenólicos mais comum, biossintetizado por hidroxilação do ácido ρ -cumárico. Possui também propriedades medicinais, uma vez que é, assim como o ácido do qual deriva, antioxidante, anti tumoral, anti-inflamatório, antimicrobiano e, ainda, antidiabético. (101,102) A quercetina é o

flavonol mais representativo dos flavonóides. Encontra-se em frutas e vegetais, em particular na maçã e na cebola, e é característica de fornecer uma cor amarelada. É bastante benéfica para a saúde humana, uma vez que é considerada antiviral, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antidiabética e anti alergénica. Pode ser usada juntamente com outros medicamentos de modo a diminuir os seus efeitos secundários e a sua toxicidade. É um dos compostos mais usados na indústria farmacêutica devido à sua elevada biodisponibilidade e por ser altamente solúvel em álcool e soluções hidroalcoólicas. Recentemente, a quercetina foi também usada em pacientes de covid-19 sintomáticos, resultando numa melhoria do quadro clínico e numa diminuição do período de internamento hospitalar (107,108). Grande parte destes compostos encontra-se em frutas, vegetais e cereais (101).

Tendo em conta os compostos encontrados na amostra procedeu-se a uma otimização de métodos considerados mais “verdes” para a extração dos compostos mais relevantes encontrados na matriz – os compostos fenólicos.

3.2. Extrações alternativas de compostos bioativos

3.2.1. Extração por Fluidos Supercríticos (SFE)

Esta técnica foi aplicada com o objetivo de extrair compostos lipídicos da salicórnia moída. Tal como referido anteriormente foram realizadas duas extrações com CO₂ supercrítico diferentes, uma sem co-solvente e outra utilizando o etanol como co-solvente. Os rendimentos destas foram 0.18 ± 0.07 % e 5.29 ± 0.84 %, respetivamente. (Figura 3.9) (Tabela 3.6) Foi analisado e quantificado o teor de carotenoides e clorofilas por HPLC-DAD. Uma vez que o rendimento da extração sem co-solvente é muito baixo analisou-se apenas o extrato obtido com o etanol.



Figura 3.9 - Extrato obtido através da extração por fluidos supercríticos sem co-solvente.

Foi utilizado um detetor de UV-Vis, a um comprimento de onda de 450 nm e, quando analisado juntamente com uma mistura dos padrões de luteína+zeaxantina e β -caroteno obtiveram-se os seguintes cromatogramas. (Figura 3.10)

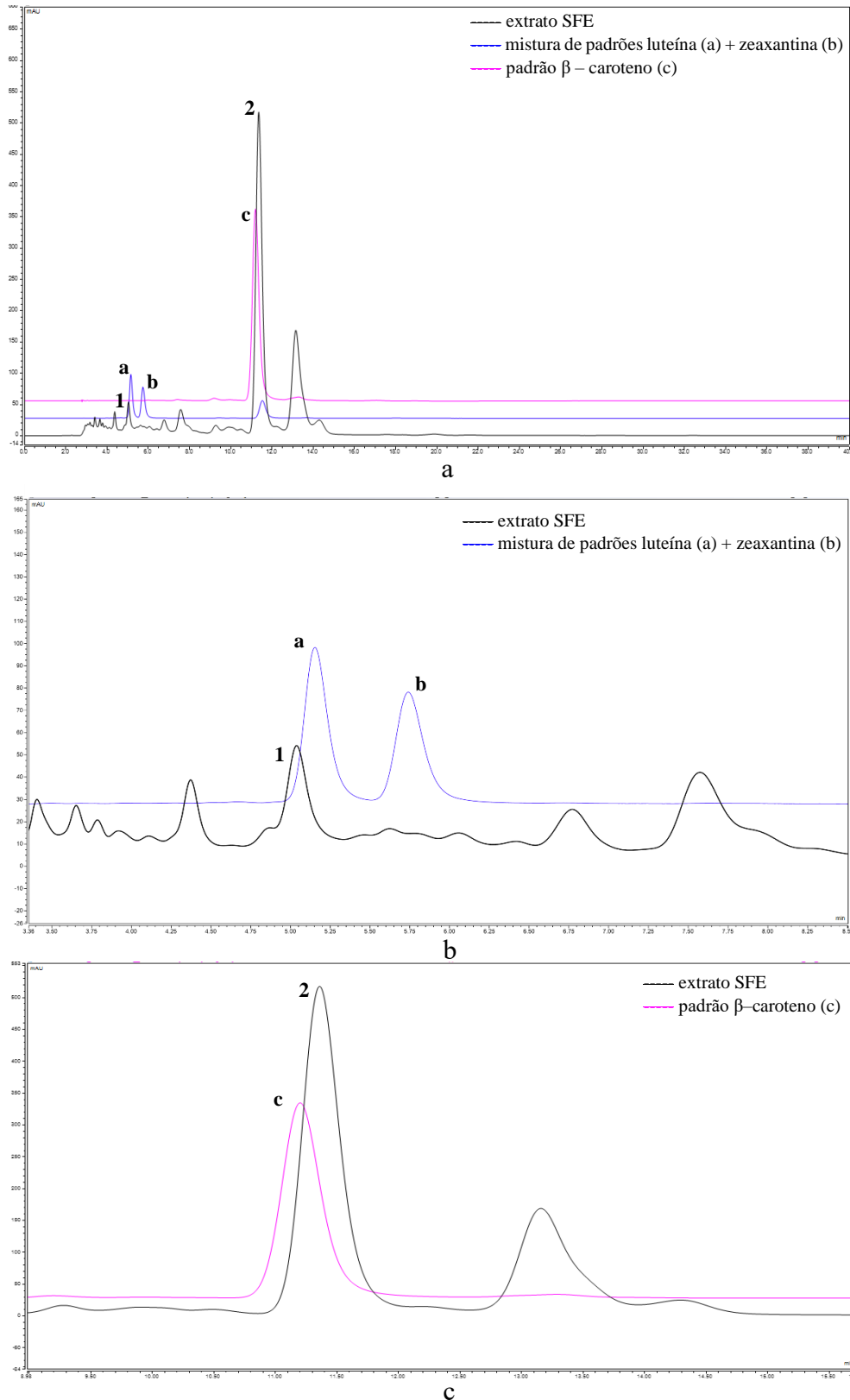


Figura 3.10 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato de SFE e dos padrões de carotenoides e respectivas aproximações (b e c) (450 nm) (a – luteína; b – zeaxantina; c – β -caroteno; 1 – pico relativo a luteína; 2 – pico relativo ao β -caroteno).

Observando os cromatogramas podemos concluir que apenas a luteína e o β -caroteno se encontram no extrato, uma vez que existem picos com tempos de retenção semelhantes, $t_r=5.05$ minutos e $t_r=11.36$ minutos, respectivamente. (t_r padrão luteína=5.15 min. e t_r padrão β -caroteno=11.17 min.) Para confirmar esta afirmação compararam-se também os máximos de absorção dos respectivos picos. (Tabela 2.1) Deste modo, é possível afirmar que os picos 1 e 2 correspondem à luteína e ao β -caroteno, respectivamente.

Através da equação da reta de calibração foi possível determinar que o teor de β -caroteno no extrato é 16.02 mg/L, podendo também ser expresso em 0.64 mg composto/g extrato ou 1.2 μ g composto/g matéria-prima. (Tabela 3.6)

Foi também analisado o extrato obtido por SFE de modo a detetar a presença de clorofilas. (Figura 3.11)

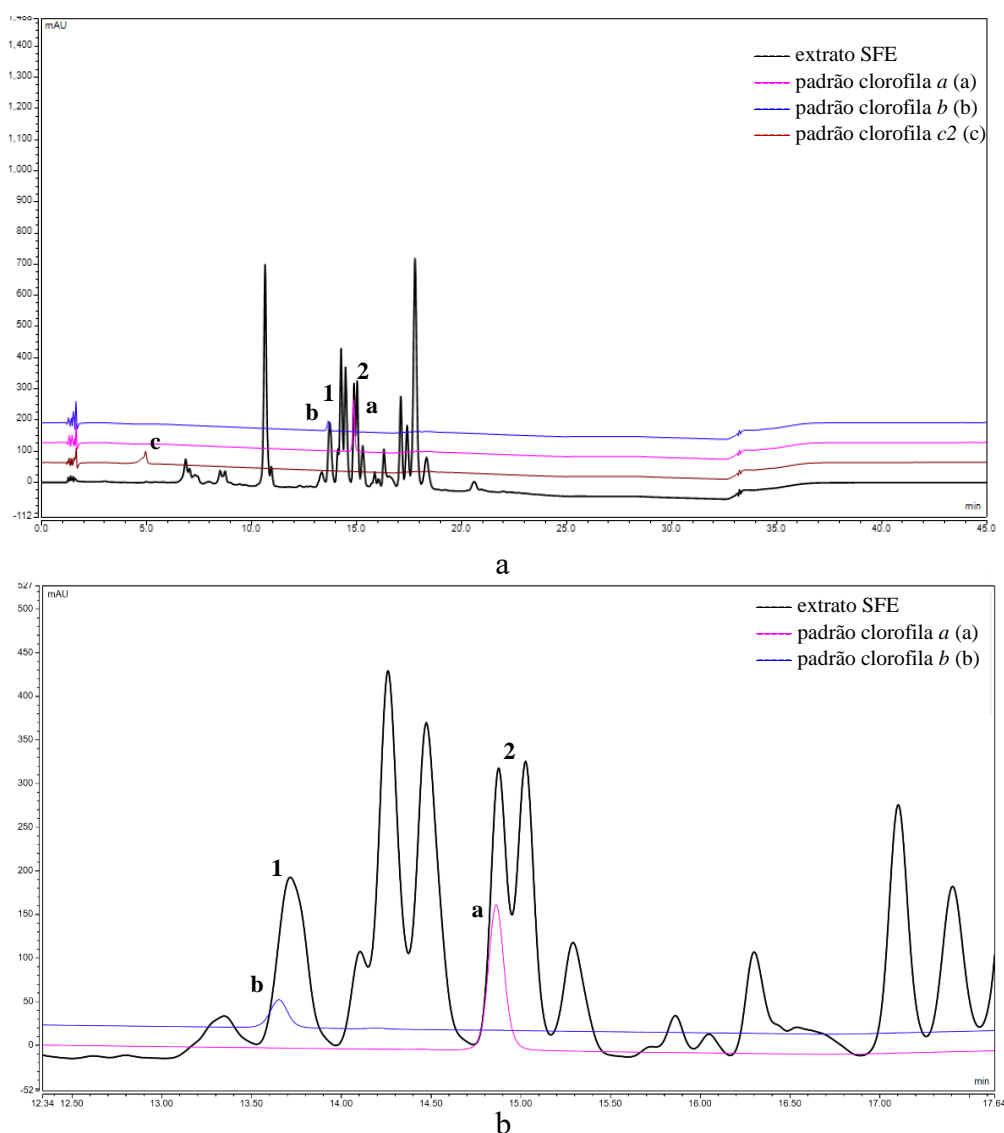


Figura 3.11 - Sobreposição do cromatograma do extrato SFE com os cromatogramas dos padrões de clorofilas e respetiva aproximação (b) (410 nm) (a – clorofila a; b – clorofila b; c – clorofila c2; 1 – pico relativo à clorofila b; 2 – pico relativo à clorofila a).

Através dos cromatogramas obtidos pode concluir-se que apenas a clorofila *a* e a clorofila *b* se encontram presentes no extrato. Esta identificação foi confirmada pelos respetivos valores dos máximos de absorção.

Através das equações das retas de calibração obtiveram-se concentrações de 60.27 mg/L para a clorofila *a* e 149.93 mg/L para a clorofila *b*. (2.41 mg composto/g extrato e 0.13 mg composto/g matéria-prima para a clorofila *a* e 6.00 mg composto/g extrato e 0.32 mg composto/g matéria-prima para a clorofila *b*). (Tabela 3.6)

Tabela 3.6 - Dados de rendimento mássico e concentração de pigmentos obtidos ao analisar o extrato de SFE.

Rendimento (%)	Concentração carotenoides (mg composto/g extrato)	Concentração clorofilas (mg composto/g extrato)
5.29 ± 0.84	β-caroteno – 0.64	clorofila <i>a</i> – 2.41 clorofila <i>b</i> – 6.00

3.2.2. Extração Assistida por Ultrassons

Através da extração hidroalcoólica (80:20) assistida com ultrassons UAE obteve-se um rendimento de 49.76 ± 13.35 %. (Figura 3.12) (Tabela 3.7)



Figura 3.12 - Extrato obtido através de uma extração assistida por ultrassons.

Tendo em conta os valores obtidos, pode concluir-se que a extração foi bem sucedida, no entanto, para confirmar tal afirmação, é necessário verificar os resultados obtidos através da análise realizada pelo método Folin-Ciocalteu, para determinar a quantidade de compostos fenólicos presente nos extratos. O valor de concentração obtido foi, em média, 13.73 ± 0.003 mg GAE/g extrato (6.83 mg GAE/g matéria-prima). Segundo a literatura (53,62), o valor de conteúdo fenólico total esperado na salicórnia ramosíssima seria entre 7.03 e 12.09 mg GAE/g extrato. Conclui-se então que o valor obtido experimentalmente é superior ao que seria expectável. Tendo em conta que o método de Folin-Ciocalteu é um método colorimétrico, está sempre bastante suscetível a erros e interferências de outros compostos (40) (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Valores de rendimento e teor de conteúdo fenólico total do extrato UAE.

Rendimento (%)	TPC (mg GAE/g extrato)
49.76 ± 13.35	13.73 ± 0.003

De modo a identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes na amostra, foi analisada juntamente com esta, a mistura de padrões fenólicos A. Assim, e comparando o cromatograma obtido (*Figura 3.13*) com os tempos de retenção descritos em Oliveira-Alves et al. (53), e com a identificação feita previamente foi possível identificar os compostos fenólicos da amostra. (*Tabela 3.8*)

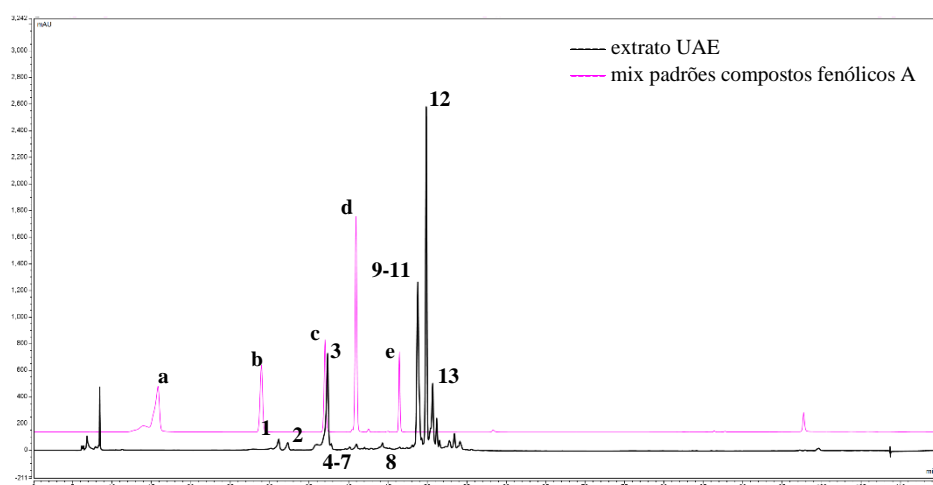


Figura 3.13 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de compostos fenólicos A (280 nm) (a – ácido gálico; b – ácido protocatecuico; c – ácido clorogénico; d – ácido cafeico; e – quercetina-3-glucósido; 1 – ácido neoclorogénico; 2 – galocatequina; 3 – ácido clorogénico; 4 – ácido ferúlico; 5 – glucósido de ácido ferúlico; 6 – derivado de ácido p-cumárico; 7 – ácido p-cumaroilquinico; 8 – derivado de ácido ferúlico; 9 – quercetina-3-glucósido; 10 – ácido 3,4-dicafeoilquinico; 11 – ácido 3,5-dicafeoilquinico; 12 – ácido 4,5-dicafeoilquinico; 13 – ácido cafeoilhidrocafeoilquinico).

Tabela 3.8 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma, respetivos valores de tempo de retenção, comprimentos de onda máximos de absorção e concentrações.

Pico	Possível identificação	t_r (min.)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Concentração extrato (mg composto/g extrato)	Concentração matéria-prima (mg composto/g matéria-prima)
1	Ácido neoclorogénico**	31.8	~300; 326	0.27	0.15
2	Galocatequina*	32.26	280	0.13	0.07
3	Ácido clorogénico	37.30	~300; 326	1.46	0.84

4	Ácido ferúlico*	39.57	316; 288	0.05	0.03
5	Glucósido de Ácido ferúlico*	40.10	330	0.09	0.05
6	Derivado de ácido p-cumárico*	40.96	320	0.17	0.10
7	Ácido p-cumaroilquínico*	42.86	318; 239	0.06	0.03
8	Derivado de ácido ferúlico*	44.26	~290; 325	0.17	0.10
9	Quercetina (quercetina-3-glucósido)	47.37	~350; 250	0.03	0.02
10	Ácido 3,4-dicafeoilquínico*	48.76	291; 326	3.49	2.00
11	Ácido 3,5-dicafeoilquínico*	49.83	~300; 327	4.49	2.57
12	Ácido 4,5-dicafeoilquínico*	50.65	296; 327	1.32	0.76
13	Ácido cafeoilhidrocafeoilquínico*	51.18	292; 328	0.38	0.22

*calculados em equivalentes de ácido gálico **calculados em equivalentes de ácido clorogénico

De modo a confirmar esta identificação, efetuou-se também uma análise por cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa do extrato obtido. De modo a facilitar a identificação dos compostos no extrato, analisaram-se duas misturas de padrões (mistura B e mistura C). As tabelas nos anexos enumeram os compostos presentes em cada uma das misturas (*Anexo 6.3 e Anexo 6.4*). Abaixo encontra-se a comparação do cromatograma do extrato com ambas as misturas, de modo a verificar possíveis sobreposições que corresponderão, provavelmente, aos 14 compostos já identificados. (*Figura 3.14(a e b)*)

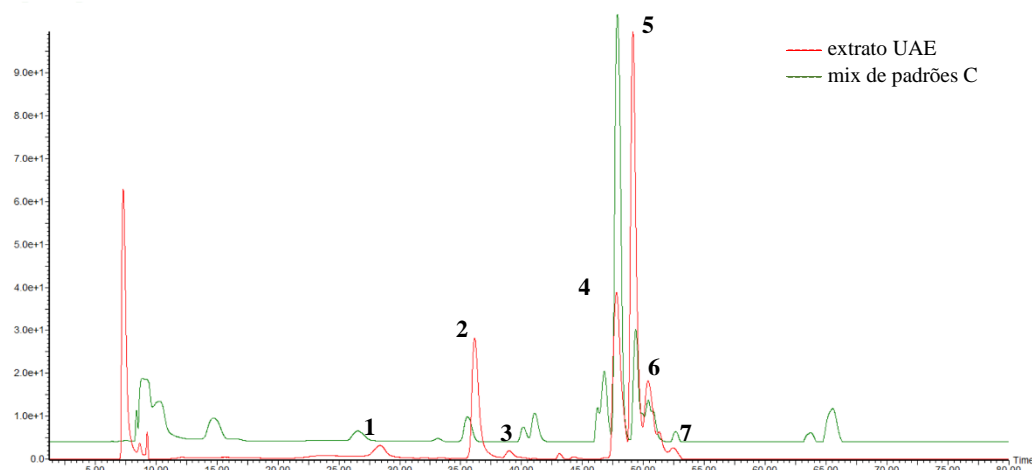
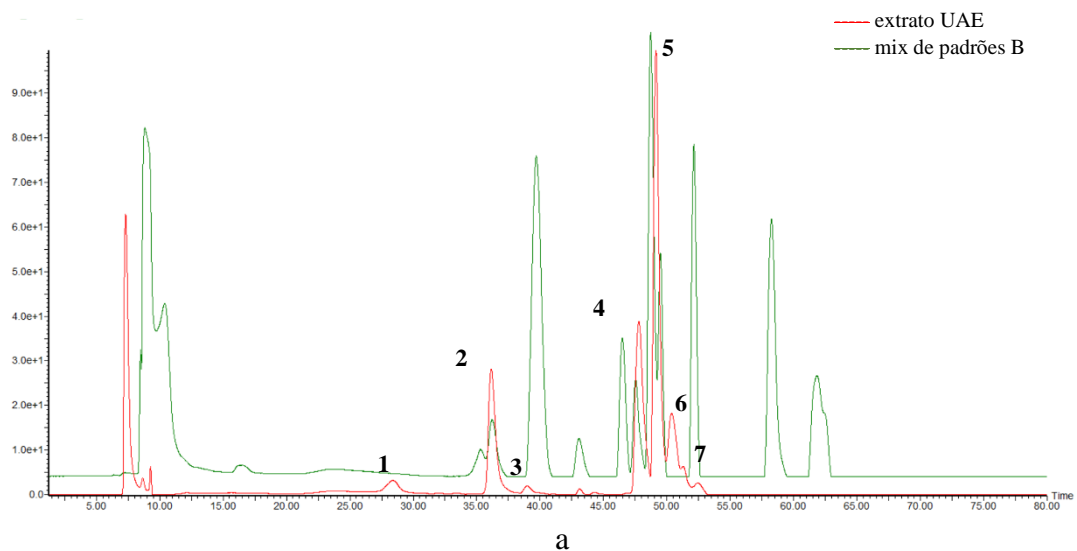


Figura 3.14 - Sobreposição do cromatograma do extrato UAE e dos cromatograma da mistura de padrões B (a) e C (b) (210 nm, modo negativo). (1 – ácido neoclorogénico; 2 – ácido clorogénico; 3 – derivado de ácido ferúlico; 4 – derivado de quercetina; 5 – ácido 3,5-dicafeoilquinico; 6 – ácido 4,5-dicafeoilquinico; 7 – derivado de quercetina)

Os picos 1 e 2 têm o seu máximo de absorção a um comprimento de onda de 324 e 325 nm, respetivamente. Possuem um valor de $[M-H]^-$ de 353 m/z e foi possível identificá-los, através da literatura e das misturas de padrões, como sendo o ácido neoclorogénico e o ácido clorogénico, respetivamente. (Anexo 6.9 a Anexo 6.11) Esta identificação corresponde também com a realizada previamente (53,109–111).

Identificou-se o pico 3 como sendo um derivado do ácido ferúlico através da identificação anterior e da literatura. Possui dois valores máximos de comprimento de onda de absorção, a 243 e a 324 nm. O seu ião precursor tem uma massa de 355 m/z (Anexo 6.12) Anexo 6.12 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e scan de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativo do pico 3.(53,112). A região entre os picos 4 a 7 tem na sua constituição uma mistura de compostos o que dificulta a

sua identificação. Os quatro picos possuem máximos de absorção em comprimento de onda bastante semelhantes, sendo de 234 e 327 nm para o pico 4, 221, 243 e 328 nm para o pico 5, 241 e 328 nm para o pico 6 e 242 e 324 nm para o último pico. Os valores dos seus fragmentos de massa são também muito semelhantes. (*Anexo 6.13 a Anexo 6.18*) Assim, e de acordo com a identificação prévia e com a literatura, afirma-se que o pico 4 e o pico 7 correspondem a derivados da quercetina e os picos 5 e 6 aos ácidos 3,5-dicafeiolquínico e 4,5-dicafeiolquínico, respetivamente (53,113).

Tabela 3.9 - Identificação, através de análise LC-MS, dos compostos encontrados no extrato.

Pico no.	t _R (min.)	λ _{máx.} (nm)	ESI -	ESI +	Nome do composto	Ref.
1	28.37	215; 217; 324	353	214; 377; 355	Ácido neoclorogénico	(53,109)
2	36.15	238; 325	353	355;393; 377; 356; 214	Ácido clorogénico	(53,110,111)
3	39.00	243; 324	355; 353	214; 298; 227; 379	Derivado de ácido ferúlico	(53,112)
4	47.79	234; 327	517	519; 501; 681	Derivados de quercetina	(53)
5	49.13	221; 243; 328	515; 353	499; 517; 500; 518	Ácido 3,5-dicafeiolquínico	(113)
6	50.38	241; 328	515; 517	517; 499; 265; 518; 500; 519; 501	Ácido 4,5-dicafeiolquínico	(53,113)
7	52.45	242; 324	515; 695; 517; 697	343; 214	Derivado de quercetina	(53)

Através dos tempos de retenção dos diferentes compostos e da respetiva ordem de eluição, quer da análise realizada previamente, quer desta última análise, é possível afirmar que as identificações feitas inicialmente se encontram corretas e que são efetivamente esses os compostos presentes no extrato. (*Tabela 3.9*)

3.2.3. Extração Assistida por Microondas

Utilizou-se a extração assistida por microondas com o objetivo de adquirir extratos ricos em compostos fenólicos. Inicialmente, realizaram-se extrações preliminares com utilizando a água como solvente e variou-se a temperatura e o tempo de extração de modo a estimar a concentração de compostos fenólicos extraídos.

Os valores de TPC obtidos encontram-se descritos na *Figura 3.15* e são relativamente inferiores ao mencionado na literatura, 8.34 mg GAE/g extrato (10).

Pode verificar-se que o valor máximo de conteúdo fenólico total foi atingido quando a temperatura era 90°C, e numa extração com a duração de 10 minutos. Ao diminuir a temperatura, mas mantendo o tempo de extração, obteve-se o valor mínimo de TPC. Assim, é possível concluir que a um determinado tempo de extração, a uma temperatura relativamente elevada, a extração é mais eficiente.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *Tukey*, um teste estatístico que compara todos os pares de médias possíveis e identifica qualquer diferença entre dois valores médios que seja superior ao erro padrão esperado, ou seja, que seja significativa (114). Esta análise estatística comprovou que ao comparar as condições de menor temperatura (*a* e *b*) à condição de 10 minutos a 90°C (*c*), a sua diferença era estatisticamente significativa. (*Figura 3.15*)

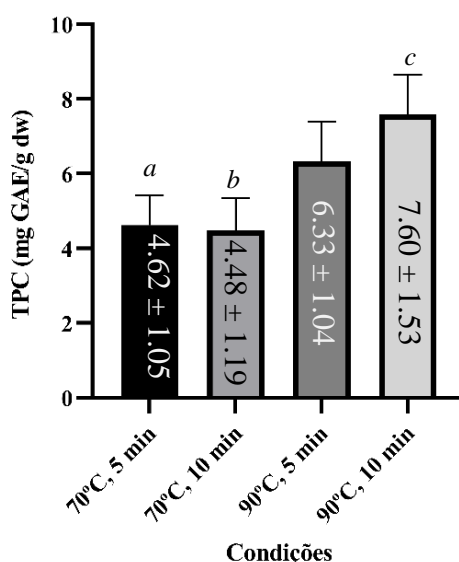


Figura 3.15 - Gráfico relativo ao estudo estatístico realizado (teste t) para os valores preliminares da extração por microondas. Os resultados estão expressos em média \pm DP (n=3) para cada uma das condições diferentes, em mg GAE/g extrato. Foi efetuada uma comparação múltipla entre as diferentes condições, sendo que os pares de condições estatisticamente significativos para o teste de Tukey são *ac* e *bc* ($p \leq 0,05$).

Através de um Desenho de Experiências (DOE) foi possível analisar de que maneira estas variantes afetam o rendimento e o teor de compostos fenólicos. Tendo em conta os resultados obtidos, e com o auxílio do programa MODDE, foi possível elaborar um Desenho de Experiências (DOE) onde se fez variar a temperatura (T), o tempo de extração (t) e a percentagem de etanol na mistura hidroalcoólica. Deste modo realizou-se um conjunto de experiências, incluindo três pontos centrais, cujo objetivo é avaliar a variabilidade experimental e a incerteza dos resultados. As condições experimentais

incluem a oscilação da temperatura entre os 80°C e os 120°C, o tempo entre os 5 minutos e os 20 minutos, e a percentagem de etanol entre os 0% e os 100%. (Tabela 3.10)

Tabela 3.10 – Condições do desenho de experiências.

Experiência	Condições		
	T (°C)	t (min)	%EtOH
R1	80	12:30	50
R2	120	5	0
R3	100	12:30	50
R4	80	5	100
R5	100	5	50
R6	100	12:30	50
R7	120	20	100
R8	120	5	100
R9	100	20	50
R10	80	20	100
R11	100	12:30	100
R12	100	12:30	50
R13	100	12:30	0
R14	120	20	0
R15	120	12:30	50
R16	80	5	0
R17	80	20	0

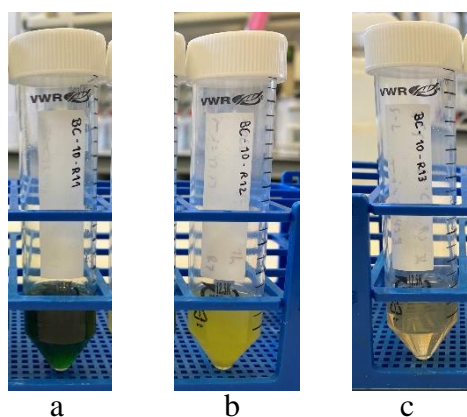


Figura 3.16 - Extratos obtidos por extração assistida por microondas, durante o desenho de experiências. (a – extrato condições R11; b – extrato condições R12; c – extrato condições R13).

Elaborou-se o DOE e ao observar os extratos obtidos, numa primeira análise visual, juntamente com as condições usadas em cada uma das extrações é possível concluir que à medida que a percentagem de água vai diminuindo a cor do extrato vai ficando mais escura, tornando-se verde quando o solvente usado é unicamente o etanol. (Figura 3.16) Assim, conclui-se que este é também capaz de extrair as clorofilas da planta. Todos os extratos obtidos foram evaporados para calcular o rendimento mássico de extração e

analisados para saber o conteúdo fenólico total através do método de Folin e a capacidade antioxidante através de ORAC. Os resultados encontram-se resumidos na *Figura 3.17*, estando descritos detalhadamente no *Anexo 6.19*.

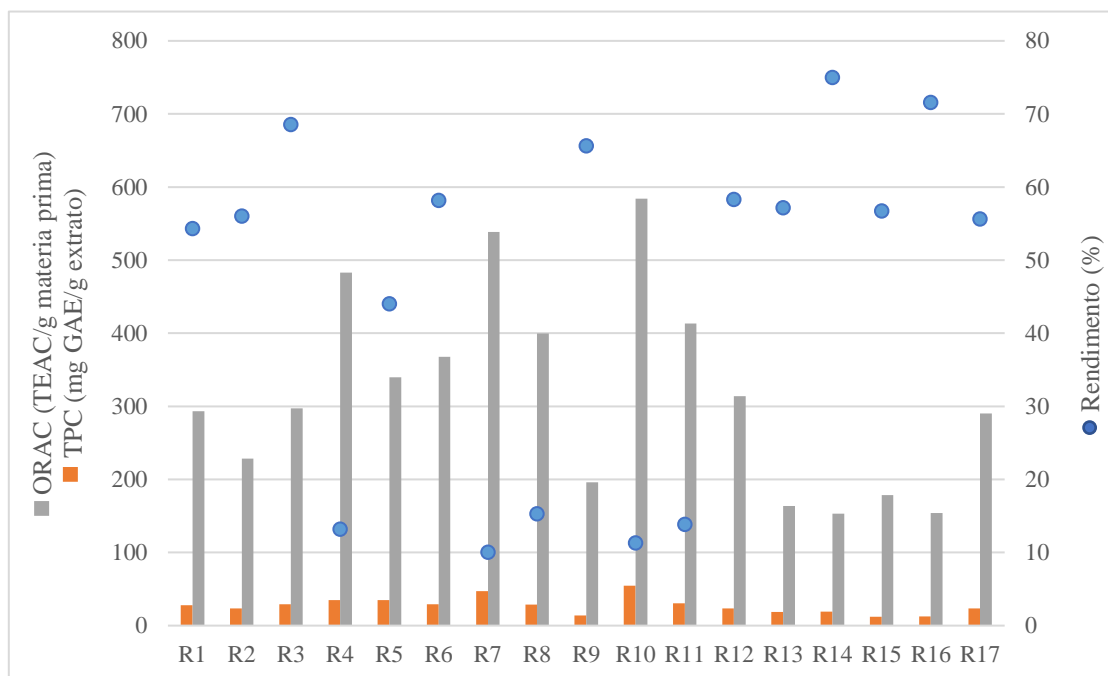


Figura 3.17 - Gráfico com os valores de rendimento, TPC e ORAC de todas as experiências do DOE.

O rendimento mássico mais elevado foi obtido no extrato com as condições descritas no R14. Estas condições levam no entanto ao menor valor de capacidade antioxidante. O menor rendimento mássico obtém-se com as condições de R7. Com as condições descritas em R10 foi possível obter o maior valor de TPC, assim como o maior valor de capacidade antioxidante. Por outro lado, o menor valor de TPC foi obtido extrato com as condições R15.

Os valores de conteúdo fenólico total obtidos são superiores ao valor descrito na literatura mencionado anteriormente, uma vez que se utilizou também o etanol como solvente, o que permitiu a extração de outros compostos. Segundo Pinto et. al (115), em extrações de microondas com uma mistura de solventes hidroalcoólica, o valor obtido foi 18.63 mg GAE/g extrato, semelhante aos valores experimentais.

Segundo a literatura (53), para uma extração de ultrassons, o valor de ORAC esperado seria de 418.81 $\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato, no entanto, obtiveram-se valores inferiores. Esta diferença pode ser devido à diferença na preparação da amostra, às técnicas de extração, aos solventes usados e até à altura do ano em que a planta foi colhida. Há estudos que afirmam que nos períodos mais secos do ano o nível de polifenóis em plantas halófitas

é maior de modo a garantir a proteção contra o stress oxidativo causado pela salinidade elevada (10,116).

Ao analisar os dados acima mencionados, pode concluir-se que as extrações com maiores rendimentos mássicos são as que possuem uma menor quantidade de compostos fenólicos, e as de menor rendimento mássico têm na sua constituição uma maior concentração de compostos fenólicos. Assim, deduz-se que quanto maior o rendimento mássico, menor seletividade tem a extração e menor é o valor de conteúdo fenólico total e respetiva capacidade antioxidante.

Para avaliar melhor a interação entre os valores de conteúdo fenólico total e da atividade antioxidante elaborou-se um gráfico que correlaciona ambos os fatores. (Figura 3.18) Assim, verifica-se que existe uma correlação linear entre eles sendo o R^2 de 0.8658, o que significa que os compostos fenólicos extraídos são os que mais contribuem para o potencial antioxidante da planta (117).

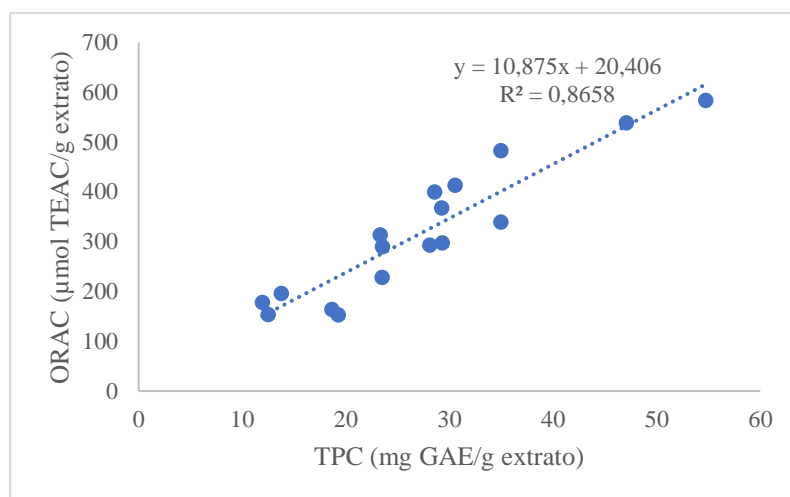


Figura 3.18 - Gráfico de correlação entre os valores obtidos de TPC e de ORAC.

Segundo este programa, as variáveis significativas quando nos estamos a referir ao rendimento de extração são o etanol e o seu efeito quadrático (p -value=1.05x10⁻⁶ e 0.00033, respetivamente). Isto significa que, ao aumentar a percentagem de etanol na extração, o rendimento aumenta também. No entanto, esta relação é descrita por uma função quadrática, ou seja, o rendimento aumenta até atingir o seu máximo e, ao continuar a aumentar a percentagem de etanol, o rendimento começa a diminuir. A equação neste caso seria: $rendimento = 57.97 - 25.17c - 20.05c^2$, com um R^2 de 0.934. O valor considerado relativamente alto de R^2 sugere concordância entre os dados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo.

Relativamente aos valores obtidos de conteúdo fenólico total e atividade antioxidante, a única variável significativa é também o etanol (p -value=0.0116 e 0.00019, respetivamente), sendo as equações, $TPC = 23.62 + 9.74c$, ($R^2=0.653$) e $ORAC = 258.29 + 142.93C$, ($R^2=0.865$). Neste caso, os valores de R^2 são consideravelmente baixos, o que pode dever-se ao facto de estarem a ser utilizados métodos colorimétricos e com baixa reprodutibilidade.

O valor de p -value permite-nos saber quais as condições são significativas e tem de ser inferior ou igual a 0.05, para um intervalo de confiança de 95%, o que se verifica neste caso.

Do programa estatístico foi possível retirar gráficos de contorno de “response surface” de modo a facilitar a análise dos resultados obtidos. Através da *Figura 3.19* conclui-se que, quando a percentagem de etanol usada é constante, o rendimento aumenta ao longo do tempo de extração e à medida que a temperatura aumenta. Os valores de TPC e ORAC aumentam também ao longo do tempo no entanto obtêm-se valores superiores quando são usadas temperaturas mais baixas.

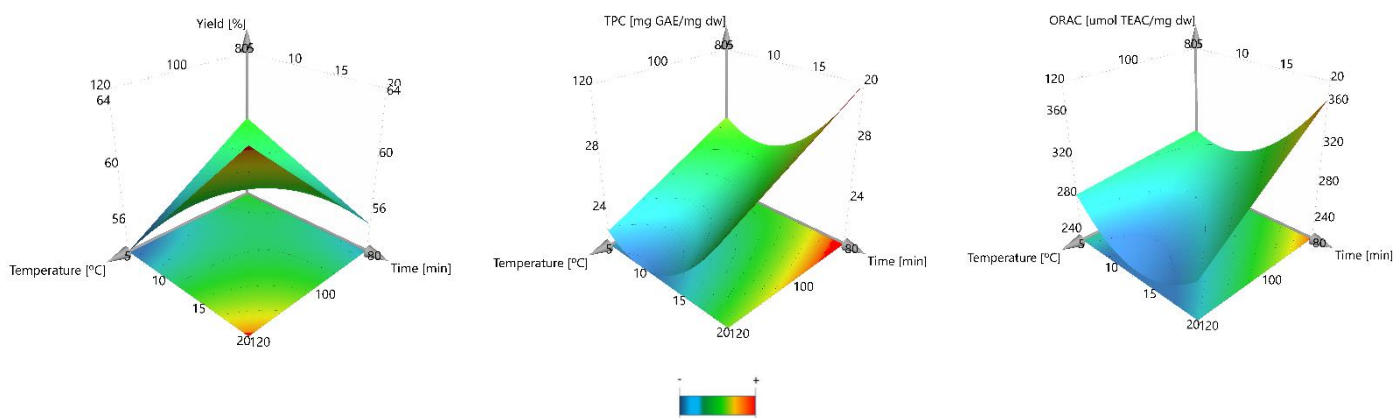


Figura 3.19 - Gráficos dos resultados do DOE, para as três respostas, com a percentagem de etanol constante, em função do tempo e da temperatura.

Ao estabilizar a temperatura, o rendimento de extração diminui com o aumento da quantidade de etanol utilizada. O mesmo acontece quando o tempo de reação é constante. Os valores de TPC e de ORAC aumentam com o aumento do uso de etanol quando a temperatura ou quando o tempo de extração são constantes. Para uma temperatura constante, os valores de conteúdo fenólico total e da capacidade antioxidante aumentam no decorrer da extração (*Figura 3.20*).

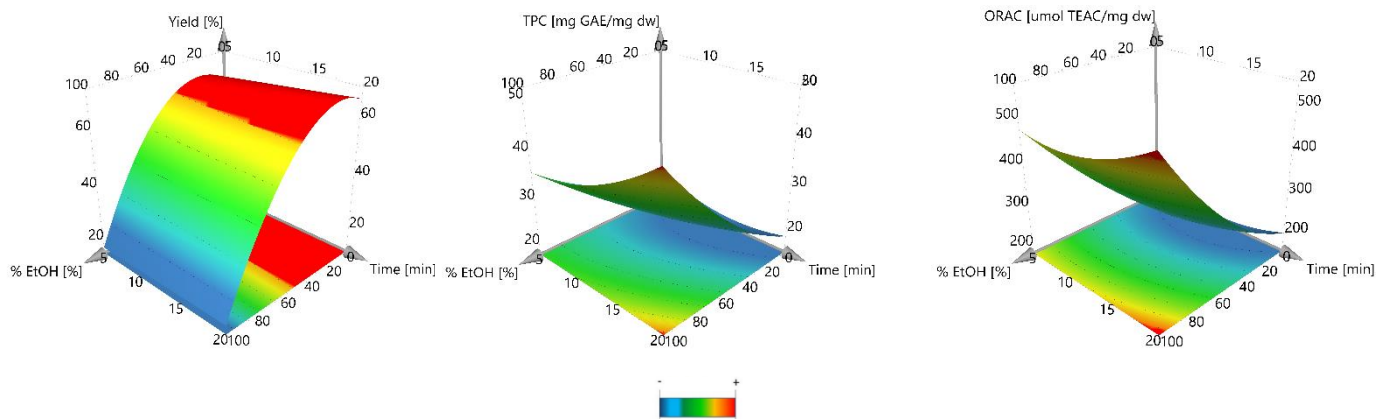


Figura 3.20 - Gráficos dos resultados do DOE, para as três respostas, com a temperatura constante, em função do tempo e da percentagem de etanol.

Para um tempo de extração constante, espera-se que o rendimento mássico seja elevado ao usar uma baixa percentagem de etanol, independentemente da temperatura usada. Os valores de TPC e ORAC aumentam com uma maior quantidade de etanol, obtendo-se valores mais elevados a temperaturas mais baixas (Figura 3.21).

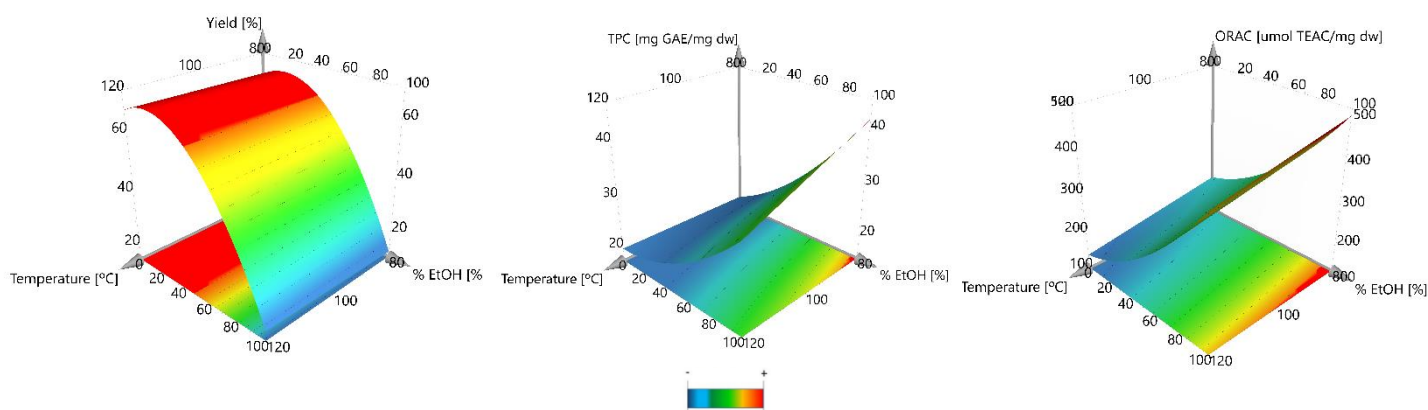


Figura 3.21 - Gráficos dos resultados do DOE, para as três respostas, com o tempo de extração constante, em função da percentagem de etanol e da temperatura.

Não sendo possível encontrar uma única condição para um extrato ótimo – um *sweet spot* - procuraram-se três condições que maximizassem simultaneamente:

- A – rendimento, TPC e ORAC;
- B – rendimento e TPC;
- C – rendimento e ORAC.

Escolheu-se maximizar estes três parâmetros de maneira a relacionar o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, e concluir se a capacidade antioxidante calculada provém unicamente dos compostos fenólicos na amostra, ou se há outros compostos que possam estar a causar interferência.

As condições de extração usadas, os resultados previstos e os resultados obtidos experimentalmente encontram-se na tabela abaixo. (*Tabela 3.11*)

Tendo em conta estes dados, conclui-se que, independentemente das condições usadas, o rendimento obtido é sempre semelhante. Ao maximizar o valor de conteúdo fenólico total, o valor de ORAC também aumenta, no entanto, ao maximizar este último, o valor de TPC é inferior ao obtido anteriormente. Tendo em conta que o rendimento das duas últimas extrações é quase idêntico, pode concluir-se que ao maximizar o valor de ORAC foram extraídos não só compostos fenólicos mas também outros compostos com atividade antioxidante.

Tabela 3.11 - Condições usadas nas extrações e comparação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo MODDE.

Respostas a maximizar	Condições usadas			Rendimento (%)		TPC (mg GAE/g extrato)		ORAC ($\mu\text{mol TEAC/g extrato}$)	
	T ($^{\circ}\text{C}$)	t (min.)	% EtOH	Previsto	Experimental	Previsto	Experimental	Previsto	Experimental
A	84.60	20	61	48.90	53.75 ± 4.59	34.59	23.63 ± 0.0012	392.97	279.98 ± 0.028
B	80.00	5	35	64.88	56.69 ± 0.26	24.28	30.76 ± 0.0016	256.85	334.42 ± 0.020
C	81.50	20	47	57.05	56.29 ± 6.58	30.09	29.11 ± 0.0014	349.41	410.56 ± 0.043

De modo a comparar os dados obtidos calculou-se o erro relativo entre os valores previstos pelo programa estatístico e os valores experimentais. (Tabela 3.12) Para tal, utilizaram-se as seguintes equações (118):

Equação 7 - Equação do cálculo do erro absoluto.

$$\text{Erro absoluto} = |\text{valor experimental} - \text{valor previsto}|$$

Equação 8 - Equação do cálculo do erro percentual relativo.

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{\text{erro absoluto}}{\text{valor experimental}} \times 100$$

Tabela 3.12 - Valores de erro relativo (%) entre os dados experimentais e os dados previstos.

Respostas a otimizar	Erro relativo (%)		
	Rendimento (%)	TPC (mg GAE/g extrato)	ORAC ($\mu\text{mol TEAC/g}$ extrato)
A	9.02	46.38	40.36
B	15.24	21.07	23.20
C	1.41	3.37	14.89

O erro relativo é maior quando se tentam maximizar as três respostas, o que explica a não existência de um *sweet spot*. Uma vez que o erro relativo ao maximizar o rendimento e o teor de conteúdo fenólico total é também elevado pode concluir-se que o modelo faz uma melhor previsão para a maximização do rendimento e da capacidade antioxidante. (Tabela 3.12)

De modo a identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos, estes foram analisados por HPLC-DAD, a 280 nm, juntamente com uma mistura de padrões de ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido cafeico e quercetina-3-O-glucosídeo, a isoquercitrina. O perfil cromatográfico dos 3 extratos é muito semelhante e, como tal, apresento apenas um deles na figura abaixo. (Figura 3.22)

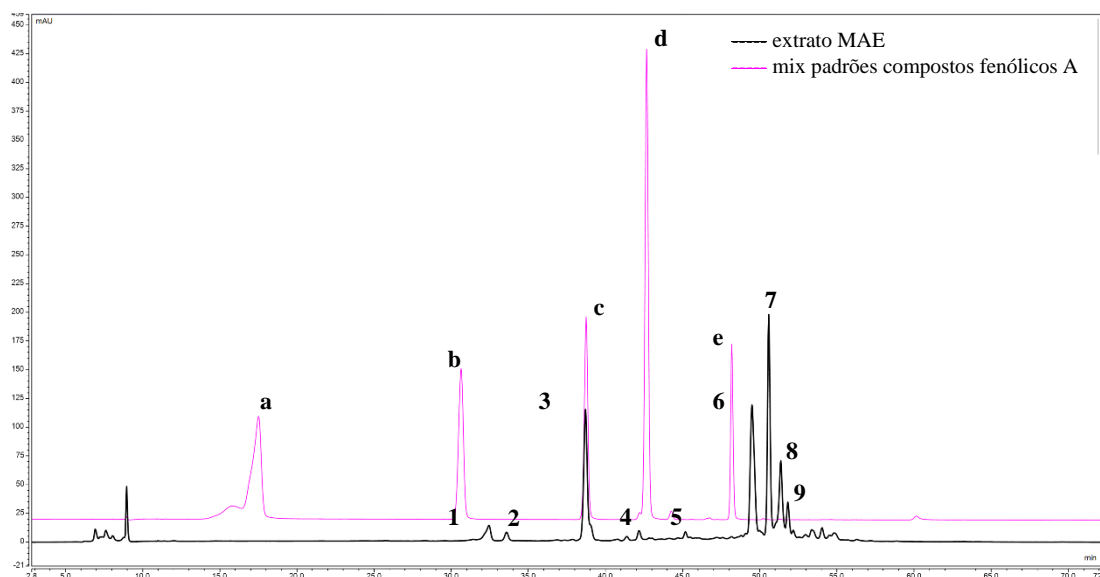


Figura 3.22 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de compostos fenólicos A (280 nm) (a – ácido gálico; b – ácido protocatecuico; c – ácido clorogénico; d – ácido cafeico; e – quercetina-3-glucósido).

Uma vez que o perfil cromatográfico do cromatograma é bastante semelhante ao do obtido através da análise do extrato da extração assistida por ultrassons, a identificação pode efetuar-se tendo por base esse, podendo assim concluir-se que os compostos extraídos são idênticos.

A quantificação dos compostos identificados foi realizada tendo em conta a área de cada um dos picos. (Tabela 3.13)

Tabela 3.13 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma obtido pela análise do extrato otimizado de MAE. Respetivos tempos de retenção, comprimentos de onda máximos de absorção e valores de concentração.

Pico	Possível identificação	t_r (min.)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Concentração extrato (mg composto/g extrato)		
				A	B	C
1	Ácido neoclorogénico**	32.44	325	0.497	0.424	0.446
2	Galocatequina**	33.59	278	0.184	0.172	0.186
3	Ácido clorogénico	38.70	326	3.386	2.792	3.204
4	Ácido ρ -cumaroilquínico**	42.17	320	0.162	0.148	0.158
5	Derivado de ácido ferúlico**	45.18	324	0.096	0.080	0.090
6	Quercetina (quercetina-3-glucósido)	49.50	327	7.826	5.149	6.146

7	Ácido 3,5-dicafeoilquínico*	50.58	328	4.166	2.279	2.645
8	Ácido 4,5-dicafeoilquínico*	51.36	328	1.339	0.995	1.321
9	Ácido cafeoilhidrocafeoilquínico*	51.82	329	0.258	0.093	0.264

*calculados em equivalentes de ácido gálico **calculados em equivalentes de ácido clorogénico

Foi também efetuada uma análise no HPLC para detetar carotenoides e clorofilas. A identificação dos carotenoides foi feita tendo por base uma mistura de padrões de luteína, zeaxantina, β -caroteno e apocarotenal – mix de padrões A. (Figura 3.23)

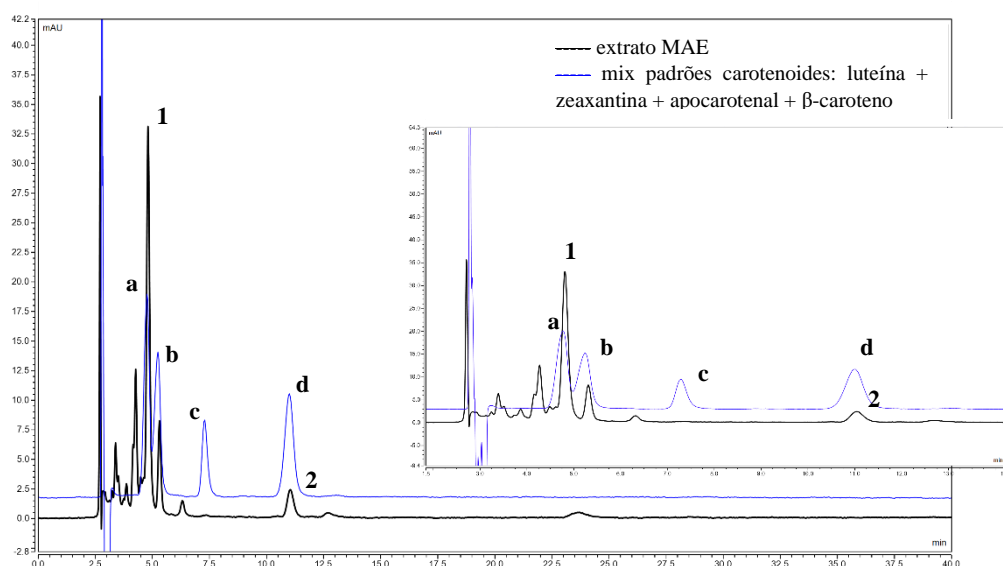


Figura 3.23 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de carotenoides e respetiva aproximação (450 nm) (a – luteína; b – zeaxantina; c – apocarotenal; d – β -caroteno) .

Tendo em conta os tempos de retenção dos compostos, conclui-se que apenas a luteína, a zeaxantina e o β -caroteno se encontram no extrato. No entanto, ao verificar que os máximos de absorção são diferentes, confirma-se que a zeaxantina não está presente no extrato da planta.

Com as equações da reta de calibração obtidas através da análise da mistura de padrões, foi possível calcular as concentrações dos carotenoides identificados, encontrando-se descritas na Tabela 3.14. Estes valores são bastante inferiores comparativamente aos calculados através dos métodos de extração anteriores.

Como referido anteriormente foram também identificadas as clorofilas presentes nos extratos. A análise foi realizada no HPLC, com detetor de arranjo de díodos, a 440 nm, juntamente com uma mistura de padrões de clorofilas para ser possível realizar a identificação destas no extrato. (Figura 3.24)

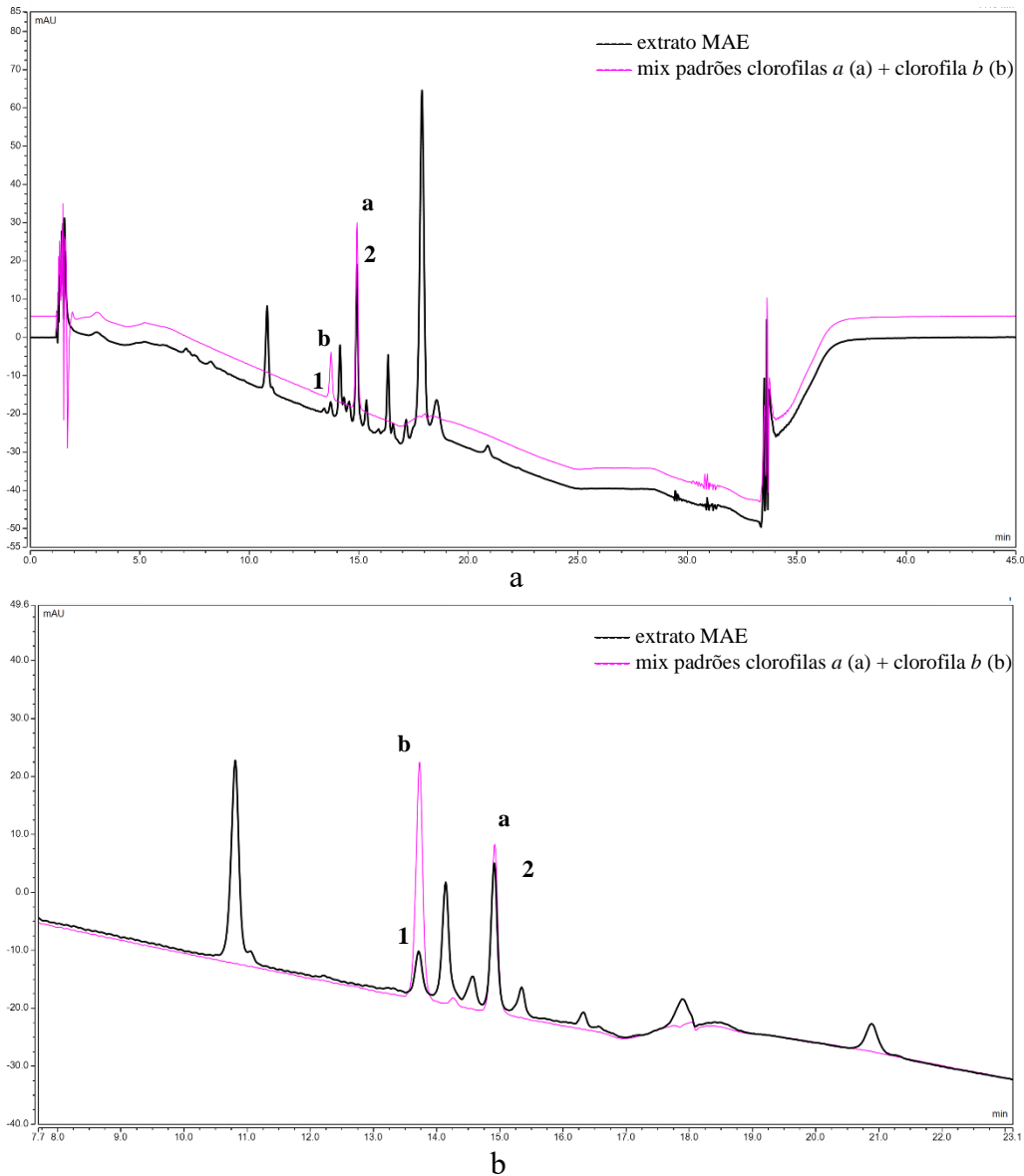


Figura 3.24 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato MAE e da mistura de padrões de clorofilas (a) e respetiva aproximação (b) (410 nm) (a – clorofila a; b – clorofila b).

Assim, através da comparação dos tempos de retenção, concluiu-se que também através desta extração é possível extrair e identificar as mesmas clorofilas que anteriormente, a clorofila *a* ($t_r=14.92$ min.) e a clorofila *b* ($t_r=13.73$ min.).

Tendo em conta a área dos picos do extratos, e através da reta de calibração foi também possível calcular a concentração das clorofilas presentes no extrato. (Tabela 3.14)

Na tabela abaixo foram reunidos todos os dados recolhidos ao analisar os extratos MAE obtidos com as condições otimizadas. (Tabela 3.14)

Tabela 3.14 - Dados de rendimento mássico, TPC, ORAC e concentrações de carotenoides e clorofilas relativos às extrações otimizadas de MAE.

Respostas a otimizar	Rendimento (%)	TPC (mg GAE/g extrato)	ORAC ($\mu\text{mol TEAC/g extrato}$)	Concentração carotenoides (mg composto/g extrato)	Concentração clorofilas (mg composto/g extrato)
A	53.75 \pm 4.59	23.64 \pm 0.0012	279.98 \pm 0.028	luteína – 0.0029 β -caroteno – n.i.	clorofila a – 0.0138 clorofila b – 0.0061
B	56.69 \pm 0.26	30.76 \pm 0.0016	334.42 \pm 0.020	luteína – 0.0329 β -caroteno – 0.0013	clorofila a – 0.1037 clorofila b – 0.0394
C	56.29 \pm 6.58	29.11 \pm 0.0014	410.56 \pm 0.043	luteína – 0.0194 β -caroteno – 0.0018	clorofila a – 0.0378 clorofila b – 0.0182

n.i. – não identificado

3.2. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes extrações

De modo a facilitar a comparação entre os três métodos de extração de compostos fenólicos utilizados, selecionaram-se os melhores extratos de cada uma das técnicas e reuniram-se na tabela abaixo os resultados obtidos ao longo deste trabalho (Tabela 3.15).

Uma vez que se comprovou a existência de uma correlação entre o teor de conteúdo fenólico total e a capacidade antioxidante, apenas se vão analisar e comparar os valores de rendimento e TPC.

Para as extrações Soxhlet e UAE utilizaram-se os dados obtidos anteriormente, e para a extração MAE se escolheu o extrato obtido com as condições para maximizar o rendimento e o TPC. (Tabela 3.4, Tabela 3.7, Tabela 3.11, Tabela 3.15)

Tabela 3.15 – Condições experimentais das diferentes extrações e respectivos dos valores de rendimento mássico e TPC obtidos.

Método de Extração	Condições				Rendimento (%)	TPC (mg GAE/g extrato)
	T (°C)	t (min.)	% EtOH	Ratio massa:solvente (g:mL)		
Soxhlet	~92	180	50	1:30	41.82 ± 7.34	29.44 ± 0.0016
UAE	25	60	80	1:50	49.76 ± 13.35	13.73 ± 0.003
MAE	80	5	35	1:30	56.69 ± 0.26	30.76 ± 0.0016

Cada uma destas técnicas atua de maneira diferente para extrair os compostos fenólicos, variando na fonte de energia usada e no mecanismo de extração (119).

Assim, é possível concluir que o rendimento de extração é a única resposta semelhante em todas as técnicas utilizadas.

A extração convencional é considerada bastante simples, extrai um elevado número de compostos fenólicos, no entanto utiliza solventes nocivos para o meio ambiente e possui um longo tempo de extração (102).

Os métodos de extração assistida por ultrassons e por microondas possuem bastantes semelhanças uma vez que ambas têm um tempo de extração mais curto do que o Soxhlet, contudo, o conteúdo fenólico extraído através da UAE é menor. Estas novas tecnologias são consideradas “verdes” e surgiram como alternativa às metodologias convencionais. A extração microondas é a mais eficiente das três, uma vez que os valores de rendimento mássico e de conteúdo fenólico total obtidos são bastante elevados para um tempo de extração tão curto. Segundo o que está descrito na literatura, estes resultados são os esperados (102,119,120).

Tendo em conta os resultados obtidos, o melhor método para extrair compostos fenólicos é a extração assistida por microondas, uma vez que é um método “verde”, não tendo muito impacto negativo no ambiente. Possui uma boa capacidade de extração de compostos fenólicos, não consome muito tempo e energia, e é um método relativamente fácil (88,102).

4. Conclusão

Esta dissertação teve como objetivo o estudo de uma das plantas halófitas mais encontrada em Portugal, a *Salicornia ramosissima*.

Ao caracterizar a composição química da planta, identificaram-se diversos compostos voláteis, maioritariamente alcanos, álcoois e também vários compostos conhecidos por fornecerem aromas característicos às plantas. Confirmou-se também a presença de ácidos gordos na planta que, segundo a literatura está relacionada com as suas propriedades benéficas para a saúde. Foram identificados e quantificados a luteína e o β -caroteno, carotenoides bastante conhecidos, e as clorofilas *a* e *b*. A planta possui também na sua composição diversos compostos fenólicos, compostos aos quais se deu mais destaque ao longo de todo o trabalho. Estes são compostos antioxidantes também com variados benefícios para a saúde humana. Foram encontrados mais de 10 compostos fenólicos, entre os quais ácidos hidroxicinâmicos, polifenóis e ácidos hidroxidicarboxílicos. Os maioritariamente presentes são o ácido clorogénico e a quercetina-3-glucósido, que possuem propriedades anti-inflamatórias, antidiabéticas, antivirais, antioxidantes, entre outras. A presença destes compostos e estas suas conhecidas características justificam os valores obtidos relativamente ao conteúdo fenólico total (TPC) e à sua capacidade antioxidante (ORAC).

Sendo a química verde e a sustentabilidade temas cada vez mais importantes na sociedade, foram também estudadas técnicas inovadoras consideradas “amigas do ambiente”. Deste modo, fez-se uma comparação entre os dados obtidos ao extrair compostos fenólicos com técnicas verdes – UAE e MAE – e ainda com uma técnica convencional, o Soxhlet. Através desta comparação, foi possível concluir que a melhor extração é a extração assistida por microondas, uma vez que se obtêm os valores mais elevados de rendimento mássico e conteúdo fenólico total e, comparativamente aos outros métodos, utiliza uma baixa quantidade de solventes e um curto tempo de extração. Concluiu-se também que o tamanho da partícula influencia o rendimento mássico e, portanto, a eficácia da extração. Quanto menor o tamanho das partículas, maior a área de superfície em contacto com o solvente e melhor é a extração.

Em suma, pode afirmar-se que os objetivos desta dissertação foram atingidos. Foi possível caracterizar a planta e extrair, usando diferentes técnicas, compostos bioativos. Os resultados obtidos demonstram que a *Salicornia ramosissima* é uma planta de bastante interesse, devido não só aos componentes que fazem parte da sua constituição e a tornam

um produto benéfico para a saúde humana, mas também à possibilidade de esta se tornar uma alternativa ao uso de sal convencional na alimentação.

5. Bibliografia

1. Holguin Peña RJ, Medina Hernández D, Ghasemi M, Rueda Puente EO. Salt tolerant plants as a valuable resource for sustainable food production in arid and saline coastal zones. *Acta Biol Colomb.* 2021;26(1):116–26.
2. Yensen NP. Halophyte uses for the twenty-first century. Khan MA Weber DJ (eds), *Ecophysiol High Salin Toler Plants Chapter 23*, Springer Sci Media BV, 2008;367–96.
3. Ventura Y, Wuddineh WA, Myrzabayeva M, Alikulov Z, Khozin-Goldberg I, Shpigel M, et al. Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2011;128(3):189–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.001>
4. Costa JC. Tipos de vegetação e adaptações das plantas do litoral de Portugal continental. *Homenagem (in Honor Profr Doutor Soares Carvalho.* 2001;283–99. Available from: http://www.isa.utl.pt/files/pub/ensino/cdocente/Adaptacoes_Plantas.pdf
5. Raquel A, Teixeira G. SALICÓRNIA – O “SAL VERDE” AMIGO DO CORAÇÃO. *Aplicação prática em sopas.* Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia; 2019.
6. Patel S. *Salicornia*: Evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech.* 2016;6(1):1–10.
7. Lopes M, Roque MJ, Cavaleiro C, Ramos F. Nutrient value of *Salicornia ramosissima* — A green extraction process for mineral analysis. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2021;104.
8. Lopes M, Cavaleiro C, Ramos F. Sodium Reduction in Bread: A Role for Glasswort (*Salicornia ramosissima* J. Woods). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2017;16(5):1056–71.
9. Padalino L, Costa C, Del Nobile MA, Conte A. Extract of *Salicornia europaea* in fresh pasta to enhance phenolic compounds and antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technol.* 2019;54(11):3051–7.
10. Silva AM, Pinto D, Moreira MM, Grosso C, Delerue-matos C, Rodrigues F, et al. *Salicornia ramosissima* Bioactive Composition and Safety : Eco-Friendly Extractions Approach (Microwave-Assisted Extraction vs . Conventional

- Maceration). *Applied Sciences*. 2021;11(11).
11. Isca VMS, Seca AML, Pinto DCGA, Silva H, Silva AMS. Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry*. 2014;165:330–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.117>
 12. Jimenez-Lopez C, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, Garcia-Oliveira P, Cassani L, Fraga-Corral M, et al. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chemistry*. 2021;341.
 13. Tuberoso CIG, Orrù CD. Phenolic compounds in food. *Progress in Food Chemistry*. 2008;(4):1–45.
 14. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013;18(2):2328–75.
 15. Lopes M, Sanches-Silva A, Castilho M, Cavaleiro C, Ramos F. Halophytes as source of bioactive phenolic compounds and their potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021.
 16. Korzeniowska K, Łęska B, Wieczorek PP. Isolation and determination of phenolic compounds from freshwater *Cladophora glomerata*. Vol. 48, *Algal Research*. 2020.
 17. Pagano I, Campone L, Celano R, Piccinelli AL, Rastrelli L, Lisa A, et al. Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. *Journal of Chromatography A*. 2021;1651:462295. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462295>
 18. Mussatto SI. Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin. *Coffee in Health and Disease Prevention*. 2015. 93–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00011-5>
 19. Danielsen SPO, Beech HK, Wang S, El-zaatari BM, Wang X, Sapir L, et al. Molecular Characterization of Polymer Networks Molecular Characterization of Polymer Networks. 2021.
 20. Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2383–9.
 21. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Vol. 13, *Chinese Medicine*. 2018.
 22. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2015;71:100–9.

23. Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2012;53:10–23.
24. Kwiatkowska B, Bennett J, Akunna J, Walker GM, Bremner DH. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):768–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000814>
25. Picot-Allain C, Mahomoodally MF, Ak G, Zengin G. Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*. 2021;40:144–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>
26. Llompart M, Garcia-Jares C, Celeiro M, Dagnac T. Extraction | Microwave-Assisted Extraction 3rd ed. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2019. 67–77 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14442-7>
27. Gomez L, Tiwari B, Garcia-vaquero M. Emerging extraction techniques: Microwave-assisted extraction. *Sustainable Seaweed Technologies*. 2020. 207–224 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00008-1>
28. Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017;97:159–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
29. Hewavitharana GG, Perera DN, Navaratne SB, Wickramasinghe I. Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(8):6865–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.06.039>
30. Esquivel-Hernández D, Ibarra-Garza I, Rodríguez J, Cuéllar-Bermúdez S, Rostro-Alanis M, Alemán-Nava G, et al. Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2016;
31. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*. 2007;1(1):7–18.
32. Rodsamran P, Sothornvit R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. Vol. 28, *Food Bioscience*. 2019. 66–73.

33. Folayan AJ, Anawe PAL, Ayeni AO. Synthesis and characterization of *Salicornia bigelovii* and *Salicornia brachiata* halophytic plants oil extracted by supercritical CO₂ modified with ethanol for biodiesel production via enzymatic transesterification reaction using immobilized *Candida antarctica*. *Cogent Engineering*. 2019;6(1):1–21.
34. Hussain S. Enhanced Oil Recovery Using Supercritical Carbon Dioxide With and Without Co-solvents. *International Journal of Petroleum and Gas Engineering*. 2014;2(1):1–12. Available from: <http://acascipub.com/Journals.php>
35. Waters. Waters - SFE Extraction Equipment. [cited 2022 Oct 17]. p. 1. Available from: https://legacy-stage.waters.com/waters/en_US/SFE-extraction-equipment/nav.htm?locale=en_US&cid=134614431
36. Mendiola JA, Herrero M, Castro-Puyana M, Ibáñez E. Supercritical fluid extraction. *RSC Green Chemistry*. 2013;196–230.
37. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:218–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007>
38. Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*. 2013;5(21):5990–9.
39. Veber J, Petrini LA, Andrade LB, Siviero J. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2015;17(2):267–73.
40. Pires JS, Torres PB, Santos DYAC, Chow F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. *Inst Biociências, Univ São Paulo*. 2017;A–5. Available from: http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=73&Itemid=98
41. Lamuela-Raventós RM. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. 2017;107–15.

42. Harris D. Quantitative Chemical Analysis. 8th ed. LTC; 2010. 719 p.
43. Shoog DA, West DM. Fundamentals of analytical chemistry. 9th ed. Cengage Learning; 1976. 958 p.
44. Técnicas de detecção de matriz de diodo | Serviços de contrato de métricas. [cited 2021 Jun 16]. Available from:
<https://www.metricscontractservices.com/resource/diode-array-detection-used-to-identify-peaks-in-chromatography/>
45. Bueno-Herrera M, Pérez-Magariño S. Validation of an extraction method for the quantification of soluble free and insoluble bound phenolic compounds in wheat by HPLC-DAD. Vol. 93, Journal of Cereal Science. 2020.
46. Silveira A. Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia. Instituto Politécnico de Castelo Branco - Escola Superior Agrária; 2013.
47. Yao L, Jiang Y, Datta N, Singanusong R, Liu X. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. 2004;84:253–63.
48. Mukherjee PK. LC–MS: A Rapid Technique for Understanding the Plant Metabolite Analysis. In: Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs. 2019. 459–79.
49. Tilvi S, Majik MS, Singh KS. Mass spectrometry for determination of bioactive compounds. In: Comprehensive Analytical Chemistry. 2014. 193–218. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63359-0.00008-2>
50. Alves CQ, Química I De, Federal U, Ondina C, Ba S, David JPJMJP, et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Quim Nov. 2010;33(10):2202–10.
51. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(16):4437–44.
52. BMG LABTECH. ORAC assay measures antioxidant capacity | BMG LABTECH. [cited 2021 Jul 6]. Available from:
<https://www.bmglabtech.com/pt/orac-assay-measures-antioxidant-capacity/>
53. Oliveira-alves SC, Andrade F, Prazeres I, Silva AB, Capelo J, Duarte B, et al. Impact of drying processes on the nutritional composition, volatile profile,

- phytochemical content and bioactivity of *salicornia ramosissima* j. Woods. *Antioxidants*. 2021;10(8):1–33.
54. Andrade F. Estudo de plantas halófitas produzidas em Portugal. Vol. 1, Tesis. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2021.
 55. Du Y, Zhang M, Mujumdar AS, Liu W, Yang C. Innovative applications of freeze-drying to produce compound formula instant foods: A review. *Drying Technology*. 2021.
 56. Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS. Lyophilization / Freeze-Drying - A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;4(8):516–43.
 57. Bhatta S, Stevanovic Janezic T, Ratti C. Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Foods*. 2020; 9(1):87. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/1/87>
 58. Bligh, E.G. and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(8).
 59. Raczyk M, Rudzińska M. Analysis of plant lipids. *Plant Lipids Science*. 2015;661(2):221–38.
 60. Navigato T, Masci M, Orban E, Di Lena G, Casini I, Caproni R. Analysis of fatty acids in 12 mediterranean fish species: Advantages and limitations of a new GC-FID/GC-MS based technique. *Lipids*. 2012;47(7):741–53.
 61. Antunes MD, Gago C, Guerreiro A, Sousa AR, Julião M, Miguel MG, et al. Nutritional characterization and storage ability of *salicornia ramosissima* and *sarcocornia perennis* for fresh vegetable salads. Vol. 7, *Horticulturae*. 2021.1–12.
 62. Lima AR, Castañeda-Loaiza V, Salazar M, Nunes C, Quintas C, Gama F, et al. Influence of cultivation salinity in the nutritional composition, antioxidant capacity and microbial quality of *Salicornia ramosissima* commercially produced in soilless systems. *Food Chemistry*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127525>
 63. Fitzner M, Fricke A, Schreiner M, Baldermann S. Utilization of regional natural brines for the indoor cultivation of *salicornia europaea*. Vol. 13, *Sustainability*. 2021.
 64. Souza MM, Mendes CR, Doncato KB, Eliana B-F, Costa C. Growth, Phenolics, Photosynthetic Pigments, and Antioxidant Response of Two New Genotypes of Sea Asparagus (*Salicornia neei* Lag.) to Salinity under Greenhouse and Field Conditions. *agriculture*. 2018;8:115.

65. Dinakaran SK, Chelle S, Avasarala H. Profiling and determination of phenolic compounds in poly herbal formulations and their comparative evaluation. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2019;9(4):319–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.12.001>
66. Arena R, Manuguerra S, Collins E, Mahdhi A, Renda G, Messina CM, et al. Antioxidant properties of a supercritical fluid extract of the halophyte *Mesembryanthemum nodiflorum* L. from sicilian coasts: Nutraceutical and cosmeceutical applications. *Applied Sciences*. 2020;10(7).
67. Messina CM, Troia A, Arena R, Manuguerra S, Ioannou T, Curcuraci E, et al. Species-specific antioxidant power and bioactive properties of the extracts obtained from wild mediterranean *Calendula* Spp. (Asteraceae). *Applied Sciences*. 2019;9(21):1–13.
68. Anaëlle T, Serrano Leon E, Laurent V, Elena I, Mendiola JA, Stéphane C, et al. Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta*. 2013;104:44–52.
69. Justo OR, Moraes ÂM, Barreto GPDM, Mercadante AZ, Rosa PDTV. Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Quimica Nova*. 2008;31(7):1699–705.
70. Gourguillon L, Lesellier E, Lobstein A. Optimization of bioactive phenolic compounds extraction by modified supercritical fluid. *Planta Medica*. 2015;81(16).
71. Cristina C, Lucia P, Sara S, Francesco S, Nobile Matteo Alessandro D, Amalia C. Study of the Efficacy of Two Extraction Techniques from *Crithmum maritimum* and *Salicornia europaea*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2018;6(7):456–63.
72. Heffernan N, Smyth TJ, FitzGerald RJ, Vila-Soler A, Mendiola J, Ibáñez E, et al. Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2016;37:221–8.
73. Pinto D, Cádiz-Gurrea M de la L, Sut S, Ferreira A, Leyva-jimenez FJ, Dall'Acqua S, et al. Valorisation of underexploited *Castanea sativa* shells bioactive compounds recovered by supercritical fluid extraction with CO₂: A response surface methodology approach. 2020;40.
74. Yuan Y, Zhang J, Fan J, Clark J, Shen P, Li Y, et al. Microwave assisted

- extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. *Food Research International*. 2018;
75. Kutlu N, Isci A, Sakiyan O, Yilmaz AE. Extraction of Phenolic Compounds from Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Using Microwave and Ohmic Heating Assisted Microwave Methods. Vol. 14, *Food and Bioprocess Technology*. 2021. 650–64.
 76. Magnusson M, Yuen AKL, Zhang R, Wright JT, Taylor RB, Maschmeyer T, et al. A comparative assessment of microwave assisted (MAE) and conventional solid-liquid (SLE) techniques for the extraction of phloroglucinol from brown seaweed. *Algal Research*.. 2017;23:28–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.002>
 77. Matešić N, Jurina T, Benković M, Panić M, Valinger D, Gajdoš Kljusurić J, et al. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Cannabis sativa* L.: optimization and kinetics study. Vol. 56, *Separation Science and Technology (Philadelphia)*. 2021. p. 2047–60.
 78. Bianchi A, Sanz V, Domínguez H, Torres MD. Valorisation of the industrial hybrid carrageenan extraction wastes using eco-friendly treatments. *Food Hydrocolloids*. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107070>
 79. Shanmugam M, Ganesam AR, Rajauria G. Extraction Technologies to Recover Dietary Polyphenols from Macro-and Microalgae. In: Rajauria G, Yuan Y V., editors. *Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing: Food and Health Perspectives*. first. John Wiley and Sons Ltd; 2021.
 80. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313–52.
 81. Boutaoui N, Zaiter L, Benayache F, Benayache S, Cacciagrano F, Cesa S, et al. *Atriplex mollis* Desf. Aerial Parts_ Extraction Procedures, Secondary Metabolites and Color Analysis.pdf. *molecules*. 2018;23.
 82. Rajabi HR, Naghiha R, Kheirizadeh M, Sadatfaraji H, Mirzaei A, Alvand ZM. Microwave assisted extraction as an efficient approach for biosynthesis of zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, and biological properties. *Materials Science and Engineering C*. 2017;78:1109–18. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.090>
83. Jitan S Al, Alkhoodi S, Ochsenkuhn M, Amin SA, Yousef LF. Ethanol/water extracts from halophyte species *Arthrocnemum macrostachyum* and *Tetraena qatarensis*.pdf. *Cogent Chemistry*. 2018;4.
 84. Farzaneh V, Carvalho I. Modelling of Microwave Assisted Extraction (MAE) of Anthocyanins (TMA). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2017;
 85. Gn A, Mv P, Sanjay P. Microwave assisted extraction of anthocyanin from *Hibiscus rosa-sinensis*. *Phytopathology*. 2020;9(2):1418–24.
 86. Dang TT, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett CJ. Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga *Sargassum vestitum*. *Separation Science and Technology*. 2018;53(11):1711–23. Available from:
<https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1414845>
 87. Li Z, Wang B, Zhang Q, Qu Y, Xu H, Li G. Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. *Journal of Applied Phycology*. 2012;24(6):1527–36.
 88. Garcia-Vaquero M, Ummat V, Tiwari B, Rajauria G. Exploring Ultrasound, Microwave and Ultrasound-Microwave Assisted Extraction Technologies to Increase the Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidants from Brown Macroalgae. *Mar Drugs*. 2020;18.
 89. Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 1959;10(1):63–8.
 90. Serra AT, Duarte RO, Bronze MR, Duarte CMM. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*. 2011;125(2):318–25. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.088>
 91. Mzoughi Z, Chahdoura H, Chakroun Y, Cámara M, Fernández-Ruiz V, Morales P, et al. Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. *Food Research International*. 2019;119(October 2018):612–21. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.039>
 92. Baum SJ, Kris-Etherton PM, Willett WC, Lichtenstein AH, Rudel LL, Maki KC,

- et al. Fatty acids in cardiovascular health and disease: A comprehensive update. *Journal of Clinical Lipidology*. 2012;6(3):216–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacl.2012.04.077>
93. Barreira L, Resek E, Rodrigues MJ, Rocha MI, Pereira H, Bandarra N, et al. Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits? *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017;59:35–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.003>
 94. Maciel E, Lillebø A, Domingues P, da Costa E, Calado R, Domingues MRM. Polar lipidome profiling of *Salicornia ramosissima* and *Halimione portulacoides* and the relevance of lipidomics for the valorization of halophytes. *Phytochemistry*. 2018;153(May):94–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.015>
 95. Mishra A, Patel MK, Jha B. Non-targeted metabolomics and scavenging activity of reactive oxygen species reveal the potential of *Salicornia brachiata* as a functional food. *Journal of Functional Foods*. 2015;13:21–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.027>
 96. Vizetto-Duarte C, Figueiredo F, Rodrigues MJ, Polo C, Resek E, Custódio L. Sustainable Valorization of Halophytes from the Mediterranean Area: A Comprehensive Evaluation of Their Fatty Acid Profile and Implications for Human and Animal Nutrition. *Sustainability*. 2019;11.
 97. Jagtap SS, Awhad RB, Santosh B, Vidyasagar PB. Effects of clinorotation on growth and chlorophyll content of rice seeds. *Microgravity Sci Technol*. 2011;23(1):41–8.
 98. Dere Ş, Güneş T, Sivaci R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total caretenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*. 1998;22(1):13–6. Available from: <http://journals.tubitak.gov.tr/botany/issues/bot-98-22-1/bot-22-1-3-96040.pdf>
 99. Lewis MR, Ulloa O, Platt T. Photosynthetic action, absorption, and quantum yield spectra for a natural population of *Oscillatoria* in the North Atlantic. *Limnol Oceanogr*. 1988;33(1):92–8.
 100. Daffodil ED, Rajalakshmi K, Mohan VR. Antioxidant Activity , Total Phenolics and Flavonoids of *Salicornia Brachiata* Roxb . Leaf Extracts (Chenopodiaceae). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;2(1):352–66.
 101. Significance C, Ferreira ICFR. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives :

- Future Perspectives , a Review. 2017;
102. Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Nature Product Communications*. 2022;17(1):1934578X2110697. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X211069721>
 103. Gouda MS, Elsebaie EM. Glasswort (*Salicornia* spp) As A Source of Bioactive Compounds and Its Health Benefits: A Review. *Alexandria Journal of Food Sciences and Technology*. 2016;13(1):1–8.
 104. Navarro-Orcajada S, Matencio A, Vicente-Herrero C, García-Carmona F, López-Nicolás JM. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid. *Scientific Reports*. 2021 Dec 8;11(1):3275. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-021-82915-9>
 105. Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*. 2006;67(17):1849–55.
 106. Li D, Rui Y xin, Guo S duo, Luan F, Liu R, Zeng N. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sciences*. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119921>
 107. Di Petrillo A, Orrù G, Fais A, Fantini MC. Quercetin and its derivates as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytherapy Research*. 2022;36(1):266–78.
 108. Singh P, Arif Y, Bajguz A, Hayat S. The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021;166:10–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
 109. Ziani BEC, Barros L, Boumehira AZ, Bachari K, Heleno SA, Alves MJ, et al. Profiling polyphenol composition by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ and the antibacterial activity of infusion preparations obtained from four medicinal plants. *Food and Function*. 2018;9(1):149–59.
 110. Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Medina-Remón A, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2010 Sep 22;24(20):2986–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.4731>

111. Surget G, Stiger-Pouvreau V, Le Lann K, Kervarec N, Couteau C, Coiffard LJM, et al. Structural elucidation, in vitro antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015;143:52–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.018>
112. Oliveira-Alves SC, Vendramini-Costa DB, Betim Cazarin CB, Maróstica Júnior MR, Borges Ferreira JP, Silva AB, et al. Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*. 2017;232:295–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.002>
113. Alves-Silva JM, Guerra I, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Figueirinha A, et al. Chemical composition of *Crithmum maritimum* L. essential oil and hydrodistillation residual water by GC-MS and HPLC-DAD-MS/MS, and their biological activities. *Industrial Crops and Production*. 2020;149:112329. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112329>
114. Tukey JW. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*. 1949 Jun;5(2):99. Available from: <https://www.jstor.org/stable/3001913?origin=crossref>
115. Pinto D, Reis J, Silva AM, Salazar M, Dall'Acqua S, Delerue-Matos C, et al. Valorisation of *Salicornia ramosissima* biowaste by a green approach – An optimizing study using response surface methodology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2021;24(October):100548. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100548>
116. Soud A, Bellani L, Magné C, Zorrig W, Smaoui A, Abdelly C, et al. Physiological and antioxidant responses of the sabkha biotope halophyte *Limonium delicatulum* to seasonal changes in environmental conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;123(December 2017):180–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.008>
117. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(5):1768–74.
118. Glen S. Relative Error: Definition, Formula, Examples. *StatisticsHowTo.com: Elementary Statistics for the rest of us!* [cited 2022 Oct 6]. Available from:

<https://www.statisticshowto.com/relative-error/>

119. Getachew AT, Jacobsen C, Holdt SL. Emerging Technologies for the Extraction of Marine Phenolics: Opportunities and Challenges. *Marine Drugs*. 2020 Jul 27;18(8):389. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/8/389>
120. da Rosa GS, Vanga SK, Garipey Y, Raghavan V. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2019;58(May 2018):102234. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234>

6. Anexos

Anexo 6.1 - Atribuição dos diferentes picos do cromatograma obtido por GC-MS e respetiva área.

	t _r (min.)	Área do pico (%)	Nome composto
1	10.793	0.75	3-etil-2-metilheptano
2	11.048	0.10	1-(4-Hidroxifenil)propano-1,2-diol
3	11.207	0.09	1-propanol
4	11.268	0.44	1-heptanol
5	11.532	1.08	1-octen-3-ol
6	11.848	0.47	2-pentilfurano
7	12.155	4.07	Decano
8	12.325	10.72	Octametilciclotetrasiloxano
9	12.466	1.81	5-etil-2-metilheptano
10	12.610	2.26	5-etil-2-metilheptano
11	12.878	0.63	2,6-dimetiloct-7-eno
12	13.057	0.31	Limoneno / 1-metil-4-prop-1-en-2-ilciclohexeno
13	13.214	4.36	2-etilhexan-1-ol
14	13.633	0.28	7-metilundec-1-eno
15	13.681	0.51	cis-2-Metil-4-deceno
16	14.124	0.36	Undecano
17	14.588	3.28	3,5-octadien-2-ona
18	14.822	1.68	cis-3-Hexadeceno
19	14.994	6.28	Fenchone; 1,3,3-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ona
20	15.511	0.37	2-bromooctano
21	15.648	8.17	3,4-Dimetilciclohexanol
22	15.846	0.24	1,3,3-trimetil-2-norbornanol
23	16.217	0.18	
24	16.587	0.95	Hexadecanohidrazida
25	16.769	2.9	Cânfora / 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ona
26	17.134	0.88	3,4,8 - trimetil-2-nonenal
27	17.259	0.04	3,6 - dimetildecano
28	17.384	6.35	Decametilciclopentasiloxano
29	17.503	0.11	Borneol / 1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol
30	17.719	9.55	Mentol / 2-Isopropil-5-metilciclohexanol
31	18.572	8.13	Tridecano
32	18.811	0.38	Verbena / 4,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona,
33	19.134	0.81	β-ciclocitral
34	19.874	0.45	4,6 - dimetildodecano
35	20.113	2.03	1,3-ditert-butilbenzeno
36	21.040	2.05	Acetate de isononila
37	21.421	3.26	Heptadecano
38	21.505	0.28	2-undecanol
39	21.591	0.78	1-Tridecanol
40	21.825	0.78	Tridecil éster
41	22.002	0.14	Isocetano; 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano
42	22.053	0.47	2-isopropil-5-metil-1-heptanol
43	22.290	6.32	1,2-Bis(.gamma.-trimethylsilylpropoxy)ethane
44	24.106	0.46	Pentadecano
45	24.649	0.15	Tetradecametilhexasiloxano
46	26.275	1.21	β-ionona / 3-Buten-2-ona, 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)
47	26.462	0.30	Valencene

48	26.680	2.58	Tetraquis (trimetilsililoxi) silano / 1,1,1,5,5,5-hexametil-3,3-bis[(trimetilsilil)oxi]- trisiloxano
49	30.618	0.20	Silicate anion tetramer

Anexo 6.2 - Compostos e tempos de retenção presentes na mistura de padrões de compostos fenólicos A.

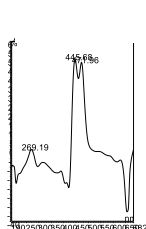
Composto	t _r (min.)
Ácido gálico	17.512
Ácido protocatecuico	30.640
Ácido clorogénico	38.745
Ácido cafeico	42.667
Quercetina (quercetina-3-glucósido)	48.183

Anexo 6.3 - Valores de massa molecular, tempo de retenção e fragmentos de massa dos compostos na mistura de padrões de compostos fenólicos B.

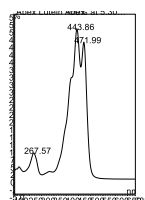
Composto	MM	t _r (min.)	ESI- (m/z)	ESI+ (m/z)
Cianidina 3-O-rutinoside	595	46.18	-----	595
Luteolina	286	48.37	285	-----
Apigenina	270	50.48	-----	271
Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico	238	58.05	-----	239
Vanilina	152	46.19	-----	153
Hesperidina	610	49.39	609	-----
(-)Galocatequina galato	458	42.92	457	-----
7-glucósido da luteolina (cinarosídeo)	448	47.94	447	-----
(-)Galato de catequina	442	47.49	441	-----
Ácido clorogénico	354	36.54	353	-----
Quercetina	302	49.41	301	-----
Catequina	290	34.82	-----	291
Floretina	274	62.11	273	-----
Ácido ferúlico	194	48.52	-----	195
Ácido cítrico	192	8.46	191	-----
Ácido cafeico	180	39.40	179	-----
Ácido o-cumárico	164	51.91	163	-----
Ácido cinâmico	148	61.31	-----	149
Ácido m-Hidroxibenzóico	138	39.69	137	-----
Ácido Succínico	118	9.21+11.31	117	-----

Anexo 6.4 - Valores de massa molecular, tempo de retenção e fragmentos de massa dos compostos na mistura de padrões de compostos fenólicos C.

Composto	MM	t _r (min.) padrões	ESI- (m/z)	ESI+ (m/z)
(-) Epicatequina	290	39.78	-----	291
Pelargonina	595	36.15	-----	
Mirecetina	318	46.88	-----	319
Kaempferol	286	48.21	-----	287
Naringenina	272	63.45	-----	273
Siringaldeído	182	47.69	-----	183
Ácido benzóico	122	47.60	-----	123
Spiraeoside	464	50.80	463	-----
Rutina	610	46.19	609	-----
(-)Epigallocatequina galato	458	40.79	457	-----
Quercitrina	448	49.92	447	-----
(-)Epicatequina galato	442	46.65	441	-----
Florizina	436	50.73	435	-----
(-)Epigallocatequina	306	40.90	305	-----
(-) Epicatequina***	290	39.75	289	-----
Genisteína	270	65.27	269	-----
Ácido quínico	192	7.78	191	-----
Ácido gálico	170	14.61	169	-----
Ácido p-cumárico	164	46.50	163	-----
Ácido m-cumárico	164	49.16	163	-----
Ácido protocatecuico	154	25.86	153	-----
Ácido p-hidroxibenzóico	138	35.17	137	-----



a
445.68 471.96

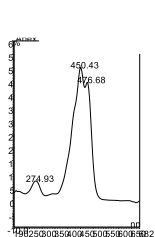


b
443.86 471.99

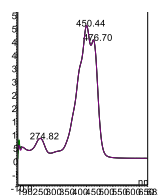
269.19

267.57

Anexo 6.5 - Comparação entre os espectros de absorção relativos ao pico da luteína na amostra (a) e no padrão (b).

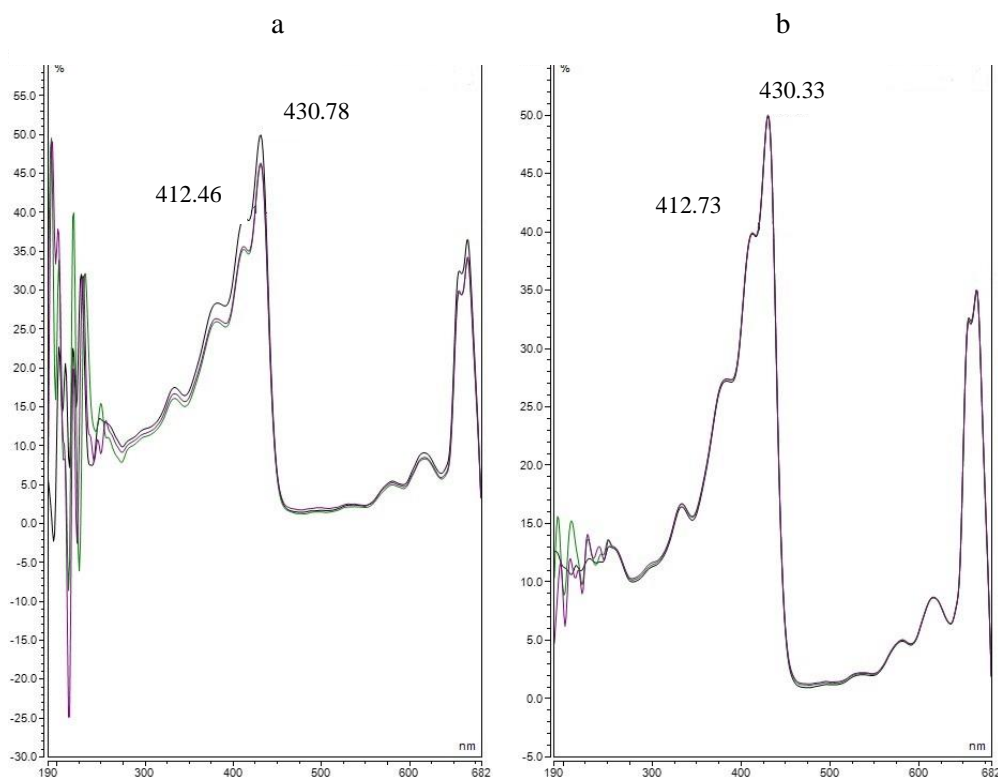


a
450.43
476.68
274.93

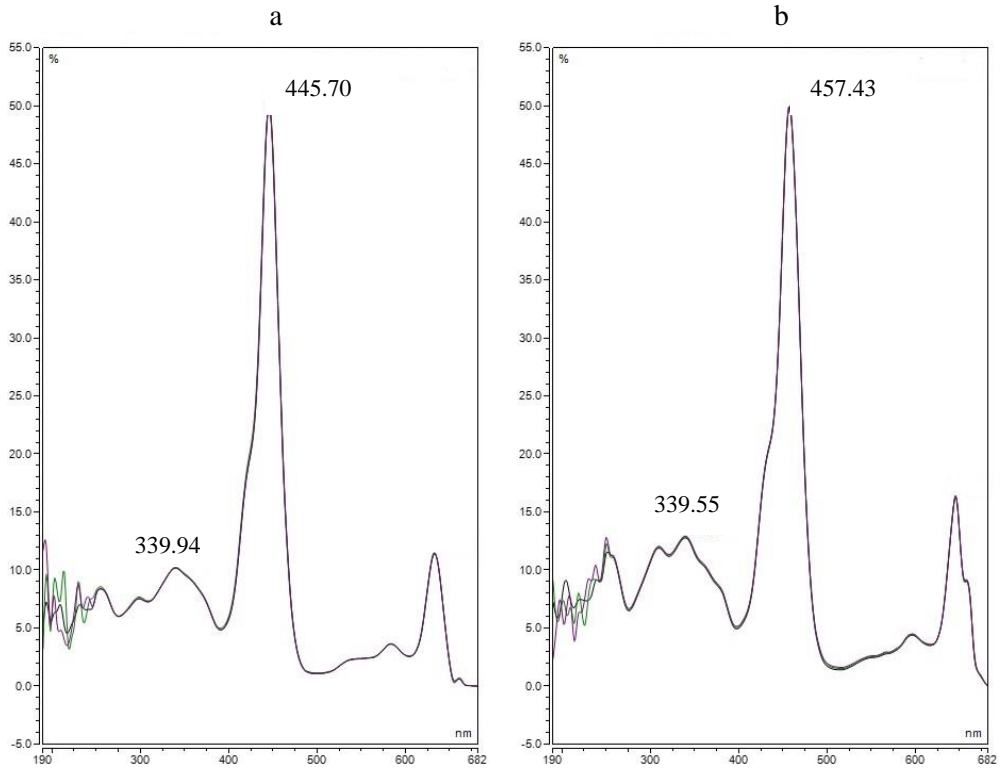


b
450.44
476.70
274.82

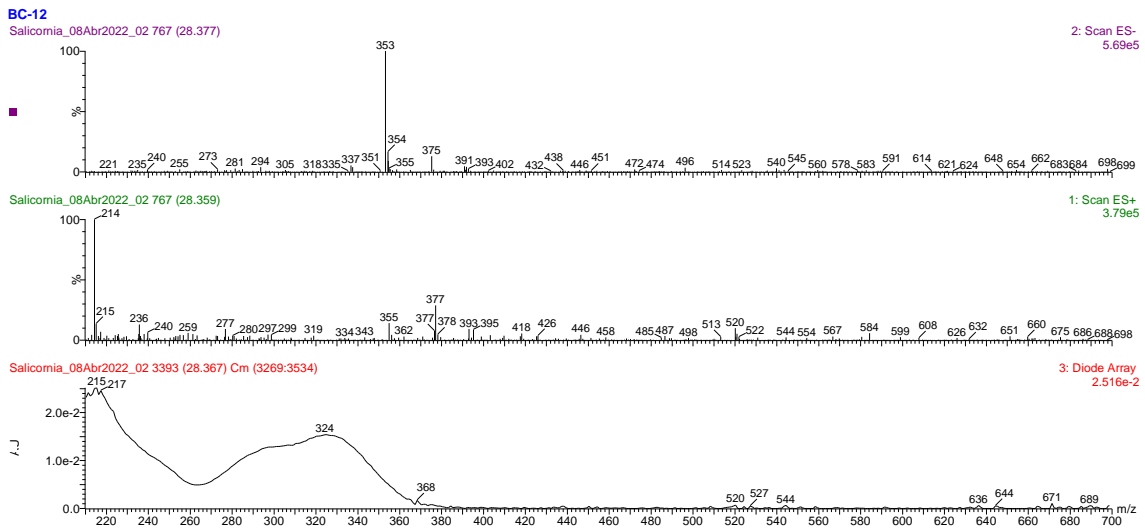
Anexo 6.6 - Comparação entre os espectros de absorção relativos ao pico da β -caroteno na amostra (a) e no padrão (b).



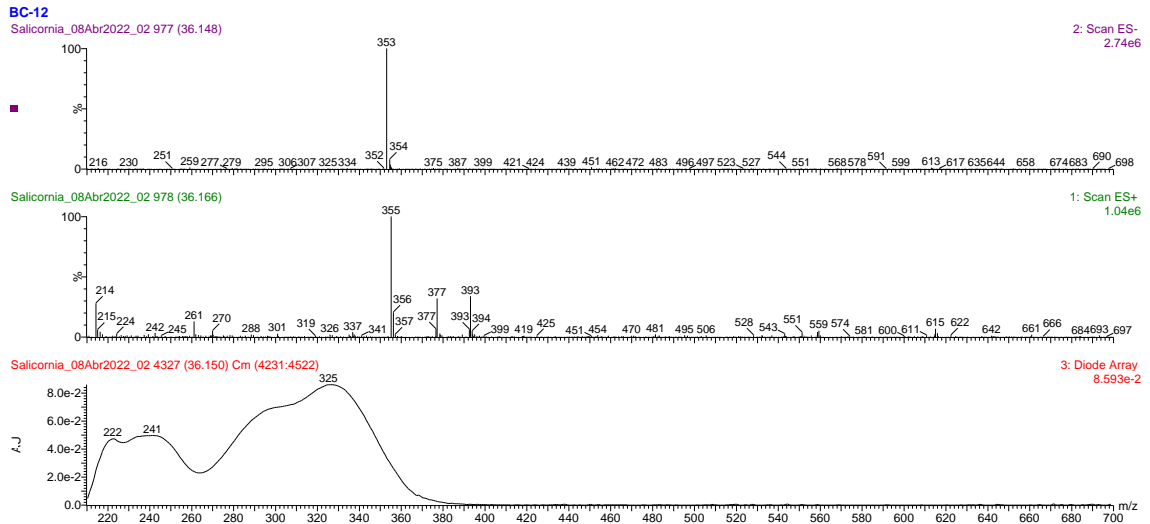
Anexo 6.7 - Comparação entre os espectros de absorção relativos ao pico da cl *a* na amostra (a) e no padrão (b).



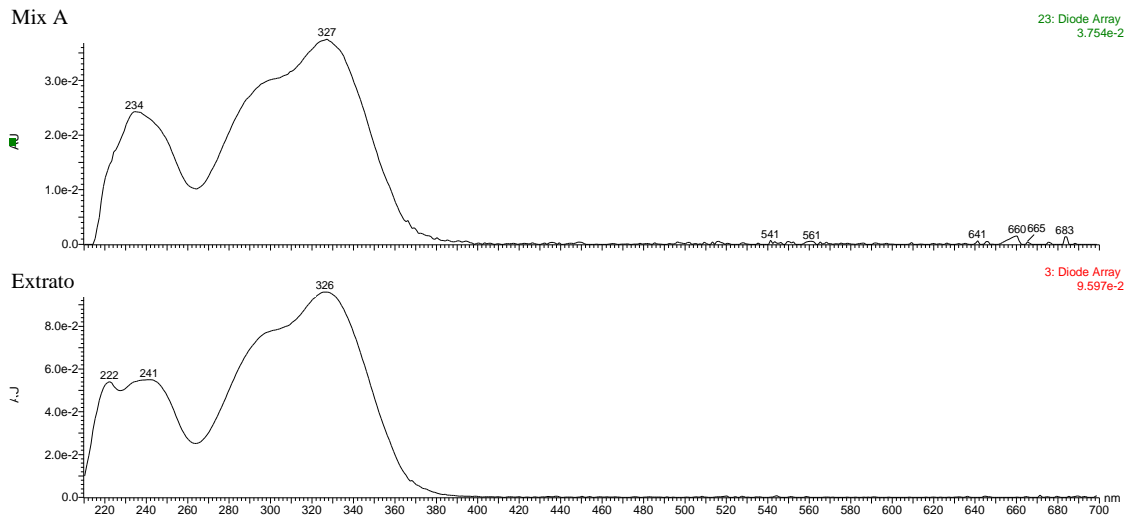
Anexo 6.8 - Comparação entre os espectros de absorção relativos ao pico da *cl b* na amostra (a) e no padrão (b).



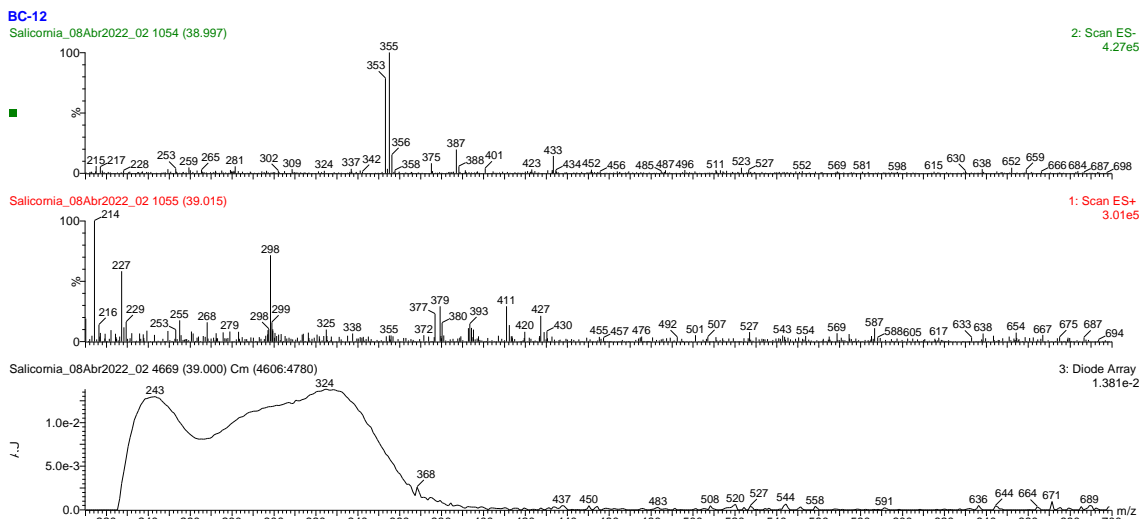
Anexo 6.9 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e *scan* de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativa do pico 1.



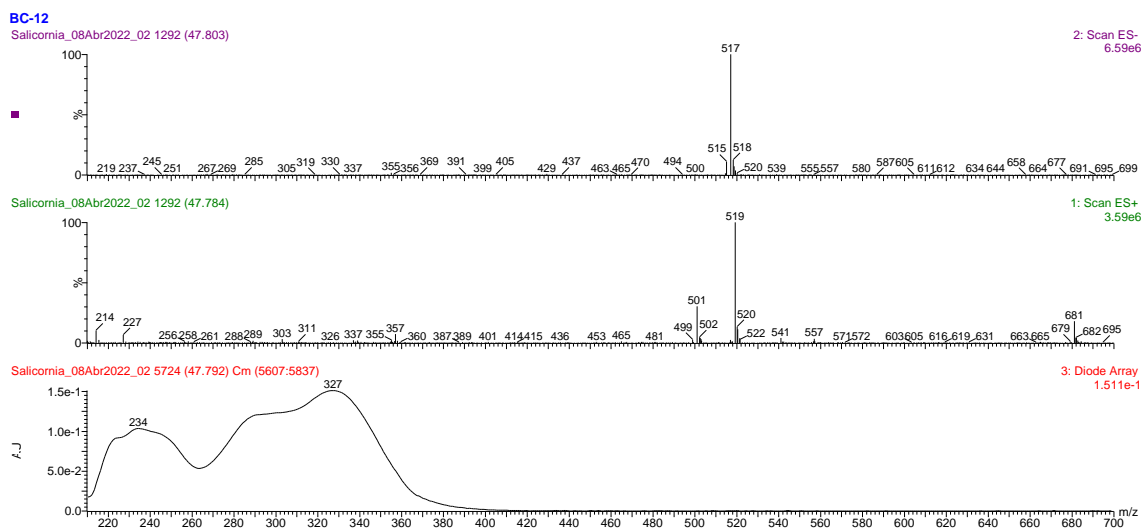
Anexo 6.10 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e *scan* de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativa do pico 2.



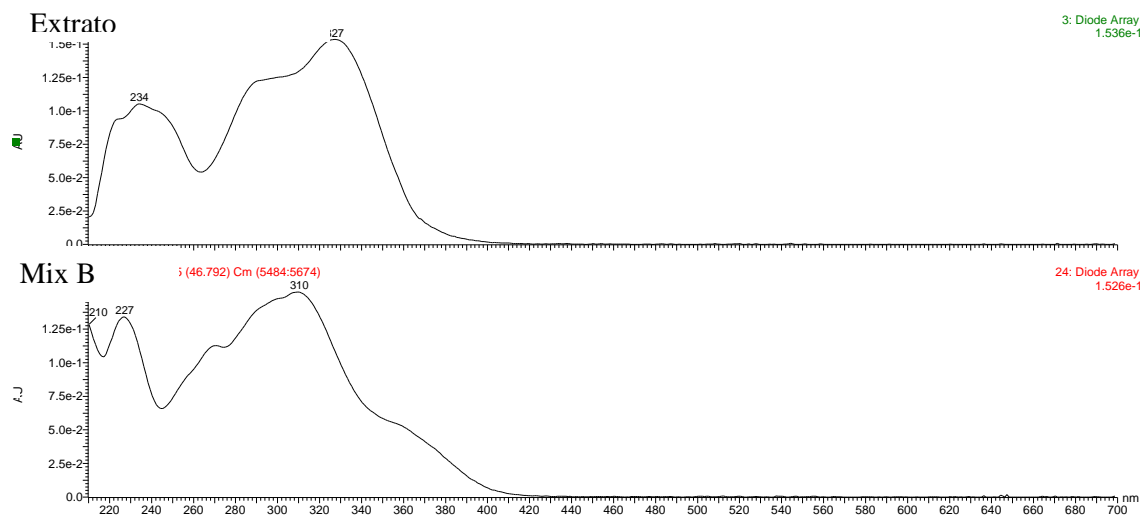
Anexo 6.11 - Comparação entre o espectro de absorção do pico 2 do extrato e o pico da mistura A a um tempo de retenção semelhante.



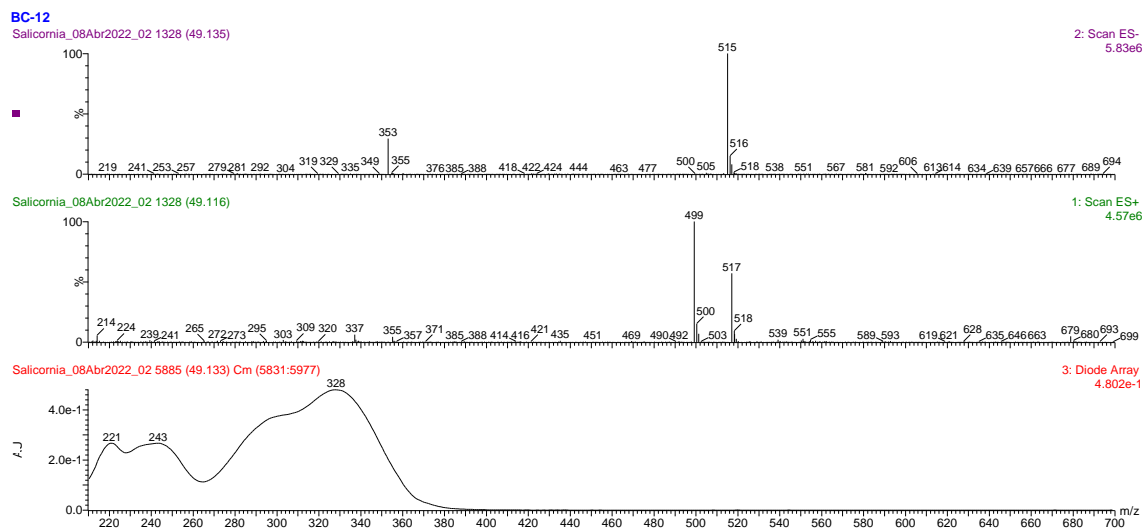
Anexo 6.12 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e *scan* de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativo do pico 3.



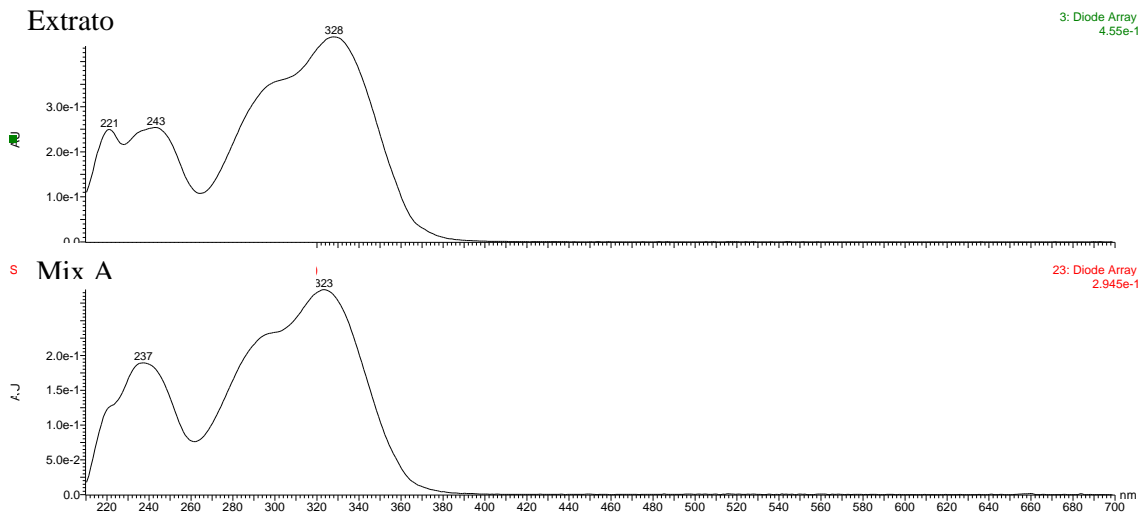
Anexo 6.13 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e *scan* de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativo do pico 4.



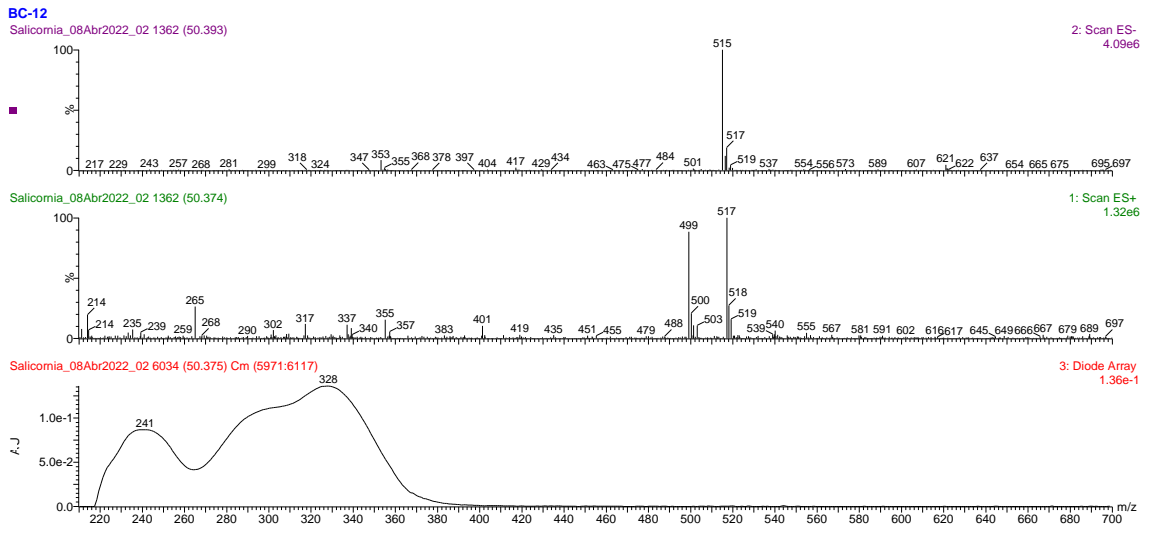
Anexo 6.14 - Comparação entre o espectro de absorção do pico 4 do extrato e o pico da mistura B a um tempo de retenção semelhante.



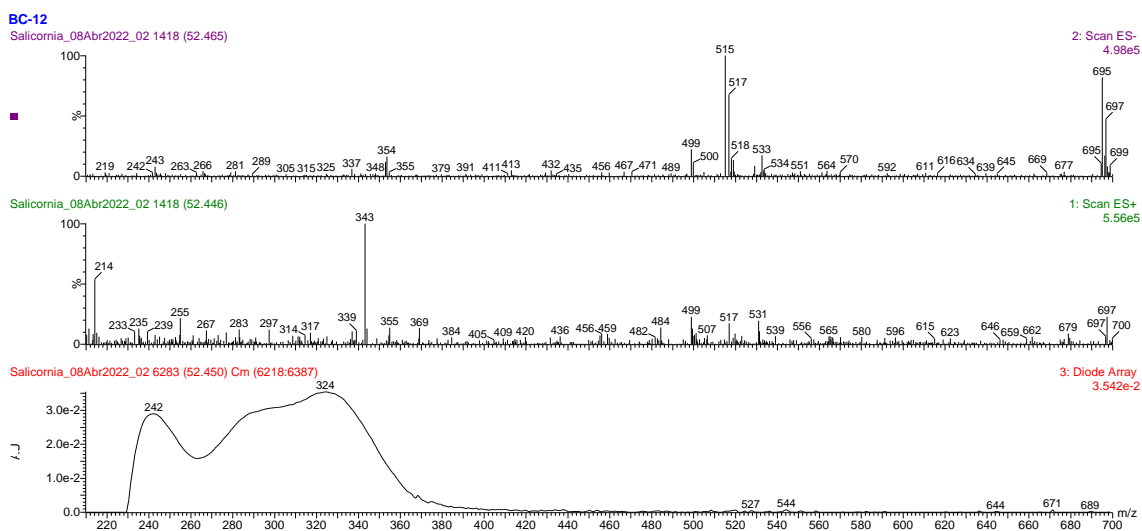
Anexo 6.15 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e *scan* de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativa do pico 5.



Anexo 6.16 - Comparação entre o espectro de absorção do pico 5 do extrato e o pico da mistura A a um tempo de retenção semelhante.



Anexo 6.17 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e scan de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativo do pico 6.



Anexo 6.18 - Valores de comprimento de onda máximo de absorção e *scan* de espectrometria de massa através de ionização positiva e negativo do pico 7.

Anexo 6.19 - Valores de rendimento mássico, TPC e ORAC obtidos no DOE da extração assistida por microondas.

Experiência	Rendimento mássico (%)	TPC (mg GAE/g extrato)	ORAC ($\mu\text{mol TEAC/g extrato}$)
R1	54.33	28.11 \pm 0.0039	293.18 \pm 0.0365
R2	56.06	23.52 \pm 0.0041	228.32 \pm 0.0096
R3	68.59	29.33 \pm 0.0010	297.46 \pm 0.0353
R4	13.21	34.98 \pm 0.0015	482.86 \pm 0.0066
R5	44.03	34.96 \pm 0.0144	339.64 \pm 0.0418
R6	58.18	29.24 \pm 0.0044	367.69 \pm 0.0040
R7	10.07	47.09 \pm 0.0031	538.67 \pm 0.0309
R8	15.30	28.56 \pm 0.0019	399.80 \pm 0.0473
R9	65.63	13.78 \pm 0.0004	195.89 \pm 0.0044
R10	11.33	54.75 \pm 0.0050	583.98 \pm 0.0478
R11	13.88	30.54 \pm 0.0037	413.22 \pm 0.0294
R12	58.31	23.31 \pm 0.0017	313.68 \pm 0.0080
R13	57.19	18.65 \pm 0.0068	163.75 \pm 0.0276
R14	75.00	19.26 \pm 0.0037	153.09 \pm 0.0084
R15	56.73	11.94 \pm 0.0012	178.50 \pm 0.0287
R16	71.58	12.52 \pm 0.0004	153.86 \pm 0.0137
R17	55.64	23.53 \pm 0.0008	290.23 \pm 0.0355