



**Caracterização química e avaliação da atividade biológica das plantas
silvestres *Umbilicus rupestris* e *Raphanus raphanistrum***

Júlia Harumi Iyda

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar, no âmbito da dupla diplomação com a Faculdade
Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

Joana S. Amaral

Isabel C. F. R. Ferreira

Flávio Dias Ferreira

Bragança

2018

Caracterização química e avaliação da atividade biológica das plantas silvestres *Umbilicus rupestris* e *Raphanus raphanistrum*

Júlia Harumi Iyda

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, no âmbito da dupla diplomação com a Faculdade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadores

Joana Amaral

Isabel C. F. R. Ferreira

Flávio Dias Ferreira

Bragança

2018

Dedico esta Dissertação a Deus, à minha família e a todos os meus amigos pela compreensão e auxílio em todos os momentos. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar durante toda a caminhada espalhando graças em cada passo. Aos meus pais, Madelon e Sergio, que não mediram esforços para tornar possível a realização deste sonho.

A minha família por toda a educação, companheirismo, amor e motivação durante esta jornada, obrigada por estarem sempre presentes.

Em especial aos meus orientadores, Joana Amaral, Isabel C. F. R. Ferreira e Flávio Dias Ferreira, e a todos os envolvidos, principalmente à professora Lillian Barros e à investigadora Ângela Fernandes por todo auxílio e ensinamento compartilhados durante esta caminhada, tornando possível a realização deste trabalho, levarei comigo toda a aprendizagem, muito obrigada.

Aos meus amigos, especialmente ao Gustavo, por todo apoio, companheirismo, incentivo e carinho, meus sinceros agradecimentos.

Finalmente, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Instituto Politécnico de Bragança por terem disponibilizado este mestrado e por todo o apoio financeiro cedido.

Muito obrigada!

Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES	XV
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 PLANTAS SILVESTRES COMESTÍVEIS	1
1.2 FAMÍLIA BRASSICACEAE	2
1.2.1. <i>Raphanus raphanistrum</i>	3
1.3 FAMÍLIA CRASSULACEAE.....	4
1.3.1. <i>Umbilicus rupestris</i>	5
1.4 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E EM COMPOSTOS BIOATIVOS	7
1.4.1. <i>Macronutrientes</i>	7
1.4.1.1. Composição em ácidos gordos	9
1.4.2. <i>Micronutrientes</i>	10
1.4.2.1. Vitamina E.....	11
1.4.3. <i>Ácidos Orgânicos</i>	13
1.4.4. <i>Compostos Fenólicos</i>	14
1.4.5. <i>Potencial Biológico</i>	16
2 OBJETIVOS.....	20
3 METODOLOGIAS	21
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	21
3.1.1. <i>Preparação dos extratos aquosos</i>	21
3.1.2. <i>Preparação dos extratos hidroalcoólicos</i>	21

3.2	VALOR NUTRICIONAL.....	22
3.3	ÁCIDOS GORDOS	22
3.4	AÇÚCARES LIVRES	23
3.5	ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	24
3.6	TOCOFERÓIS	24
3.7	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
3.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
3.9	ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	27
3.9.1.	<i>Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)</i>	28
3.9.2.	<i>Poder redutor</i>	28
3.9.3.	<i>Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	29
3.9.4.	<i>Inibição da descoloração do β-caroteno.....</i>	29
3.10	CITOTOXICIDADE.....	30
3.11	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	31
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	<i>RAPHANUS RAPHANISTRUM</i>	33
4.2	<i>UMBILICUS RUPESTRIS</i>	50
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folha e caule de <i>Raphanus raphanistrum</i> L.	4
Figura 2. Planta <i>Umbilicus rupestris</i>	6
Figura 3. Flores de <i>Umbilicus rupestris</i>	6
Figura 4. Estrutura química básica dos flavonoides (A) e molécula de canferol (B)....	15
Figura 5. Perfil fenólico dos extratos hidroalcolico e aquoso (decoção) da planta <i>Raphanus raphanistrum</i> a 370 nm. Os números apresentados nos cromatogramas correspondem aos compostos identificados na Tabela 7.....	43
Figura 6. Cromatograma relativo à análise de tocoferóis das plantas <i>Umbilicus rupestris</i> 1 (...), <i>Umbilicus rupestris</i> 2 (--) e <i>Umbilicus rupestris</i> 3 (-). 1- α -tocoferol, 2- β -tocoferol, 3- γ -tocoferol, 4- δ -tocoferol, 5- Tocol (PI).	54
Figura 7. Perfil fenólico dos extratos hidroalcolico e decoção da planta <i>Umbilicus rupestris</i> 1 a 370 nm. Todos os números apresentados nos cromatogramas correspondem aos compostos identificados na Tabela 14.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos da planta <i>Raphanus raphanistrum</i> (média \pm DP, n=3).....	33
Tabela 2. Composição nutricional de diferentes plantas de folha verde.	34
Tabela 3. Ácidos gordos da planta <i>Raphanus raphanistrum</i> (média \pm DP, n=3).....	37
Tabela 4. Tocoferóis da da planta <i>Raphanus raphanistrum</i> (média \pm DP, n=3).....	39
Tabela 5. Valores diários recomendados relativos ao consumo de vitamina E.....	39
Tabela 6. Açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis identificados nos extratos da planta <i>Raphanus raphanistrum</i> (média \pm DP, n=3).....	41
Tabela 7. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massas, identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos extratos alcoólico e decocção da <i>Raphanus raphanistrum</i> (média \pm DP, n=3).....	46
Tabela 8. Atividades antioxidante, anti tumoral, anti-inflamatória e hepatotoxicidade dos extratos obtidos da planta <i>Raphanus raphanistrum</i> (média \pm DP, n=3).	47
Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos da planta <i>Raphanus raphanistrum</i>	49
Tabela 10. Valor nutricional, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos das plantas de <i>Umbilicus rupestris</i> em estudo (média \pm DP, n=3).....	51
Tabela 11. Ácidos gordos identificados nas plantas <i>Umbilicus rupestris</i> (média \pm DP, n=3).....	53
Tabela 12. Tocoferóis das plantas <i>Umbilicus rupestris</i> (média \pm DP, n=3).....	55
Tabela 13. Açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis dos extratos das plantas em estudo <i>Umbilicus rupestris</i> (média \pm DP, n=3).....	56
Tabela 14. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massas e identificação dos compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólicos e decocções das plantas <i>Umbilicus rupestris</i>	61

Tabela 15. Quantificação dos compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólicos e decocções das plantas <i>Umbilicus rupestris</i> (mg/g extrato, média \pm DP, $n=3$).....	62
Tabela 16. Atividade antioxidante, anti tumoral, anti-inflamatória e hepatotoxicidade dos extratos obtidos da planta <i>Umbilicus rupestris</i> (média \pm DP, $n=3$).....	64
Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos e decocções da planta <i>U. rupestris</i>	66

LISTA DE ABREVIACOES

ACR	Atividade Captadora de Radicais
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
BHT	2,6-Di- <i>t</i> -butil-4-metilfenol
CAM	Metabolismo Ácidos das Crassuláceas
CE	Comissão Europeia
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DAD	Detetor de Díodos
DCV	Doenças Cardiovasculares
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante/anti-inflamatória ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder reductor
ELSD	Detetor Evaporativo de Espalhamento de Luz
ESI	Fonte de Ionização <i>Electrospray</i>
FAMEs	Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detetor de Ionização de Chama
FL	Detetor de Fluorescência
GC	Cromatografia Gasosa

GI ₅₀	Concentração de extrato que corresponde a 50% de inibição do crescimento celular
GPC	Cromatografia de Gel Permeação
HCT15	Carcinoma do Cólon
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HeLa	Carcinoma Cervical
HepG2	Carcinoma Hepatocelular
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólico
LOD	Limite de detecção
LPS	Lipopolissacárido
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MBC	Concentração Mínima Bactericida
MCF7	Carcinoma da Mama
MDA	Malondialdeído
MHB	Muller Hinton Broth
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
MS	Espectrometria de massas
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólito
MUFA	Ácidos Gordos Monoinsaturados
NED	Cloreto de hidrocloreto etilenodiamina N-(1-naftil)
PI	Padrão Interno
PLP2	Células Normais de Fígado de Porco
PUFA	Ácidos Gordos Polinsaturados
RAW 264,7	Linha Celular de Macrófagos de Rato

RI	Detetor de Índice de Refração
SFA	Ácidos Gordos Saturados
SRB	Sulfarrodamina B
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPLC	Cromatografia Líquida Ultra Rápida
UR1	Amostra 1 de <i>Umbilicus rupestris</i>
UR2	Amostra 2 de <i>Umbilicus rupestris</i>
UR3	Amostra 3 de <i>Umbilicus rupestris</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
Vis	Visível
w/v	Relação peso/volume
ω -3	Ómega-3
ω -6	Ómega-6

RESUMO

A inclusão de plantas silvestres na alimentação humana continua a ser uma prática comum, não só devido à sua utilização em zonas rurais como também pela tendência crescente na procura de novos sabores. De uma forma geral, estas plantas possuem um grande valor nutricional, podendo ser também uma fonte de vitaminas, antioxidantes e minerais. Por este motivo, diversos estudos recentes têm incidido sobre a avaliação nutricional e a composição em compostos bioativos de várias plantas silvestres. Contudo, para algumas espécies silvestres comestíveis continua a ser escassa a informação disponível. Desta forma, este trabalho visou o estudo de duas plantas provenientes de Portugal, nomeadamente *Raphanus raphanistrum* L. e *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy, no que respeita a sua composição nutricional e o potencial bioativo, com o propósito último de estimular a sua inclusão em dietas contemporâneas

Ambas as plantas apresentaram um teor elevado de humidade, seguindo-se o grupo dos glúcidos, proteínas e, em menor quantidade, os lípidos. As duas podem ser consideradas aptas para o consumo humano, com potencialidade de incorporação nas dietas como fonte de nutrientes e compostos bioativos, nomeadamente ácidos gordos, com particular ênfase para os ómega-3, vitamina E (tocoferóis), ácidos orgânicos e compostos fenólicos, mais especificamente flavonoides.

Relativamente as bioatividades, ambas as espécies demonstraram potencial antioxidante nas diferentes metodologias testadas, nomeadamente captação do radical DPPH, poder redutor, β -caroteno e TBARS. Contudo, os extratos não evidenciaram atividade citotóxica e anti-inflamatória para as concentrações testadas. No que concerne a atividade microbiana, os extratos de ambas as plantas demonstraram possuir ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, evidenciando um amplo espetro de atuação e sendo capazes de inibir o crescimento de alguns microrganismos normalmente envolvidos em doenças de origem alimentar.

ABSTRACT

The inclusion of edible wild plants on the human diet continues to be an ordinary practice, not only because of its use in rural areas as well due to an increasing tendency of searching for new flavours. In a general way, these plants have a large nutritional value, and they can also be a source of vitamins, antioxidants and minerals. For this reason, many recent studies have focused on the nutritional assessment and bioactive compounds characterization of several wild plants. However, for some edible wild species, the available information remains scarce. Therefore, this work aimed studying two plants from Portugal, namely *Raphanus raphanistrum* L. e *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy, with respect to their nutritional composition and bioactive potential for the purpose of stimulate their inclusion in contemporary diets.

Both plants had a high content of moisture, followed by the carbohydrates, proteins and lipids to a lower extent. The two can be considered suitable for human consumption, with potential for incorporation in diets as a source of nutrients and bioactive compounds, namely fatty acids, in particular emphasis on ómega-3, vitamin E (tocopherols), organic acids and phenolic compounds, more specifically flavonoids.

Regarding the bioactivities, both species demonstrated antioxidant potential in different methodologies tested, namely DPPH scavenging activity, reducing power, β -carotene and TBARS. However, the extracts did not reveal cytotoxic and anti-inflammatory activity at the concentrations tested. As regards microbial activity, the extracts of both plants showed action on Gram-positive and Gram-negative bacteria, evidencing a broad spectrum of action and being able to inhibit the growth of some microorganisms normally involved in food-borne disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS SILVESTRES COMESTÍVEIS

As plantas silvestres comestíveis, como o próprio nome indica, são plantas não cultivadas, ou seja, aquelas que crescem livremente no seu *habitat* natural (Łuczaj *et al.*, 2012; Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007). Na Europa, o seu consumo é frequentemente associado a diversos motivos, sendo o principal a escassez de alimentos em tempos de crise e fome muitas vezes associadas a épocas de guerra, mas também devido à sua sazonalidade e a casos de doenças que afetaram diversas plantações. A importância das plantas silvestres na dieta humana é por vezes vista como sendo secundária, muito devido a processos de industrialização e urbanização que conduziram a mudanças no estilo de vida das sociedades e, conseqüentemente, ao declínio no consumo deste tipo de alimento (Branco, 2015; Łuczaj *et al.*, 2012). De facto, a sociedade atual procura sobretudo formas fáceis e rápidas de obter os seus alimentos, recorrendo muitas vezes a grandes superfícies comerciais, alimentos processados e refeições pré-cozinhadas, o que dificilmente se coaduna com a colheita, manual e laboriosa, de plantas na natureza. No entanto, a tradição do consumo de plantas silvestres não caiu em completo desuso, visto que em algumas zonas rurais europeias, bem como na dieta mediterrânica, estas continuam a ser consumidas como parte de uma alimentação diversificada (Bicho, 2015). Adicionalmente, a importância de plantas silvestres para a segurança alimentar e para a criação de modelos alternativos de consumo, tem sido cada vez mais enfatizada a nível mundial (Łuczaj *et al.*, 2012). Recentemente, tem-se verificado um aumento de interesse na utilização de plantas silvestres comestíveis, proporcionado por um maior conhecimento dos consumidores em geral e uma maior divulgação e promoção destes recursos. Para esta última, tem sido crucial o papel desempenhado por diversos *chefs* que têm explorado estas plantas de forma inovadora e criativa, dando forma a novos pratos. Por outro lado, tem-se assistido também a uma crescente desconfiança por parte de muitos consumidores no que respeita à qualidade dos produtos hortofrutícolas disponíveis em grandes superfícies comerciais, frequentemente provenientes de regiões longínquas em outros continentes, o que contribui também para uma crescente procura de plantas silvestres (Łuczaj *et al.*, 2012).

A importância da utilização destas plantas como complemento de uma dieta diversificada é ainda reforçada tendo em conta os benefícios nutricionais associados ao seu consumo, por estas serem consideradas fontes interessantes de vitaminas, minerais e antioxidantes (Bicho, 2015; Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007; Tardío, Pardo-De-Santayana & Morales, 2006). Por estas razões, existem casos especiais de plantas selvagens que são atualmente cultivadas com o objetivo de se obterem plantas destinadas à culinária, em quantidade suficiente e com disponibilidade imediata, as quais são por vezes inexistentes naturalmente em dada região (Łuczaj *et al.*, 2012).

O crescente aumento no interesse pela alimentação com plantas silvestres, muito associado aos seus diferentes sabores, à sua relação com a natureza e com o património cultural e aos benefícios para a saúde, fez com que muitos estudos etnobotânicos fossem desenvolvidos, principalmente na Europa, a fim de evitar a perda de informações transmitidas durante o passar dos anos, de geração em geração (Bicho, 2015; Ghirardini *et al.*, 2007; Łuczaj *et al.*, 2012). Atualmente, podem-se encontrar diversos registos etnobotânicos relativos a plantas silvestres consumidas em diferentes regiões do mundo. Estes demonstram a grande variedade quer das partes comestíveis quer das formas de utilização gastronómica que, de acordo com a espécie, podem ser as sementes, raízes, inflorescências, frutos, caules e folhas, a serem consumidas, cruas ou confecionadas, como por exemplo em saladas sopas, temperos, aperitivos, bebidas e acompanhamento de prato principal (Branco, 2015). De entre diversas plantas silvestres comestíveis consumidas em Portugal, duas foram selecionadas para a realização deste trabalho, dada a escassez de dados a seu respeito, nomeadamente *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy e *Raphanus raphanistrum* L.. A planta *Umbilicus rupestris*, pertencente à família Crassulaceae, é consumida na forma de saladas, sendo usadas as suas folhas (Branco, 2015). No que respeita à planta *Raphanus raphanistrum*, pertencente à família Brassicaceae, podem ser consumidas a raiz, folhas, sumidades dos caules jovens e sementes, contudo, sendo mais usadas as folhas na forma de saladas, como também em massas, arroz, esparregado e sopa (Branco, 2015).

1.2 FAMÍLIA BRASSICACEAE

A família Brassicaceae inclui cerca de 338 géneros e mais de 3709 espécies distribuídas por todo o mundo (Warwick, Francis & Al-Shehbaz, 2006). Nesta família

encontram-se grupos com importância económica, incluindo plantas destinadas à alimentação tais como: *Brassica nigra* (mostarda negra), *B. oleracea* (couves), *B. rapa* var. *rapa* (nabo e nabiça), *Raphanus sativus* var. *sativus* (rabanete), entre outros vegetais e oleaginosas, e plantas ornamentais tais como: *Erysimum cheiri* (gouveiro) e a *Lunaria annua* (moedas-do-papa). Esta família inclui ainda diversas plantas silvestres, onde se encontra a planta comestível *Raphanus raphanistrum* L. (Aguiar, 2012; Aires, 2014).

No geral, as plantas pertencentes a esta família possuem certas características, destacando-se as seguintes: são ervas eretas, prostradas ou subarbutos; as folhas são geralmente simples; a inflorescência pode ocorrer na forma de racimo ou corimbo; as flores possuem 4 pétalas, de 2 a 6 estames, e são actinomorfas; o fruto possui formato variável (Scalon & Souza, 2002).

As hortaliças e vegetais que fazem parte da família Brassicaceae, normalmente possuem a capacidade de produzir como metabolitos secundários glucosinolatos, os quais possuem potencial antioxidante e anticarcinogénico, assim como os seus produtos de hidrólise (Paulino, 2008).

1.2.1. *Raphanus raphanistrum*

Raphanus raphanistrum L. é uma planta silvestre comestível que é frequentemente conhecida em Portugal como Saramagos ou Labrestos, sendo também nomeada popularmente como: Cabrestos, Ineixa, Labrêsto branco, Rábão, Rábão-bravo, Rábão silvestre, Saramago-de fruto-articulado, Saramago-de-fruto-grosso, Saramago-de-fruto-delgado e Rábano silvestre (Bicho, 2015).

R. raphanistrum é uma erva ereta, podendo medir de 20 a 80 centímetros. Por todo o seu caule subquadrangular se encontram os tricomas, medindo cerca de 0,5 a 1 milímetro, distribuídos de forma pubescente na base e esparsamente pubescente em direção ao topo. As suas folhas estão distribuídas de forma alterna, possuem pecíolo e são pubescentes, ou seja, possuem pêlos moles, pequenos e retos (Figura 1). A inflorescência ocorre na forma de racemo medindo de 13 a 28 centímetros. Suas flores são actinomorfas, ou seja, possuem uma simetria radial, possuem coloração de brancas a violáceas (Scalon & Souza, 2002).



Figura 1. Folha e caule de *Raphanus raphanistrum* L.
(Fonte: Sociedade Portuguesa de Botânica, 2014).

Esta planta, nativa da Europa, possui habitat vasto, estando amplamente distribuída pelo mundo, podendo ser encontrada nas regiões do sudoeste dos Estados Unidos da América, no sul da Austrália, na área meridional da Europa e por toda a região Mediterrânica. Apresenta-se ainda distribuída em regiões de clima temperado e subtropical, podendo ser avistada em campos agrícolas, cultivados ou não, searas, olivais, pomares, vinhas, bermas de caminhos e terrenos baldios. São consideradas plantas ruderais e invasoras de culturas (Lima, Aldrighi, Sakai, Solimam & Moraes, 2007; Maldini *et al.*, 2017; Scalon & Souza, 2002).

1.3 FAMÍLIA CRASSULACEAE

A família Crassulaceae subdivide-se em seis subfamílias e possui cerca de 35 géneros, contendo uma grande variedade de espécies com diferentes características morfológicas (Ortiz, Lumbreras & Rosselló, 2008). Geralmente são classificadas como sendo plantas suculentas, possuindo, normalmente, essa característica nos arbustos, caules ou cáudices subterrâneos (Eggli, 2003).

As plantas pertencentes a esta família apresentam ainda as seguintes características: inflorescência lateral ou terminal na forma de racimo ou panícula; flores unissexuais ou bissexuais; sépalas e pétalas livres ou unidas; os óvulos na escala de um a numerosos em cada carpelo; sementes pequenas e suavemente alongadas, com tamanho compreendido entre 1,5 a 3 milímetros e coloração acastanhada (Eggli, 2003). Adicionalmente, refira-se que as plantas da família Crassulaceae possuem uma característica padrão no comportamento estomático, uma vez que os estomas permanecem fechados durante a maior parte do dia e abrem durante a noite,

denominando-se este ciclo como estomático invertido (Daniel, Woodward, Bryant & Etherington, 1985).

Estas plantas realizam a fotossíntese através de um metabolismo característico comumente designado de metabolismo ácido das crassuláceas (CAM, *Crassulacean acid metabolism*). Neste, quando os estomas estão abertos durante a noite, ocorre a captação de CO₂ através da formação de fosfoenolpiruvato, que é convertido a malato e armazenado em vacúolos. Já durante o dia, com os estomas fechados, o malato sofre descarboxilação e o CO₂ libertado é posteriormente utilizado para a realização da fotossíntese, ou seja, para a execução do ciclo de Calvin-Benson (Daniel, Bryant & Woodward, 1984). O recurso a este tipo de metabolismo, característico das plantas suculentas, permite a sua adaptação a ambientes de grande luminosidade e elevado estresse hídrico. Dentro da família Crassulaceae encontra-se a planta *Umbilicus rupestris* classificada como sendo uma planta suculenta, silvestre e comestível.

1.3.1. *Umbilicus rupestris*

Assim como outras plantas, *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy também possui nomes populares, sendo conhecida em diferentes regiões de Portugal como Sombreira-dos-telhados, Orelha-de-monge, Couxilgos, Copilas, Conchelos, Conchilros, Cochilros, Chapéu-dos-telhados, Coucelos, Cauxilhos, Chapéus-de-parede, Cachilro, Bacelos e Bifes. Porém, tem como nome comum mais frequente Umbigo-de-vénus (Bicho, 2015).

Caracteriza-se por possuir folhas redondas carnosas, conforme apresentado na Figura 2, que podem alcançar os 60 cm de diâmetro e apresentam um rebordo irregular com serrilha. No centro da folha insere-se um longo pecíolo (folhas peltadas). No ponto de inserção, o limbo deprime-se, adquirindo a forma de umbigo tão característica desta espécie, o que explica o seu nome latino, *Umbilicus*, e o nome popular Umbigo-de-vénus (González, Ramón & Castro, 2009). *Umbilicus rupestris* é uma planta facilmente encontrada, situando-se comumente em paredes, telhados, afloramentos rochosos e em substratos ácidos, preferindo locais húmidos e sombreados (Afferni, 2009).



Figura 2. Planta *Umbilicus rupestris*
(Fonte: Sociedade Portuguesa de Botânica, 2014).

As flores desta planta (Figura 3) caracterizam-se pelo seu formato tubular de coloração amarela esverdeada, os estames ficam presos à base da corola, normalmente formada por 5 pétalas. A inflorescência ocorre sobre o mesmo pedúnculo formando um cacho simples, o androceu contém 10 estames e o gineceu possui 5 carpelos em formato lanceolado e estigma subséssil (Afferni, 2009).



Figura 3. Flores de *Umbilicus rupestris*
(Fonte: Sociedade Portuguesa de Botânica, 2014).

De acordo com a ficha apresentada pelo Plano Sectorial Rede Natura 2000 (2006), a planta *Umbilicus rupestris*, ao desenvolver-se em locais rochosos calcários e com vegetação casmofítica, é considerada um bioindicador de degradação juntamente com outras espécies de plantas da classe Parietarietea (Câmara Municipal de Pombal, 2014). O habitat tem influência direta no tamanho das folhas e da própria planta, sendo que as que se encontram ramificadas e com grandes folhas crescem em lugares húmidos e à sombra, enquanto que as de menor tamanho desenvolvem-se em paredes secas e ensolaradas podendo, ainda, adquirir coloração diferenciada variando de rosa avermelhado até vermelho tijolo (Afferni, 2009).

Umbilicus rupestris pode crescer em regiões até aos 1500 metros, sendo mais facilmente encontrada em menores altitudes. Apresenta ainda um melhor crescimento na

faixa de 10 a 160 Km da costa. O desenvolvimento desta planta não ocorre em temperaturas muito baixas, encontrando-se o mínimo suportável na faixa de -1 °C a 1 °C, ao passo que as temperaturas máximas rondam os 25 °C, aproximadamente (Monteiro-Henriques *et al.*, 2016).

Como referido, em Portugal, *U. rupestris* é consumida sobretudo na forma de saladas, onde as suas folhas podem, ou não, ser cozinhadas (Bicho, 2015). Refira-se ainda que esta planta, mais concretamente as suas folhas, consta na lista indicativa de Itália como sendo uma planta apta para ser usada como ingrediente alimentar em suplementos alimentares (Bicho, 2015). Tal como outras listas nacionais que enumeram plantas com utilização positiva ou negativa como ingrediente alimentar ou como alimento em alguns Estados-Membros, esta lista enquadra-se no âmbito do Regulamento (CE) n.º. 258/97 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares.

1.4 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E EM COMPOSTOS BIOATIVOS

Muitas plantas são consumidas na dieta pelo seu valor nutricional, aportando macro e micronutrientes importantes para o bom funcionamento do organismo humano. Muitas são também usadas empiricamente na medicina tradicional pelos seus benefícios para a saúde. Assim, torna-se importante conhecer não só a sua composição em macro e micronutrientes, mas também em diferentes compostos bioativos frequentemente associados a potenciais benefícios para a saúde.

1.4.1. Macronutrientes

Os macronutrientes denominados de glúcidos, lípidos e proteínas, são os principais constituintes dos alimentos, sendo encontrados tanto em vegetais como animais (Almeida & Fernandes, 2011; Aude-Pimentel, 2007).

Os glúcidos dos alimentos são considerados uma fonte principal de energia, possuindo influência sobre a textura e processos fisiológicos. As fibras dietéticas possuem propriedades que contribuem para o volume, viscosidade, estabilidade de emulsões, capacidade de retenção de água, estabilidade no processo de congelamento e descongelamento, no escurecimento, nos sabores e aromas (Nielsen, 2009). Alguns

glúcidos têm sido descritos como sendo substâncias bioativas, podendo ter atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antiviral, antineoplásicas, entre outras (Nogueira, Parmanhan, Farias & Corrêa, 2009).

De acordo com Belitz e Grosch (1999) nos vegetais, os mono e oligossacáridos predominantemente presentes são a glucose e frutose (0,3-4%) e a sacarose (0,1-12%), podendo ainda encontrar-se o manitol nas plantas pertencentes à família Brassicaceae, como é o caso da espécie *Raphanus raphanistrum*. Já no que respeita aos polissacáridos, destacam-se o amido, a celulose, a hemicelulose e a pectina (Belitz & Grosch, 1999).

Existem diferentes métodos para a determinação de glúcidos, quer de forma quantitativa quanto qualitativa, tais como: o método Somogyi-Nelson para quantificação de açúcares redutores; cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) para a análise de determinados monossacáridos e oligossacáridos; conteúdo de amido e utilização de métodos cromatográficos, como por exemplo a cromatografia de gel permeação (GPC), para a determinação de polissacáridos (Nielsen, 2009; Scoparo, Iacomini & Souza, 2011).

As proteínas podem ser classificadas em simples, conjugadas e derivadas de acordo com a sua estrutura, função biológica, solubilidade e composição (DeMan, 1990; Nielsen, 2009). Tanto os alimentos de origem animal como vegetal podem ser fontes interessantes deste macronutriente (DeMan, 1990). Nos vegetais em geral, existem cerca de 1-3% de compostos nitrogenados, considerando-se que destes cerca de 35-80% corresponde a proteínas (Belitz & Grosch, 1999). Porém, é importante salientar que uma alimentação que tem vegetais como principal fonte de proteínas pode ser pobre em certos aminoácidos essenciais (DeMan, 1990).

Entre os métodos mais utilizados para a determinação de proteínas, refira-se o Kjeldahl, Dumas (sendo que ambos determinam a quantidade de azoto) e a espectroscopia de infravermelho (Nielsen, 2009).

Os lípidos são macronutrientes que desempenham diversas funções no organismo, sendo uma das principais a reserva de energia. Estes compostos também exercem funções estruturais (ex.: fosfolípidos de membranas), hormonais (esteroides no ser humano), auxiliam o transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) no intestino, atuam como mensageiros celulares e, adicionalmente, conferem sabor, consistência e estabilidade aos alimentos (Aude-Pimentel, 2007).

Nos vegetais o seu conteúdo é geralmente baixo, podendo corresponder apenas a cerca de 0,1-0,9% (Belitz & Grosch, 1999). Para a análise quantitativa de lípidos, geralmente utilizam-se métodos baseados na extração com solvente (Soxhlet, Monjonier) ou de extração por via húmida sem solvente (Gerber) (Nielsen, 2009).

1.4.1.1. *Composição em ácidos gordos*

Os ácidos gordos são compostos que têm influência direta na saúde do consumidor, sendo classificados em saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) (Bockisch, 1998; Roberfroid, Coxam & Delzenne, 2008). Em geral, os SFA, principalmente os de cadeia curta e média, contribuem para o aumento do nível de colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Aude-Pimentel, 2007; Chiara, Silva, Jorge & Brasil, 2002). Enquanto que a carne pode apresentar teores elevados de SFA, pelo contrário os vegetais são ricos em ácidos gordos insaturados, com mais efeitos benéficos para a saúde do consumidor (Azevedo, 2014). Os MUFA não provocam alterações significativas ao nível do colesterol, mas podem atuar reduzindo a pressão arterial, melhorando na resistência à insulina e mudando favoravelmente os níveis de colesterol-HDL (Lopes, Peluzio & Hermsdorff, 2016; R. D. Santos *et al.*, 2013). Os PUFA podem ser divididos em duas famílias principais, os ácidos ómega-3 e ómega-6. Os primeiros têm como origem principal produtos marinhos e também vegetais, atuando de forma positiva sobre as doenças cardiovasculares (DCV). Para além de estarem associados à redução de DCV, várias propriedades benéficas foram já referidas para estes PUFA, tais como propriedades anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e antiarrítmicas. Desta forma, estes ácidos poderão ser potencialmente benéficos em diversas patologias, tais como artrite, doenças autoimunes e hipertensão (Dobson, 2002; Sepannen-LaaksoLaakso& Hiltunen, 2002). O ácido gordo essencial α -linolénico (ALA) é um dos representantes desta classe. Os ómega-6, incluem o ácido gordo essencial ácido linoleico e outros tais como o γ -linolénico. Este último é muito apreciado devido aos benefícios que lhe são geralmente atribuídos por apresentar uma significativa capacidade anti-inflamatória (Gurib-Fakim, 2006).

Por último, refira-se uma outra classe de ácidos gordos, os ácidos gordos *trans*, que estão relacionados com uma série de efeitos adversos à saúde do consumidor, tais como aumento de doenças cardiovasculares, redução na sensibilidade à ação da insulina,

propensão ao desenvolvimento de aterosclerose, aumento do colesterol-LDL e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Aude-Pimentel, 2007; Chiara *et al.*, 2002; R. D. Santos *et al.*, 2013). Estes ácidos gordos encontram-se em carnes e leites, porém em quantidade insignificantes, sendo mais abundantes em produtos industrializados.

A análise da composição em ácidos gordos é geralmente realizada por métodos cromatográficos, nomeadamente por GC com detetor de ionização de chama (GC-FID) após a sua derivatização a esteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (Azevedo, 2014).

Para as plantas em estudo, é escassa a informação encontrada sobre a sua composição em ácidos gordos, estando descrita a presença de teores elevados de ácido linolénico em extratos de *R. raphanistrum* (Marrelli, Cristaldi, Menichini & Conforti, 2015).

1.4.2. Micronutrientes

Os micronutrientes são um grupo de substâncias necessárias em pequenas quantidades para um bom funcionamento do organismo e que compreende as vitaminas e os oligoelementos (García, Menéndez-conde & Vicedo, 2011). Tais substâncias podem ser adquiridas através de diferentes fontes alimentares, como plantas e animais, sendo que o nível de ingestão recomendado para cada indivíduo pode variar, dependendo da idade, sexo, doenças crónicas, gravidez e outras condições específicas (Shergill-Bonner, 2013).

Os minerais estão envolvidos numa série de funções importantes no organismo, sendo algumas vezes indispensáveis para bom funcionamento do metabolismo corporal e, portanto, a deficiência de alguns minerais provoca sérias desordens (Belitz & Grosch, 1999). A importância dos minerais nos alimentos relaciona-se com a sua contribuição para o flavor e textura, e na ativação ou inibição da catálise enzimática e outras reações (Belitz & Grosch, 1999).

Outras substâncias que constituem o grupo dos micronutrientes são as vitaminas, constituintes essenciais por serem compostos orgânicos que não são sintetizados pelo organismo, sendo, contudo, necessários para o metabolismo (Belitz & Grosch, 1999; García *et al.*, 2011). Este grupo pode ser dividido em duas classes: vitaminas lipossolúveis, que incluem o retinol (A), calciferol (D), tocoferol (E) e fitomenadiona

(K1), e vitaminas hidrossolúveis, onde se incluem as vitaminas do complexo B e o ácido ascórbico (C) (Belitz & Grosch, 1999; Shergill-Bonner, 2013).

Alguns micronutrientes, além de serem importantes do ponto de vista nutricional por possuírem diversas propriedades funcionais, possuem ainda a capacidade de atuar como antioxidantes, como é o caso de alguns oligoelementos e as vitaminas C e E (Roberfroid, Coxam & Delzenne, 2008).

1.4.2.1. *Vitamina E*

A vitamina E foi descoberta por Evans & Bishop durante estudos de infertilidade em ratos em 1992, onde os animais apresentavam síndrome de reabsorção fetal devido a deficiência de vitamina E (Batista, Costa & Pinheiro-Sant'Ana, 2007). O termo vitamina E designa oito compostos diferentes derivados do tocol, nomeadamente alfa, beta, gama e delta tocoferóis e tocotrienóis. Os vitâmeros diferenciam-se pela localização dos radicais substituintes no anel aromático, apresentando igualmente diferenças na atividade vitamínica que possuem (Fennema, 2000; Guinazi, Miranda, Milagres, Pinheiro-Sant'Ana & Chaves, 2009). De uma forma geral, o α -tocoferol é considerado o principal vitâmero, pois é o mais abundante e possui a maior atividade biológica dentre os demais, encontra-se na natureza com a configuração RRR- α -tocoferol, sendo aquele que apresenta a maior atividade vitamínica E (DeMan, 1990; Fennema, 2000; Yúfera, 1998). O α -tocoferol tem a capacidade de agir como um antioxidante através da captação dos radicais peróxido que são produzidos em processos oxidativos (Belitz & Grosch, 1999; Yúfera, 1998). Esta vitamina tem a função de proteger o corpo dos radicais livres de oxigénio que podem provocar danos no ácido desoxirribonucleico (ADN), estando também associada a processos de inibição da mutagenicidade no trato gastrointestinal, proteção de doenças cardiovasculares e cancerígenas e ainda ao potencial de retardar o envelhecimento do corpo (Michlová, Dragounová & Horníčková, 2015). A deficiência de vitamina E em adultos pode causar diminuição imunitária, afetando as respostas humorais e celulares dos indivíduos (Roberfroid, Coxam & Delzenne, 2008). Assim, a sua ingestão é frequentemente recomendada em muitas dietas pelo seu elevado impacto na saúde (Belitz & Grosch, 1999; Eitenmiller, Ronald & Lee, 2004). Dada a sua importância na alimentação humana, considera-se necessário o consumo de aproximadamente 15 mg de

α -tocoferol/dia, valor determinado para um indivíduo saudável e com idade entre 14 e 70 anos (Monsen, 2000).

Sendo uma vitamina lipossolúvel, a vitamina E pode ser encontrada na membrana celular de células vegetais e animais, sendo que nestes últimos também se encontra disponível para exercer proteção a nível das lipoproteínas (Eitenmiller, Ronald; Lee, 2004). Por serem apolares, os tocoferóis e os tocotrienóis localizam-se na fase lipídica dos alimentos e atuam como antioxidantes, quando não estão na forma esterificada, agindo sobre os radicais livres, neutralizando-os. Assim os tocoferóis podem proteger os ácidos gordos presentes nos alimentos prevenindo a rancificação durante o armazenamento, podendo contribuir para aumentar o prazo de validade de diversos produtos (Fennema, 2000).

Os tocoferóis e tocotrienóis podem ser encontrados em cereais, frutos secos e sementes oleaginosas (Belitz & Grosch, 1999). Os óleos vegetais e seus derivados, as margarinas e maionese são considerados fontes principais de vitamina E, seguindo-se as frutas e os legumes, enquanto os produtos de origem animal contribuem escassamente para os teores desta vitamina no organismo (Roberfroid, Coxam & Delzenne, 2008).

As substâncias com atividade vitamínica E são razoavelmente estáveis na ausência de oxigénio e de lipídios oxidáveis, em contraste, a sua degradação é acentuada na presença de oxigénio molecular (Fennema, 2000). A degradação dos tocoferóis pode acontecer de várias formas, sobretudo devido ao processamento e forma de armazenamento. Alguns exemplos de processos onde a perda é significativamente elevada, são: os processos de fervura/cozimento de vegetais, o cozimento de pães e a fritura de batatas chips posteriormente armazenadas à temperatura ambiente (DeMan, 1990).

São diversos os meios que podem ser utilizados para a determinação da vitamina E. Porém, o método de HPLC é o mais frequente por permitir a determinação dos diferentes vitâmeros e, portanto, possibilitar estimar a atividade vitamínica E total (Coultate, 1998; Fennema, 2000). Encontra-se descrita quer a utilização de HPLC em fase normal quer em fase reversa, bem como diferentes detetores, tais como ultravioleta, detetor de díodos (DAD), *evaporative light scattering detetor* (ELSD) e fluorescência, sendo este último o mais frequente (Cunha, Amaral, Fernandes & Oliveira, 2006; Kamal-Eldin, Görgen Pettersson & Lampi, 2000; Rupérez, Martín, Herrera & Barbas, 2001).

1.4.3. Ácidos Orgânicos

De acordo com McMurry (2008), os ácidos orgânicos podem ser divididos em dois tipos principais, os que possuem um átomo de hidrogénio ligado a um átomo eletronegativo de oxigénio e os que contém um átomo de carbono ligado, com uma ligação simples, a um oxigénio e uma ligação dupla a outro oxigénio, sendo estes últimos denominados como ácidos carboxílicos.

Muitos ácidos orgânicos são libertados pelas raízes das plantas, onde as concentrações variam de acordo com os fatores genéticos e as condições de *stress* a que estão submetidas (Jones, 1998). Os principais ácidos encontrados nas hortaliças, grupo no qual se integram as plantas em estudo segundo a classificação de hortaliças da ANVISA, na Resolução - CNNPA nº 12 de 1978, são o cítrico e o málico. No entanto, também o ácido oxálico se apresenta em algumas hortaliças em grandes quantidades (Belitz & Grosch, 1997).

Os ácidos orgânicos fazem parte do grupo de substâncias que tem influência sobre o sabor, aroma e aparência das hortaliças (Calbo, Moretti & Henz, 2007). Uma característica principal destes compostos é o seu potencial de dissociação (Ferreira, 2001).

Nas plantas pertencentes à família Crassulaceae, os ácidos orgânicos desempenham um papel fundamental. Como referido, estas possuem metabolismo ácido (CAM), promovendo a absorção de carbono e formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido málico, por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase durante a noite para posterior descarboxilação durante o dia fornecendo CO₂ ao ciclo de Calvin-Benson (Reinert & Blankenship, 2010).

No caso dos microrganismos, os ácidos orgânicos podem atuar de diferentes formas, como fonte de carbono e energia ou como agente antimicrobiano, dependendo da concentração, da capacidade de penetração na célula e da capacidade de metabolização da célula (Ferreira, 2001). São várias as formas de deteção dos ácidos orgânicos podendo ser utilizados métodos espectrofotométricos, eletroforese capilar e cromatografia, sendo esta última a metodologia mais utilizada uma vez que permite a identificação individual e quantificação dos compostos (J. S. dos Santos, Santos & Azevedo, 2014).

1.4.4. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas sendo componentes importantes no seu desenvolvimento e reprodução, podendo ainda ser formados devido a fatores como condições de *stress*, radiação UV, entre outros (Angelo & Jorge, 2007). Estes compostos são abundantes em frutos, vegetais e alimentos derivados dos mesmos, conferindo cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (Oliveira & Bastos, 2011; Soethe, Steffens, Do Amarante, De Martin & Bortolini, 2016). A sua composição nas plantas varia de acordo com a espécie, cultivar, estado de maturação, condições climáticas e até mesmo com as condições de armazenamento (Melo, Maciel, Lima & Nascimento, 2008). Devido ao seu potencial antioxidante, o consumo de compostos fenólicos tem sido associado a diversos benefícios para a saúde, tais como prevenção de cancro, doenças cardiovasculares, arteriosclerose e outras doenças (Angelo & Jorge, 2007; Soares, 2002; Soutinho, 2012).

Os compostos fenólicos caracterizam-se por conterem grupos aromáticos hidroxilados na sua estrutura química, podendo ser divididos em diversos grupos tais como os fenóis simples, flavonoides, ligninas, ácidos fenólicos, taninos e estilbenos (Xu, Wang, Pu, Tao & Zhang, 2017). Os ácidos fenólicos têm em comum a presença de um anel benzénico, um grupo ácido e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo (Soutinho, 2012). Estes compostos são classificados em dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, sendo exemplos destes últimos os ácidos cafeico, cumárico, ferúlico e sinápico que podem ser encontrados esterificados com outras moléculas, tais como o ácido quinico, tartárico ou açúcares (Angelo & Jorge, 2007; Oliveira & Bastos, 2011). Através da esterificação do ácido quinico com os ácidos trans-cinâmicos, em especial o cafeico, obtêm-se os ácidos clorogénicos, possíveis geradores de benefícios para a saúde humana (Fennema, 2000; Garambone & Rosa, 2007).

Outro grupo pertencente aos compostos fenólicos são os flavonoides. Estes encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo ser encontrados dispersos por toda a planta, nomeadamente nos frutos, folhas e sementes (Angelo & Jorge, 2007). Os flavonoides apresentam uma estrutura comum, do tipo C6-C3-C6, consistindo em dois anéis aromáticos (anéis A e B), ligados entre si por uma cadeia de três carbonos que usualmente se encontra organizada num terceiro anel, sendo este um anel

heterocíclico oxigenado (o anel C). A estrutura química de três anéis comum aos flavonoides apresenta-se na Figura 4.

De uma forma geral, os flavonoides exercem importantes funções para os vegetais, pois atuam sobre o crescimento, desenvolvimento e na defesa contra ataques de patogênicos, entre outros (Dornas, Oliveira, Rodrigues-das-Dores, Santos & Nagem, 2007). Devido à sua estrutura química, nomeadamente à presença de grupos hidroxilo fenólicos e à possibilidade de formação de estruturas de ressonância, os flavonoides apresentam propriedades antioxidantes, podendo atuar como agentes redutores, dadores de hidrogénio, captadores de radicais e como quelantes de metais (Carocho & Ferreira, 2013).

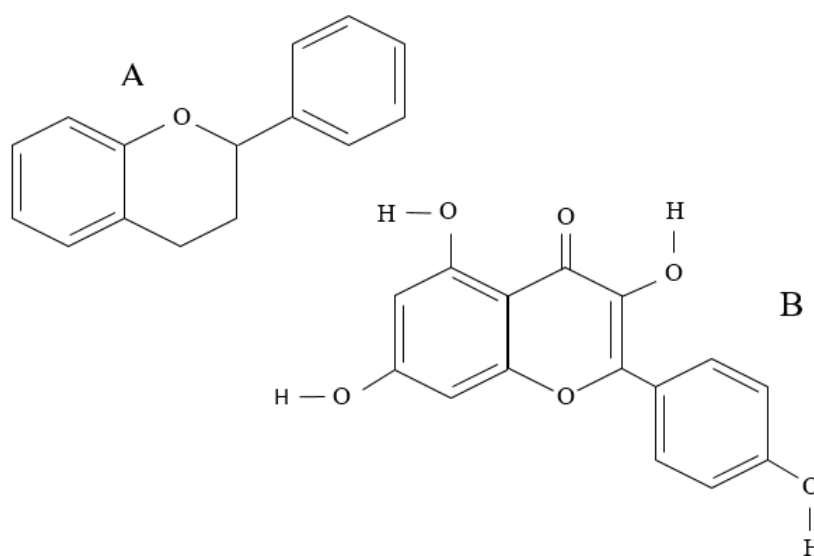


Figura 4. Estrutura química básica dos flavonoides (A) e molécula de canferol (B)

De acordo com a estrutura e oxidação do anel C, os flavonoides podem ser divididos em classes sendo as principais: flavonóis, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (Machado, Nagem, Peters, Fonseca & Oliveira, 2008). Estes compostos podem ser encontrados na natureza na sua forma livre, mas também combinados com outros flavonoides, açúcares ou compostos de natureza não flavonoide. As flavonas e flavanonas são usualmente encontradas nos mesmos frutos, enquanto que as flavonas e flavonóis não partilham este fenómeno, não sendo usual encontrar estes últimos juntos na mesma matriz (Carocho & Ferreira, 2013). As antocianinas desempenham um importante papel na coloração vermelha intensa, azul ou arroxeadada em pequenos frutos (Soutinho, 2012; Su & Chien, 2007). Vários estudos

têm demonstrado que as antocianinas exibem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos neuroprotetores para além de atividades antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011; Su & Chien, 2007).

À semelhança de outras famílias de compostos, não se conhece dados sobre a composição em flavonoides da planta *U. rupestris*. Já para *R. raphanistrum*, foi descrita a presença de 17 flavonoides em extratos obtidos com etanol a 70%, sendo estes compostos heterósidos derivados do canferol (Figura 4) e da quercetina (Ibrahim *et al.*, 2016). Segundo Marrelli, Cristaldi, Menichini e Conforti (2015), *R. raphanistrum* apresenta um teor total de flavonoides de $9,1 \pm 0,1$ mg/g de extrato, segundo determinação por métodos espectofotométricos.

Os taninos representam outra classe de compostos e podem ser classificados de duas formas de acordo com a estrutura química, nomeadamente em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Estes últimos, também designados como proantocianidinas e frequentemente incluídos na família dos flavonoides, têm por base unidades de flavanóis. Grande parte das plantas que compõem a família Crassulaceae possuem taninos condensados (proantocianidinas) que apresentam a capacidade de formar complexos insolúveis com as proteínas (Angelo & Jorge, 2007; Stevens *et al.*, 1995).

As metodologias utilizadas para análise de compostos fenólicos variam de acordo com o objetivo pretendido. Assim, podem ser determinados os compostos fenólicos totais, geralmente por métodos espectofotométricos, ou pode-se proceder à quantificação individual de cada composto e/ou um grupo ou classe de compostos fenólicos, recorrendo a métodos cromatográficos (Angelo & Jorge, 2007).

1.4.5. Potencial Biológico

O cancro é considerado uma das doenças mais mortais, apresentando índice de mortalidade inferior apenas quando comparado com as doenças cardiovasculares. Atualmente acredita-se que componentes da alimentação e fatores ambientais possam atuar de maneira positiva ou negativa sobre esta doença. Muitas plantas e extratos são desde há muito usados para o tratamento de várias doenças e, atualmente, diversas substâncias anticancerígenas provenientes de plantas são reconhecidas e utilizadas globalmente. Adicionalmente, nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado ação

quimioprotetora para diferentes constituintes da dieta, bem como elucidados os mecanismos celulares associados (Marrelli, Cristaldi, Menichini & Conforti, 2015). Recentemente, Marrelli, Cristaldi, Menichini e Conforti (2015) demonstraram que extratos etanol:água (70:30, v/v) de *R. raphanistrum* possuem atividade moderada sobre células de hepatocarcinoma, mais especificamente a linha HepG2. A avaliação da atividade anti tumoral pode ser realizada por diferentes métodos, executados *in vitro* ou *in vivo*, sendo para este último necessária uma determinação citotóxica preliminar (Costa, 2013). Podem-se utilizar para esta análise os testes do corante vermelho neutro, redução de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólito (MTT), libertação de enzimas, vermelho neutro e Sulfarrodamina B (Abreu *et al.*, 2011; Costa, 2013)

Outra característica presente em muitos compostos é o potencial de atuação como antioxidante. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) os antioxidantes são substâncias capazes de preservar o alimento, retardando as reações de deterioração, rancidez e descoloração provocadas pela autooxidação, ou seja, atuam no alimento sobre reações de oxidação, inativando os radicais livres, de forma a retardar ou impedir o seu início ou propagação (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). A indústria alimentar, com o intuito de aumentar a vida útil do alimento e evitar reações indesejadas nos seus produtos, aderiu ao uso de antioxidantes nos processos produtivos, seguindo os padrões descritos pelo Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia. Este regulamento, no geral, refere que estes compostos devem ser atóxicos e não provocar alterações no sabor dos alimentos (Davy, 2009; Yúfera, 1998).

No organismo, os radicais livres, quando não combatidos a tempo, podem atingir diferentes órgãos e provocar doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes, hipertensão, infertilidade, asma, alergia, dislipidemia, catarata, entre outras (Carocho & Ferreira, 2013). Nos alimentos, diversos compostos possuem potencial antioxidante, incluindo substâncias como as vitaminas C e E, enzimas, minerais, compostos fenólicos e outros compostos vegetais, capazes de atuar nos efeitos negativos que os radicais livres podem gerar (Davy, 2009).

Dentre os métodos para deteção de antioxidantes *in vitro*, destacam-se o sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico e o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), métodos diretos e indiretos, respectivamente (Tomei & Salvador, 2007). Os resultados obtidos com o sistema DPPH apresentam algumas desvantagens sendo a mais referida o facto de o DPPH não poder ser correlacionado com os radicais livres presentes

nos sistemas biológicos. Contudo, apresenta como vantagem a facilidade e simplicidade de aplicação (Oliveira, 2015; Tomei & Salvador, 2007).

Outro importante fator biológico das plantas diz respeito ao seu potencial antimicrobiano, ou seja, à sua atuação contra microrganismos causadores de doenças. Muitos são os compostos capazes de realizar tal função, entre os quais se incluem determinados compostos fenólicos e ácidos orgânicos (Dornas *et al.*, 2007; Ferreira, 2001). Os principais microrganismos vinculadores de doenças transmitidas por alimentos, são frequentemente considerados ser os seguintes: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Os métodos capazes de verificar o potencial antimicrobiano podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, sendo que os estudos *in vitro* são de ampla utilização por serem rápidos e seguros. Entre estes, refere-se o método da microdiluição em caldo com a utilização do corante cloreto de iodonitrotetrazólio (Dias *et al.*, 2016; Martins, Barros, Henriques, Silva & Ferreira, 2015). Considera-se a realização dos métodos *in vivo* quando não se conseguem os dados requeridos através de métodos *in vitro*, pelo fato de ocorrer variação dos modos de ação (Martins *et al.*, 2015).

Por último, refira-se que *R. raphanistrum* possui a capacidade de produzir glucosinolatos, assim como as demais plantas pertencentes à família Brassicaceae. Estes metabolitos secundários degradam-se dando origem a diversos compostos, entre os quais os isotiocianatos (Malik, Riley, Norsworthy & Bridges, 2010a). Nestes vegetais, as substâncias derivadas da hidrólise dos glucosinolatos são responsáveis por gerar características intensas no aroma e sabor, sendo a sinigrina e progoitrina as causas do amargor em algumas plantas pertencentes à família Brassicaceae (Deng *et al.*, 2015). O grande interesse nos glucosinolatos e isotiocianatos advém do seu potencial antimicrobiano, além de lhes serem atribuídos benefícios para a saúde, nomeadamente a redução de doenças degenerativas como cancro do pulmão e do trato gastrointestinal (Deng *et al.*, 2015). Até à presente data já foram identificados mais de 200 diferentes glucosinolatos, sendo estes discriminados pela alteração de um radical na molécula. No caso de *Raphanus raphanistrum*, provenientes de diferentes regiões, foram identificados 17 diferentes glucosinolatos utilizando HPLC–ESI–MS/MS, sendo os mais prevalentes a glucoerucina e glucorafnina. Ainda nestas plantas, é possível encontrar os maiores teores de glucosinolatos, nas suas flores e brotos primários, na etapa correspondendo a 50% de

floração (Maldini *et al.*, 2017; Malik, Riley, Norsworthy & Bridges, 2010a; Malik, Riley, Norsworthy & Bridges, 2010b).

2 OBJETIVOS

Dada a relevância e o interesse crescente na utilização de plantas silvestres como fontes alternativas de vegetais, este trabalho tem como objetivo geral contribuir para um aumento do conhecimento de duas plantas consumidas em Portugal, *Umbilicus rupestris* conhecida como umbigo-de-vénus e *Raphanus raphanistrum* conhecida como labrestos ou saramagos, para as quais existe pouca informação disponível, principalmente no que respeita à sua composição química. Assim, pretende-se avaliar a composição em macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos não nutrientes das espécies escolhidas. Considerando que a dieta pode ter um grande impacto na saúde e que muitas espécies vegetais, ricas em compostos bioativos, têm sido associadas a efeitos benéficos para a saúde dos consumidores, pretende-se ainda avaliar o seu potencial biológico no que respeita à sua atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica em linhas celulares tumorais. Assim, este trabalho pretende também contribuir para a validação de saberes ancestrais e fornecer novas perspetivas sobre alimentos cuja utilização tem caído em desuso, para que de uma forma crescente o consumidor possa considerá-los como alternativas viáveis que podem ser incorporadas nas dietas de forma vantajosa.

Como cada planta pode adaptar-se de forma distinta a diferentes locais, sofrendo variação das suas características de acordo com sua proveniência, torna-se relevante avaliar o efeito da sua origem no que respeita ao seu potencial nutricional e biológico. Assim, serão avaliadas amostras destas plantas silvestres comestíveis provenientes de diferentes regiões de Portugal.

3 METODOLOGIAS

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

No presente estudo foram selecionadas amostras provenientes de diferentes localidades de Portugal; nomeadamente *Umbilicus rupestris* colhida em Trás-os-Montes, (Bragança, 41° 54' 04" N, 6° 44' 22" W, 669 m asl), interior norte (Vila Real, 41° 17' 34" N, 7° 47' 16" W, 614 m asl) e centro (Viseu, 40° 39' 39" N, 7° 54' 34" E, 468 m asl) na primeira semana de Janeiro de 2018.

A planta *Raphanus raphanistrum* foi colhida no interior norte (Vila Real, 41° 17' 34" N, 7° 47' 16" W, 614 m asl) em Outubro de 2017.

O material vegetal (folhas) foi liofilizado, reduzido a pó (20 mesh) e conservado a -20 °C para posterior análise.

3.1.1. Preparação dos extratos aquosos

Para a preparação das decocções, 1g de cada amostra liofilizada foi extraída com 100 mL de água desionizada (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA), em ebulição durante 5 minutos; de seguida a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 5 min e posteriormente filtrou-se com filtro de papel Whatman N° 4. Procedeu-se à congelação e liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, MO, EUA) para a obtenção dos extratos.

3.1.2. Preparação dos extratos hidroalcoólicos

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos, 2,5g de cada amostra liofilizada foi extraída com 30 mL de etanol/água (80:20, v/v) sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, durante uma hora. O preparado foi filtrado através de um filtro de papel Whatman N° 4 e o resíduo re-extraído pela repetição do procedimento. Posteriormente, o etanol foi evaporado a 40 °C (Buchi R-2010), e procedeu-se à congelação e liofilização para a obtenção dos extratos.

3.2 VALOR NUTRICIONAL

Foi avaliada a composição em macronutrientes (glúcidos, cinzas, proteínas e lípidos), a humidade e o valor energético conforme os métodos oficiais da AOAC (2016). O teor de humidade das amostras foi avaliado a partir das massas obtidas antes e depois da liofilização. O teor de proteínas totais foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total utilizando o fator de correção ($N \times 6,25$). A gordura total foi determinada após extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração numa mufla a 600 ± 15 °C. Os glúcidos foram calculados por diferença, segundo equação (1). A energia foi calculada com base no sistema de Atwater de acordo com a equação (2).

$$\text{Glúcidos} = 100 - (\text{humidade} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{lípidos}) \quad (1)$$

$$\text{Energia (Kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos}). \quad (2)$$

3.3 ÁCIDOS GORDOS

Os ácidos gordos foram determinados seguindo o protocolo descrito pelos autores Obodai *et al.* (2017), por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID).

A massa obtida por extração em Soxhlet foi misturada com 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. Os FAMES foram recuperados com 3 mL de éter etílico em agitação no *vortex*; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um vial com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se com um filtro de *nylon* 0,2 µm Milipore.

O perfil de ácidos gordos foi obtido num sistema GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm *df*). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C e 20 °C/min até 220 °C, que foi mantida durante 15 min. O

gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da mistura padrão de 37 FAMES e das amostras. Os resultados foram processados usando o *software* Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Podohradská, República Checa) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.4 AÇÚCARES LIVRES

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme a metodologia descrita pelos autores Barros *et al.* (2013).

Às amostras liofilizadas (1 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno (melezitose, 5 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1h 30 min. De seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi K-210) e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração a 40 °C, o resíduo sólido foi redissolvido em água para um volume final de 5 mL, filtrado (filtros de nylon de 0,2 µm) para *vials* e analisado por HPLC-RI.

Os açúcares foram determinados usando o HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35 °C. O sistema de HPLC estava equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões.

Os açúcares livres foram também determinados nos extratos hidroalcoólicos e decocções. Pesaram-se 30 mg dos extratos e redissolveram-se em 2 mL de água desionizada, e posterior filtração para *vials* (filtros de nylon de 0,2 µm).

Os resultados foram expressos em g por 100g de massa seca e no caso dos extratos expressos em mg/g extrato.

3.5 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos foram determinados segundo o procedimento previamente descrito por Barros *et al.* (2013).

As amostras (1,5 g) foram extraídas por agitação com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) durante 25 min e filtradas através de papel Whatman N° 4. Posteriormente, as amostras foram filtradas através de filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) passando o conteúdo para *vials*.

A análise foi realizada por cromatografia líquida ultra-rápida com detetor de díodos (UPLC-DAD), utilizando Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A separação foi conseguida através de uma coluna de fase inversa C18 SphereClone (Phenomenex, 5 µm, 250 × 4,6 mm), termostaticada a 35 ° C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 mL/min. A detecção foi levada a cabo num DAD, utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda. Os ácidos orgânicos identificados foram quantificados por comparação da área dos seus picos registados a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de produtos comerciais de cada composto.

Os ácidos orgânicos foram também determinados nos extratos; neste caso, pesaram-se 10 mg, redissolveu-se em 2 mL de ácido metafosfórico (4,5%) e posteriormente filtrou-se com filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para *vials*.

Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca e no caso dos extratos expressos em mg/g extrato.

3.6 TOCOFERÓIS

Os tocoferóis foram determinados de acordo com o procedimento otimizado por Barros *et al.* (2010). Antes de se proceder à extração, adicionou-se às amostras uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL, 100 µL) e o padrão interno (PI, tocol em hexano 50 µg/mL; 400 µL). As amostras liofilizadas (~500 mg) foram homogeneizadas com 4 mL de metanol num *vortex* durante 1 min. De seguida, adicionaram-se 4 mL de hexano procedendo-se, posteriormente, a nova homogeneização no *vortex* (1 min). Posteriormente adicionou-se ainda 2 mL de uma solução aquosa saturada de cloreto de

sódio, homogeneizou-se no *vortex* (1 min), centrifugou-se (centrifuga refrigerada Centurion K240R-2003, 5 min, 4000g) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco. As amostras foram re-extraídas mais duas vezes com hexano. Os extratos foram levados à secura recorrendo a uma corrente de azoto, re-dissolvidos em 2 mL de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados (filtro de 0,22 µm), transferidos para *vials* âmbar e analisados por HPLC-FL. Utilizou-se um sistema integrado de bomba quaternária (Knauer, sistema Smatline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (FL, Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o *software* Clarity 2,4 (DataApex, Praga, Republica Checa). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (5 µm, 250 × 4.6 mm, WMC Waters, Japão), operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min.

Os tocoferóis foram também determinados nos extratos, tendo-se, neste caso, pesado 40 mg, os quais foram redissolvidos em 2 mL de hexano e filtrados para *vials*.

A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de matéria seca e os extratos foram expressos em mg/g extrato.

3.7 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os extratos foram submetidos a análise cromatográfica de acordo com o procedimento descrito pelos autores Bessada, Barreira, Barros, Ferreira e Oliveira (2016), em HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) utilizando um sistema composto por bomba quaternária e dupla deteção *on-line*: detetor de díodos (DAD), usando comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm, e um detetor de espectrometria de massas (MS). Para a separação utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 150 × 4,6 mm, Waters Milford, MA, USA), operando a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10

min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção MS foi realizada por um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), com uma fonte de ionização electrospray ESI. O azoto foi utilizado como gás de arrasto a 50 psi. O sistema operou com uma coltagem de *spray* a 5 kV à 325 °C com tensão capilar de -20 V. Foi mantida a voltagem de -66 V do *tube lens offset*. Os espectros foram gravados em modo ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias), Os resultados foram recolhidos e analisados por intermedio no programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Identificaram-se os compostos fenólicos através de comparações dos tempos de retenção, espectros de massa e de UV-Vis com os obtidos pelos padrões quando disponíveis, e/ou comparando com a informação disponível na literatura. Realizou-se a análise quantitativa de acordo com a reta de calibração (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina-3-*O*-rutinósido, ácido cafeico, quercetina-3-*O*-glucósido) usando como base o sinal UV-Vis dos padrões comerciais em seu comprimento de onda máximo e, quando não disponíveis, a partir de outros compostos com o mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método descrito por Pires *et al.* (2018), utilizando o método colorimétrico por microdiluição utilizando corante INT (cloreto de *p*-iodonitrotetrazólico). Os microrganismos utilizados foram isolados clínicos obtidos a partir de pacientes hospitalizados na Unidade de Saúde Local de Bragança e no Centro Hospitalar de Trás-os Montes e Alto-Douro Vila Real. As estirpes usadas compreenderam bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*), além de avaliar a atividade sobre um fungo (*Candida albicans*).

Para isso, foram preparadas a partir de uma solução mãe de concentração 100 mg/mL de cada extrato alcoólico e aquoso as diferentes concentrações para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos. A primeira concentração testada foi de 20 mg/ml, seguindo-se as diluições sucessivas.

A preparação das bactérias foi realizada tendo em conta a leitura da densidade ótica com base na escala de McFarland correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, foram colocados em microplacas de 96 poços, 150 μ L do meio de cultura Muller Hinton Broth (MHB) ou Tryptic Soy Broth (TSB) de acordo com a estirpe a testar, juntamente com 40 μ L da solução inicial. Foram efetuadas diluições sucessivas (20 a 0,156 mg/mL). No final de todo o procedimento foram adicionados a cada poço 10 μ L do inóculo bacteriano, seguido de incubação em estufa (Jouan, Berlin, Germany) a 37 °C durante 24 horas. Terminado o período de incubação foram adicionados a todos os poços 40 μ L de INT (0,2 mg/mL). As microplacas foram colocadas na estufa a 37 °C durante 30 minutos. Terminado este intervalo de tempo os resultados foram avaliados tendo em conta a mudança de coloração passando de amarelo para cor-de-rosa.

Os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória (MIC) definida como a concentração mínima de extrato necessária para promover inibição do crescimento bacteriano. A concentração mínima bactericida (MBC) correspondente à concentração mínima de extrato necessária para obter ação bactericida, foi realizada pela adição de 50 μ L dos poços sem crescimento com diferentes meios de cultura. As placas foram colocadas em estufa por 48 horas, e avaliados os crescimentos microbianos.

Como controlo positivo foram utilizados dois antibióticos de acordo com a estirpe em estudo, para as bactérias Gram-negativas usou-se a Ampicilina e o Imipenem, para as Gram-positivas foram usados a Vancomicina e Ampicilina. O controlo negativo foi realizado com bactéria e meio de cultura TSB ou MHB acrescido de 5% de DMSO.

3.9 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação do potencial antioxidante foi determinada *in vitro* nos extratos aquosos e hidroalcoólicos conforme a metodologia descrita por Sarmiento *et al.* (2015).

Das soluções extraídas e liofilizadas, pesou-se a massa de extrato para a preparação de uma solução-mãe (5 mg/mL) com etanol 80% e posteriormente diluída sucessivamente em diferentes concentrações.

3.9.1. Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

De cada uma das diferentes soluções de extrato (gama de 5 mg/mL a 0,0391 mg/mL) foram retirados 30 μ L e adicionados 270 μ L de uma solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/mL). Foi preparado um controlo com solvente de extração em vez da solução de extrato para posterior comparação. A mistura foi preservada ao abrigo da luz e após 60 minutos foi determinada a redução do radical DPPH no leitor de microplacas ELX800 Biotek (BioTek Instruments, Inc; Winooski, VT, USA) num comprimento de onda de 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada através da percentagem de descoloração da solução de DPPH usando a equação (3).

$$\%ACR = \left[\frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} \right] \times 100 \quad (3)$$

Em que, A_A corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e A_{DPPH} corresponde à absorvância do controlo. A concentração de extrato que corresponde a 50% da atividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de ACR em função da concentração de extrato. Como controlo foi utilizado o trolox.

3.9.2. Poder redutor

A cada uma das diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foi adicionada uma solução tampão de fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6) e ferricianeto de potássio 1% (0,5 mL). Após as misturas terem sido incubadas a 50 °C durante 20 minutos, foi incorporado ácido tricloroacético 10% (0,5 mL). A este sobrenadante foi retirado um volume de 0,8 mL para uma microplaca, juntamente com água desionizada (0,8 mL) e 160 μ L de cloreto de ferro III (0,1%). Foi preparado um controlo com solvente de extração em vez da solução de extrato para posterior comparação.

A leitura da absorvância foi efetuada a 690 nm no leitor de microplacas descrito no procedimento anterior, apresentando os resultados em EC₅₀ calculados a partir da representação gráfica obtida pela absorvância em função da concentração de extrato correspondente.

3.9.3. Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para o ensaio TBARS foram obtidos tecidos cerebrais de porco, a partir de animais oficialmente abatidos. Estes foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) para produzir uma porção de 1:2 (w/v) de homogeneizado cerebral, centrifugado a 3000g durante 10 minutos. Uma alíquota (100 µL) do sobrenadante foi incubada com as soluções das amostras (200 µL) na presença de FeSO₄ (10 mM; 100 µL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 100 µL) a 37 °C por 1 h. A reação parou com a adição ácido tricloroacético (28% w/v, 500 µL), seguido de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, w/v, 380 µL), e depois a mistura foi aquecida a 80 °C por 20 minutos. Após centrifugação a 3000g por 10 minutos para remover o precipitado proteico, a intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA) - TBA no sobrenadante foi medido pela sua absorvância a 532 nm. A inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada usando a fórmula (4). Em que A corresponde à absorvância do controle e B à absorvância da amostra.

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = [(A - B)/A] \times 100\% \quad (4)$$

3.9.4. Inibição da descoloração do β-caroteno

Foi preparada uma solução de β-caroteno dissolvendo 2 mg do composto em 10 mL de clorofórmio. Desta solução foram pipetados 2 mL para um balão e procedeu-se à evaporação do clorofórmio num evaporador rotativo a 40 °C. Foram adicionados 400 mg do emulsificador Tween 80, 2 gotas de ácido linoleico e 100 mL de água destilada, agitando vigorosamente até emulsionar. Posteriormente, desta emulsão, foram transferidos 4,8 mL para um tubo de ensaio contendo 0,2 mL das diferentes concentrações do extrato.

Foi preparado também um controlo com solvente de extração em vez da solução de extrato para posterior comparação.

Os tubos foram agitados (*vortex*) e incubados a 50 °C em banho-maria, sob agitação (50 rpm). Logo que a emulsão foi adicionada a cada tubo, a absorvância foi medida (tempo zero) a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200-2004), tendo sido novamente medida no final da incubação. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação (5).

$$\% \text{ Inibição da coloração } \beta - \text{ caroteno} = \frac{\text{Abs } T_{120}}{\text{Abs } T_0} \times 100 \quad (5)$$

Onde, Abs T_{120} corresponde ao valor de absorvância obtido duas horas após incubação e Abs T_0 ao valor de absorvância inicial. A concentração de extrato que corresponde a 50% de atividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração da amostra.

3.10 CITOTOXICIDADE

O efeito dos extratos no crescimento de linhas celulares tumorais humanas foi avaliado através do ensaio da Sulfarrodamina B (SRB) como descrito por Abreu *et al.* (2011) a fim de determinar a inibição do crescimento celular. Para tal foram utilizadas 4 linhas celulares tumorais, nomeadamente MCF7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) e ainda células normais de fígado de porco (PLP2).

Pesaram-se 8 mg de cada extrato e redissolveu-se em água obtendo a concentração de 8 mg/mL e por conseguinte fizeram-se diluições sucessivas compreendidas entre a gama de 400 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

As células foram cultivadas numa incubadora de ar humidificado e com 5% de CO_2 , em frascos de cultura de tecidos de 25 cm^2 e suplementadas com RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais e glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Foi efetuada uma monitorização contínua das células num microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100). Para preparar o ensaio, começou-se por retirar o meio de cultura do frasco de cultura com as células e

lavou-se com solução salina (HBSS, 2 mL). Descartou-se o meio de lavagem e adicionou-se tripsina (2,5 mL) para desagregar as células da caixa de cultura durante três minutos em incubação. De seguida, adicionou-se meio de cultura (5 mL) de modo a neutralizar a ação da tripsina, e colocou-se a suspensão da linha celular em tubos de Falcon estéreis para centrifugar (5 min). Descartou-se o meio de cultura com tripsina e retirou-se a suspensão celular (75 µL) para um *ependorf* à qual se juntou a mesma quantidade (75 µL) de azul tripano para se proceder à contagem de células numa câmara de Neubauer.

Posteriormente, colocaram-se os extratos (10 µL) em microplacas de 96 poços juntamente com o volume de suspensão celular calculado para a densidade estabelecida, e perfez-se o volume do poço com meio de cultura. Após isto, as microplacas armazenaram-se devidamente seladas durante 72 horas a 37 °C com humidade e 5% de CO₂. Já com as células devidamente aderidas, desprezou-se o conteúdo da microplaca, e deu-se início ao teste da SRB pela adição de ácido tricloroacético frio (10%, 100 µL) a cada um dos poços e pela incubação a 4 °C por 60 minutos. Após isto, lavaram-se devidamente com água destilada e as microplacas foram colocadas a secar. Adicionou-se então a SRB (0,1 em 1% ácido acético; 100 µL) incubando de seguida durante 30 minutos à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, desta vez com ácido acético (1%) de modo a retirar cuidadosamente o excesso SRB e deixou-se secar. Solubilizou-se a SRB com Tris (200 µL, pH 7,4) com auxílio de um agitador de microplacas (Stat Fax-2100), e procedeu-se à leitura da absorvância no leitor de microplacas referido previamente. Os resultados foram expressos pelo fator de diluição que inibiu 50% do crescimento celular (GI₅₀). Todos estes processos e operações foram efetuados em ambiente assético numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70).

3.11 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Villavicencio *et al.* (2018). Foi utilizada uma linha celular de macrófagos de rato RAW 264,7 cultivada em DMEM/HIGH GLUCOSE e mantida a 37 °C sob atmosfera húmida com 5 % de CO₂. Em microplacas de 96 poços foi adicionado o meio de forma a ter em cada poço cerca de 15×10^4 macrófagos, e incubou-se durante 18-24 horas para aderirem à placa. No fim do período de incubação, o meio consumido é removido para deixar as células fixadas nos poços, com a adição de 150 µL de meio

DMEM/HIGH GLUCOSE e 15 μ L das diluições descritas anteriormente na secção 3.10 e incubando novamente durante 60 minutos. De seguida, as células foram estimuladas com solução de lipopolissacárido (LPS) na concentração de 10 μ g/mL (30 μ L) e os poços foram completados com meio até obtenção de um total de 300 μ L, procedendo-se seguidamente a incubação durante 24 horas. Como controlo utilizaram-se soluções com o LPS e soluções sem os extratos, de forma a avaliar a produção de óxido nítrico respetivamente 0% e 100%. O LPS utilizado é um produto obtido a partir da bactéria *E. coli* e a sua preparação também é realizada com o meio DMEM/HIGH GLUCOSE. Após o período de incubação, o sobrenadante da cultura celular (100 μ L) é transferido para outra microplaca e adicionado o reagente Griess que contém uma mistura de sulfanilamida e soluções NED (cloreto de hidrocloreto etilenodiamina N-(1-naftil)), as placas foram mantidas em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. O óxido nítrico foi determinado através da medição da absorvância a 515 nm utilizando o leitor de microplacas descrito anteriormente e por comparação com a curva de calibração padrão. Os resultados foram calculados a partir da equação da reta obtida do gráfico que relaciona a concentração de óxido nítrico e a absorvância, sendo o resultado expresso em EC₅₀.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada análise foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão correspondentes (DP). Os resultados foram analisados por uma análise 1 fator de variância a (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com $\alpha = 0,05$. No caso de haver menos de três grupos amostras, os resultados foram analisados utilizando um teste *t*-Student. O tratamento estatístico foi realizado pelo programa SPSS v. 23.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Raphanus raphanistrum*

Os resultados do valor nutricional, teor em açúcares livres e composição em ácidos orgânicos obtidos para a planta em estudo apresentam-se na Tabela 1. No que respeita aos macronutrientes, os glúcidos foram o grupo mais abundante, seguidos das proteínas, cinzas e lípidos, o que está de acordo com os resultados previamente descritos por Kala e Prakash (2006) para *R. raphanistrum* adquiridos num mercado Indiano. No entanto, a amostra Indiana apresentou um teor superior de humidade (94,60 g/100 g massa fresca) e inferior de proteína, cinzas e lípidos (0,55, 0,55 e 0,06 g/100 g massa fresca, respetivamente) quando comparada à amostra estudada neste trabalho. Contudo, o teor de glúcidos foi similar para ambas as amostras (4,22 vs. 4,23 g/100 g massa fresca) (Kala & Prakash, 2006). O valor energético obtido para *R. raphanistrum* é relativamente baixo, o que torna esta planta apta para o consumo em dietas de baixa ingestão de glúcidos (*Low carb diets*), desta forma permitindo igualmente uma diversificação da alimentação.

Tabela 1. Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos da planta *Raphanus raphanistrum* (média \pm DP, n=3).

Valor Nutricional (g/100 g massa fresca)	
Humidade	89,9 \pm 0,6
Cinzas	1,58 \pm 0,08
Proteínas	4,04 \pm 0,01
Lípidos	0,23 \pm 0,03
Glúcidos	4,22 \pm 0,08
Valor energético (kcal/100 g massa fresca)	35,1 \pm 0,1
Açúcares livres (g/100 g massa fresca)	
Frutose	0,153 \pm 0,004
Glucose	0,348 \pm 0,003
Trealose	0,034 \pm 0,001
Total de açúcares livres	0,53\pm0,01
Ácidos Orgânicos (g/100 g massa fresca)	
Oxálico	0,706 \pm 0,001
Quínico	0,62 \pm 0,01
Málico	0,58 \pm 0,01
Ascórbico	0,008 \pm 0,001
Cítrico	0,613 \pm 0,005
Fumárico	0,005 \pm 0,001
Total de ácidos orgânicos	2,54\pm0,01

A título de comparação, a Tabela 2 apresenta a composição nutricional de dois vegetais de folha verde frequentemente utilizados na alimentação humana e disponíveis em superfícies comerciais (alface e espinafre), e três espécies pertencentes à mesma família de *R. raphanistrum* (Brassicaceae) (rabanete, mostarda e couve penca). Comparativamente aos resultados para o valor nutricional obtido para a planta *R. raphanistrum*, apresentados na Tabela 1, pode-se observar que o valor de humidade é relativamente semelhante ao das plantas pertencentes à mesma família (Brassicaceae), sendo praticamente idêntico ao valor descrito para a planta do mesmo género (*Raphanus sativus*). Em relação ao teor de cinzas, observa-se que o valor obtido se encontra próximo aos valores das restantes plantas, com exceção da alface, sendo particularmente similar ao apresentado pelo rabanete (pertencente ao mesmo género). A variação observada no teor de cinzas, principalmente quando comparada com os valores descritos por Kala e Prakash (2006), pode advir da diferente composição nutricional do solo, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2016). No que se refere ao teor de proteína, as folhas de *R. sativus* são as que mais se assemelham ao valor obtido para as folhas de *R. raphanistrum*, apresentando ambas teores superiores comparativamente com os vegetais amplamente consumidos da Tabela 2 (espinafre, alface e couve). Juntamente com a couve penca, são notoriamente as espécies que apresentam teores superiores de lípidos e glúcidos.

Tabela 2. Composição nutricional de diferentes plantas de folha verde.

Plantas	Humidade	Cinzas	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Referência
<i>Raphanus sativus</i> (rabanete, folha)	90	1,70	3,8	0,37	4,04	Goyeneche <i>et al.</i> (2015)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> (couve penca)	90,9	1,3	2,9	0,5	4,3	NEPA ^a (2011)
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern (mostarda, folha)	93,4	1,1	2,1	0,2	3,2	NEPA (2011)
<i>Tetragonia expansa</i> (espinafre)	94,0	1,2	2,0	0,2	2,6	NEPA (2011)
<i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	97,2	0,3	0,6	0,1	1,7	NEPA (2011)

^aValores adaptados da Tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos) desenvolvida pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Resultados expressos em g/100 g de massa fresca.

No que se refere ao teor de açúcares livres presentes naturalmente no alimento, foi possível identificar três compostos, nomeadamente um dissacarídeo (Trealose) e dois monossacarídeos (Glucose e Frutose) (Tabela 1). Destes, o que apresentou teor superior foi a glucose, o que pode ser explicado pelo facto de esta ser a hexose mais prevalente na natureza, tanto na forma livre quanto em ligações glicosídeas. A frutose, o açúcar com maior teor de doçura conhecido, sendo igualmente um açúcar com ampla distribuição na natureza, foi o segundo açúcar livre mais abundante nas folhas de *R. raphanistrum*. Por fim, foi também identificada a trealose, um dissacarídeo com poder de atuação como protetor de membrana em condições de desidratação-hidratação (Queiroz, 2006). É válido ressaltar a importância destes glúcidos para o organismo, indo além da fonte disponível de energia, tendo potencial de atuação como reserva de alimento e material estrutural (Lee, Shallenberger & Vittum, 1970). Contudo, refira-se que os açúcares livres correspondem apenas a uma pequena parte do conteúdo total de glúcidos, que incluiu também diversos polissacarídeos.

Os ácidos orgânicos são substâncias presentes naturalmente nas hortaliças e que exercem influência sobre certas características, tais como sabor, aroma e aparência (Calbo *et al.*, 2007). De facto, diferentes ácidos orgânicos são utilizados na indústria alimentar como acidulantes de alimentos. A título de exemplo, o ácido cítrico possui sabor pronunciado, mas momentâneo, que recorda o sabor do limão, já o ácido málico tem sabor forte, duradouro e com perceção não imediata (Food Ingredients Brasil, 2015). Além de afetar as características organolépticas os ácidos orgânicos podem interferir na estabilidade microbiana, no valor nutricional e na aceitabilidade dos consumidores (A. A. dos Santos, 2013). Neste trabalho, foram identificados seis ácidos orgânicos na planta *R. raphanistrum* (Tabela 1), sendo o ácido oxálico o mais abundante, seguido dos ácidos quinico, cítrico e málico. Comparativamente com os ácidos orgânicos quantificados por Goyeneche *et al.* (2015) na planta de mesmo género (folhas de *R. sativus*) observam-se diferenças significativas, sendo o ácido ascórbico o composto mais abundante nas folhas de rabanete ($38,69 \pm 1,99$ mg/100 g massa fresca), contrariamente ao verificado nos saramagos, onde este ácido foi identificado em baixas quantidades.

Vegetais com alta concentração de ácido oxálico, como por exemplo o espinafre e a *R. raphanistrum*, devem ser consumidos com moderação pois a elevada ingestão de oxalatos pode provocar a formação de pedras nos rins e irritação da mucosa intestinal (Benevides, Souza, Souza & Lopes, 2011), podendo, também, interferir na absorção de

cálcio pelo organismo (Vega & Florentino, 2000). Em particular, a ingestão de alimentos com altas concentrações de ácido oxálico deve ser evitada por pessoas propensas a desenvolver doenças tais como pedra nos rins, artrite, reumatismo e gota (Benevides, Souza, Souza & Lopes, 2011).

No entanto, refira-se que o ácido oxálico juntamente com os ácidos cítrico, málico e fumárico desempenham um papel importante ao participarem do ciclo de Krebs, via de produção de energia da célula, encontrando-se incluídos no metabolismo dos lípidos, glúcidos e proteínas (A. A. dos Santos, 2013). Adicionalmente, o ácido málico participa do processo de respiração e fotossíntese da planta (A. A. dos Santos, 2013).

A Tabela 3 apresenta os ácidos gordos identificados na planta *Raphanus raphanistrum*, podendo-se verificar que, maioritariamente, foram detetados ácidos gordos polinsaturados (PUFA), seguindo-se os ácidos gordos saturados (SFA) e em menor quantidade os monoinsaturados (MUFA). À semelhança de outros vegetais de folha verde, selvagens e edíveis, tais como *Beta maritima*, *Rumex papillaris*, *Rumex pulcher* e *Taraxacum obovatum* o ácido gordo mais abundante em *R. raphanistrum* foi o alfa-linolénico (C18:3n3, 73,5%) (Morales *et al.*, 2012). Refira-se ainda que, comparativamente às plantas citadas, o conteúdo deste ácido gordo essencial ómega-3 (ω -3) foi superior nas folhas de *R. raphanistrum*. A planta em estudo apresentou ainda teores consideráveis de ácido palmítico (C16:0, 10,8%) e linoleico (C18:2n6, 10,1%). Contrariamente ao obtido neste trabalho, Conforti *et al.* (2011) descreve valores muito inferiores para os teores dos ácidos alfa-linolénico e linoleico (9,43% e 1,65%, respetivamente) analisados por cromatografia gasosa acoplada a deteção por espectrometria de massa (GC-MS). Contudo, estes valores referem-se não à planta crua, mas sim a extratos hidroalcoólicos, pelo que não podem ser diretamente comparados. No entanto, considerando os resultados obtidos por Conforti *et al.* (2011) para as 18 plantas estudadas, verifica-se que *R. raphanistrum* é aquela que apresenta o teor mais elevado de ácido alfa-linolénico, o que está de acordo com o elevado teor deste composto obtido no presente estudo.

No total, foram identificados 22 ácidos gordos nas folhas de *R. raphanistrum*, pelo que este trabalho introduz informações detalhadas sobre o perfil em ácidos gordos desta planta, até à data pouco estudada. Avaliando o geral, esta planta apresentou uma composição predominante de ácidos gordos insaturados, particularmente PUFA ω -3, pelo que o seu consumo pode ser associado a efeitos benéficos para a saúde do consumidor.

De fato, diversos estudos observacionais sugerem que o consumo de ácido alfa-linolénico (ω -3) de origem vegetal pode diminuir o risco da ocorrência de doenças cardiovasculares (DCV) (R. D. Santos *et al.*, 2013). Também a substituição dos SFA por PUFA, numa taxa correspondente entre 5 a 10% da energia consumida, tem sido associada à diminuição do risco de DCV (R. D. Santos *et al.*, 2013). Adicionalmente, embora as evidências não sejam absolutamente conclusivas, alguns estudos têm sugerido que esta substituição (SFA por PUFA, particularmente ω -6) pode reduzir o risco de diabetes mellitus tipo 2 (R. D. Santos *et al.*, 2013).

Tabela 3. Ácidos gordos da planta *Raphanus raphanistrum* (média \pm DP, n=3).

Ácidos Gordos	<i>R. raphanistrum</i>
C6:0	0,062 \pm 0,002
C8:0	0,055 \pm 0,002
C10:0	0,029 \pm 0,001
C12:0	0,116 \pm 0,003
C14:0	0,189 \pm 0,006
C15:0	0,189 \pm 0,001
C16:0	10,81 \pm 0,01
C16:1	0,135 \pm 0,001
C17:0	0,172 \pm 0,004
C18:0	1,53 \pm 0,01
C18:1n9	1,05 \pm 0,02
C18:2n6	10,09 \pm 0,01
C18:3n3	73,45 \pm 0,05
C20:0	0,225 \pm 0,005
C20:2	0,138 \pm 0,001
C20:3n3+C21:0	0,307 \pm 0,004
C20:5n3	0,062 \pm 0,002
C22:0	0,460 \pm 0,008
C22:1n9	0,372 \pm 0,004
C24:0	0,218 \pm 0,006
C24:1	0,34 \pm 0,01
SFA (%)	14,05\pm0,01
MUFA (%)	1,89\pm0,03
PUFA (%)	84,05\pm0,04
ω-6/ω-3	0,14\pm0,03

SFA: ácidos gordos saturados, MUFA: ácidos gordos monoinsaturados, PUFA: ácidos gordos polinsaturados, ω -6/ ω -3: rácio ómega 6 e ómega 3. Ácidos caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9), linoleico (C18:2n6), alfa-linolénico (C18:3n3), araquídico (C20:0), *cis*-11,14-eicosenoico (C20:2), *cis*-11,14,17-eicosatrienoico + heneicosanoico (C20:3n3+C21:0), *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentenóico (C20:5n3), beénico (C22:0), erúxico (C22:1n9), lignocérico (C24:0), nervónico (C24:1).

No que respeita a dieta humana, é de elevada importância o consumo de quantidades adequadas de ácidos gordos ω -3 e ω -6, em virtude de alguns destes compostos desempenharem funções fisiológicas relevantes, tais como a prevenção de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias crónicas, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre o crescimento fetal e desenvolvimento neural e participação nas funções imunoduladoras. Baixas quantidades ou ausência destes ácidos gordos no organismo humano, particularmente de ácidos gordos essenciais, podem promover o desenvolvimento de algumas doenças degenerativas e DCV, além de acelerar o processo de envelhecimento (Perini *et al.*, 2010).

Adicionalmente, diversos autores referem que a razão ω -6/ ω -3 deve ser controlada pois estes dois tipos de ácidos gordos competem pelas enzimas que realizam as reações de insaturação e alongamento da cadeia. Uma razão ω -6/ ω -3 desequilibrada a favor de ácidos gordos ω -6, pode ser considerada como pró-trombótica e pró-inflamatória, contribuindo para a prevalência de aterosclerose, obesidade e diabetes (Simopoulos, 2016). Porém, refira-se que nem todos os autores são unânimes em relação a esta razão, considerando que a relação mais adequada na dieta humana não se encontra evidentemente estabelecida devido à existência de estudos em que o consumo do ácido linoleico em altas concentrações não promoveu o aumento do teor de ácido araquidónico no plasma ou lípidos das plaquetas (Smit, Mozaffarian & Willett, 2009). Considerando, no entanto, que a dieta de diversos países ocidentais apresenta caracteristicamente rácios ω -6/ ω -3 superiores a 15:1 devido ao elevado consumo de alimentos ricos em ω -6 (Simopoulos, 2016), pode ser interessante a inclusão de *R. raphanistrum*, rica em PUFA ω -3 e com uma razão ω -6/ ω -3 de 0,14 (Tabela 3) em dietas ocidentais, uma vez que estas frequentemente se apresentam muito desequilibradas no que respeita este parâmetro.

A vitamina E engloba um conjunto de compostos lipossolúveis, nomeadamente tocoferóis e tocotrienóis em diferentes conformações, sendo associada a diversos efeitos benéficos à saúde do consumidor, tais como ação anti-inflamatória, neuroprotetora e propriedades antioxidantes (Singh, Beattie & Seed, 2013).

Os resultados obtidos para a análise de Vitamina E apresentam-se na Tabela 4, onde se pode verificar que todas as configurações de vitâmeros (α -, β -, γ - e δ -tocoferol) foram identificadas e quantificadas nas folhas de *Raphanus raphanistrum*. Dos diferentes vitâmeros, o α -tocoferol foi o que apresentou a concentração mais elevada. Fennema

(2000) refere que este composto é frequentemente considerado como sendo o vitâmero principal, por ser o mais abundante e com maior atividade biológica entre os demais.

Tabela 4. Tocoferóis da da planta *Raphanus raphanistrum* (média ± DP, n=3)

Tocoferóis (mg/100 g massa fresca)	<i>R. raphanistrum</i>
α-Tocoferol	0,89±0,01
β-Tocoferol	0,041±0,002
γ-Tocoferol	0,084±0,003
δ-Tocoferol	0,052±0,001
Total tocoferóis	1,07±0,01

Tabela 5. Valores diários recomendados relativos ao consumo de vitamina E.

Idade	AI (mg/dia)¹	EAR (mg/dia)²	RDA (mg/dia)³
0 – 6 meses	4		
7 – 12 meses	6		
1 – 3 anos		5	6
4 – 8 anos		6	7
9 – 13 anos		9	11
14 – 18 anos		12	15
19 – > 70 anos		12	15
Gestantes			
≤ 18 anos		12	15
19 – 50 anos		12	15
Lactantes			
≤ 18 anos		16	19
19 – 50 anos		16	19

Fonte: Mosen (2000); Padovani *et al.* (2006).

AI¹ – (*Adequate Intake*), corresponde ao valor de consumo recomendável de ingestão de nutrientes para grupo de pessoas saudáveis; EAR² – (*Estimated Average Requirement*), corresponde à mediana de distribuição das necessidades de um nutriente em um grupo de indivíduos saudáveis do mesmo sexo e idade, atendendo as necessidades de 50% da população; RDA³ – (*Recommended Dietary Allowances*), valor determinado para atender as necessidades de um nutriente para 97- 98% dos indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida.

A deficiência na ingestão de vitamina E é considerada rara por esta estar presente num elevado número de alimentos. Porém, anormalidades nas lipoproteínas, síndrome de má absorção devido a insuficiência pancreática, doença celíaca, doença de Crohn e desnutrição, entre outros fatores, são descritos como as causas principais da deficiência em Vitamina E (Cohen, Silva & Vannucchi, 2014). O nível de ingestão diária de vitamina

E (expressa apenas na forma de alfa-tocoferol) recomendado pelo *Institute of Medicine, Food and Nutrition Board*, encontra-se apresentado na Tabela 5.

Como se pode verificar, seria necessária a ingestão de quantidades muito elevadas de *R. raphanistrum* para atingir os valores recomendados, caso esta planta fosse a sua principal fonte. Assim, dado o reduzido teor de vitamina E na planta fresca, é aconselhável o consumo de *R. raphanistrum* no âmbito de uma dieta variada e mais equilibrada, contribuindo desta forma para o aporte diário de vitamina E.

Relativamente aos compostos hidrófilos (açúcares livres e ácidos orgânicos) e lipófilos (tocoferóis), para além da planta crua, procedeu-se à sua determinação nos extratos preparados, nomeadamente aquoso (decoção) e hidroalcoólico. A análise sobre o extrato aquoso, em particular, é de grande relevância uma vez que permite determinar os compostos que ficaram presentes na água após o cozimento, podendo ou não ocorrer perda dessas substâncias de acordo com o objetivo pretendido de aplicação. Assim, estes compostos são ingeridos no caso de sopas ou infusões, contrariamente ao que ocorre se a planta for consumida como vegetal cozido.

Analisando a Tabela 6, onde são apresentados os açúcares livres e respetiva quantificação nos extratos, é possível observar que, comparativamente ao perfil obtido para a planta crua (Tabela 1), apenas a trealose não foi identificada, possivelmente devido à baixa concentração deste açúcar na planta. Contudo, entre os extratos analisados a maior extratibilidade dos açúcares livres ocorreu no hidroalcoólico. Foram detetadas diferenças significativas entre os resultados obtidos para os dois extratos, o que se poderá dever a fatores descritos por Stalikas (2007), nomeadamente a agitação e o tempo de contacto da amostra com o solvente.

Observando o perfil de ácidos orgânicos determinados nos extratos, é possível concluir que praticamente todos os ácidos presentes na planta foram também identificados no extrato aquoso, com exceção do ácido quínico que não foi detetado em ambas as amostras. Relativamente ao ácido ascórbico, em virtude de ser uma substância polar, o reduzido teor na decoção poderá dever-se a fenómenos de degradação devido à utilização de temperatura elevada durante o processo extrativo (A. A. dos Santos, 2013)

Em contrapartida, tem-se a não deteção dos ácidos málico e cítrico no extrato alcoólico, porém com alta extração do ácido oxálico, superando o obtido pelo extrato aquoso, demonstrando diferença significativa entre os extratos. A possível explanação

sobre o efeito de superioridade da extração do ácido oxálico deriva da utilização da temperatura no processo de decocção, consoante a fundamentação abordada por Berdonces (1996) no qual o cozimento pode promover destruição parcial das partículas de ácido oxálico.

A ocorrência da extração aquosa ser superior à alcoólica na remoção do ácido málico é justificada pela polaridade da solução, onde ao realizar a injeção de etanol na água ocorre a redução da polaridade, dessa forma promovendo a diminuição da extração do ácido málico (Yuan, Leng, Shao, Huang & Shan, 2014). O mesmo fenómeno pode ser utilizado para a explicação do não aparecimento de ácido cítrico no extrato alcoólico, portanto a solubilidade desse ácido orgânico em água é superior ao etanol (Daneshfar *et al.*, 2012).

Abordando o teor total de ácidos orgânicos, verifica-se a diferença significativa devido à superioridade do extrato aquoso sobre o alcoólico na extração de diferentes compostos presentes na planta, indicando maior solubilidade de compostos para a água e, portanto, passíveis de perda consoante a sua utilização.

Tabela 6. Açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis identificados nos extratos da planta *Raphanus raphanistrum* (média \pm DP, $n=3$).

	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico	teste <i>t</i> -Student <i>p</i> -valor
Açúcares livres (mg/g extrato)			
Frutose	27,8 \pm 0,3	41,4 \pm 0,7	<0,001
Glucose	45,5 \pm 0,6	65,5 \pm 0,4	<0,001
Total de açúcares livres	73,3\pm0,9	107\pm1	<0,001
Ácidos orgânicos (mg/g extrato)			
Oxálico	283 \pm 2	344 \pm 3	<0,001
Málico	55,9 \pm 0,3	nd	-
Ascórbico	tr	0,13 \pm 0,001	-
Cítrico	96 \pm 2	nd	-
Fumárico	tr	tr	-
Total de ácidos orgânicos	435\pm4	344\pm3	<0,001
Tocoferóis (mg/g extrato)			
α -Tocoferol	nd	99 \pm 1	-
Total tocoferóis	nd	99\pm1	-

nd – não detetado; tr – vestígios (abaixo dos LOD dos padrões); Análise da diferença significativa ($p < 0.05$).

No que diz respeito aos teores de tocoferóis determinados nos extratos, apenas no extrato hidroalcoólico foi identificada a presença de α -tocoferol, sendo este o vitâmero maioritário na planta crua (Tabela 1). Este resultado advém da diferente polaridade das soluções utilizadas, sendo expectável a ausência de tocoferóis no extrato aquoso, uma vez que estes são vitaminas lipossolúveis.

O conhecimento sobre os compostos fenólicos presentes na planta é de suma importância, em virtude de estes estarem relacionados com o potencial bioativo, nomeadamente com o poder antioxidante e a capacidade antimicrobiana, entre outros. Na Figura 5 apresentam-se os compostos tentativamente identificados nos extratos aquoso e alcoólico de *R. raphanistrum* e respetiva quantificação na Tabela 7. De uma forma geral, constata-se que a extração hidroalcoólica foi mais eficaz, permitindo obter um valor significativamente superior de compostos fenólicos totais quando comparado com o aquoso. Tal deve-se sobretudo à maior extração dos flavonoides, havendo diferenças significativas entre os dois tipos de solventes utilizados na extração. Vizzotto e Pereira (2011) apontam a água como um mau extrator de compostos fenólicos devido à sua alta polaridade e obtenção de extratos com muitas impurezas pela extração de ácidos orgânicos, açúcares e proteínas solúveis, que podem interferir na quantificação de compostos fenólicos. Por este motivo, a extração com solventes hidroalcoólicos tende a ser mais utilizada para a quantificação deste grupo de compostos, uma vez que permite obter valores mais próximos do teor presente na planta.

Embora a extração dos compostos fenólicos seja superior quando utilizada a mistura hidroalcoólica, os valores obtidos para o extrato de decocção são assim mesmo muito relevantes, uma vez que esta planta pode também ser consumida após cozedura. Os resultados demonstram que a água utilizada no processo de decocção promove a extração de compostos fenólicos de maneira significativa, pelo que o não aproveitamento da água de cozimento implica a perda de muitos destes compostos, em particular dos ácidos fenólicos cuja extração foi superior na decocção face ao solvente hidroalcoólico. Os dois ácidos fenólicos presentes na planta, ácidos 5-*p*-cumaroilquinico e 5-*O*-feruloilquinico, são produtos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos *p*-cumárico e ferúlico, respetivamente, sendo ambos frequentemente encontrados na natureza. Descrevem-se os ácidos *p*-cumárico e ferúlico com poder de atuação como antioxidantes (Degáspari & Waszczyński, 2004). Os resultados obtidos para as extrações com diferentes solventes (aquoso vs. hidroalcoólico) podem ser explicados pela diferente solubilidade dos

compostos, grau de polimerização e sua interação com outros constituintes do alimento (Naczki & Shahidi, 2004).

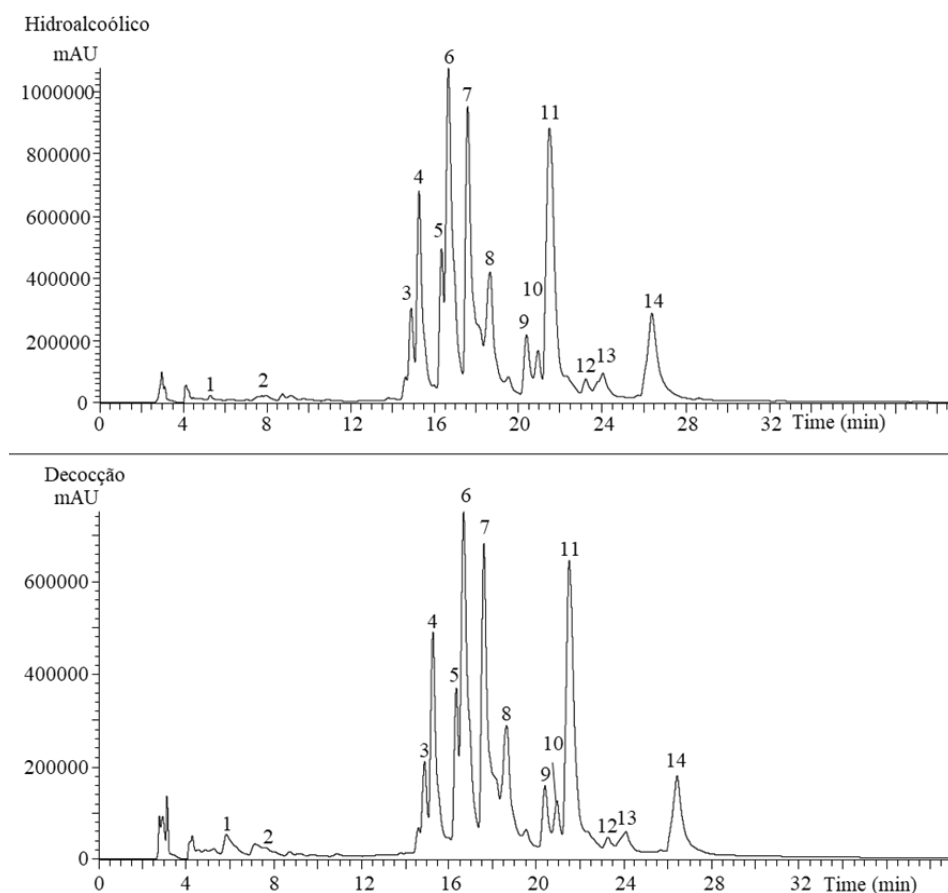


Figura 5. Perfil fenólico dos extratos hidroalcoólico e aquoso (decocção) da planta *Raphanus raphanistrum* a 370 nm. Os números apresentados nos cromatogramas correspondem aos compostos identificados na Tabela 7.

Os flavonoides são importantes para os vegetais pois exercem funções sobre o crescimento, desenvolvimento e proteção contra microrganismos patogênicos. Neste estudo foram identificados doze flavonoides, sendo nove derivados do canferol e três derivados da quercetina. Estudos *in vitro* demonstraram que a quercetina atua como um poderoso antioxidante, inibindo a oxidação e citotoxicidade de lipoproteínas de baixa densidade, podendo assim reduzir o risco de doença coronária ou cancro (Miean & Mohamed, 2001). Relativamente ao canferol, estudos demonstram o seu potencial face a doenças crónicas, em especial cancro, além de promover o aumento das defesas antioxidantes no corpo humano (Chen & Chen, 2013).

A caracterização do perfil de compostos fenólicos na amostra de *R. raphanistrum* foi realizada por HPLC-DAD-ESI/MS, tendo-se obtido os dados de tempo de retenção, λ_{\max} , íão pseudomolecular, íões do fragmento principal em MS², permitindo a identificação tentativa e quantificação dos compostos fenólicos conforme apresentado na Tabela 7.

O pico 1^{RR} ([M-H]⁻ a m/z 337) foi identificado como ácido 3-*p*-cumaroilquinico e o pico 2^{RR} ([M-H]⁻ a m/z 367) foi identificado como ácido 3-*O*-feruloilquinico tendo em conta as chaves hierárquicas anteriormente desenvolvidas por Clifford, Johnston, Knight e Kuhnert (2003) e Clifford, Knight e Kuhnert (2005). Ambos os compostos, na medida do conhecimento dos autores, não foram anteriormente descritos na planta *R. raphanistrum*.

Os compostos seguintes foram identificados como derivados glicosídicos da quercetina (λ_{\max} em torno de 353 nm e um fragmento MS² em m/z 301) e do canferol (λ_{\max} em torno de 356 nm e um fragmento MS² em m/z 285). Os picos 3^{RR} e 4^{RR} apresentaram o mesmo íão pseudomolecular [M-H]⁻ em m/z 609, revelando a possível perda de resíduos hexosil (m/z em 447, -162 u) e deoxihexosil-hexósido (m/z em 301, -308 u), indicando a localização de cada resíduo em diferentes posições da aglicona. Estes compostos foram tentativamente identificados como quercetina-3-*O*-ramnósido-7-*O*-glucósido, estando de acordo com a descrição previamente realizada por Ibrahim *et al.* (2016) num extrato hidroetanólico (70%) das partes aéreas de *R. raphanistrum* colhidas no campo de Gizé no Egito. Similarmente, os compostos 6^{RR} e 7^{RR} ([M-H]⁻ em m/z 593) foram identificados como canferol 3-*O*-ramnósido-7-*O*-glucósido. Ibrahim *et al.* (2016) também descreveu a presença de canferol 3-*O*-(2''-glucosil)-ramnósido-7-*O*-ramnósido, tendo este composto sido identificado por LC-ESI-MS e ressonância magnética nuclear. Assim, o composto 9^{RR} ([M-H]⁻ em m/z 739) foi tentativamente identificado como esta molécula. As características do espectro de massa do composto 5^{RR} ([M-H]⁻ em m/z 771) indicam que também corresponde a um derivado do canferol, apresentando três resíduos hexosil (-486 u), os quais estarão ligados dada a observação de apenas um fragmento MS². Assim, identificou-se o composto como canferol-*O*-suforosil-glucósido. O composto presente no pico 8^{RR} ([M-H]⁻ em m/z 563) apresentou dois fragmentos MS², um em m/z 417 (-146 u) e outro em 285 (-162 u), indicando adicionalmente a perda alternativa de cada um dos açúcares, o que sugere que a sua localização se encontra em diferentes posições na aglicona. Desta forma, o composto foi tentativamente identificado como canferol-*O*-

ramnósido-*O*-pentósido. Com base na literatura disponível, ambos os compostos são pela primeira vez descritos em *R. raphanistrum*. O composto 11^{RR} ([M-H]⁻ em *m/z* 577) apresentou um padrão de fragmentação semelhante ao pico 8^{RR}, com a perda de dois resíduos ramnosil (292 u), sendo assim tentativamente atribuído como um canferol-3-*O*-di-ramnósido, tendo este composto sido anteriormente descrito em *Rorippa indica* (Linn.), uma espécie pertencente à mesma família de *R. raphanistrum* (Lin *et al.*, 2014). Os restantes compostos (picos 10^{RR}, 12-14^{RR}) foram todos identificados como flavonoides acilados devido à observação da perda de um resíduo feruloil (176 u), sendo coerente com as identidades dos compostos remanescentes, bem como sua eluição tardia, visto que a presença de um resíduo hidroxicinamoil implica um decréscimo da polaridade, bem como uma diminuição nos valores de absorvância máxima. Todos os compostos destes picos foram anteriormente identificados por Lin *et al.* (2014), sendo esta informação tida em conta para a espécie estudada neste trabalho. O extrato hidroalcoólico foi aquele que apresentou a maior concentração de compostos fenólicos identificados, sendo o grupo dos flavonoides o mais abundante (97-99% do conteúdo total de compostos fenólicos), e o canferol-3-*O*-di-ramnósido o composto maioritário em ambos os extratos.

As plantas silvestres comestíveis podem ser consumidas com diferentes propósitos, podendo ser utilizadas como alimento, infusões ou na medicina tradicional (Özen, 2010). Como referido, a planta *Raphanus raphanistrum*, para além de poder ser consumida crua (sobretudo em saladas) ou confeccionada (sopas, esparregados, etc.), tem sido também associada a propriedades benéficas para além das nutricionais, sendo usada no tratamento de afeções hepatobiliares, brônquicas e em problemas dispépticos, principalmente relacionados com disquinésia biliar (Neto e Simões, [s,d,]). Assim, neste trabalho procedeu-se à avaliação de diferentes propriedades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana.

Os resultados da atividade antioxidante, avaliada através de quatro métodos distintos, são apresentados na Tabela 8. Como se pode observar, verificaram-se diferenças significativas entre os dois extratos, sendo evidente a superioridade do extrato alcoólico sobre a decocção, em virtude de menores quantidades de extrato serem requeridas para obter o EC₅₀. Este resultado está de acordo com os apresentados nos pontos anteriores, uma vez que a extração com o solvente hidroalcoólico permitiu obter teores superiores de compostos fenólicos e tocoferóis, isto é, de substâncias com potencial antioxidante. Contudo, é de salientar que a água de decocção apresenta também atividade antioxidante,

Tabela 7. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massas, identificação e quantificação dos compostos fenólicos nos extratos alcoólico e decocção da *Raphanus raphanistrum* (média \pm DP, $n=3$).

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Decocção (mg/g extrato)	Hidroalcoólico (mg/g extrato)	teste <i>t</i> -Student <i>p</i> -valor
1 ^{RR}	6,41	313	337	191(100),173(5),163(5),147(3),129(2)	Ácido 3- <i>p</i> -Cumaroilquinico ^{a:1}	0,52 \pm 0,01	0,16 \pm 0,004	<0,001
2 ^{RR}	7,76	318	367	193(29),191(100),173(5),147(5),129(2)	Ácido 3- <i>O</i> -Feruloilquinico ^{b:1}	0,22 \pm 0,001	0,175 \pm 0,001	<0,001
3 ^{RR}	14,88	353	609	463(60),447(100),301(15)	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido-7- <i>O</i> -glucósido ²	0,94 \pm 0,02	1,2 \pm 0,03	<0,001
4 ^{RR}	15,25	353	609	463(49),447(100),301(15)	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido-7- <i>O</i> -glucósido ²	2,34 \pm 0,001	3,63 \pm 0,01	<0,001
5 ^{RR}	16,31	266,346	771	285(100)	Canferol- <i>O</i> -suforosil-glucósido ³	1,53 \pm 0,01	1,88 \pm 0,005	<0,001
6 ^{RR}	16,65	266,350	593	447(100),285(5)	Canferol 3- <i>O</i> -ramnósido-7- <i>O</i> -glucósido ²	4,07 \pm 0,1	6 \pm 0,2	<0,001
7 ^{RR}	17,58	266,346	593	447(100),431(47),285(8)	Canferol 3- <i>O</i> -ramnósido-7- <i>O</i> -glucósido ²	3,62 \pm 0,06	4,47 \pm 0,02	<0,001
8 ^{RR}	18,64	347	563	417(100),285(50)	Canferol- <i>O</i> -ramnósido- <i>O</i> -pentósido ³	1,8 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	0,001
9 ^{RR}	20,39	348	739	593(100),431(20),285(12)	Canferol 3- <i>O</i> -(2''-glucosil)-ramnósido-7- <i>O</i> -ramnósido ²	1,04 \pm 0,004	1,44 \pm 0,01	<0,001
10 ^{RR}	20,90	326	931	785(100),285(5)	Canferol-3- <i>O</i> -feruloildihexósido-7- <i>O</i> -ramnósido ⁴	0,85 \pm 0,005	1,1 \pm 0,03	<0,001
11 ^{RR}	21,48	329	577	431(100),285(11)	Canferol-3- <i>O</i> -di-ramnósido ⁴	4,85 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1	<0,001
12 ^{RR}	23,19	330	917	771(5),609(100),285(11)	Canferol-3- <i>O</i> -cafeioildihexósido-7- <i>O</i> -ramnósido ⁴	0,47 \pm 0,02	0,7 \pm 0,02	<0,001
13 ^{RR}	24,03	332	947	801(100),625(22),301(15)	Quercetina-3- <i>O</i> -feruloildihexósido-7- <i>O</i> -ramnósido ⁴	0,68 \pm 0,04	0,8 \pm 0,02	0,002
14 ^{RR}	26,37	330	931	785(100),609(11),285(5)	Canferol-3- <i>O</i> -feruloildihexósido-7- <i>O</i> -ramnósido ⁴	1,84 \pm 0,04	2,5 \pm 0,02	<0,001
Total de ácidos fenólicos						0,74 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	<0,001
Total de flavonoides						24,02 \pm 0,4	33,26 \pm 0,5	<0,001
Total de compostos fenólicos						24,76 \pm 0,4	33,59 \pm 0,5	<0,001

Padrões das curvas de calibração: ^aÁcido *p*-cumárico ($y = 301,950x + 6966,7$; $R^2 = 0,999$); ^bÁcido ferúlico ($y = 633,126x - 185,462$; $R^2 = 0,999$); Para os picos restantes (3^{RR} ao 14^{RR}) utilizou a curva Quercetina-3-*O*-rutinósido ($y = 13343x + 76,751$, $R^2 = 0,9998$). Análise da diferença significativa ($p < 0,05$). Tipos de identificação: 1 – Clifford, Johnston, Knight e Kuhner (2003), Clifford, Knight e Kuhnert (2005); 2 – Ibrahim *et al.* (2016), 3 –DAD, MS; 4 – Lin *et al.* (2014).

daí que, quando cozinhada, será mais benéfico o consumo desta planta em sopas do que cozida com rejeição da água de cozimento.

Tabela 8. Atividades antioxidante, anti tumoral, anti-inflamatória e hepatotoxicidade dos extratos obtidos da planta *Raphanus raphanistrum* (média \pm DP, $n=3$).

	<i>R. raphanistrum</i>		teste <i>t</i> -Student <i>p</i> -valor
	Decocção	Hidroalcoólico	
Atividade antioxidante (EC ₅₀ mg/mL)			
DPPH (EC ₅₀ ; mg/mL)	4,0 \pm 0,1	3,12 \pm 0,07	<0,001
Poder Redutor (EC ₅₀ ; mg/mL)	3,23 \pm 0,03	1,01 \pm 0,01	<0,001
β -caroteno (EC ₅₀ ; mg/mL)	0,56 \pm 0,02	0,26 \pm 0,03	<0,001
TBARS (EC ₅₀ ; mg/mL)	0,16 \pm 0,06	0,108 \pm 0,007	0,022
Atividade anti tumoral (GI ₅₀ μ g/mL)			
MCF-7 (Carcinoma de mama)	>400	>400	-
NCI-H460 (Carcinoma de pulmão)	>400	>400	-
HeLa (Carcinoma cervical)	>400	>400	-
HepG2 (Carcinoma de fígado)	>400	>400	-
Hepatotoxicidade (GI ₅₀ μ g/mL)			
PLP2	>400	>400	-
Atividade anti-inflamatória (EC ₅₀ μ g/mL)			
Produção de óxido nítrico (NO) em RAW264,7	>400	>400	-

A atividade antioxidante foi expressa em valores de EC₅₀, significando que altos valores correspondem a baixo poder redutor ou potencial antioxidante. EC₅₀: corresponde a concentração de extrato necessária para obter 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância na análise de poder redutor. Trolox valores de EC₅₀: 41 μ g/mL (poder redutor), 42 μ g/mL (DPPH), 18 μ g/mL (β -carotene) e 23 μ g/mL (TBARS). Os resultados da atividade anti-inflamatória foram expressos em valores de EC₅₀: correspondendo as concentrações necessárias para promover a inibição de 50% da produção de óxido nítrico (NO). Os resultados de citotoxicidade foram expressos em valores de GI₅₀: correspondendo a concentração de amostra necessária para realizar a inibição do crescimento em 50% sob células tumorais humanas ou em cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). Elipticina valores de GI₅₀: 1,2 μ g/mL (MCF-7), 1,0 μ g/mL (NCI-H460), 0,91 μ g/mL (HeLa), 1,1 μ g/mL (HepG2) e 2,3 μ g/mL (PLP2).

A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico, determinada pelo método de DPPH, foi também efetuada por Nehir El e Karakaya (2004), tendo no entanto descrito um valor de EC₅₀ superior ao obtido neste trabalho. Situação idêntica (EC₅₀ superior ao deste trabalho) foi observada para o extrato aquoso preparado por maceração à temperatura ambiente (Küçükboyacı, Güvenç, Turan & Aydın, 2012). Bevilaqua, Schiedeck e Schwengber (2007) descrevem que a diferença nos genótipos das plantas pode estar associada a variabilidade química e, por consequência, variações de

bioatividade. Outros fatores como o momento da colheita, localização geográfica/clima e adaptação da planta ao solo devem também serem levados em consideração, pois podem causar alterações do conteúdo de compostos bioativos nas plantas.

Na Tabela 8 são ainda apresentados os resultados para as análises de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória. Como se pode verificar, os extratos não apresentaram atividade antitumoral nas concentrações testadas, o que não está de acordo com o estudo de Marrelli, Cristaldi, Menichini e Conforti (2015) onde o extrato hidroetanólico de *R. raphanistrum* demonstrou atividade sobre as células de cancro de fígado (HepG2) numa concentração de 100 µg/mL. Da mesma forma, no estudo de Ibrahim *et al.* (2016) foi demonstrada moderada atividade citotóxica em células HepG2, além de atuar sobre as células de cancro de mama (MCF-7). Porém, a concentração testada foi na ordem de 100 mg/mL, sendo muito superior à concentração máxima utilizada neste trabalho (400µg/mL).

No âmbito da segurança alimentar os perigos de origem biológica, tais como fungos, bactérias, toxinas microbianas, vírus e parasitas patogénicos, são requisitos a ser controlados dado o risco que a sua ingestão representa, podendo, em situações extremas, provocar a morte (Baptista & Venâncio, 2003).

Segundo o *Center for Food Safety and Applied Nutrition* e o *European Food Safety Authority*, os microrganismos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* estão frequentemente envolvidos em doenças de origem alimentar. Conforme apresentado na Tabela 9, ambos os extratos possuem potencial de inibição dessas bactérias, apresentando ainda ação bactericida sobre *E. coli* e *L. monocytogenes*.

De um modo geral, constata-se que os dois extratos apresentam resultados idênticos contra os microrganismos testados, apresentando valores de MIC inferiores para a bactéria *E. coli* e não apresentando atividade antibacteriana contra *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, para as concentrações testadas. Para MRSA e *E. faecalis*, os extratos possuem apenas atividade inibidora sem potencial de atuação como agente bactericida nas concentrações testadas.

De forma similar, Abdou *et al.* (1972) descreveu previamente que extratos etanólicos de *Raphanus sativus*, planta pertencente ao mesmo género de *R. raphanistrum*, apresentam ação inibitória contra *E. coli*.

Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos da planta *Raphanus raphanistrum*.

	Alcoólico		Decocção		Ampicilina (20 mg/mL)		Imipenem (1mg/mL)		Vancomicina (1 mg/mL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Atividade antibacteriana										
Bactérias Gram-negativas										
<i>Escherichia coli</i>	2,5	20	2,5	20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	20	10	20	10	20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Morganella morganii</i>	10	20	10	20	20	>20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	>20	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	0,5	1	nt	nt
Bactérias Gram-positivas										
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	>20	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	20	5	20	<0,15	<0,15	nt	nt	nt	nt
MRSA	10	>20	10	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
Atividade antifúngica*										
<i>Candida albicans</i>	>20	>20	>20	>20	nt	nt	nt	nt	nt	nt

nt – Não testado. MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MIC – Concentração mínima inibitória; MBC – Concentração mínima bactericida; MFC – Concentração mínima fungicida. Resultados expressos em mg/mL de extrato. * Fluconazol (1 mg/mL, controlo positivo): MIC e MFC = 0.06 mg/mL.

4.2 *Umbilicus rupestris*

Esta planta, à semelhança de *R. raphanistrum*, enquadra-se na classe de plantas silvestres e comestíveis, existindo igualmente uma escassez de informação sobre a sua composição nutricional. Este facto contribui para uma menor divulgação e consequente utilização por parte dos consumidores, fundamentando a realização do presente estudo.

A Tabela 10 apresenta os valores obtidos para a composição nutricional das folhas de três amostras de *U. rupestris*, provenientes de diferentes localidades, nomeadamente Viseu (*U. rupestris* 1, UR1), Vila Real (*U. rupestris* 2, UR2) e Bragança (*U. rupestris* 3, UR3). Como esperado, verificou-se um elevado teor de humidade em todas as amostras o que poderá ser explicado pelo metabolismo característico desta espécie (CAM). Este, como referido, caracteriza-se pela abertura dos estomas durante a noite para captura de água do meio ambiente e posterior armazenamento na planta (Geydan & Melgarejo, 2005). Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes, seguidos das proteínas, cinzas e lípidos. No que respeita o valor energético, assim como *R. raphanistrum*, as amostras de *U. rupestris* apresentaram um valor muito baixo, pelo que podem ser englobadas em dietas de baixo índice de ingestão calórico.

O controlo do metabolismo, crescimento e desenvolvimento das plantas são exemplos de situações que envolvem os açúcares por elas produzidos a partir da fotossíntese (Rolland, Moore & Sheen, 2002). Nas amostras de *U. rupestris* foram identificados apenas dois açúcares livres, nomeadamente manose e sacarose, sendo o composto maioritário a manose. Foram detetadas diferenças significativas no teor destes açúcares livres entre as amostras de diferentes localidades, as quais, à semelhança das diferenças observadas para os restantes parâmetros apresentados na Tabela 10, podem ser explicadas por fatores tais como as condições climáticas, fertilidade do solo e diferentes estágios de maturação (Hu *et al.*, 2016). Contudo, este último fator terá uma menor influência nos resultados, dado que as amostras foram colhidas na mesma época do ano, em datas muito próximas entre si.

Fatores ambientais, nomeadamente o frio e estresse hídrico podem ocasionar alterações nos constituintes das plantas como consequência de mudanças metabólicas (Pedro Machado *et al.*, 2013). Observando os dados meteorológicos relativos aos meses de Novembro e Dezembro para as regiões de colheita das plantas, Viseu apresenta valores superiores de temperatura (mínima e máxima) e pluviosidade, seguida por Vila Real e

Bragança (Divisão de Clima e Alterações Climáticas, 2017). Refira-se ainda que os valores de temperatura e pluviosidade são mais semelhantes entre Viseu e Vila Real, comparativamente a Bragança. Outras condições do ambiente, mais especificamente a composição nutricional do solo, podem interferir nos teores identificados para determinadas substâncias da composição proximal da planta, em particular as proteínas (Guimarães, Souza, Hirano, Pereira & Baracat-Pereira, 2013) e teor de cinzas (Oliveira *et al.*, 2016).

Tabela 10. Valor nutricional, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos das plantas de *Umbilicus rupestris* em estudo (média \pm DP, $n=3$).

	<i>U. rupestris</i> 1	<i>U. rupestris</i> 2	<i>U. rupestris</i> 3
Valor nutricional (g/100 g massa fresca)			
Humidade	93 \pm 1a	94,6 \pm 0,5a	93,6 \pm 0,1a
Cinzas	0,91 \pm 0,01a	0,61 \pm 0,07b	0,83 \pm 0,05a
Proteínas	1,83 \pm 0,06a	1,60 \pm 0,05b	1,35 \pm 0,01c
Lípidos	0,255 \pm 0,002a	0,203 \pm 0,006b	0,17 \pm 0,02c
Glúcidos	3,90 \pm 0,03b	2,94 \pm 0,09c	4,03 \pm 0,05a
Energia (Kcal/100 g massa fresca)	25,2 \pm 0,1a	20,0 \pm 0,2c	23,0 \pm 0,1b
Açúcares livres (g/100 g massa fresca)			
Manose	0,902 \pm 0,01a	0,51 \pm 0,02c	0,78 \pm 0,06b
Sacarose	0,082 \pm 0,002a	0,020 \pm 0,002c	0,073 \pm 0,003b
Total de açúcares livres	0,98 \pm 0,01a	0,53 \pm 0,03c	0,85 \pm 0,06b
Ácidos orgânicos (g/100 g massa fresca)			
Ácido Oxálico	0,48 \pm 0,01a	0,33 \pm 0,01b	0,27 \pm 0,01c
Ácido Málico	0,210 \pm 0,005b	0,215 \pm 0,001b	0,421 \pm 0,002a
Ácido Ascórbico	0,021 \pm 0,001a	0,008 \pm 0,001c	0,013 \pm 0,001b
Ácido Cítrico	0,334 \pm 0,001b	0,375 \pm 0,002a	0,21 \pm 0,01c
Ácido Fumárico	tr	tr	tr
Total de ácidos orgânicos	1,04 \pm 0,01a	0,93 \pm 0,01b	0,92 \pm 0,01b

tr – vestígios (abaixo dos LOD dos padrões). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p<0,05$).

Relativamente ao teor de ácidos orgânicos, observa-se que as plantas analisadas apresentam diferenças, em particular no que respeita ao composto maioritário, variando este entre os ácidos oxálico, cítrico e málico. O teor de ácido oxálico nas amostras de *U. rupestris* variou entre 0,27-0,48 mg/100 g planta fresca, sendo inferior ao determinado na planta *Raphanus raphanistrum* (item 4.1). Relativamente aos valores de ácido ascórbico, observa-se que todas as amostras diferiram entre si, apresentando teores geralmente superiores quando comparados com outros vegetais como a alface e o espinafre (11,0 e

2,4 mg/g massa fresca, respetivamente) (NEPA, 2011). O USDA – *United States Department of Agriculture* recomenda uma ingestão diária mínima de vitamina C, variando de acordo com a idade e necessidade do indivíduo. Demonstração a título de exemplo, uma pessoa do sexo masculino, não fumador, com idade superior a 19 anos deveria ingerir 90 mg de vitamina C por dia. Consequentemente, numa dieta equilibrada a planta *U. rupestris* contribuirá razoavelmente para o valor diário ingerido.

Quanto ao teor de ácido cítrico e málico foram detetadas diferenças significativas entre as amostras, verificando-se um teor superior do segundo nas amostras UR1 e UR2, ocorrendo o oposto na planta UR3. Segundo Chen e Nose (2004) a importação do malato para os vacúolos, associada ao metabolismo CAM, é realizada com utilização de energia implicando um maior consumo de ácido cítrico. Desta forma, justifica-se que a amostra UR3, que apresenta a quantidade de ácido málico superior, seja aquela que apresenta igualmente um menor teor de ácido cítrico.

A determinação do teor lipídico e composição em ácidos gordos da planta possibilita avaliar de forma criteriosa a composição de nutrientes e potenciais benefícios associados ao seu consumo. A Tabela 11 apresenta os ácidos gordos identificados nas amostras de *U. rupestris* e respetivas quantidades.

Identificaram-se como compostos maioritários dois ácidos gordos essenciais, o ácido alfa-linolénico (C18:3n3, ω -3 PUFA) e o ácido linoleico (C18:2n6, ω -6 PUFA), os quais, como referido no item 4.1, possuem efeitos benéficos a saúde do consumidor quando em ingestão equilibrada. Encontra-se também presente em quantidade considerável o ácido palmítico (C16:0, SFA), frequentemente encontrado na alimentação humana.

Apesar do perfil qualitativo ser semelhante entre as amostras, a análise estatística permitiu verificar a existência de diferenças significativas entre elas, o que, como referido para outros parâmetros, poderá estar relacionado com diferentes fatores agroambientais (clima, latitude, solo, entre outras) (Balbino, 2017). Estudos realizados sugerem que o aumento da irrigação promove o aumento significativo do conteúdo de ácido linolénico, com simultânea redução do teor de ácido oleico, conforme apresentado em variedades de oliveira (Caruso *et al.*, 2014) e girassol (Sezen, Yazar, Kapur & Tekin, 2011). Um resultado similar foi obtido neste trabalho, uma vez que a amostra colhida em Viseu, localidade com nível médio de precipitação superior nos meses de novembro e dezembro

de 2017 (Divisão de Clima e Alterações Climáticas, 2017), foi a que apresentou o conteúdo superior de ácido linolénico e inferior de oleico, ocorrendo o oposto com a amostra colhida em Bragança.

Tabela 11. Ácidos gordos identificados nas plantas *Umbilicus rupestris* (média \pm DP, $n=3$).

	<i>U. rupestris</i> 1	<i>U. rupestris</i> 2	<i>U. rupestris</i> 3
Ácidos gordos			
C8:0	0,043 \pm 0,001a	0,025 \pm 0,001c	0,029 \pm 0,001b
C10:0	0,024 \pm 0,001a	0,023 \pm 0,002a	0,017 \pm 0,001b
C11:0	0,23 \pm 0,01a	0,18 \pm 0,01b	0,26 \pm 0,03a
C12:0	0,043 \pm 0,001c	0,070 \pm 0,001a	0,056 \pm 0,002b
C13:0	0,169 \pm 0,004b	0,38 \pm 0,03a	0,12 \pm 0,01c
C14:0	0,48 \pm 0,007b	0,77 \pm 0,02a	0,76 \pm 0,05a
C14:1	0,153 \pm 0,001b	0,275 \pm 0,004a	0,086 \pm 0,003c
C15:0	0,068 \pm 0,005b	0,079 \pm 0,003a	0,065 \pm 0,001b
C16:0	10,6 \pm 0,8b	12,0 \pm 0,5a	11,0 \pm 0,2ab
C16:1	1,07 \pm 0,03a	0,98 \pm 0,04b	0,61 \pm 0,04c
C17:0	0,128 \pm 0,001b	0,114 \pm 0,008c	0,201 \pm 0,001a
C18:0	1,6 \pm 0,2a	0,80 \pm 0,02c	1,06 \pm 0,02b
C18:1n9	0,641 \pm 0,002b	0,50 \pm 0,02c	0,69 \pm 0,02a
C18:2n6	18,3 \pm 0,6b	17,9 \pm 0,9b	21,0 \pm 0,3a
C18:3n3	62 \pm 2a	61 \pm 2ab	58,9 \pm 0,6b
C20:0	0,68 \pm 0,04a	0,54 \pm 0,04b	0,48 \pm 0,02b
C20:1	0,037 \pm 0,001b	0,047 \pm 0,000a	0,028 \pm 0,001c
C20:2	0,079 \pm 0,004b	0,105 \pm 0,005a	0,077 \pm 0,003b
C21:0	0,046 \pm 0,004a	0,035 \pm 0,003b	0,028 \pm 0,002c
C20:4n6	0,449 \pm 0,004c	0,60 \pm 0,02a	0,56 \pm 0,02b
C20:3n3	0,151 \pm 0,009a	0,11 \pm 0,01b	0,121 \pm 0,001b
C22:0	1,27 \pm 0,09a	1,2 \pm 0,1a	0,92 \pm 0,05b
C23:0	1,25 \pm 0,09c	1,83 \pm 0,03b	2,038 \pm 0,001a
C24:0	0,926 \pm 0,002ab	0,9 \pm 0,1b	0,95 \pm 0,02a
SFA (%)	18 \pm 1a	18,9 \pm 0,7a	18,0 \pm 0,3a
MUFA (%)	1,90 \pm 0,02a	1,79 \pm 0,05b	1,41 \pm 0,01c
PUFA (%)	80 \pm 1a	79,2 \pm 0,8a	80,6 \pm 0,3a
ω-6/ω-3	0,30 \pm 0,02b	0,29 \pm 0,02b	0,36 \pm 0,01a

SFA: ácidos gordos saturados, MUFA: ácidos gordos monoinsaturados, PUFA: ácidos gordos polinsaturados, ω -6/ ω -3: rácio ómega 6 e ómega 3. Ácido caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); undecanóico (C11:0); láurico (C12:0); tridecanóico (C13:0); mirístico (C14:0); miristoleico (C14:1); pentadecanóico (C15:0); palmítico (C16:0); palmitoleico (C16:1); heptadecanóico (C17:0); esteárico (C18:0); oleico (C18:1n9c); linoleico (C18:2n6c); alfa-linolénico (C18:3n3); araquídico (C20:0); eicosenóico (C20:1c); *cis*-11,14-eicosenóico (C20:2c); heneicosanóico (C21:0); araquidônico (C20:4n6); *cis*-11, 14, 17- eicosatrienóico (C20:3n3); behênico (C22:0); tricosanóico (C23:0); lignocérico (C24:0). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p<0.05$).

Outros autores descrevem a existência de diferenças significativas nos teores de ácidos monoinsaturados, em particular de ácido palmitoleico (C16:1), em *Salvia officinalis* sob condições de *deficit* hídrico (Bettaieb, Zakhama, Wannes, Kchouk & Marzouk, 2009). Também neste trabalho se observou um efeito similar nas plantas *U. rupestris*, apresentando a amostra de Bragança (região com menor pluviosidade no mês de colheita e mês anterior) um teor inferior de C16:1n7.

Da mesma forma como descrito para a planta *R. raphanistrum* (item 4.1), o rácio ω -6/ ω -3 obtido para as amostras de *U. rupestris* é consideravelmente baixo devido ao teor elevado de ácido α -linolénico (C18:3n3, ω -3).

A vitamina E é adquirida pelo organismo humano através da ingestão de alimentos e/ou suplementos vitamínicos. Na Figura 6 apresentam-se as isoformas de tocoferol identificadas na planta *U. rupestris*, sendo a sua quantificação nas amostras apresentada na Tabela 12. Nesta, pode observar-se que a isoforma presente em maiores quantidades na planta em análise foi o α -tocoferol, seguido do vitâmero γ -tocoferol.

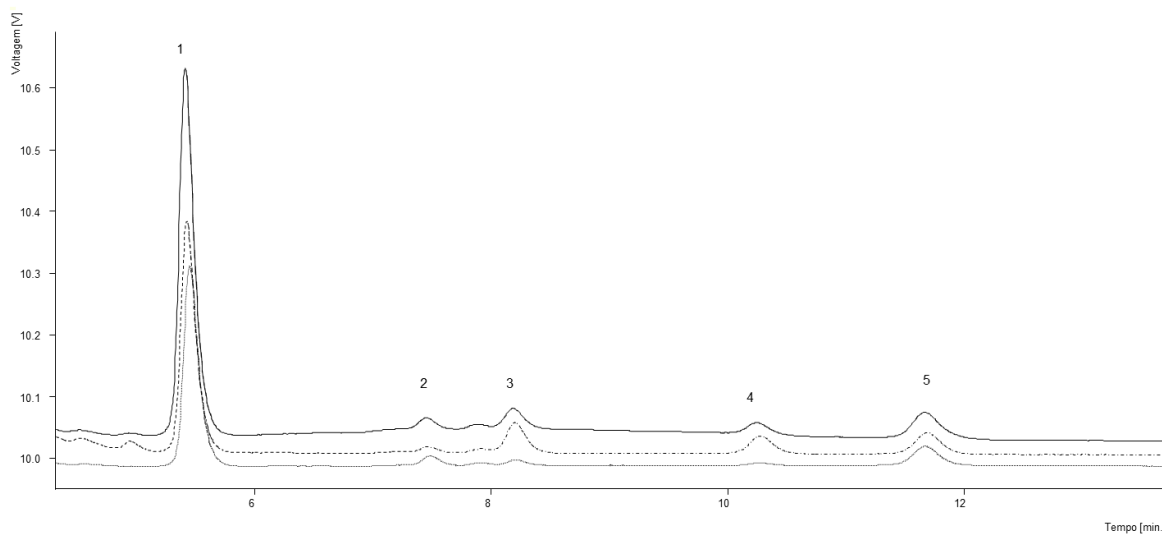


Figura 6. Cromatograma relativo à análise de tocoferóis das plantas *Umbilicus rupestris* 1 (...), *Umbilicus rupestris* 2 (--) e *Umbilicus rupestris* 3 (-). 1- α -tocoferol, 2- β -tocoferol, 3- γ -tocoferol, 4- δ -tocoferol, 5- Tocol (PI).

Os radicais livres atuam nas plantas e alimentos provocando danos sobre as características sensoriais e qualidade nutricional (Alves, David, David, Bahia & Aguiar, 2010). Tanto o α -tocoferol quanto o γ -tocoferol são descritos como tendo potencial de atuação como antioxidantes. No entanto, o γ -tocoferol tem reduzida capacidade de doar elétrons aos radicais lipídicos devido à falta de um grupo metilo doador. Contudo, os

autores Jiang, Christen, Shigenaga e Ames (2001) descrevem que a posição C-5 não substituída do γ -tocoferol aparentemente o torna mais capaz de atuar sobre radicais lipofílicos, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

O vitâmero α -tocoferol possui potencial de atuação em radicais peróxido promovendo a sua transformação em radicais α -tocoferoxilo, o qual pode ser regenerado à sua forma original de α -tocoferol pela ação do ácido ascórbico ou ubiquinona-10 (Tucker & Townsend, 2005). Assim, os níveis do α -tocoferol (Tabela 12) e do ácido ascórbico (Tabela 10) estão interligados o que poderá explicar que a amostra UR2, que apresenta um teor inferior de ácido ascórbico, seja a que igualmente apresenta um menor conteúdo em α -tocoferol. No entanto, interessantemente, UR2 foi a amostra que apresentou o teor total em tocoferóis mais elevado.

Tabela 12. Tocoferóis das plantas *Umbilicus rupestris* (média \pm DP, $n=3$).

	<i>U. rupestris</i> 1	<i>U. rupestris</i> 2	<i>U. rupestris</i> 3
Tocoferóis ($\mu\text{g}/100$ g de massa fresca)			
α -Tocoferol	636 \pm 0,006b	552 \pm 0,001c	700 \pm 0,001a
β -Tocoferol	42 \pm 0,001a	20 \pm 0,001c	25 \pm 0,001b
γ -Tocoferol	70 \pm 0,001c	300 \pm 0,001a	152 \pm 0,001b
δ -Tocoferol	36 \pm 0,002c	180 \pm 0,001a	101 \pm 0,003b
Total de tocoferóis	790 \pm 0,01c	1050 \pm 0,01a	980 \pm 0,01b

À semelhança de *R. raphanistrum*, também para esta planta se procedeu à realização de dois extratos diferentes, hidroalcoólico e aquoso (decoção). Relativamente aos teores de açúcares identificados nos extratos observa-se que, de uma maneira geral, a extração com o solvente hidroalcoólico foi mais efetiva, sendo este resultado similar ao obtido para *R. raphanistrum* (item 4.1).

Apenas três dos ácidos orgânicos determinados na planta foram também identificados nos extratos, sendo o ácido oxálico o maioritário, seguido do ácido málico e ascórbico, com exceção na decoção da amostra UR3 (Tabela 13).

Relativamente aos vitâmeros de tocoferol, detetou-se a presença nos extratos hidroalcoólicos de todas as isoformas presentes na planta, sendo o α -tocoferol o composto maioritário, seguido do gama, delta e beta-tocoferol. A ausência destes compostos na decoção acontece em virtude da polaridade do solvente.

Tabela 13. Açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis dos extratos das plantas em estudo *Umbilicus rupestris* (média ± DP, n=3).

	<i>U. rupestris</i> 1		<i>U. rupestris</i> 2		<i>U. rupestris</i> 3	
	Decocção	Hidroalcoólico	Decocção	Hidroalcoólico	Decocção	Hidroalcoólico
Açúcares livres (mg/g extrato)						
Manose	183±2c	376±7a	99±6e	87±9e	134±3d	266±7b
Sacarose	nd	24,3±0,2*	nd	nd	nd	16,3±0,4*
Total de açúcares livres	183±2c	401±7a	99±6e	87±9e	134±3d	283±7b
Ácidos orgânicos (mg/g extrato)						
Oxálico	170±1d	181,0±0,3c	184±3b	200,6±0,8a	85,9±0,8f	101±1e
Málico	45±1c	1,1±0,01e	81,4±0,8b	5,8±0,3d	101±4a	8,2±0,1d
Ascórbico	2,66±0,01a	0,43±0,001d	0,94±0,001c	0,277±0,001e	2,06±0,01b	0,165±0,003f
Total de ácidos orgânicos	218±2b	182,5±0,3e	267±3a	207±1c	189±5d	109±1f
Tocoferóis (mg/g extrato)						
α-Tocoferol	nd	0,91±0,05c	nd	1,88±0,03b	nd	2,10±0,02a
β-Tocoferol	nd	0,048±0,005b	nd	0,099±0,001a	nd	0,095±0,004a
γ-Tocoferol	nd	0,186±0,003c	nd	1,06±0,01a	nd	0,593±0,005b
δ-Tocoferol	nd	0,09±0,01c	nd	0,798±0,004a	nd	0,368±0,005b
Total de tocoferóis	nd	1,24±0,05c	nd	3,84±0,06a	nd	3,16±0,03b

nd – Não detetado. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0.05$). *Simboliza diferenças significativas ($p < 0.05$) determinadas através do teste *t*-Student.

Para a avaliação do potencial bioativo das plantas colhidas nas diferentes localizações geográficas foram utilizados os extratos hidroalcoólico e aquoso, visto que o seu consumo pode ser realizado de diversas formas. Adicionalmente, esta espécie de *Umbilicus* pode ser utilizada em fitoterapia, atuando como desinfetante e parasiticida e utilizando-se as suas folhas em casos de queimaduras e feridas na pele. Ainda, devido a propriedade antisséptica infusões preparadas com as folhas são capazes agir como desinfetante oftalmológico (Benhouda & Yahia, 2015).

Os compostos fenólicos são substâncias com grande influência no potencial bioativo das plantas. A caracterização do perfil das amostras de *U. rupestris* nestes compostos foi realizada por meio cromatográfico (HPLC-DAD-ESI/MS), sendo os dados de tempo de retenção, λ_{\max} , m/z pseudomolecular, fragmentos de íons principais em MS², tentativa de identificação e quantificação dos compostos fenólicos apresentados na Tabela 14 e Tabela 15.

Nas amostras de *U. rupestris* foi identificada a presença de 16 compostos, 3 ácidos fenólicos (derivados do hidroxicinâmico), 12 flavonoides (derivados glicosídicos de flavonóis e flavonas), e um glicosídeo fenilpropanóide (venusol) (Figura 7). De acordo com a literatura disponível, o perfil fenólico desta espécie de planta ainda não havia sido explorado.

Os compostos 3^{UR} (ácido cafeico) e 8^{UR} (ácido ferúlico) foram identificados positivamente em comparação com o padrão comercial. O composto 4^{UR} ([M-H]⁻ em m/z 355) apresentou 162 u (fração de glicosil) a mais que o pico 8^{UR}, sendo identificado como ácido ferúlico hexósido. Entre os ácidos fenólicos quantificados na planta, o que se encontra em maior quantidade é o cafeico, seguido do ferúlico, ambos descritos com propriedades bioativas, como potencial citotóxico, antioxidante e antimicrobiano (Magnani, Isaac, Correa & Salgado, 2014; Oliveira Silva & Batista, 2017), ao ácido ferúlico tem-se também associado a capacidade de atuação como anti-inflamatório (Oliveira Silva & Batista, 2017).

O pico 6^{UR} ([M-H]⁻ em m/z 323) foi identificado como venusol, tendo em conta os espectros de UV e o m/z pseudomolecular em comparação com outros estudos da espécie *Umbilicus* (Viorneri *et al.*, 2000), em que foi previamente identificado este composto.

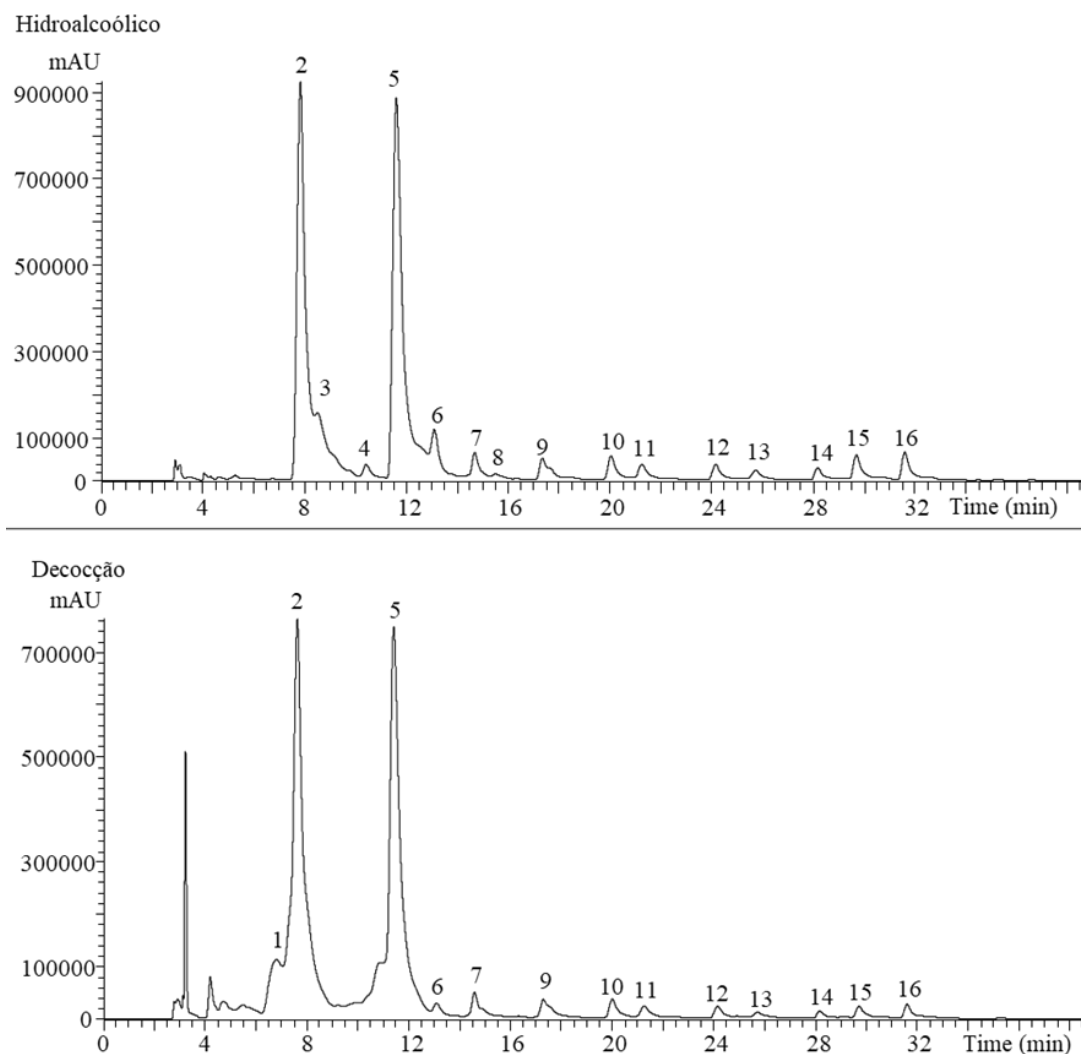


Figura 7. Perfil fenólico dos extratos hidroalcoólico e decocção da planta *Umbilicus rupestris* 1 a 370 nm. Todos os números apresentados nos cromatogramas correspondem aos compostos identificados na Tabela 14.

Os compostos remanescentes foram identificados como derivados glicosídicos de flavonóis: quercetina (λ_{max} em cerca de 353 nm, e um fragmento MS^2 em m/z 301), isoramnetina (λ_{max} em cerca de 358 nm, e um fragmento MS^2 em m/z 315), miricetina (λ_{max} em cerca de 356 nm, e um fragmento MS^2 em m/z 317) e o derivado glicosídeo da flavona crisoeriol (λ_{max} em cerca de 354 nm, e um fragmento MS^2 em m/z 299). Os compostos 1^{UR} e 2^{UR} apresentaram o mesmo íon pseudomolecular ($[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 655), com fragmentos MS^2 revelando a possível perda de resíduos de glucuronil (m/z em 479, -176 u) e hexosil (m/z em 317, -162 u), indicando a localização de cada resíduo em diferentes posições da aglicona, ambos identificados como miricetina-*O*-glucuronídeo-*O*-hexósido. Similarmente, o composto 5^{UR} ($[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 639) foi identificado como

quercetina-*O*-glucoronídeo-*O*-hexósido. O pico 7^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 741) apresentou 86 u (fração de malonil) a mais que os compostos 1^{UR} e 2^{UR}, sendo tentativamente identificado como miricetina-*O*-malonilglucorósido-*O*-hexósido. As características de massa do pico 9^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 725) e 11^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 739) indicaram que correspondem a derivados de isoramnetina, tendo no primeiro pico um grupo de pentosil (9^{UR}) e um deoxihexósido no segundo pico (11^{UR}), e a perda adicional em ambos os picos de resíduos de deoxihexosil-pentósido. A observação dos fragmentos MS² em *m/z* 593 (-132 e 146 u) e 315 (-146+132 u), também indicam a perda alternativa de cada um dos grupos de açúcar, respetivamente, apontando os seus locais em diferentes posições da aglicona. Assim, estes compostos foram tentativamente identificados como isoramnetina-*O*-pentósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido) e isoramnetina-*O*-deoxihexósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido), respetivamente. Similarmente, os compostos 10^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 709) e 12^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 723) foram identificados como crisoeriol-*O*-pentósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido) e crisoeriol-*O*-deoxihexósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido), respetivamente. Os compostos 13^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 811) e 15^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 825) apresentaram 86 u (fração malonil) a mais que os compostos 9^{UR} e 11^{UR}, sendo tentativamente identificados como isoramnetina-*O*-malonilpentósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido) e isoramnetina-*O*-malonildeoxihexósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido), respetivamente. Tendo em conta estes resultados, os compostos 14^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 795) e 16^{UR} ([M-H]⁻ em *m/z* 809) também foram identificados como tendo resíduos de malonil (86 u) a mais que os picos 10^{UR} e 12^{UR}, sendo assim identificados como crisoeriol-*O*-malonilpentósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido) e crisoeriol-*O*-malonildeoxihexósido-*O*-(deoxihexosil-pentósido), respetivamente.

Os extratos hidroalcoólicos apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos em comparação com as decocções, estes extratos não revelaram a presença de ácidos fenólicos, sendo apenas identificados os flavonoides. Os compostos maioritários em todas as amostras são a miricetina-*O*-glucorósido-*O*-hexósido (pico 2^{UR}) e a quercetina-*O*-glucorósido-*O*-hexósido (pico 5^{UR}).

Aos flavonoides identificados estão associados uma série de benefícios a saúde do consumidor. No que diz respeito à miricetina, composto comumente encontrado em plantas, apresenta bom reconhecimento pelo seu potencial nutracêutico, possuindo forte atuação como antioxidante, anticancerígeno, antidiabético e anti-inflamatório, além de ter atividades no sistema nervoso central podendo proteger de doenças como Parkinson e

Alzheimer (Semwal, Semwal, Combrinck & Viljoen, 2016). À isoramnetina estão associados efeitos anticancerígenos (Li, Yang, Chen, Cai & Hu, 2014). Por fim, a quercetina tem potencial de atuação como poderoso antioxidante, estando ainda associada a uma redução do risco de doença coronária ou cancro (Miean & Mohamed, 2001).

Observando os teores de compostos fenólicos totais obtidos pelas decoções na Tabela 15 é possível concluir que as mesmas extraíram teores consideráveis destas substâncias, quando comparando com suas respectivas extrações hidroalcoólicas nos valores de flavonoides. Essa situação explica alguns potenciais benefícios provocados pela planta, além de evidenciar a conveniência da utilização da água de cozimento para fins alimentares.

Tabela 14. Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massas e identificação dos compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólicos e decocções das plantas *Umbilicus rupestris*.

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação
1 ^{UR}	6,78	355	655	479(100),317(60)	Miricetina- <i>O</i> - glucuronídeo- <i>O</i> -hexósido
2 ^{UR}	7,61	358	655	479(100),317(71)	Miricetina- <i>O</i> - glucuronídeo- <i>O</i> -hexósido
3 ^{UR}	8,52	330	179	135(100)	Ácido Cafeico ^a
4 ^{UR}	10,4	318	355	193(67),133(100)	Ácido Ferúlico hexósido ^b
5 ^{UR}	11,4	356	639	463(100),301(59)	Quercetina- <i>O</i> - glucuronídeo- <i>O</i> -hexósido
6 ^{UR}	13,08	326	323	179(29),175(21),163(20),159(6),147(13), 133(62),123(25),105(100)	Vernusol
7 ^{UR}	14,58	354	741	479(100),317(42)	Miricetina- <i>O</i> -malonilglucorósido- <i>O</i> -hexósido
8 ^{UR}	15,49	324	193	134(100)	Ácido Ferúlico ^b
9 ^{UR}	17,29	360	725	593(100),315(50)	Isoramnetina- <i>O</i> -pentósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
10 ^{UR}	20	354	709	577(100),299(69)	Crisoeriol- <i>O</i> -pentósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
11 ^{UR}	21,25	360	739	593(100),315(54)	Isoramnetina- <i>O</i> -deoxihexósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
12 ^{UR}	24,14	354	723	577(100),299(77)	Crisoeriol- <i>O</i> -deoxihexósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
13 ^{UR}	25,72	360	811	593(100),315(51)	Isoramnetina- <i>O</i> -malonilpentósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
14 ^{UR}	28,16	354	795	577(100),299(71)	Crisoeriol- <i>O</i> -malonilpentósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
15 ^{UR}	29,7	360	825	593(100),315(43)	Isoramnetina- <i>O</i> -malonildeoxihexósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)
16 ^{UR}	31,59	354	809	577(100),299(56)	Crisoeriol- <i>O</i> -malonildeoxihexósido- <i>O</i> -(deoxihexosil-pentósido)

Tabela 15. Quantificação dos compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólicos e decocções das plantas *Umbilicus rupestris* (mg/g extrato, média \pm DP, $n=3$).

Pico	<i>U. rupestris</i> 1		<i>U. rupestris</i> 2		<i>U. rupestris</i> 3	
	Hidroalcoólico	Decocção	Hidroalcoólico	Decocção	Hidroalcoólico	Decocção
1 ^{UR}	nd	1,31 \pm 0,01b	nd	0,426 \pm 0,001c	nd	1,37 \pm 0,01a
2 ^{UR}	2,586 \pm 0,005b	2,01 \pm 0,07c	0,92 \pm 0,04f	1,07 \pm 0,04e	2,67 \pm 0,01a	1,512 \pm 0,01d
3 ^{URa}	1,43 \pm 0,04b	nd	2,3 \pm 0,2a	nd	1,211 \pm 0,06c	nd
4 ^{URb}	0,080 \pm 0,002a	nd	0,091 \pm 0,001a	nd	0,059 \pm 0,019b	nd
5 ^{UR}	2,83 \pm 0,03b	2,40 \pm 0,02c	1,69 \pm 0,09e	1,804 \pm 0,004d	3,337 \pm 0,004a	2,42 \pm 0,04c
6 ^{UR}	nq	nq	nq	nq	nq	nq
7 ^{UR}	0,310 \pm 0,001cd	0,318 \pm 0,002c	0,30 \pm 0,01d	0,283 \pm 0,003f	0,366 \pm 0,001a	0,320 \pm 0,002c
8 ^{URb}	0,082 \pm 0,001a	nd	0,073 \pm 0,002b	nd	0,072 \pm 0,002b	nd
9 ^{UR}	0,295 \pm 0,001a	0,260 \pm 0,001b	0,208 \pm 0,001d	0,201 \pm 0,002e	0,261 \pm 0,001b	0,248 \pm 0,001c
10 ^{UR}	0,328 \pm 0,001b	0,269 \pm 0,001e	0,277 \pm 0,006d	0,258 \pm 0,006f	0,347 \pm 0,001a	0,310 \pm 0,001c
11 ^{UR}	0,2820 \pm 0,0005a	0,249 \pm 0,002c	0,221 \pm 0,002d	0,207 \pm 0,001e	0,265 \pm 0,006b	0,2529 \pm 0,0005c
12 ^{UR}	0,2788 \pm 0,0002a	0,243 \pm 0,001d	0,218 \pm 0,002e	0,211 \pm 0,002f	0,273 \pm 0,001b	0,253 \pm 0,001c
13 ^{UR}	0,252 \pm 0,004a	0,218 \pm 0,001c	0,212 \pm 0,001d	0,204 \pm 0,001e	0,2252 \pm 0,0005b	0,212 \pm 0,002d
14 ^{UR}	0,256 \pm 0,002b	0,2186 \pm 0,0004e	0,248 \pm 0,003c	0,2194 \pm 0,0001e	0,272 \pm 0,001a	0,242 \pm 0,002d
15 ^{UR}	0,330 \pm 0,003a	0,2402 \pm 0,0002c	0,215 \pm 0,002e	0,201 \pm 0,002f	0,261 \pm 0,003b	0,230 \pm 0,001d
16 ^{UR}	0,342 \pm 0,003a	0,241 \pm 0,003d	0,246 \pm 0,002d	0,217 \pm 0,002e	0,331 \pm 0,005b	0,274 \pm 0,003c
Total de ácidos fenólicos	1,59 \pm 0,04b	nd	2,5 \pm 0,2a	nd	1,34 \pm 0,04c	nd
Total de flavonoides	8,08 \pm 0,02b	8,0 \pm 0,1b	4,8 \pm 0,1e	5,30 \pm 0,04d	8,61 \pm 0,01a	7,64 \pm 0,04c
Total de compostos fenólicos	9,68 \pm 0,06a	8,0 \pm 0,1b	7,2 \pm 0,3d	5,30 \pm 0,04e	9,95 \pm 0,04a	7,64 \pm 0,04c

nq – não quantificado; nd – não detetado. Padrões das curvas de calibração: ^aÁcido cafeico ($y = 388345x + 406,369$, $R^2 = 0.994$); ^bÁcido Ferúlico ($y = 633,126x - 185,462$; $R^2 = 0.999$); Para os demais picos foi utilizado a Quercetina-3-*O*-glucósido ($y = 34843x - 160,173$, $R^2 = 0.998$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0.05$).

A Tabela 16 apresenta os resultados da atividade antioxidante, avaliada através de quatro métodos distintos, para os dois tipos de extratos (hidroalcoólico e decocção). Como se pode observar, verificou-se a existência de diferenças significativas entre as amostras, bem como entre os dois métodos extrativos. O extrato hidroalcoólico da planta colhida em Vila Real apresentou melhores resultados para a captação de radicais DPPH e ensaio da descoloração do β -caroteno, ao passo que o melhor resultado para o poder redutor foi apresentado para o extrato hidroalcoólico da planta colhida em Viseu e para o ensaio de TBARS da planta colhida em Bragança. Os resultados evidenciam a superioridade dos extratos hidroalcoólicos como agente antioxidante (valores de EC_{50} inferiores), o que poderá estar relacionado com o teor de ácidos fenólicos existentes nestes extratos, não tendo estes compostos sido detetados nas decocções.

Até à presente data, são escassos os estudos realizados sobre a atividade antioxidante das folhas de *Umbilicus rupestris*. Piluzza e Bullitta (2011) analisaram esse parâmetro sobre toda a planta, a qual demonstrou valores na análise de DPPH na faixa de 36.22 ± 2.61 mmol/100 g massa seca, contudo, extrapolando os resultados através do método proposto por Polak e Bartoszek (2018) chegou-se a conclusão de que os valores atingidos nesse trabalho são superiores, indicando menor atividade antioxidante, o que pode estar relacionado com a variação de compostos devido à sazonalidade da colheita, clima e região, como também à utilização apenas das folhas para a preparação do extrato.

Os resultados das atividades anti-inflamatória e citotóxica apresentam-se igualmente na Tabela 16. Ambos os extratos preparados com as diferentes amostras de *Umbilicus rupestris* não apresentaram ação sobre células tumorais para as concentrações testadas. Convenientemente, a ingestão desta planta não tem potencial de causar danos às células humanas, visto que não foi identificado qualquer efeito hepatotóxico nas concentrações testadas.

De forma similar, os resultados indicam que a planta não possui anti-inflamatória nas concentrações testadas, visto que não houve ação protetora por parte dos extratos sobre os macrófagos de rato. Contudo, no estudo realizado pelos autores Benhouda e Yahia (2015), em que a atividade anti-inflamatória foi avaliada *in-vivo* em ratos Wistar, o extrato metanólico de folhas de *U. rupestris* demonstrou a capacidade de atuação como anti-inflamatório quando administrado numa concentração de 200 mg/Kg massa corporal.

Tabela 16. Atividade antioxidante, anti tumoral, anti-inflamatória e hepatotoxicidade dos extratos obtidos da planta *Umbilicus rupestris* (média±DP, n=3).

	<i>U. rupestris</i> 1		<i>U. rupestris</i> 2		<i>U. rupestris</i> 3	
	Decocção	Hidrolcoólico	Decocção	Hidrolcoólico	Decocção	Hidrolcoólico
Atividade antioxidante (EC₅₀ mg/mL)						
Atividade de DPPH (EC ₅₀ ; mg/mL)	2,98±0,06a	2,70±0,09c	2,22±0,03d	1,39±0,09f	2,80±0,06b	2,08±0,07e
Poder redutor (EC ₅₀ ; mg/mL)	1,26±0,08d	0,422±0,002f	2,49±0,06b	0,746±0,008e	2,57±0,05a	1,57±0,02c
β-caroteno (EC ₅₀ ; mg/mL)	2,1±0,2c	0,55±0,03d	3,6±0,2a	0,46±0,03d	3,3±0,3b	0,55±0,02d
TBARS (EC ₅₀ ; mg/mL)	0,22±0,03c	0,155±0,005e	0,41±0,02a	0,18±0,01d	0,35±0,02b	0,12±0,01f
Atividade anti tumoral (GI₅₀ µg/mL)						
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	>400	>400	>400	>400	>400	>400
NCI-H460 (Carcinoma de pulmão)	>400	>400	>400	>400	>400	>400
HeLa (carcinoma cervical)	>400	>400	>400	>400	>400	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Hepatotoxicidade (GI₅₀ µg/mL)						
PLP2	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Atividade anti-inflamatória (EC₅₀ µg/mL)						
Produção de óxido nítrico (ON) em RAW264.7	>400	>400	>400	>400	>400	>400

A atividade antioxidante foi expressa em valores de EC₅₀, significando que altos valores correspondem a baixo poder redutor ou potencial antioxidante. EC₅₀: corresponde a concentração de extrato necessária para obter 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância na análise de poder redutor. Trolox valores de EC₅₀: 41 µg/mL (poder redutor), 42 µg/mL (DPPH), 18 µg/mL (β-carotene) e 23 µg/mL (TBARS). Os resultados da atividade anti-inflamatória foram expressos em valores de EC₅₀: correspondendo as concentrações necessárias para promover a inibição de 50% da produção de óxido nítrico (NO). Os resultados de citotoxicidade foram expressos em valores de GI₅₀: correspondendo a concentração de amostra necessária para realizar a inibição do crescimento em 50% sob células tumorais humanas ou em cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). Elipticina valores de GI₅₀: 1,2 µg/mL (MCF-7), 1,0 µg/mL (NCI-H460), 0,91 µg/mL (HeLa), 1,1 µg/mL (HepG2) e 2,3 µg/mL (PLP2).

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos e aquosos de *U. rupestris* são apresentados na Tabela 17. Os extratos apresentam potencial de atuação em ambas as classes bacterianas, Gram-positiva e Gram-negativa, atuando de maneira mais eficaz como composto inibidor. De uma maneira geral, observou-se alguma variabilidade de resultados entre as diferentes extrações, sendo em alguns casos obtidos melhores resultados (valores de MIC inferiores) para as decocções face aos extratos hidroalcoólicos. A decocção da planta colhida em Vila Real (UR2) foi a amostra que permitiu obter valores de MIC inferiores face à maioria das bactérias Gram-negativas testadas, inibindo igualmente o crescimento das bactérias Gram-positivas avaliadas. O valor de MIC inferior (5 mg/ml) foi obtido para este mesmo extrato face a *L. monocytogenes*. Valor similar foi ainda obtido com o extrato hidroalcoólico da mesma planta (UR2) também face a *L. monocytogenes* e para o decocto da planta colhida em Bragança face a *E. coli*.

Nenhum dos extratos testados teve atividade inibitória contra as bactérias *P. aeruginosa*, e *P. mirabilis* e contra o fungo *C. albicans*.

Os resultados de atividade antimicrobiana de extratos metanólicos da planta *Umbilicus rupestris* foram previamente reportados por Benhouda *et al.* (2014). De forma similar ao obtido no presente trabalho, estes autores também não obtiveram qualquer efeito inibitório sobre o fungo *C. albicans*. Contudo, face a *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Proteus* sp. os resultados obtidos foram superiores ao deste trabalho. Contudo, refira-se que no presente trabalho foi utilizado uma estirpe de *S. aureus* resistente à meticilina e que a espécie de *Proteus* testada foi também diferente (*Proteus mirabilis* vs. *Proteus mobilis*). A variação de resultados pode estar associada à diferente composição dos extratos testados, a qual pode advir de diferenças no método extrativo bem como de outros fatores associados à planta, tais como variação genética e fatores ambientais (Hansen & Wold, 2010). De salientar a variação dos compostos bioativos devido à sazonalidade, visto que Benhouda *et al.* (2014) colheu as plantas no período de primavera no mês de abril e neste trabalho as plantas foram obtidas no mês de janeiro durante o inverno (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos e decocções da planta *U. rupestris*.

Atividade antimicrobiana	<i>U. rupestris</i> 1				<i>U. rupestris</i> 2				<i>U. rupestris</i> 3				Ampicilina (20 mg/mL)		Imipenem (1 mg/mL)		Vancomicina (1 mg/mL)	
	Hidroalcoólico		Decocção		Hidroalcoólico		Decocção		Hidroalcoólico		Decocção		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Bactéria Gram-negativa																		
<i>Escherichia coli</i>	20	>20	10	20	20	>20	20	>20	20	>20	5	20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	>20	>20	>20	20	>20	10	20	10	20	>20	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Morganella morganii</i>	>20	>20	>20	>20	20	>20	10	20	>20	>20	>20	>20	20	>20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	0,5	1	nt	nt
Bactéria Gram-positiva																		
<i>Enterococcus faecalis</i>	>20	>20	20	>20	>20	>20	20	>20	20	>20	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	>20	>20	10	>20	5	20	5	20	20	>20	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	nt	nt
MRSA	20	>20	20	>20	10	>20	20	>20	20	>20	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
Atividade antifúngica																		
<i>Candida albicans</i> *	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	nt	nt	nt	nt	nt	nt

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MIC – Concentração mínima inibitória; MBC – Concentração mínima bactericida; nt – Não testado. Resultados expressos em mg/mL de extrato. * Fluconazol (1 mg/mL, controlo positivo): MIC e MFC = 0.06 mg/mL.

5 CONCLUSÕES

As plantas silvestres podem ser consideradas fontes de nutrientes, sendo que distintas plantas podem possuir inúmeros compostos diferentes e, conseqüentemente, diferente potencial de ação. Neste estudo, pretendeu-se avaliar as propriedades nutricionais e bioativas das plantas silvestres *Raphanus raphanistrum* e *Umbilicus rupestris*.

A caracterização nutricional das amostras incluiu a determinação da humidade, proteínas, lípidos, cinzas, glúcidos e valor energético. Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes em ambas as plantas, evidenciando igualmente ambas um baixo teor em gordura e valor calórico.

Foram ainda analisados os açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e os perfis individuais de ácidos gordos para ambas as plantas. A glucose foi o açúcar livre mais abundante na planta *R. raphanistrum*, ao passo que em *U. rupestris* foi a manose, apresentando esta última também uma maior concentração total de açúcares livres. Foram identificados seis e cinco ácidos orgânicos diferentes em *R. raphanistrum* e *U. rupestris*, respetivamente, sendo os ácidos oxálico, cítrico e málico os presentes em quantidades superiores, em ambos os casos. *R. raphanistrum* apresentou um conteúdo total em ácidos orgânicos superior a *U. rupestris*. Ambas as plantas apresentaram uma predominância de ácidos gordos PUFA, em particular ómega-3, e igualmente em ambas foi detetada a presença dos quatro vitâmeros de tocoferol (α , β , γ e δ).

No que respeita o perfil em compostos fenólicos, foram identificados um total de 14 compostos em *R. raphanistrum*, nomeadamente dois ácidos fenólicos, 3 derivados da quercetina e 9 derivados do canferol. Para esta planta foram identificados pela primeira vez 4 compostos fenólicos, nomeadamente os dois ácidos fenólicos e dois derivados do canferol. Para *U. rupestris*, foi identificada a presença de 16 compostos diferentes, nomeadamente 3 ácidos fenólicos (derivados do hidroxicinâmico), 12 flavonoides e um glicosídeo fenilpropanóide (venusol). Relativamente aos compostos fenólicos da planta *U. rupestris*, a identificação foi realizada pela primeira vez no presente trabalho. Em ambos os casos, foram obtidos teores superiores para a maioria dos compostos nos extratos hidroalcoólicos em comparação com os decoctos.

No caso de *U. rupestris*, foram obtidas amostras colhidas no mesmo período em regiões geográficas diferentes. Verificou-se a existência de diferenças significativas entre as amostras para diferentes parâmetros, incluindo os grupos de macronutrientes, bem como ácidos orgânicos, vitamina E (tocoferóis), compostos fenólicos e ácidos gordos (ômega-3 e 6), o que sugere a influência da origem geográfica (possivelmente devido a variações climáticas, solo, entre outras que podem provocar variações metabólicas e conseqüentemente, de composição química.

No que respeita ao potencial bioativo das plantas estudadas, ambas apresentaram atividade antioxidante nos quatro métodos testados e atividade antimicrobiana face diversas bactérias. Contudo, para as concentrações testadas (concentração superior testada = 400 µg/mL), os extratos hidroalcoólicos e decoctos de ambas as espécies não demonstraram possuir atividade anti-inflamatória nem citotóxica face às quatro linhas celulares testadas (MCF-7, adenocarcinoma de mama; HCT15, carcinoma colon; HeLa, carcinoma cervical e HepG2, carcinoma hepatocelular). No entanto, é de salientar que ambas as espécies não tiveram efeito hepatotóxico nas concentrações testadas, ou seja, não causam danos as células humanas, portanto, sendo deste ponto de vista, segura a sua utilização na dieta.

De entre as 3 amostras de *U. rupestris* avaliadas, a amostra *Umbilicus rupestris* 2, colhida em Vila Real, foi a que apresentou melhor valor desde EC₅₀ no ensaio de captação de radicais DPPH apresentando ainda valores de MIC inferiores contra algumas bactérias Gram-positivas e negativas. Tal poderá estar relacionado com um teor superior de ácidos fenólicos apresentados por esta amostra.

A atividade antimicrobiana avaliada nos extratos das plantas *U. rupestris* e *R. raphanistrum* determinou que ambas possuem potencial de atuação contra bactérias Gram-positivas e negativas, atuando como inibidor sob microrganismos que frequentemente estão envolvidos em doenças de origem alimentar tais como *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2012). Logo, as duas plantas demonstram utilidade no combate de microrganismos patogénicos.

No geral, a realização deste trabalho permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização química e às propriedades bioativas destas duas plantas silvestres pouco estudadas, e demonstrar que ambas são aptas para o consumo humano e podem ser

incorporadas na alimentação como uma fonte diferente de nutrientes, permitindo diversificar a dieta.

REFERÊNCIAS

- Abdou, I. A., Abou-Zeid, A. A., El-Sherbeeney, M. R., & Abou-El-Gheat, Z. H. (1972). Antimicrobial activities of *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Raphanus sativus*, *Capsicum frutescens*, *Eruca sativa*, *Allium kurrat* on bacteria. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 22, 29–35.
- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5800–5806.
- Afferri, M. (2009). Il comune *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy ed il raro *Umbilicus horizontalis* (Guss.) DC. (Crassulaceae) in Toscana. *Società Toscana di Orticoltura*, 10–13.
- Aguiar, C. (2012). *Sistemática* (1st ed., Vol. 3). Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.
- Aires, A. (2014). Brassica Composition and Food Processing. In V. Preedy (Ed.), *Processing and Impact on Active Components in Food* (1st ed., pp. 17–25). Amsterdam: Academic Press.
- Almeida, C. A. N. de, & Fernandes, G. de C. (2011). A importância do porcionamento na alimentação balanceada. *International Journal of Nutrology*, 4, 53–59.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33, 2202–2210.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1–9.
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. (D. G. W. L. Jr, Ed.) (20th ed.). USA: AOAC INTERNATIONAL.
- Aude-Pimentel, S. (2007). *Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios*. Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo.

- Azevedo, H. I. V. (2014). *Composição química da folha e do caule de Calamintha baetica. Efeito do solvente na extração de compostos antioxidantes*. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, *34*, 1301–1309.
- Balbino, S. (2017). Vegetable oil yield and composition influenced by environmental stress factors. In P. Ahmad (Ed.), *Oilseed Crops: Yield and Adaptations under Environmental Stress* (1st ed., pp. 80–101). Índia: John Wiley & Sons Ltd.
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos* (1st ed.). Portugal: Forvisão - Consultoria em Formação integrada, Lda.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, *120*, 247–254.
- Barros, L., Pereira, E., Calhela, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, *5*, 1732–1740.
- Batista, E. D. S., Costa, A. G. V., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2007). Adicao da vitamina E aos alimentos: Implicacoes para os alimentos e para a saude humana. *Revista de Nutricao*, *20*, 525–535.
- Belitz, H., & Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. (M. O. L. Buesa, Ed.) (2nd ed.). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Belitz, H., & Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*. (P. Hessel, C. Sprinz, S. Jordan, & M. Burghagen, Eds.) (2nd ed.). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Benevides, C. M. de J., Souza, M. V., Souza, R. D. B., & Lopes, M. V. (2011). Fatores antinutricionais em alimentos: revisão Antinutritional factors in foods: a review. *Segurança Alimentar e Nutricional*, *18*, 67–79.
- Benhouda, A., & Yahia, M. (2015). Toxicity and anti-inflammatory effects of methanolic extract of *Umbilicus rupestris* L. leaves (Crassulaceae). *International Journal*

of Pharma and Bio Sciences, 6, 395–408.

Benhouda, A., Yahia, M., Benhouda, D., Bousnane, N. E., Benbia, S., Hannachi, N. E., & Ghecham, A. (2014). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Various Extracts of *Hyoscyamus Albus* L. and *Umbilicus rupestris* L. Leaves. *Algerian Journal of Natural Products*, 1, 4–17.

Berdonces, J. L. (1996). Toxicología alimentaria. *Natura medicatrix*, 44, 16–20.

Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51.

Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W. A., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120, 271–275.

Bevilaqua, G. a P., Schiedeck, G., & Schwengber, J. E. (2007). Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. *Embrapa*. Pelotas, RS.

Bicho, R. C. (2015). *Regulamentação europeia sobre novel food: Identificação de plantas silvestres comestíveis nacionais como não novo alimento*. Universidade de Lisboa, Lisboa.

Bockisch, M. (1998). *Fats and Oils Handbook* (Vol. 115). Alemanha: The Burlington Magazine.

Branco, A. C. F. V. B. (2015). *Caracterização Nutricional e Toxicológica de Espécies de Plantas Silvestres: Análise mineral, antioxidante e de lectinas*. Universidade de Lisboa, Lisboa.

BRASIL. Resolução CNNPA nº 12, de 1978. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária 49–51 (1978). Brasil.

Calbo, A. G., Moretti, C. L., & Henz, G. P. (2007). *Respiração de Frutas e Hortaliças. Comunicado Técnico* (Vol. 46). Brasília.

Câmara Municipal de Pombal. (2014). *1ª REVISÃO DO PLANO DIRETOR MUNICIPAL DE POMBAL. Estudos de Caracterização*, 2, 1–446.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and

related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*.

Caruso, G., Gucci, R., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., Di Maio, I., ... Servili, M. (2014). Effect of different irrigation volumes during fruit development on quality of virgin olive oil of cv. Frantoio. *Agricultural Water Management*, 134, 94–103.

Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2012). Foodborne Illnesses: What You Need to Know. *U.S. Food and Drug Administration*. Acedido a 27 fev. 2018. Disponível em

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm100250.htm>.

Chen, A. Y., & Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*.

Chen, L. S., & Nose, A. (2004). Day-night changes of energy-rich compounds in crassulacean acid metabolism (CAM) species utilizing hexose and starch. *Annals of Botany*, 94, 449–455.

Chiara, V. L., Silva, R., Jorge, R., & Brasil, A. P. (2002). Ácidos graxos trans: Doenças cardiovasculares e saúde materno-infantil. *Revista de Nutricao*.

Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900–2911.

Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3821–3832.

Cohen, C., Silva, C. S., & Vannucchi, H. (2014). *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Vitamina E* (Vol. 23). São Paulo: ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil.

Conforti, F., Marrelli, M., Carmela, C., Menichini, F., Valentina, P., Uzunov, D., ... Menichini, F. (2011). Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), in vitro inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food Chemistry*, 129, 1413–1419.

Costa, Â. D. A. da. (2013). *Avaliação da citotoxicidade de diferentes*

nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade populacional. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.

Coultate, T. P. (1998). *Manual da Química y Bioquímica de los Alimentos* (2nd ed.). Espanha: Acribia, S.A.

Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2006). Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 3351–3356.

Daneshfar, A., Baghlani, M., Sarabi, R. S., Sahraei, R., Abassi, S., Kaviyan, H., & Khezeli, T. (2012). Solubility of citric, malonic, and malic acids in different solvents from 303.2 to 333.2K. *Fluid Phase Equilibria*, *313*, 11–15.

Daniel, P. P., Bryant, J. A., & Woodward, F. I. (1984). Phosphoenolpyruvate carboxylase from pennywort (*Umbilicus rupestris*): Changes in properties after exposure to water stress. *Biochemical Journal*, *218*, 387–393.

Daniel, P. P., Woodward, F. I., Bryant, J. A., & Etherington, J. R. (1985). Nocturnal Accumulation of Acid in Leaves of Wall Pennywort (*Umbilicus rupestris*) Following Exposure to Water-Stress. *Annals of Botany*, *55*, 217–223.

Davy, H. (2009). Os antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, 16–31.

Degáspari, C. H., & Waszczynskyj, N. (2004). Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, *5*, 33–40.

DeMan, J. M. (1990). *Principles of food chemistry* (2nd ed.). New York: Chapman & Hall.

Deng, Q., Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Orlie, V., Grimi, N., Vorobiev, E., ... Barba, F. J. (2015). The Effects of Conventional and Non-conventional Processing on Glucosinolates and Its Derived Forms, Isothiocyanates: Extraction, Degradation, and Applications. *Food Engineering Reviews*, *7*, 357–381.

Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Cámara, M., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., ... Ferreira, I. C. F. R. (2016). Wild *Fragaria vesca* L. fruits: a rich source of bioactive phytochemicals. *Food & Function*, *7*, 4523–4532.

Divisão de Clima e Alterações Climáticas. (2017). *Boletim Climatológico - Portugal*

Continental. Portugal.

Dobson, G. (2002). Analysis of Fatty Acids in Functional Foods with Emphasis on ω 3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* (1st ed., pp. 85–146). Boca Raton: CRC Press.

Dornas, W. C., Oliveira, T. T., Rodrigues-das-Dores, R. G., Santos, A. F., & Nagem, T. J. (2007). Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 28, 241–249.

Eggli, U. (2003). *Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae* (1st ed.). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Eitenmiller, Ronald; Lee, J. (2004). *Vitamin E: Food Chemistry, Composition and Analysis* (1st ed.). New York: Marcel Dekker Inc.

European Food Safety Authority. ([s.d.]). Food-borne zoonotic diseases. *European Food Safety Authority*. Acedido a Disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-borne-zoonotic-diseases>.

Fennema, O. R. (2000). *Food Chemistry. Food Chemistry* (3rd ed.). New York: Acribia.

Ferreira, F. A. B. (2001). *Uso de um “pool” de antibióticos, ácidos orgânicos e mananoligossacarídeos na alimentação de frangos de corte*. Universidade Federal do Paraná, Paraná.

Food Ingredients Brasil. (2015). *Os Ácidos Na Indústria Alimentícia. Food Ingredients Brasil*, 35, 58–67.

Garambone, E., & Rosa, G. (2007). Possíveis Benefícios Do Ácido Clorogênico À Saúde. *Alimentos e Nutrição*, 18, 229–235.

García, M. M., Menéndez-conde, C. P., & Vicedo, T. B. (2011). Avances en el conocimiento del uso de micronutrientes en nutrición artificial. *Nutrición Hospitalaria*, 26, 37–47.

Geydan, T., & Melgarejo, L. (2005). Metabolismo Ácido De Las Crasuláceas. *Revista Scielo*, 10, 13.

Ghirardini, M. P., Carli, M., del Vecchio, N., Rovati, A., Cova, O., Valigi, F., ... Pieroni, A. (2007). The importance of a taste: A comparative study on wild food plant consumption in twenty-one local communities in Italy. *Journal of Ethnobiology and*

Ethnomedicine, 3.

Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*.

González, A. R., Ramón, V. L., & Castro, M. (2009). *Plantas medicinais do norte de Portugal e Galiza*. Portugal: MEL Editores.

Goyeneche, R., Roura, S., Ponce, A., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Uribe, E., & Di Scala, K. (2015). Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*, 16, 256–264.

Guimarães, D. S. P. S. F., Souza, M. R. de M., Hirano, R. T., Pereira, P. R. G., & Baracat-Pereira, M. C. (2013). Concentração de proteína solúvel por bradford revela diferenças no metabolismo de plantas de ora-pro-nobis em diferentes doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 3, 40–44.

Guinazi, M., Miranda Milagres, R. C. R., Pinheiro-SanT’Ana, H. M., & Chaves, J. B. P. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*, 32, 2098–2103.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.

Hansen, M., & Wold, A.-B. (2010). Contents of bioactive compounds in food plants as affected by traditional breeding and environmental factors. In A. Bernhof (Ed.), *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals* (Vol. 50, pp. 212–222). Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters.

Hu, X., Shi, Y., Zhang, P., Miao, M., Zhang, T., & Jiang, B. (2016). d-Mannose: Properties, Production, and Applications: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 773–785.

Ibrahim, L. F., Elkhateeb, A., Marzouk, M. M., Hussein, S. R., Abdel-Hameed, E.-S. S., & Kassem, M. E. S. (2016). Flavonoid investigation , LC – ESI-MS profile and cytotoxic activity of *Raphanus raphanistrum* L . (Brassicaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 786–793.

Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K., & Ames, B. N. (2001). γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 714–722.

- Jones, D. L. (1998). *Organic acids in the rhizosphere - A critical review. Plant and Soil.*
- Kala, A., & Prakash, J. (2006). The comparative evaluation of the nutrient composition and sensory attributes of four vegetables cooked by different methods. *International Journal of Food Science and Technology*, *41*, 163–171.
- Kamal-Eldin, A., Gørgen, S., Pettersson, J., & Lampi, A.-M. (2000). Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, *881*, 217–227.
- Küçükboyacı, N., Güvenç, A., Turan, N. N., & Aydın, A. (2012). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Aqueous Extract from *Raphanus raphanistrum* L. *Turk J. Pharm. Sci.*, *9*, 93–100.
- Lee, C. Y., Shallenberger, R. S., & Vittum, M. T. (1970). Free sugars in fruits and vegetables. *New York's Food and Life Science Bulletin*, *1*, 1–12.
- Li, C., Yang, X., Chen, C., Cai, S., & Hu, J. (2014). Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, *9*, 935–940.
- Lima, J. D., Aldrighi, M., Sakai, R. K., Solimam, E. P., & Moraes, W. da S. (2007). Comportamento do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) e da nabiça (*Raphanus raphanistrum* L.) como adubo verde. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, *37*, 60–63.
- Lin, L. Z., Sun, J., Chen, P., Zhang, R. W., Fan, X. E., Li, L. W., & Harnly, J. M. (2014). Profiling of glucosinolates and flavonoids in *Rorippa indica* (Linn.) Hiern. (cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 6118–6129.
- Lopes, L. L., Peluzio, M. do C. G., & Hermsdorff, H. H. M. (2016). Ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e metabolismo lipídico. *Jornal Vascular Brasileiro*, *15*, 52–60.
- Łuczaj, Ł., Pieroni, A., Tardío, J., Pardo-De-Santayana, M., Sõukand, R., Svanberg, I., & Kalle, R. (2012). Wild food plant use in 21st century Europe: The disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *81*, 359–370.
- Machado, H., Nagem, T., Peters, V., Fonseca, C., & Oliveira, T. (2008). Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, *27*, 33–39.

- Magnani, C., Isaac, V. L. B., Correa, M. a., & Salgado, H. R. N. (2014). Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*, 6, 3203.
- Maldini, M., Foddai, M., Natella, F., Petretto, G. L., Rourke, J. P., Chessa, M., & Pintore, G. (2017). Identification and quantification of glucosinolates in different tissues of *Raphanus raphanistrum* by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 20–27.
- Malik, M. S., Riley, M. B., Norworthy, J. K., & Bridges, W. (2010a). Glucosinolate profile variation of growth stages of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3309–3315.
- Malik, M. S., Riley, M. B., Norworthy, J. K., & Bridges, W. (2010b). Variation of glucosinolates in wild radish (*Raphanus raphanistrum*) accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11626–11632.
- Marrelli, M., Cristaldi, B., Menichini, F., & Conforti, F. (2015). Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 16–24.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). In vivo anti-Candida activity of phenolic extracts and compounds: future perspectives focusing on effective clinical interventions. *BioMed Research International*, 2015, 1–14.
- McMurry, J. (2008). *Organic Chemistry* (7th ed.). Canada: Brooks/Cole.
- Melo, E. de A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G. de, & Nascimento, R. J. do. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 193–201.
- Michlová, T., Dragounová, H., & Horníčková, Š. (2015). Factors influencing the content of vitamins A and E in sheep and goat milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 33, 58–65.
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106–3112.
- Monsen, E. R. (2000). Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients Vitamin C Vitamin E selenium and carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 637–640.

- Monteiro-Henriques, T., Martins, M. J., Cerdeira, J. O., Silva, P., Arsénio, P., Silva, ... Costa, J. C. (2016). Bioclimatological mapping tackling uncertainty propagation: Application to mainland Portugal. *International Journal of Climatology*, 36, 400–411.
- Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., & Tardío, J. (2012). Fatty acids profiles of some Spanish wild vegetables. *Food Science and Technology International*, 18, 281–290.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.
- Nehir El, S., & Karakaya, S. (2004). Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55, 67–74.
- NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. (2011). Tabela brasileira de composição de alimentos. *NEPA - Unicamp*, 161.
- Neto, F. C., & Simões, M. T. F. ([s.d.]). *As Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares da Terra Fria Transmontana*. Bragança: DRAP-Norte.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2009). *Análisis de los alimentos* (3rd ed.). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Nogueira, C. M., Parmanhan, B. R., Farias, P. P., & Corrêa, A. G. (2009). The increasing importance of carbohydrates in medicinal chemistry. *Revista Virtual de Química*, 1, 149–159.
- Obodai, M., Mensah, D. L. N., Fernandes, Â., Kortei, N. K., Dzomeku, M., Teegarden, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2017). Chemical characterization and antioxidant potential of wild ganoderma species from Ghana. *Molecules*, 22.
- Oliveira, D. M. de, & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, 34, 1051–1056.
- Oliveira, M. I. V. de, Pereira, E. M., Porto, R. M., Leite, D. D. de F., Fidelis, V. R. de L., & Magalhaes, W. B. (2016). Avaliação da qualidade pós-colheita de hortaliças tipo fruto, comercializadas em feira livre no município de Solânea-PB, Brejo Paraibano. *Revista Agropecuária Técnica*, 37, 13–18.
- Oliveira, G. L. S. (2015). Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas*

Medicinais, 17, 36–44.

Oliveira Silva, E. de, & Batista, R. (2017). Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 580–616.

Ortiz, D. G., Lumbreras, E. L., & Rosselló, J. A. (2008). *La familia Crassulaceae en la flora alóctona valenciana*. (J. L. B. Alonso, Ed.) *Monografías de la revista bouteloua* (4th ed.). Valencia: Jolube.

Özen, T. (2010). Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea region of Turkey. *Grasas y Aceites*, 61, 86–94.

Padovani, R. M., Farfán, J. A., Collugnati, F. A. B., & Domene, S. M. Á. (2006). Dietary reference intakes : application of tables in nutritional studies. *Revista de Nutrição*, 19, 741–760.

Pardo-de-Santayana, M., Tardio, J., Blanco, E., Carvalho, A., Lastra, J., San Miguel, E., & Morales, R. (2007). Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 27.

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. REGULAMENTO (CE) N.º 258, de 27 de Janeiro de 1997. 14 Jornal Oficial das Comunidades Europeias 1–6 (1997).

PARLAMENTO EUROPEU E O CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos alimentares. 354 Jornal Oficial da União Europeia 16–33 (2008).

Paulino, F. F. (2008). *Avaliação dos componentes voláteis e atividade antioxidante de Eruca sativa Mill ., Brassica rapa L . e Raphanus sativus L . após processamento* . Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Pedro Machado, D. F. S., Andrade Lagôa, A. M. M., Ribeiro, R. V., Ribeiro Marchiori, P. E., Machado, R. S., & Machado, E. C. (2013). Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48, 487–495.

Perini, J. Â. de L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M.

- de O., Matshushita, M., ... Visentainer, J. V. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: Metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de Nutricao*, 23, 1075–1086.
- Piluzza, G., & Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 49, 240–247.
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., ... Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580–588.
- Plano Sectorial Rede Natura 2000. (2006). Habitat 8210: Vertentes rochosas calcárias com vegetação casmofítica. *Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas*.
- Polak, J., & Bartoszek, M. (2018). A new equation for converting the parameter EC 50 into the total antioxidant capacity TEAC and vice versa. *Food Chemistry*, 248, 46–51.
- Queiroz, R. J. B. (2006). *Quantificação da Trealose e da Prolina Livre em Cana-De-Açúcar Sob Efeito da Disponibilidade Hídrica do Solo*. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Reinert, F., & Blankenship, R. E. (2010). Evolutionary Aspects of Crassulacean Acid Metabolism. *Oecologia Australis*, 14, 359–368.
- Roberfroid, M. B., Coxam, V., & Delzenne, N. (2008). *Aliments fonctionnels* (2nd ed.). Paris: Lavoisier.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant Cell*, 14, 185–205.
- Rupérez, F. J., Martín, D., Herrera, E., & Barbas, C. (2001). Chromatographic analysis of alpha-tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of chromatography. A*, 935, 45–69.
- Santos, A. A. dos. (2013). *Avaliação da bioatividade e caracterização química de uma espécie medicinal de uso tópico: Juglans regia L*. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Santos, J. S. dos, Santos, M. L. P. dos, & Azevedo, A. dos S. (2014). Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia

- líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. *Química Nova*, 37, 540–544.
- Santos, R. D., Gagliardi, A., Xavier, H., Magnoni, C., Cassani, R., Lottenberg, A., ... Ramos, S. (2013). I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 100, 1–40.
- Sarmiento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Valorization of traditional foods: Nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 179–185.
- Scalon, V. R., & Souza, V. C. (2002). BRASSICACEAE. In M. das G. L. Wanderley, G. J. Shepherd, A. M. Giuliatti, T. S. Melhem, V. Bittrich, & C. Kameyama (Eds.), *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* (2nd ed., Vol. 2, pp. 269–278). São Paulo: Editora HUCITEC.
- Scoparo, C. T., Iacomini, M., & Souza, L. M. de. (2011). *Análise dos polissacarídeos presentes em Camelia sinensis e desenvolvimento de cromatografia líquida bidimensional abrangente para compostos de baixa massa molecular*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2016). Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, 8, 90.
- Sepannen-Laakso, T., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465, 39–62.
- Sezen, S. M., Yazar, A., Kapur, B., & Tekin, S. (2011). Comparison of drip and sprinkler irrigation strategies on sunflower seed and oil yield and quality under Mediterranean climatic conditions. *Agricultural Water Management*, 98, 1153–1161.
- Shergill-Bonner, R. (2013). Micronutrients. *Paediatrics and Child Health*, 23, 331–336.
- Simopoulos, A. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8, 128.
- Singh, V. K., Beattie, L. A., & Seed, T. M. (2013). Vitamin E: Tocopherols and tocotrienols as potential radiation countermeasures. *Journal of Radiation Research*, 54, 973–988.

- Smit, L. A., Mozaffarian, D., & Willett, W. (2009). Review of fat and fatty acid requirements and criteria for developing dietary guidelines. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55, 44–55.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutricao*, 15, 71–81.
- Sociedade Portuguesa de Botânica. (2014). Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. *Sociedade Portuguesa de Botânica*. Disponível em www.flora-on.pt.
- Soethe, C., Steffens, C. A., Do Amarante, C. V. T., De Martin, M. S., & Bortolini, A. J. (2016). Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas “Tupy” e “Guarani” armazenadas a diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 51, 950–957.
- Soutinho, S. M. A. (2012). *Avaliação dos compostos fenólicos e da actividade antioxidante de frutos vermelhos produzidos em modo biológico*. Instituto Politécnico de Viseu, Viseu.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295.
- Stevens, J. F., Hart, H., Van Ham, R. C. H. J., Elema, E. T., Van Den Ent, M. M. V. X., Wildeboer, M., & Zwaving, J. H. (1995). Distribution of alkaloids and tannins in the Crassulaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 157–165.
- Su, M.-S., & Chien, P.-J. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104, 182–187.
- Tardío, J., Pardo-De-Santayana, M., & Morales, R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 27–71.
- Tomei, R. R., & Salvador, M. J. (2007). Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação.*, 1963–1967.
- Tucker, J. M., & Townsend, D. M. (2005). Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, 380–387.
- Vega, P. V., & Florentino, B. L. (2000). *Toxicologia de alimentos*. Instituto Nacional de

Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental (2 ed.). México: Instituto Nacional de Salud Pública Centro Nacional de Salud Ambiental.

Villavicencio, A. L. C. H., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Santos-Buelga, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). The influence of electron beam radiation in the nutritional value, chemical composition and bioactivities of edible flowers of *Bauhinia variegata* L. var. candida alba Buch.-Ham from Brazil. *Food Chemistry*, *241*, 163–170.

Viornerly, L., Saliba, C., Daskiewicz, J. B., Bayet, C., Comte, G., Fenet, B., ... Barron, D. (2000). Phenylpropanoids from *Umbilicus pendulinus*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, *48*, 1768–1770.

Vizzotto, M., & Pereira, M. C. (2011). Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *33*, 1209–1214.

Warwick, S. I., Francis, A., & Al-Shehbaz, I. A. (2006). Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution*, *259*, 249–258.

Xu, C.-C., Wang, B., Pu, Y.-Q., Tao, J.-S., & Zhang, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *15*, 721–731.

Yuan, Y., Leng, Y., Shao, H., Huang, C., & Shan, K. (2014). Solubility of dl-malic acid in water, ethanol and in mixtures of ethanol+water. *Fluid Phase Equilibria*, *377*, 27–32.

Yúfera, E. P. (1998). *Química de los alimentos*. Madrid: Síntesis, S.A.