

**Avaliação da composição química e atividade biológica de
Levisticum officinale W.D.J. Koch**

Rafael Mascoloti Spréa

*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 Universidade
Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

Joana S. Amaral

Isabel C. F. R. Ferreira

Cristiane Canan

Bragança

2019



**Avaliação da composição química e atividade biológica de
Levisticum officinale W.D.J. Koch**

Rafael Mascoloti Spréa

Orientadores

Professora Doutora Joana Amaral

Professora Doutora Isabel C. F. R. Ferreira

Professora Doutora Cristiane Canan

Bragança

2019

“Se não tivermos dispostos a pagar um preço por nossos valores, se não tivermos dispostos a fazer algum sacrifício para realizá-lo, então deveríamos nos perguntar se realmente acreditamos neles”

Barack Obama

Agradecimentos

Sou grato, primeiramente aos meus pais Mestre Joseney e Silvana Spréa, meus eternos amores; gratidão, amor, carinho, educação, compreensão, oportunidades; vocês que muitas vezes tiveram que trabalhar dobrado renunciando seus sonhos em favor dos meus, o meu mais profundo agradecimento, ao meu irmão Daniel Spréa pelo apoio e atitudes, mesmo que discretas me deram forças a continuar.

Sou grato pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná e aos meus professores Valdemar Padilha Feltrin, homem que com sua humildade e carisma me introduziu ao mundo da pesquisa. A professora e Co-orientadora deste trabalho Cristiane Canan pelas mais diversas formas de ensinamento ao longo da minha caminhada acadêmica. Aos amigos que fiz durante este mestrado, sobretudo aqueles que se tornaram família, Leonardo Delgado, Ana Caroline Royer, Victoria Franco e Isabele Catori pelo apoio emocional e pelos momentos que passamos juntos.

Por fim, sou grato em especial as Doutoradas Joana Amaral, Isabel Ferreira, Lillian Barros e Ângela Fernandes, mulheres excepcionais no qual tive a oportunidade de ser orientado e que sempre estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho, assim como toda equipe do Centro de Investigação de Montanha (CIMO).

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



Sumário

RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. PLANTAS AROMÁTICAS	1
1.2. FAMÍLIA APIACEAE	2
1.2.1. <i>Levisticum officinale</i> W.D.J. Koch.....	2
1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	4
1.3.1. Óleos essenciais.....	6
1.3.2. Compostos fenólicos	9
1.4. PROPRIEDADES BIOATIVAS	12
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGIAS	15
3.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRATOS	15
3.1.1. <i>Preparação dos extratos das folhas</i>	15
3.1.2. <i>Preparação dos extratos da raiz</i>	15
3.1.3. <i>Extração do óleo essencial</i>	16
3.2. VALOR NUTRICIONAL	16
3.3. ÁCIDOS GORDOS.....	17
3.4. AÇÚCARES LIVRES	17
3.5. ÁCIDOS ORGÂNICOS	18
3.6. TOCOFERÓIS.....	19
3.7. COMPOSTOS FENÓLICOS	20
3.8. COMPOSTOS VOLÁTEIS	21
3.9. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	21
3.10. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	23
3.10.1. <i>Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)</i>	23
3.10.2. <i>Poder redutor</i>	23
3.10.3. <i>Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	24
3.10.4. <i>Inibição da descoloração do β-caroteno</i>	24
3.10.5. <i>Ensaio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)</i>	25
3.11. CITOTOXICIDADE	26
3.12. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	27
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	29
4.1.2. COMPOSIÇÃO EM COMPOSTOS FENÓLICOS	38
4.2. PROPRIEDADES BIOATIVAS	49
5. CONCLUSÃO	58
6. REFERÊNCIAS	60

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Levisticum officinale</i> : (A) folha, (B) frutos, (C) raízes, (D) planta com umbelas de flores amarelas.....	3
Figura 2. Estrutura química das ftalidas maioritárias presentes no óleo essencial de <i>Levisticum officinale</i>	8
Figura 3. Algumas cumarinas extraídas de <i>Levisticum officinale</i>	11
Figura 4. Perfil cromatográfico de açúcares livres das folhas de <i>Levisticum officinale</i>	31
Figura 5. Perfil cromatográfico de ácidos orgânicos das folhas de planta <i>Levisticum officinale</i>	31
Figura 6. Cromatograma de ácidos gordos das folhas da planta <i>Levisticum officinale</i>	33
Figura 7. Cromatograma da análise de tocoferóis por HPLC-FL da parte aérea de <i>Levisticum officinale</i>	34
Figura 8. Perfil fenólico das folhas do <i>Levisticum officinale</i> registradas a 280 nm (A), 370 nm (B). . .	38
Figura 9. Perfil fenólico da raiz do <i>Levisticum officinale</i> registrado a 280 nm (A), 370 nm (B).	39
Figura 10. Cromatograma obtido por GC-MS relativo à análise do óleo essencial extraído das folhas (A) e da raiz (B) de <i>Levisticum officinale</i> (numeração dos compostos como na Tabela 13).	43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais constituintes majoritários do óleo essencial extrade diferentes partes estruturais de <i>Levisticum officinale</i> segundo dados de diferentes estudos disponíveis na literatura.....	8
Tabela 2. Teor de ácidos fenólicos livres totais determinados por HPLC-DAD em diferentes partes anatómicas de <i>Levisticum officinale</i>	10
Tabela 3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Levisticum officinale</i> e suas diluições contra várias espécies de bactérias, expressa em zonas de inibição (mm).	13
Tabela 4. Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos e compostos hidrofílicos da parte aérea (folhas e caules) da planta <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).	29
Tabela 5. Composição nutricional de plantas da família Apiaceae (g/100g massa fresca).	30
Tabela 6. Resultados da avaliação dos compostos lipofílicos da parte aérea da planta <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).	32
Tabela 7. Ingestão média diária adequada de Vitamina E na isoforma de α -Tocoferol.	35
Tabela 8. Açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis dos extratos preparados com a parte aérea da planta <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).	36
Tabela 9. Ácidos orgânicos e tocoferóis identificados na raiz da planta <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).	37
Tabela 10. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ max), dados espectrais de massa e tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na parte aérea de <i>Levisticum officinale</i>	40
Tabela 11. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ max), dados espectrais de massa e tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos em raízes de <i>Levisticum officinale</i>	41
Tabela 12. Identificação dos componentes do óleo essencial de diferentes partes anatómicas de <i>Levisticum officinale</i>	44
Tabela 13. Atividades antioxidante dos extratos obtidos da parte aérea planta <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).	49

Tabela 14. Atividades antioxidante dos extratos obtidos da raiz da planta <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).....	51
Tabela 15. Atividade antitumoral e hepatotoxicidade dos extratos obtidos das folhas de <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).	52
Tabela 16. Atividade antitumoral e hepatotoxicidade dos extratos obtidos das raízes de <i>Levisticum officinale</i> (média ± DP, n=9).....	53
Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos da folha da planta <i>Levisticum officinale</i>	56
Tabela 18. Atividade antimicrobiana dos extratos (mg/mL) obtidos da raiz da planta <i>Levisticum officinale</i>	57

Lista de abreviaturas

~	Próximo a
>	Maior que
ACR	Atividade Captadora de Radicais
AI	Valor de consumo recomendável de ingestão de nutrientes para grupo de pessoas saudáveis
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
BHT	2,6-Di-t-butil-4-metilfenol
CG	Cromatografia Gasosa
DAD	Detetor de Díodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EAR	Mediana de distribuição das necessidades de um nutriente num grupo de indivíduos saudáveis do mesmo sexo e idade, atendendo às necessidades de 50% da população
EC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante/anti-inflamatória ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAME's	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FID	Detetor de Ionização de Chama
FL	Detetor de Fluorescência
FNB	<i>Food and Nutrition Board</i>
HCT15	Linha celular de Carcinoma do Cólon
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HeLa	Linha celular de Carcinoma Cervical
HepG2	Linha celular de Carcinoma Hepatocelular
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólico
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LRI	Índice de retenção linear

m/v	Relação massa/volume
m/z	Relação massa/carga
MBC	Concentração mínima bactericida
MCF7	Linha celular de Carcinoma da Mama
MHB	<i>Muller Hinton Broth</i>
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS	Espectrometria de massa
MUFA	Ácidos Gordos Monoinsaturados
nd	Não detetado
Nº	Número
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Padrão interno
PLP2	Linha celular de Células Normais de Fígado de Porco
PUFA	Ácidos Gordos Polinsaturados
RDA	Valor determinado para atender as necessidades de um nutriente para 97-98% dos indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida
rpm	Rotações por minuto
Rt	Tempo de Retenção
SFA	Ácidos Gordos Saturados
SRB	Sulfarrodamina B
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBS	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TF	Flavonóides totais
TIC	Corrente iônica total
TPA	Total de ácidos fenólicos
TPC	Compostos fenólicos totais
UV-VIS	Ultra Violeta/Visível
v/v	Relação volume/volume
vs.	<i>versus</i>
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máxima
ω -3	Ómega 3
ω -6	Ómega 6

RESUMO

As plantas são uma fonte considerável de produtos naturais, sendo frequentemente utilizadas pelo homem pelas suas capacidades aromáticas, medicinais e condimentares. Por este motivo, bem como devido à crescente procura de substâncias naturais, biologicamente ativas, tem vindo a aumentar o interesse na sua utilização. Considerando que um número crescente de consumidores associa produtos com ingredientes naturais a uma qualidade superior, também a indústria alimentar tem dado uma maior relevância à utilização de extratos de plantas, óleos essenciais e/ou seus componentes, como uma possível alternativa ao uso de aditivos alimentares sintéticos. *Levisticum officinale* W.D.J. Koch. é uma planta utilizada como condimento em diversas regiões da Europa, sendo ainda utilizada como ingrediente em temperos comerciais e conhecida em Portugal como a planta do knorr. No entanto, até à data, são escassos os estudos realizados sobre esta espécie. Assim, este trabalho teve por objetivo realizar uma avaliação detalhada e exaustiva sobre a sua composição e bioatividade, incidindo sobretudo na parte consumida como alimento (folhas e caules), mas também na raiz, usada em fitoterapia.

A parte aérea, cultivada em Portugal, apresentou uma percentagem elevada de humidade, sendo os glúcidos o principal macronutriente. Verificou-se a predominância de ácidos gordos polinsaturados, em particular de ácido α -linolénico, e o α -tocoferol foi a principal isoforma da vitamina E nas folhas e caules. Em relação aos compostos fenólicos, foram identificados um total de 7 compostos, incluindo ácidos fenólicos e flavonoides, sendo o ácido 5-*O*-cafeoilquínico o predominante. Em relação aos compostos voláteis do óleo essencial foram identificados principalmente monoterpenos e ftalidas. Ambos os extratos (decoção e hidroalcoólico) apresentaram propriedades antioxidantes interessantes e, no geral, melhor atividade contra bactérias Gram-negativo. Apenas a decoção da apresentou atividade citotóxica contra a linha celular HepG2.

Já nas as raízes, foram identificados 8 compostos fenólicos, sendo o ácido vanílico o maioritário, e diversos compostos voláteis, particularmente ftalidas. De uma forma geral, os extratos apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana, se bem que menor comparativamente à folha. O extrato de hexano foi capaz de inibir várias linhas celulares, apresentando contudo toxicidade face a células de fígado não tumorais (PLP2). Este estudo revelou que o levístico apresenta uma composição nutricional interessante sendo também uma fonte de diversos compostos bioativos.

ABSTRACT

Plants are a considerable source of natural products and are often used by humans for their aromatic, medicinal and flavoring abilities. For this reason, as well as the growing demand for natural, biologically active substances, the interest in its use has increased. Considering that an increasing number of consumers associate products with natural ingredients to a higher quality, the food industry has also given greater importance to the use of plant extracts, essential oils and / or its components as a possible alternative to the use of synthetic food additives. *Levisticum officinale* W.D.J. Koch. is a plant used as a condiment in several regions of Europe, and is still used as an ingredient in commercial spices and known in Portugal as the knorr plant. However, to date, there are few studies on this species. Thus, the objective of this work was to carry out a detailed and exhaustive evaluation of its composition and bioactivity, focusing mainly on the part consumed as food (leaves and stems), but also in the root, used in phytotherapy.

The aerial part, cultivated in Portugal, presented a high percentage of humidity, being the carbohydrates the main macronutrient. There was a predominance of polyunsaturated fatty acids, in particular α -linolenic acid, and α -tocopherol was the main vitamin E isoform in leaves and stems. In relation to the phenolic compounds, a total of 7 compounds were identified, including phenolic acids and flavonoids, with 5-*O*-caffeoylquinic acid being the predominant one. In regarding to the volatile compounds of the essential oil, monoterpenes and phthalides were identified. Both extracts (decoction and hydroalcoholic) presented interesting antioxidant properties and, in general, better activity against Gram-negative bacteria. Only the decoction showed cytotoxic activity against the HepG2 cell line.

For the roots, 8 phenolic compounds were identified, with vanillic acid being the major, and several volatile compounds, particularly phthalides. In general, the extracts presented antioxidant and antimicrobial activity, although smaller compared to the leaf. The hexane extract was able to inhibit several cells lines, but also exhibited toxicity to non-tumor liver cells (PLP2). This study revealed that the Lovage presents an interesting nutritional composition and is also a source of several bioactive compounds.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Plantas aromáticas

As plantas são uma fonte considerável de produtos naturais, muitos deles metabolitos secundários que o homem utiliza pelas suas capacidades aromáticas, medicinais e condimentares (Figueiredo *et al.*, 2008). As plantas aromáticas em particular, têm sido alvo de um interesse crescente em Portugal e no mundo, quer por parte dos seus consumidores quer pelos produtores destes vegetais. Devido às capacidades referidas, as plantas aromáticas têm diversas aplicações nas indústrias química, farmacêutica e alimentar (Figueiredo *et al.*, 2008).

No que diz respeito a espécies aromáticas, a flora portuguesa destaca-se pela sua riqueza, uma vez que cerca de 500 das aproximadamente 3800 espécies que compõe a sua flora são classificadas como aromáticas. Estas espécies estão distribuídas principalmente pelas famílias Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hipericaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Leguminosae, Liliaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Pinaceae, Rosaceae e Rutaceae (Barata *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008).

A procura de substâncias naturais, biologicamente ativas, tem aumentado o interesse e encorajado a utilização destas plantas. Entre as várias substâncias encontradas nestes vegetais, os óleos essenciais são os mais explorados, pois possuem propriedades antimicrobianas e desempenham um papel aromatizante em diversos alimentos, para além de serem produtos naturais e biodegradáveis, apresentando em baixas concentrações geralmente toxicidade reduzida para mamíferos. A sua extração pode ser realizada a partir da planta como um todo ou de partes da planta, como folhas, flores, frutos, sementes, caules e raízes (Barata *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Nas plantas, os óleos essenciais atuam em diversas funções, tais como no envio de sinais de comunicação e mecanismos de defesa química contra animais, podendo ainda atuar na polinização e na proteção contra a perda de água (Lupe, 2007; Evans, 1996). Os óleos essenciais estão presentes em maior abundância no reino vegetal especialmente nas famílias Apiaceae (Umbelliferae), Asteraceae (Compositae), Lamiaceae (Labiatae) e Lauraceae (Florão, 2006). Dentre as plantas da família Apiaceae encontra-se a espécie *Levisticum officinale* W.D.J. Koch, objeto de estudo deste trabalho.

1.2. Família Apiaceae

A família Apiaceae é considerada uma das mais antigas famílias incluída nas plantas aromáticas (Sayed-Ahmad *et al.*, 2017). Encontra-se distribuída em todo o mundo, contudo predominando nas zonas temperadas, sendo composta por 3780 espécies agrupadas em 434 géneros. As plantas pertencentes a esta família apresentam características comuns, tais como, propriedades aromáticas, folhas alternadas com bainha, hastes ocas, pequenas flores e frutos ou sementes indeiscentes com dutos de óleo (Christensen & Brandt, 2006).

Diversos estudos têm revelado que as plantas da família Apiaceae possuem compostos fitoquímicos e metabolitos secundários tais como terpenóides, saponinas, flavonóides, taninos, ácidos fenólicos, poliacetilenos e esteróides, tendo por isso importância como potenciais fontes de compostos bioativos e agroquímicos naturais. São ainda geralmente ricas em ácidos gordos, proteínas, glúcidos e óleos essenciais (Aćimović *et al.*, 2015; Tuncturk & Özgokce, 2015).

Devido à sua composição química, diversas atividades biológicas têm sido descritas e associadas a plantas desta família, nomeadamente propriedades antitumorais, antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, sequestradoras de radicais livres, diuréticas, gastrointestinais e anti-obesidade, estando muitas delas associadas à bioatividade dos poliacetilenos (Christensen & Brandt, 2006; Działo *et al.*, 2016; Sayed-Ahmad *et al.*, 2017). Na indústria alimentar e na gastronomia, várias espécies pertencentes a esta família são frequentemente utilizadas como condimentos ou até mesmo em infusões, referindo-se como exemplo os cominhos (*Cuminum cyminum* L.), o funcho ou erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.), os coentros (*Coriandrum sativum* L.), o anis (*Pimpinella anisum* L.), o endro (*Anethum graveolens* L.) e a salsa (*Petroselinum crispum* L.) (Sayed-Ahmad *et al.*, 2017). Comparativamente com as espécies citadas, *Levisticum officinale* é ainda pouco utilizada, sendo igualmente escassos os estudos realizados sobre a sua composição química e as suas propriedades bioativas.

1.2.1. *Levisticum officinale* W.D.J. Koch

Nativo do sudoeste da Ásia e sul da Europa, o levístico (*Levisticum officinale*) é cultivado em diversos locais, principalmente em zonas de clima tropical, podendo receber

uma gama distinta de nomes comuns na literatura inglesa, como por exemplo, “Lovage”, “Smallege”, “Love Parsley”, “Sea Parsley”, entre outros (Samiee *et al.*, 2006; Mirjalili & Javanmardi, 2012), sendo mais comumente encontrado com o nome popular “Lovage”. Em Portugal, é vulgarmente conhecido como levístico, mas também conhecido como “planta do knorr”, dado o seu forte aroma que se assemelha a este produto comercial utilizado como tempero.

Levisticum officinale, representado na Figura 1, é classificado como uma planta dicotiledónia perene pertencente à família Apiaceae. À semelhança de outras plantas desta família, o levístico é principalmente utilizado pelas suas propriedades aromáticas, sendo caracterizado pelo seu forte sabor similar a aipo (Raal *et al.*, 2012), mas também pelas suas propriedades medicinais (Garvey *et al.*, 2011). Os principais produtores de *Levisticum officinale* são a Alemanha, Hungria, Holanda, Polónia, Bélgica, Finlândia e EUA (Mirjalili & Javanmardi, 2012).



Figura 1. *Levisticum officinale*: (A) folha, (B) frutos, (C) raízes, (D) planta com umbelas de flores amarelas (Polunin & Robbins 1993).

Como características botânicas mais específicas, *Levisticum officinale* apresenta-se em forma de arbusto, atingindo até 1 metro de altura, possui hastes resistentes, sulcadas, estriadas e robustas, as quais podem ramificar-se até 2,5 m. As folhas aparecem numa

estrutura alternada, tendo um comprimento de 0,5 a 0,6 cm com coloração verde escura, peciolada com estípulas, sem pelos e com formato triangular. Apresenta um pecíolo oco e inflado perto da base, e um rizoma de coloração cinza-acastanhado, vertical, podendo penetrar no solo até 0,5m, terminando numa raiz principal, de coloração esbranquiçada, apresentando ligações transversais. As suas flores são hermafroditas com coloração amarelo-esverdeada, sendo pequenas, mas presentes em grande numero na época de floração. O fruto possui 5 a 7 mm de tamanho, com forma elíptica, de coloração castanho-amarelado, tendo sementes férteis com uma capacidade média de germinação de 68% (Mirjalili & Javanmardi, 2012).

Da planta *Levisticum officinale*, são aproveitadas as suas raízes, folhas e sementes (Nunes, 2007), sendo esta usada há séculos como um remédio herbáceo pelas suas propriedades carminativas, diuréticas e antimicrobianas (Stuart 1989; Moradalizadeh *et al.*, 2012). Na década de 90, o levístico começou a ser utilizado na perfumaria, indústrias de tabaco, alimentar e de bebidas (Stuart 1989; Bylaitė *et al.*, 1996). Na indústria alimentar, é sobretudo utilizado na produção de condimentos como, por exemplo, os cubos Maggi (Blank & Schieberle, 1993). Atualmente, é um dos ingredientes descritos no rótulo do caldo granulado de legumes Knorr, comercializado em Portugal. Na gastronomia, são utilizadas principalmente as suas folhas, para aromatizar saladas, caldos, sopas, entre outros cozinhados, mas também as suas sementes, em confeitaria e licores à semelhança das sementes de funcho (Hogg, 2001; Mirjalili & Javanmardi, 2012).

1.3. Composição química

De uma forma geral, as plantas aromáticas incluem na sua composição diversos nutrientes e substâncias biologicamente ativas tais como vitaminas, flavonoides, terpenóides, carotenoides, fitoestrogéneos e minerais, entre outros (Suhaj, 2006; Hedges & Lister 2007; Figueiredo *et al.*, 2008). Apesar das plantas aromáticas serem geralmente consumidas em pequenas quantidades, quando ingeridas regularmente podem ser uma fonte potencial de compostos benéficos, desempenhando assim um papel de maior relevo na dieta humana. Por outro lado, dado que as plantas aromáticas têm como principal característica o seu forte sabor e intenso aroma, estas podem ser utilizadas na culinária como um substituinte do sal de cozinha, diminuindo assim a quantidade de cloreto de

sódio consumida e, conseqüentemente, proporcionando benefícios à saúde humana. Assim, torna-se relevante o estudo do seu perfil químico e nutricional, bem como das suas propriedades biológicas, por forma a conhecer os seus potenciais benefícios e estimular o seu consumo. No que respeita ao levístico em particular, são ainda escassos os estudos disponíveis na bibliografia, não tendo sido encontrada informação sobre a sua composição nutricional. De facto, a maioria dos trabalhos realizados até à presente data incidem sobre a composição do óleo essencial extraído de várias estruturas botânicas da planta, o qual apresenta como principais compostos as ftalidas, terpenóides e ácidos voláteis (Gijbels *et al.*, 1981; Gijbels *et al.*, 1982; Cu *et al.*, 1990; Hogg, 2001).

A ftalida ligustilida, foi descrita como sendo o principal constituinte do óleo essencial extraído das raízes de *Levisticum officinale* (Moradalizadeh *et al.*, 2012; Raal *et al.*, 2012). Outros compostos, como os terpenos α -terpinil acetato e β -felandreno, foram encontrados em grandes quantidades em folhas de *Levisticum officinale* (Hogg, 2001; Bylaitė *et al.*, 1998). Diferentes estudos, realizados com amostras de *Levisticum officinale* colhidas nos continentes Europeu e Norte Americano, descrevem a presença de mais de 200 compostos no óleo essencial de *Levisticum officinale* (Blank & Schieberle, 1993) incluindo os seguintes compostos: falcarinol, (Z)-ligustilida, (Z)-3-butiliden-ftalida, trans- β -farneceno, β -felandreno, *n*-octanal, γ -elemene e ácido palmítico, este encontrado no óleo essencial extraído das raízes da planta (Bylaitė *et al.*, 1996; Mirjalili & Javanmardi, 2012).

Contudo, refira-se que fatores tais como o método de extração utilizado (destilação a vapor, CO₂ supercrítico, extração por solvente, entre outros), preparação das amostras, localização geográfica, estação do ano, maturidade, tempo de colheita e parte anatómica da planta afetam o perfil químico dos extratos (Cu *et al.*, 1990; Bylaitė *et al.*, 1998; Daukšas *et al.*, 1999; Menaker *et al.*, 2004; Badalamenti, 2004; Samiee *et al.*, 2006; Raal *et al.*, 2012; Mirjalili & Javanmardi, 2012).

Para além da composição do óleo essencial, poucos estudos se encontram disponíveis relativos à composição desta planta. Estes referem a existência de furanocumarinas no levístico, à semelhança de outras plantas da família Apiaceae (Mirjalili & Javanmardi, 2012) e outros compostos fenólicos (Zheng & Wang, 2001; Justesen & Knuthsen, 2001; Wojdylo *et al.*, 2007). Adicionalmente, Schinkovitz *et al.* (2008) identificaram a presença de diferentes poliacetilenos, tais como o 3(R)-falcarinol, em extratos de raiz de levístico preparados com diclorometano.

Seguidamente, apresenta-se com maior detalhe a informação disponível na literatura sobre a composição química do levístico.

1.3.1. Óleos essenciais

Durante a história, várias civilizações como os egípcios, vedas, astecas e maias utilizaram os óleos essenciais com vários propósitos, incluindo em cerimónias religiosas, como fragrâncias em perfumaria e na medicina tradicional (Sonwa, 2000). Atualmente, com o aumento e diversificação das aplicações de óleos essenciais, nomeadamente em medicina/farmacologia, cosmética, agricultura e na indústria alimentar, entre outras, tem-se assistido a um incremento no interesse do estudo de novas plantas produtoras destas substâncias (Lopez-Reyes *et al.*, 2013; Turek & Stintzing, 2013; Ríos, 2015; Teixeira *et al.*, 2018). Na área alimentar, refira-se a sua utilização como aromatizante em produtos de confeitaria, refrigerantes e bebidas alcoólicas destiladas, sendo ainda percepcionados como uma possível alternativa a conservantes químicos utilizados na indústria de alimentos processados. Para tal, contribuem sobretudo as suas propriedades antioxidantes (Dandlen *et al.*, 2010) e antimicrobianas (Lang & Buchbauer, 2012), devendo contudo existir uma harmonização criteriosa entre o potencial antimicrobiano e o tipo de alimento a que se deseja aplicar, uma vez que a interação dos compostos ativos do óleo essencial com ingredientes da matriz alimentar podem conduzir à diminuição da sua atividade (Hyldgaard *et al.*, 2012). Adicionalmente, pelo facto de serem obtidos de plantas, a sua utilização permite conferir uma imagem “verde” aos alimentos, pela substituição de compostos sintéticos por óleos naturais (Burt, 2004; Kettenring & Geeganage, 2010). Um óleo essencial é, por definição, o produto obtido por (1) destilação, hidrodestilação ou destilação por arrastamento de vapor, de uma planta ou das suas partes, ou por (2) um processo mecânico, sem envolvimento de calor (Council of Europe, 2010). Além disso para a extração do óleo o estágio de desenvolvimento da planta deve ser levado em conta, pois muitas vezes é o que determina o rendimento final da extração do óleo essencial (Badalamenti, 2004).

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura de compostos voláteis e não-voláteis, representando os primeiros cerca de 90 a 95% da fração total do óleo, e incluindo terpenos, éteres, esterres, álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, fenóis alílicos e isoalílicos, entre outros, ao passo que os restantes 5 a 10% são representados

principalmente por hidrocarbonetos, cumarinas e polifenóis (Bakkali, *et al.*, 2008; Jalali-Heravi, *et al.*, 2010; Sell, 2010; Chamorro *et al.*, 2008). Assim, estas misturas caracterizam-se por serem altamente voláteis e geralmente possuem características lipofílicas. Para além dos grupos de compostos referidos, os quais são os mais frequentemente encontrados nos óleos essenciais, podem ainda estar presentes na sua composição outras substâncias, tais como ftalidas, como por exemplo no caso do óleo essencial de *Levisticum officinale* que apresenta quantidades significativas de ligustilida (Ríos, 2015).

Os óleos essenciais das plantas pertencentes à família Apiaceae têm sido objeto de diversos estudos, podendo geralmente ser extraídos de qualquer parte anatômica da planta (Barros *et al.*, 2010). Os óleos essenciais do *Levisticum officinale* possuem uma cor levemente amarelada com odor acentuado. Todas as estruturas botânicas da planta como folha, flor, fruta madura, fruta imatura e raízes possuem óleos essenciais (Perineau *et al.*, 1992). A extração pode ser realizada por solventes orgânicos como etanol, benzeno e hexano, porém solventes orgânicos, dependendo das suas propriedades podem extrair menos substâncias voláteis ou até mesmo outras substâncias não desejadas, com isso a escolha do solvente neste tipo de extração deve ser analisado com cuidado (Cu *et al.*, 1990). O teor de óleo essencial (%) em diferentes estruturas é de 0,05 - 1,0% no rizoma e raízes, 0,1 - 0,4% no caule frondoso com semente verde, 0,08 - 0,2% nas folhas e 0,8 - 2,7% nas sementes maduras (Daukšas *et al.*, 1999). Os monoterpenos e ftalidas são os principais constituintes, porém há mais de 190 compostos que fazem parte da composição química desta planta. Sendo assim, fica evidente que tais concentrações de monoterpenos e ftalidas podem variar drasticamente em concentração de acordo com a parte anatômica da planta que foi submetida a extração do óleo essencial, o tipo de extração, origem e idade (Venskutonis, 2016).

De uma forma geral, a fração monoterpénica tem como principais constituintes o β -felandreno, α -terpinenil acetato, α -felandreno, β -mirceno, enquanto que os isómeros *Z*-ligustilida e *E*-ligustilida são os principais constituintes da fração das ftalidas. Em plantas de origem Lituana, as ftalidas (Figura 2) demonstraram ser responsáveis por mais de 70% do valor total de óleo volátil das raízes, 25% das folhas e aproximadamente 6% das sementes (Daukšas, Venskutonis & Sivik, 1999; Venskutonis, 2016).

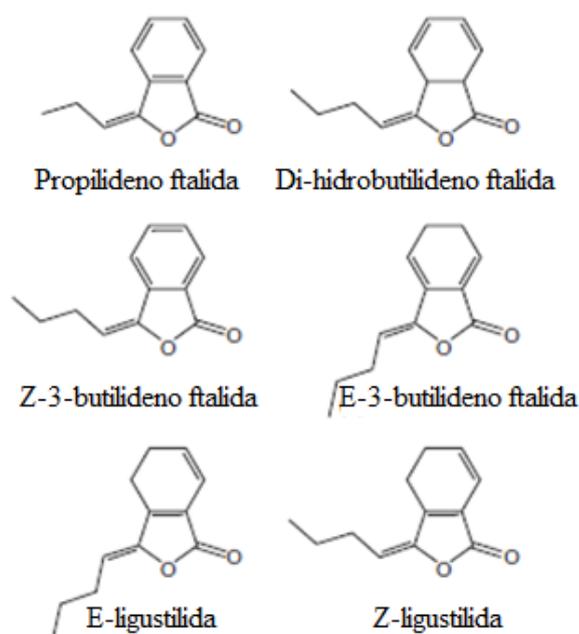


Figura 2. Estrutura química das ftalidas maioritárias presentes no óleo essencial de *Levisticum officinale*. Fonte (Mirjalili; Javanmardi, 2012).

Já em *Levisticum officinale* de origem iraniana, os constituintes α -terpinil acetato, Z-ligustilida, β -felandreno e β -mirceno, compõe cerca de 96,1% do óleo essencial extraído das folhas desta planta, enquanto que a ftalida Z-ligustilida demonstrou ser o composto maioritário no óleo essencial extraído da raiz (Heidarpour *et al.*, 2013). A composição de diferentes partes da planta pode ser consultada na Tabela 1.

Tabela 1. Principais constituintes maioritários do óleo essencial extraído de diferentes partes estruturais de *Levisticum officinale* segundo dados de diferentes estudos disponíveis na literatura. (adaptado de Hogg, 2001).

Constituinte	Folhas (%)	Caule (%)	Raízes (%)
(Z)-Ligustilida	4,4 – 11,7	4,8 – 13,8	37,0 – 67,5
β -Felandreno	13,4 – 26,5	10,8 – 28,5	1,7 – 15,5
α -Felandreno	0,4 – 1,2	0,1 – 1,2	0,2 – 0,5
β -Mirceno	1,6 – 6,5	1,3 – 7,0	0,3 – 0,9
Acetato de α -terpinilo	35,1 – 70,0	37,5 – 69,0	0,1 – 0,2

O composto Z-ligustilida, tem sido descrito como sendo a ftalida mais abundante em *Levisticum officinale* proveniente de diversas regiões da Europa, sendo considerado o fitoquímico mais valioso no aroma da planta (Raal *et al.*, 2012). Vários estudos relataram

efeitos positivos deste composto para a saúde tais como atividade anti-inflamatória (Ma & Bai, 2013), antitumoral (Long, *et al.*, 2012; Su, *et al.*, 2013) e antitrombótica (Zhang *et al.*, 2009) e ainda um efeito positivo contra distúrbios neurológicos (Feng *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2012). No entanto, estes estudos foram realizados com Z-ligustilida extraída da planta dong quai (*Angelica sinensis*).

Já no caso do acetato de α -terpinilo, estudos realizados com este composto obtido do óleo essencial de *Elettaria cardamomum*, demonstram que possui atividade esporicida contra esporos de *Bacillus subtilis*, uma bactéria gram-positivo (Lang & Buchbauer, 2012).

1.3.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são exemplos de compostos obtidos a partir do metabolismo secundário de plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Atuam como agentes protetores contra patogêneos, inibindo o crescimento de bactérias e fungos, bem como a oxidação lipídica. São por isso considerados como os compostos bioativos mais relevantes de infusões e decocções. Contudo, refira-se que a sua síntese pode variar se a planta for submetida a uma condição de stresse (Barroso *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2016; Fotakis *et al.*, 2016). A separação, identificação e quantificação de compostos fenólicos, assim como a sua aplicação em alimentos, são um desafio, pois englobam uma enorme quantidade de substâncias como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, ligninas, entre outros. Tais compostos, na sua maioria, possuem uma polaridade elevada (Soares, 2001), sendo considerados excelentes antioxidantes, pois possuem capacidade de sequestrar radicais livres, neutralizando a ação destes radicais pela transferência de um hidrogénio (Sharma & Singh, 2013).

Para além de contribuir para a conservação da qualidade do alimento, pensa-se que este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, esteja associado a um importante papel na alimentação humana, reduzindo o risco de desenvolvimento de patologias como a arteriosclerose e diferentes tipos de cancro (Taylor & Namiki, 1990; Ramarathnam *et al.*, 1995). Em particular, compostos fenólicos como o resveratrol, quercetina, ácido cafeico e diferentes flavonóis têm sido descritos como sendo responsáveis por estas propriedades benéficas para o ser humano (Pimentel *et al.*, 2005).

Após extração com uma mistura metanol: água (25:75, v/v) com 1% de ácido acético (v/v) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor de díodos (HPLC-DAD), Najda *et al.* (2003) identificaram a presença de diferentes ácidos fenólicos em amostras de *Levisticum officinale* (Tabela 2), nomeadamente os ácidos clorogénico, cafeico, *p*-cumárico e *m*-cumárico. Estes apresentaram diferentes concentrações conforme a parte da planta analisada.

Tabela 2. Teor de ácidos fenólicos livres totais determinados por HPLC-DAD em diferentes partes anatómicas de *Levisticum officinale* (adaptado de Najda *et al.*, 2003).

Ácidos Fenólicos	Tempo de Retenção (min)	Ácidos fenólicos livres totais (mg / 100g de massa seca)		
		<i>Partes anatómicas</i>		
		<i>Raízes</i>	<i>Folhas</i>	<i>Frutos</i>
Clorogénico	9,16	0,123	1,362	2,123
Cafeico	12,98	0,264	2,121	3,067
<i>p</i>-Cumárico	24,37	0,044	0,063	0,758
<i>m</i>-Cumárico	33,51	0,0052	0,098	0,214

O teor de compostos fenólicos totais de extratos de folhas de levístico, avaliado pelo método de *Folin-Ciocalteu* e expresso em ácido clorogénico, foi descrito por Materska (2010). O teor determinado foi de 5,3 mg de ácido clorogénico/g planta fresca, tendo o extrato desta planta sido aquele que evidenciou uma maior estabilidade durante um período de armazenagem de 6 meses, comparativamente com os extratos de outras sete plantas testadas.

Wojdyło & Oszmian'ski, (2007) relatam na sua investigação que o teor fenólico total expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE) do *Levisticum officinale* foi de 0,72 mg GAE por 100 gramas de massa seca. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade antioxidante pelas metodologias ABTS (2,20 ácido azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)), DPPH (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) e FRAP (poder redutor/antioxidante férrico), obtendo os seguintes resultados, respetivamente, expressos em (μ M trolox/100 g planta seca: 18.9 \pm 0.4 (ABTS), 232 \pm 5 (DPPH) e 123 \pm 2 (FRAP). Um estudo similar foi realizado por Zheng & Wang (2001), porém apresentando os resultados expressos em massa fresca de *Levisticum officinale*. No que respeita o teor de fenóis totais os resultados obtidos foram de 2,63 mg GAE/100 g de planta fresca, ao passo que para a atividade antioxidante (ORAC) foram obtidos valores de 21.54 μ mol de

equivalente de Trolox/g de massa fresca. Justesen & Knuthsen (2001) avaliaram o teor de flavonóides de um extrato hidrometanólico submetido a hidrólise ácida por HPLC-DAD obtendo valores de 170 mg de quercetina e 7 mg de canferol expressa por 100 g de levistico fresco.

Para além de ácidos fenólicos e flavonóides, como referido, foi também descrita a presença de cumarinas nesta planta, mais especificamente de furanocumarinas. Estes compostos são potentes fotossensibilizadores quando ativados por luz ultravioleta (300–380 nm), intercalando-se prontamente no DNA e formando mono- ou di-adutos com bases pirimidínicas. Assim sendo, podem ocorrer dermatites severas após contato com plantas contendo furanocumarinas na presença de luz solar, sendo estes compostos considerados como sendo fototóxicos, mutagénicos e fotocarcinogénicos (Zorbel, 1991; Ashwood-Smith *et al.*, 1992; Mirjalili & Javanmardi, 2012).

Existem relatos de dermatites de contato causadas pelo contacto direto durante a colheita de *Levisticum officinale* (Ashwood-Smith *et al.*, 1992) e pela aplicação do seu óleo essencial (Lapeere *et al.*, 2013). Ambos os casos podem ser explicados pela presença de furanocumarinas anteriormente identificadas nesta planta, nomeadamente o psoraleno, 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), representados na Figura 3 (Ashwood-Smith *et al.*, 1992; Paszkiewicz *et al.*, 2008).

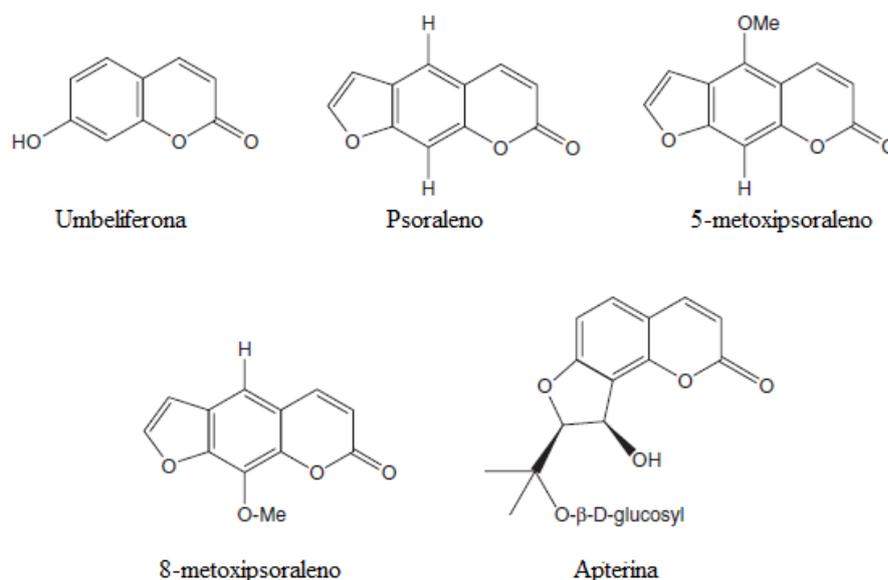


Figura 3. Algumas cumarinas extraídas de *Levisticum officinale*. Fonte: (Mirjalili & Javanmardi, 2012).

Por último, refira-se brevemente que 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 espectrofotométricos, ou pode-se recorrer a métodos cromatográficos, o que permite a análise dos compostos individualmente (Angelo & Jorge, 2007).

1.4. Propriedades bioativas

As propriedades bioativas de extratos de plantas estão diretamente relacionadas com a sua composição química e concentração de compostos bioativos. No que respeita aos óleos essenciais, refira-se a presença de fitoquímicos do metabolismo secundário biossintetizados por diferentes vias, como por exemplo os derivados de terpenóides ou de fenilpropanóides (Burt, 2004; Lupe, 2007).

O aumento do interesse na aplicação dos óleos essenciais na indústria alimentar e farmacêutica deve-se ao facto de serem constituintes naturais de plantas, biodegradáveis, normalmente de baixa toxicidade para os mamíferos, apresentando potencial antimicrobiano e antioxidante e sendo capazes de realizar simultaneamente a função dos seus equivalentes sintéticos (Figueiredo *et al.*, 2008). Atualmente, encontram-se disponíveis vários óleos essenciais e/ou seus componentes reconhecidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) como tendo estatuto GRAS (*generally recognized as safe*) e aceites pela Comissão Europeia para utilização como conservantes alimentares dadas as suas propriedades antimicrobianas.

No que respeita óleo essencial de *Levisticum officinale*, o seu efeito inibitório contra bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Salmonella enteritidis* foi já comprovado (Garvey *et al.*, 2011; Ebrahimi *et al.*, 2017). A inibição de outros microrganismos foi igualmente descrita por Deans e Ritchie (1987) e Mirjalili *et al.* (2012), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Levisticum officinale* e as diluições contra várias espécies de bactérias, expressa em zonas de inibição (mm).

Microrganismo	Diluição				MIC*	Ampicilina
	Sem diluição	1:2	1:5	1:10		
<i>Escherichia coli</i>	9,0	0	5,0	0	0,9–1,9	12,0 ± 0,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,5	7,5	5,5	4,5	>14,4–>15,2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	7,5	5,0	>14,4–>15,2	9,7 ± 0,7
<i>Streptococcus faecalis</i>	6,0	7,0	5,0	0	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	7,5	7,0	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	8,0	8,5	0	0	0,9–3,8	14,0 ± 0,7

*Concentração mínima inibitória determinada em ágar aplicando 10 µL de óleo de sementes imaturas, maduras e amadurecidas, em poços no meio de cultura. Adaptado de Deans e Ritchie (1987) e Mirjalili *et al.* (2012).

Como referido, para além do óleo essencial outros compostos já foram descritos nesta planta, nomeadamente ácidos fenólicos e flavonoides, compostos estes frequentemente descritos como tendo capacidade antioxidante.

Refira-se ainda que o extrato etanólico (80:20, v/v) de frutos de *Levisticum officinale* (300 µg/ml) apresentou potencial citotóxico com efeitos positivos contra a multiplicação de células leucémicas durante ensaios realizados com azul de tripano para estudos da viabilidade de diferentes linhas celulares (Bogucka-Kocka *et al.*, 2008).

De uma forma geral, são ainda escassos os estudos sobre o potencial bioativo desta planta, nomeadamente no que respeita a diferentes atividades tais como antibacteriana, antifúngica, antioxidante e outras potencialmente benéficas para a saúde (Venskutonis, 2016).

2. Objetivos

A opção por alimentos mais saudáveis é uma tendência em todo o mundo. Tal como em outros países, em Portugal tem vindo a crescer o número de produtores e consumidores de alimentos orgânicos (Governo Português, 2017), estando este facto aliado a um mercado consumidor exigente, que procura a redução de aditivos/ingredientes sintéticos.

Nos últimos anos, a indústria alimentar tem estado atenta a este movimento, uma vez que cada vez mais os consumidores associam produtos com ingredientes naturais a uma qualidade superior. Desta forma, encontrar ingredientes que atendam a estas necessidades e ainda assim apresentem as mesmas funcionalidades dos ingredientes sintéticos exige a realização de novos estudos. O levístico é uma planta comum a diversas partes da Europa, onde suas folhas são utilizadas como condimento e o uso de suas raízes na medicina tradicional para preparo de infusões, porém ainda pouco se conhece sobre suas características químicas e nutricionais. De igual forma, são escassos os estudos realizados sobre as suas propriedades biológicas. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo proceder à avaliação nutricional desta planta, bem como à caracterização química quer do seu óleo essencial quer de diferentes extratos da parte aérea edível, mas também da raiz, preparados com solventes de diferentes polaridades. Adicionalmente, será estudada a bioatividade no que respeita ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico em células tumorais.

Assim, pretende-se que o conhecimento resultante do desenvolvimento deste trabalho contribua para o desenvolvimento futuro de alternativas viáveis e seguras para a redução do uso de aditivos/ingredientes sintéticos em alimentos.

3. Metodologias

3.1. Preparação das amostras e extratos

Neste trabalho foram estudadas duas partes distintas da planta *Levisticum officinale*, nomeadamente a parte aérea (folhas e caules) e a raiz. A parte aérea da planta foi obtida numa rede de supermercados na cidade do Porto, Portugal (Makro), tendo sido transportada para Bragança de forma refrigerada. As raízes foram adquiridas numa empresa Espanhola (Herbolario El Manantial, Madrid). As folhas, os caules e as raízes foram pesados, liofilizados e triturados, reduzidos a pó (20 mesh) e conservados a -20 °C para posterior análise.

3.1.1. Preparação dos extratos das folhas

Para a preparação da decocção, 3 g das folhas liofilizadas (partes aéreas), foram extraídas com 300 mL de água desionizada (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA), em ebulição durante 5 min; de seguida foram deixadas em repouso à temperatura ambiente e posteriormente filtraram-se com filtro Whatman N° 4. Procedeu-se à congelação e liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, MO, EUA) para a obtenção dos extratos.

Para a preparação do extrato hidroalcoólico, 3 g das folhas foram extraídas com 90 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 repetindo-se o procedimento. Posteriormente, o etanol foi evaporado a 40 °C (Buchi R-2010), e procedeu-se à congelação e liofilização para a obtenção do extrato.

3.1.2. Preparação dos extratos da raiz

Para a preparação da decocção e hidroalcoólico da raiz procedeu-se de acordo com o descrito anteriormente no ponto 3.1.1.

Para a preparação do extrato de hexano, 3 g da raiz foram extraídas com 90 mL de hexano sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, durante uma hora. O

preparado foi filtrado através de um filtro de papel e o resíduo re-extraído repetindo-se o procedimento. Posteriormente, o hexano foi evaporado a 40 °C para a obtenção do extrato.

Preparou-se ainda um extrato hidroalcoólico (conforme descrito anteriormente no ponto 3.1.1) com o resíduo da planta resultante da extração com o hexano.

3.1.3. Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger, realizado de acordo com a Farmacopeia Europeia (1996), com algumas modificações. Dado o baixo rendimento da extração, foram feitas várias destilações de forma sequencial, com 250 g de raiz triturada em 500 mL de água, tendo-se recolhido o óleo essencial obtido em 2 mL de n-hexano.

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) das folhas da planta liofilizada. O teor de humidade foi avaliado com base na diferença de massa obtida 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 conversão ($N \times 6,25$). A gordura total foi determinada através da extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando-se o aparelho de Soxhlet. O teor de cinzas foi determinado por incineração numa mufla a 550 ± 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).

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

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

3.3. Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado conforme a metodologia descrita por (Obodai *et al.*, 2017) com base na utilização de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID).

A massa resultante da extração por Soxhlet foi misturada a 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno na proporção 2:1:1 (v/v/v), durante 12 horas num banho a 50 °C a 160 rotações por min (rpm), de seguida foram adicionados 3 mL de água destilada para a obtenção das diferentes fases. Os FAMES (ésteres metílicos de ácidos gordos) foram recuperados com 3 mL de éter etílico com agitação em *vortex*. Para eliminar qualquer resíduo de água, o sobrenadante foi submetido a uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, recuperou-se então a amostra para um *vial* com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se utilizando 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), com detetor a 260 °C e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm *df*).

O programa de temperatura do forno obedeceu à seguinte configuração: a temperatura inicial da coluna foi 100 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10 °C/min até 140 °C, 3 °C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C durante 2 min. O hidrogénio (gás de transporte) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:50) 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

A determinação dos açúcares livres foi realizada com base na metodologia descrita por Obodai *et al.* (2017), utilizando um sistema de HPLC com detetor de índice de refração (HPLC-RI).

À amostra liofilizada (1,5 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno (melezitose, 25 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1h 30 min. Em seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol 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 destilada para um volume final de 5 mL. Após filtração em filtros de nylon de 0,2 µm para *vials*, procedeu-se à análise por HPLC-RI a 35 °C utilizando um sistema de HPLC (Knauer, sistema Smartline) equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi realizada usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões comerciais.

Os açúcares livres foram também determinados nos extratos hidroalcoólicos e decocções. Pesaram-se 30 mg dos extratos, redissolveram-se em 2 mL de água desionizada, filtraram-se para *vials* (filtros de nylon de 0,2 µm) e procedeu-se à análise por HPLC-RI como descrito anteriormente.

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

3.5. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida ultra rápida com detetor de díodos (UPLC-DAD), conforme a metodologia descrita e otimizada por Barros *et al.* (2013).

Procedeu-se à extração de 1,5 g da amostra liofilizada com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) em agitação durante 25 min. As soluções obtidas foram filtradas através de papel Whatman N° 4 e seguidamente através de filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para *vials*. Os ácidos orgânicos foram analisados utilizando um sistema Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna de fase reversa 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 picos registada a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto.

Para as partes aéreas, os resultados foram expressos em g por 100 g de massa fresca, os extratos em mg/g extrato e os resultados da raiz foram expressos em g por 100 g de massa seca.

3.6. Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados de acordo com o procedimento otimizado pelos autores Barros *et al.* (2010). Antes de se proceder à extração, adicionou-se à amostra liofilizada (~500 mg) uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL, 100 µL) e o padrão interno (PI) (tocol em hexano 50 µg/mL; 400 µL). Adicionaram-se 4 mL de metanol e posterior homogeneização no *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. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano e desidratada com sulfato de sódio anidro. O extrato foi levado à secura recorrendo a uma corrente de azoto. De seguida foi re-dissolvido em 2 mL de hexano, filtrado (filtros de 0,22 µm) 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 aquoso e hidroalcoólico das folhas da planta, tendo-se, neste caso, pesado 40 mg e 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 massa fresca para o caso das partes aéreas, os extratos foram expressos em $\mu\text{g/g}$ extrato e os resultados da raiz foram expressos em mg/100 g massa seca.

3.7. Compostos fenólicos

Os extratos hidroalcoólico e de decocção de ambas as partes botânicas esturadas foram submetidos a análise cromatográfica de acordo com o procedimento descrito pelos autores Costa *et al.* (2016) utilizando o procedimento em HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) utilizando um sistema composto por bomba quaternária e dupla detecção on-line: detetor de díodos (DAD), tendo como comprimentos de onda de 280 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 \times 4,6 mm, Waters Milford, MA, USA), numa temperatura de operação de 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).

Para a identificação dos compostos fenólicos estes foram comparados com os tempos de retenção comparando a literatura e/ou quando possível aos espectros de massa UV-

Vis. A análise quantitativa foi realizada de acordo com a reta de calibração (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina-3-*O*-rutinósido, ácido cafeico, quercetina-3-*O*-glucósido) tendo 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. Compostos voláteis

Para a análise qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis totais nas folhas e na raiz foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa, GC-2010 Plus (Shimadzu) com injetor automático AOC-20iPlus (Shimadzu), com a coluna SH-RXi-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; Shimadzu, USA). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial de 40 °C, durante 4 min, em seguida aumentou-se a temperatura 3 °C/min até 175 °C, 15 °C/min até 300°C e foi mantida durante 10 min.

O volume da amostra injetado correspondeu a 1 μ L, com uma razão de *Split* 1:10, sendo a temperatura do injetor 260 °C e a temperatura do detetor 280 °C, a temperatura da fonte iônica foi 220 °C. A energia de ionização foi 70 eV, tendo-se utilizado uma faixa de varrimento de 35-500 *u*, com tempo de varrimento 0,3 s.

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros obtidos com os da biblioteca espectral de massa NIST17 e na determinação do índice de retenção linear (LRI) com base nos tempos de retenção obtidos para uma mistura de *n*-alcanos (C8-C40, ref. 40147-U, Supelco) analisados em condições idênticas, tendo-se ainda procedido à comparação com os dados publicados.

A quantificação dos diferentes compostos foi realizada usando valores relativos das áreas dos picos, obtidas diretamente dos valores de corrente total de iões (TIC).

3.9. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método descrito por Dias *et al.*, (2016), utilizando o método colorimétrico por microdiluição 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-positivo: *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e Gram-negativo: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*), e ainda a atividade sobre o fungo *Candida albicans*.

As amostras foram primeiramente dissolvidas em 5% (v/v) de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de Caldo Mueller-Hinton (MHB) / Caldo de Soja Tríptico (TSB) para dar uma concentração final de 20 mg/mL.

A preparação das bactérias em solução aquosa foi realizada através da leitura da densidade ótica com base na escala de McFarland correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. De seguida, foram colocados em microplacas de 96 poços, 150 µL do meio de cultura Muller Hinton Broth (MHB) ou Tryptic Soy Broth (TSB), o TSB para as estirpes de *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* e o MHB para as demais estirpes, juntamente com 40 µL da solução inicial. Foram efetuadas diluições sucessivas (20 a 0,156 mg/mL). No final de todo o procedimento foram então adicionados a cada poço 10 µL do inóculo bacteriano, seguindo 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 µL de INT (0,2 mg/mL). As microplacas foram colocadas na estufa a 37 °C durante 30 min. Terminado este intervalo de tempo os resultados foram avaliados tendo em conta a mudança de coloração passando de amarela para cor-de-rosa.

Os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória (MIC) definida como a concentração mínima de extrato necessária para promover a inibição do crescimento bacteriano. A concentração mínima bactericida (MBC), determinada em cultura celular em placa (meio sólido) a partir das MIC's (concentração mínima inibitória), foi realizada pela adição de 50 µL dos poços sem crescimento com os meios de cultura condizentes com o tipo de estirpe. As placas foram colocadas em estufa durante 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 Imipenemo, 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

3.10. Atividade antioxidante

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

Das soluções extraídas e liofilizadas, pesou-se a massa dos diferentes extratos para a preparação de uma solução-mãe, com concentração igual a 5 mg/mL e posteriormente diluída sucessivamente no seu respectivo solvente.

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

Foram utilizadas 30 μL dos diferentes extratos diluídos numa concentração de 5 mg/mL até 0,0391 mg/mL e adicionados 270 μL de uma solução metanólica contendo uma concentração de 6×10^{-5} mol/mL de radicais de DPPH. O solvente da extração também foi utilizado como controlo para uma posterior comparação dos resultados. As misturas foram mantidas ao abrigo da luz e após 60 min foi determinada a redução do radical DPPH com base na leitura de absorvância a 515 nm utilizando um leitor de microplacas ELX800 Biotek (BioTek Instruments, Inc; Winooski, VT, USA). A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada de acordo com a percentagem de descoloração da solução de DPPH conforme a equação (3), (Sarmiento *et al.* 2015).

$$\text{Equação 3. \%ACR} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{AA}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100$$

onde, AA corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e ADPPH corresponde à absorvância da solução de 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.

3.10.2. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o leitor de microplacas mencionado anteriormente e foi avaliada a capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . As soluções das amostras

com diferentes concentrações (0,5 mL), foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L; pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% *m/v*; 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e, de seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (10% *m/v*; 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada em microplacas de 48 poços, assim como água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% *m/v*; 0,16 mL). Posteriormente, a absorvância foi lida a 690 nm.

Os resultados foram apresentados em EC₅₀ calculado a partir da representação gráfica obtida pela absorvância em função da concentração de extrato correspondente.

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

Neste ensaio os TBARS foram obtidos a partir de tecidos cerebrais de porco, de animais oficialmente abatidos. O tecido cerebral foi homogeneizado em solução tampão Tris-HCl (20 mM e pH 7,4) para se obter uma porção de 1:2 (*m/v*) de homogeneizado cerebral após a centrifugação a 4000 g durante 10 min. Após centrifugação (4000 g, 10 min) recolheu-se o sobrenadante, o qual foi adicionando (100 µL) do sobrenadante foi incubado com as soluções das amostras (200 µL) na presença de 100 µL de FeSO₄ (0,1 mM). Após incubação a 37 °C durante 1 hora, sessou-se a reação através da adição de 500 µL de ácido tricloroacético (28%, *m/v*), seguido do ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, *m/v*, 380 µL). Seguidamente a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min e centrifugada a 3000 g durante 10 min para remover o precipitado proteico. A intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA) – TBA no sobrenadante foi medida a 532 nm e a inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada segundo a equação (4), (Sarmiento *et al.* 2015):

$$\text{Equação 4. Inibição de peroxidação lipídica (\%)} = \left[\frac{A-B}{A} \right] \times 100$$

onde, A corresponde à absorvância do controlo e B à absorvância da amostra.

3.10.4. 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 volumétrico 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 200 µL das diferentes concentrações de extrato.

O controlo foi preparado utilizando o solvente da extração para posterior comparação.

Os tubos foram agitados em *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 (tempo 120). A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a equação (5).

A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada pela utilização da equação (5):

$$\text{Equação 5. Inibição da descoloração do } \beta - \text{caroteno } \% = [ABS_{120} - ABS_0] \times 100 \quad (5)$$

onde, ABS_{120} corresponde ao valor de absorvância obtido duas horas após incubação e ABS_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 (Sarmiento *et al.* 2015).

3.10.5. Ensaio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

Para a realização deste ensaio celular, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelha do qual foram obtidos apenas os eritrócitos por centrifugação (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) a 2900 rpm, durante 5 min a 10 °C. Após eliminação do sobrenadante, a amostra centrifugada foi submetida a uma lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4), procedendo-se a centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem. Em seguida preparou-se uma solução de eritrócitos a 2,8% (v/v) tendo como diluente o PBS. Posteriormente 200 µL da solução de eritrócitos foram adicionados a 400 µL de PBS, (servindo esta solução de controlo), bem como às diferentes concentrações de extrato dissolvidas em PBS (20 a 0,625 mg/mL). Realizou-se ainda a adição da solução de eritrócitos a água (para promover a hemólise

completa), funcionando como um controlo negativo. Os ensaios foram realizados em microplacas de 48 poços, as quais foram incubadas a 37 °C durante 10 min com agitação. Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH; 160 mM) e a densidade ótica foi medida a 690 nm. As microplacas foram depois incubadas nas mesmas condições até hemólise completa, com medições a cada 10 min (Lockowandt *et al.*, 2019).

A percentagem da população de eritrócitos (PE) que permanece intacta foi calculada conforme a equação (6):

$$\text{Equação 6. PE (\%)} = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100 \quad (6)$$

onde S_t e S_0 correspondem à densidade ótica da amostra num instante de tempo t e 0 min, respetivamente, e CH_0 é a densidade ótica correspondente à hemólise completa aos 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), calculado da seguinte equação (7):

$$\text{Equação 7. } \Delta t \text{ (min)} = H_{t50} \text{ (amostra)} - H_{t50} \text{ (controlo)} \quad (7)$$

onde H_{t50} é o tempo correspondente a 50% de hemólise (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise para cada concentração de amostra antioxidante.

Foram estabelecidas correlações entre os valores de Δt e as diferentes concentrações de amostra, de forma a calcular a concentração capaz de retardar a hemólise em 60 min (EC_{50} (60 min), mg/mL) e 120 min (EC_{50} (120 min), mg/mL).

3.11. Citotoxicidade

A atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* através do ensaio da Sulforrodamina B (SRB) descritos pelos autores (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), HCT15 (carcinoma do cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular); utilizou-se também uma linha não tumoral de células primárias de fígado de porco (PLP2).

As células foram cultivadas numa incubadora de ar humidificado e com 5% de CO_2 , em frascos de cultura de tecidos de 25 cm² 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 então efetuada uma monitorização contínua das células num microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100).

Para preparar o ensaio, retirou-se 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 min 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 μ L) para um *eppendorf* à qual se juntou a mesma quantidade (75 μ L) de azul tripano para se proceder à contagem de células numa câmara de Neubauer.

Posteriormente, colocaram-se os estratos (10 μ L) em microplacas de 96 poços juntamente com o volume de suspensão celular calculado para a densidade estabelecida, e fez-se o volume do poço com meio de cultura. Após isto, as microplacas armazenaram-se devidamente seladas durante 72 h 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 μ L) a cada um dos poços e incubação a 4 °C durante 60 min. De seguida, 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 μ L) incubando de seguida durante 30 min 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 μ L, pH 7,4) com auxílio de um agitador de microplacas (Stat Fax-2100), e procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm 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).

3.12. 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 15x10⁴ macrófagos, e incubou-se durante 18-24 h 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 µL das diluições descritas anteriormente na secção 3.11 e incubando novamente durante 60 min. De seguida, as células foram estimuladas com solução de lipopolissacárido (LPS) na concentração de 10 µg/mL (30 µL) e os poços foram completados com meio até obtenção de um total de 300 µL, 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 µL) é transferido para outra microplaca e adicionado o reagente Griess que contém uma mistura de sulfanilamida e soluções NED (cloreto de hidrocloreto de etilenodiamina N-(1-naftil)), as placas foram mantidas em repouso por 5 min 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. 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.

3.13. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os valores expressos como média±desvio padrão (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. Composição Química

4.1.1 Composição proximal, açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e Vitamina E

Os resultados da composição em macronutrientes, açúcares livres e ácidos orgânicos encontram-se representados na Tabela 4, para a parte aérea da planta. O valor nutricional foi determinado apenas para a parte aérea (folhas e caules) da planta, uma vez que as raízes são preferencialmente usadas em infusões e não ingeridas diretamente. Como se pode verificar, a amostra das partes aéreas apresentou um teor de humidade próximo dos 90%, sendo os glúcidos (5,66%) e os lípidos (0,37%) os macronutrientes maioritários e minoritários, respetivamente.

Tabela 4. Composição proximal, valor energético, açúcares livres e ácidos orgânicos e compostos hidrofílicos da parte aérea (folhas e caules) da planta *Levisticum officinale* (média \pm DP, n=9).

Valor Nutricional (g/100 g massa fresca)	
Humidade	89,4 \pm 0,1
Cinzas	1,52 \pm 0,06
Proteínas	3,01 \pm 0,06
Lípidos	0,37 \pm 0,02
Glúcidos	5,7 \pm 0,2
Valor Energético (Kcal/100 g massa fresca)	38,0 \pm 0,6
Açúcares livres (g/100g massa fresca)	
Arabinose	0,048 \pm 0,001
Glucose	0,090 \pm 0,001
Sacarose	0,092 \pm 0,003
Trealose	0,073 \pm 0,002
Total de açúcares totais	0,30 \pm 0,01
Ácidos orgânicos (g/100g massa fresca)	
Oxálico	0,462 \pm 0,001
Quínico	0,37 \pm 0,06
Málico	0,203 \pm 0,001
Xiquímico	0,012 \pm 0,001
Cítrico	0,21 \pm 0,04
Fumárico	0,003 \pm 0,001
Total de ácidos orgânicos	1,26 \pm 0,02

Na Tabela 5 apresenta-se a composição nutricional de três vegetais pertencentes à família Apiaceae, comumente utilizados na alimentação humana. Quando comparados com os resultados da composição nutricional de *Levisticum officinale* pode perceber-se que os valores são semelhantes, principalmente para o caso da salsa e coentros, sendo o aipo aquele que apresenta uma composição mais diferenciada. Fazendo os cálculos para massa seca, verifica-se que, comparativamente ao levístico, o aipo apresenta um teor muito superior de glúcidos (69,4 g/100 g vs. 53,4 g/100 g) e inferior de proteína (12,9 g/100 g vs. 28,4 g/100 g).

Tabela 5. Composição nutricional de plantas da família Apiaceae (g/100g massa fresca).

	Humidade	Proteína	Lipídeos	Glúcidos	Cinzas	Energia
Salsa	88,7	3,3	0,6	5,7	1,8	33
Coentro^a	87,16	3,23	0,6	7,16	1,62	47
Aipo	93,8	0,8	0,1	4,3	1,1	19

Valores adaptados da Tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos) desenvolvida pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). ^a (Oliveira & Soares, 2012).

Os glúcidos são substâncias que apresentam a fórmula molecular geral $C_n(H_2O)_n$. Neste grupo incluem-se os açúcares resultantes do processo de fotossíntese, componentes integrais do metabolismo das plantas. Os açúcares intervêm em quase todos os processos no ciclo de vida das plantas, armazenando energia e fornecendo estruturas base para a síntese de outros compostos orgânicos (Shah *et al.*, 2019). No que respeita à composição em açúcares livres da parte edível do levístico, foram identificados e quantificados 2 monossacarídeos, arabinose e glucose, e 2 dissacarídeos, sacarose e trealose (Tabela 4 e Figura 4). Destes, a sacarose (0,092 g/100 g massa fresca) e a glucose (0,090 g/100g massa fresca) foram os presentes em maior quantidade. Refira-se que estes compostos são considerados o dissacarídeo e monossacarídeo mais comumente encontrados em plantas.

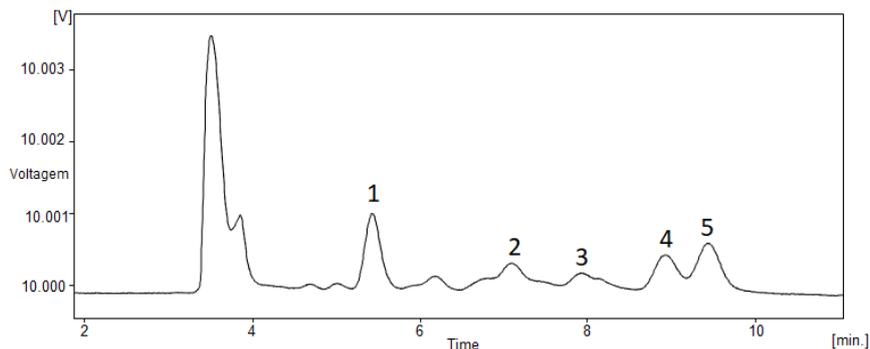


Figura 4. Perfil cromatográfico de açúcares livres das folhas de *Levisticum officinale*. 1 – Arabinose, 2 – Glucose, 3 – Sacarose, 4 – Trealose, 5 – Melezitose (padrão interno).

Os ácidos orgânicos, para além de desempenharem papéis importantes no metabolismo da planta, tais como a produção de energia, armazenamento de carbono, interações microbianas, entre outros, são também responsáveis pela acidez, contribuindo assim para o sabor característico (Vallarino & Osorio, 2019). No caso da amostra de *Levisticum officinale* estudada, foram identificados 6 ácidos orgânicos nas folhas, nomeadamente os ácidos oxálico, quínico, cítrico, málico, xiquímico e fumárico (Tabela 4 e Figura 5).

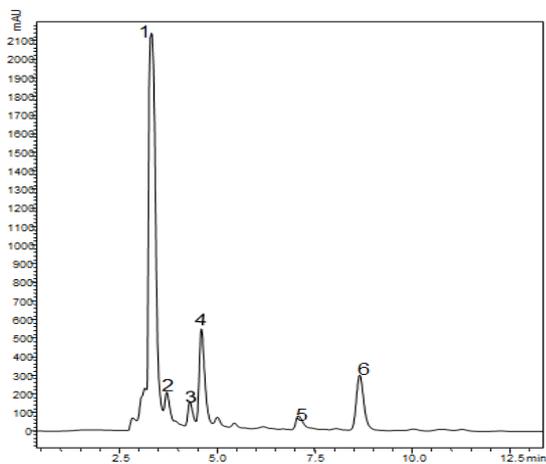


Figura 5. Perfil cromatográfico de ácidos orgânicos das folhas da planta *Levisticum officinale*. 1 – Ácido oxálico, 2 – Ácido quínico, 3 – Ácido Málico, 4 – Ácido xiquímico, 5 – Ácido cítrico e 6 – Ácido fumárico.

De uma maneira geral, estes ácidos são substâncias presentes naturalmente nas hortaliças e que exercem influência sobre certas características, tais como sabor, aroma e aparência (Calbo & Henz, 2007). Alguns destes ácidos orgânicos, com especial destaque para o cítrico, são comumente utilizados na indústria de alimentos como acidulantes. Para além de afetarem as características organolépticas dos alimentos, os ácidos orgânicos

podem interferir na estabilidade microbiana, no valor nutricional e na aceitabilidade dos consumidores (Santos, 2013).

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados da avaliação dos compostos lipofílicos da parte aérea da planta, nomeadamente ácidos gordos e Vitamina E. Na Figura 6, apresenta-se um cromatograma representativo do perfil de ácidos gordos da parte aérea da planta em estudo.

Tabela 6. Compostos lipofílicos da parte aérea da planta *Levisticum officinale* (média ± DP, n=9).

Ácidos gordos (%)	
C8:0	0,067±0,004
C10:0	0,076±0,006
C12:0	0,117±0,004
C14:0	0,63±0,02
C15:0	0,237±0,008
C16:0	10,0±0,3
C16:1	1,05±0,04
C17:0	0,162±0,001
C18:0	1,44±0,08
C18:1n9c	1,83±0,05
C18:2n6c	28,5±0,5
C18:3n3	48,7±0,6
C20:0	0,388±0,001
C20:1	0,043±0,004
C20:2	1,38±0,03
C21:0	0,063±0,001
C20:3n3	0,44±0,02
C23:0	1,03±0,04
C24:0	3,84±0,02
SFA	18,0±0,2
MUFA	2,93±0,09
PUFA	79,0±0,1
ω-6	29,9±0,3
ω-3	49,2±0,41
Tocoferóis (mg/100g massa fresca)	
α-Tocoferol	0,773±0,004
γ-Tocoferol	0,028±0,001
Total de tocoferóis	0,80±0,01

SFA: ácidos gordos saturados, MUFA: ácidos gordos monoinsaturados, PUFA: ácidos gordos polinsaturados. Ácidos 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 (C18:1n9c), linoleico (C18:2n6c), alfa-linolénico (C18:3n3), araquídico (C20:0), araquídico (C20:1), cis-11,14-eicosenoico (C20:2), heneicosanoico (C21:0), cis-11,14,17-eicosatrienoico (C20:3n3), Tricosanoico (C23:0) e Tetracosanoico (C24:0).

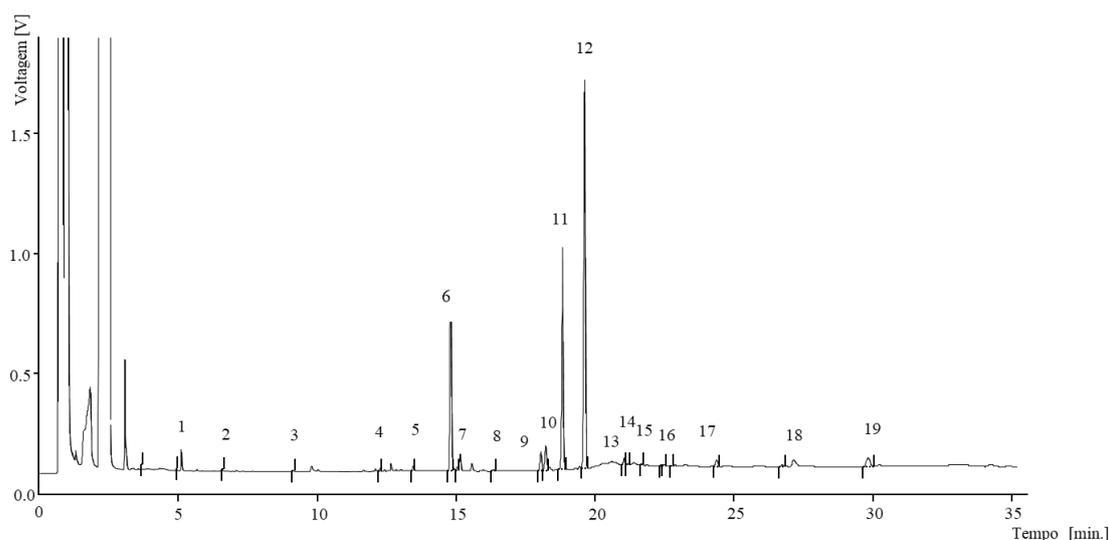


Figura 6. Cromatograma de ácidos gordos das folhas da planta *Levisticum officinale*. 1- C8:0; 2- C10:0; 3- C12:0; 4- C14:0; 5- C15:0; 6- C16:0; 7- C16:1; 8- C17:0; 9- C18:0; 10- C18:1n9c; 11- C18:2n6c; 12- C18:3n3; 13- C20:0; 14- C20:1; 15- C20:2; 16- C21:0; 17- C20:3n3; 18- C23:0. 19 - C24:0.

Com base na literatura disponível, o presente trabalho apresenta pela primeira vez a descrição detalhada sobre o perfil em ácidos gordos da parte edível desta espécie. Pode-se observar que, da totalidade dos 19 ácidos gordos identificados, destacam-se, como grupo maioritário de compostos, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA), seguindo-se os ácidos gordos saturados (SFA) e em menor quantidade os monoinsaturados (MUFA). De referir ainda que no grupo dos PUFA predominam os ácidos gordos ω -3, sendo o composto maioritário o ácido α -linolénico (48,7%).

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. Uma ingestão deficiente de ácidos gordos essenciais pode conduzir a vários problemas nomeadamente, dermatites, imunossupressão e disfunções cardíacas. Para além de doenças cardiovasculares, baixas quantidades ou ausência destes ácidos gordos no organismo humano, podem promover o desenvolvimento de algumas doenças degenerativas e acelerar o processo de envelhecimento (Perini *et al.*, 2010).

Nesta perspectiva, a planta estudada pode contribuir para o aporte alimentar de ácido α -linolénico (C18:3n3) e linoleico (C18:2n6c). Segundo a literatura (Águila *et al.*, 1997; Burchfield *et al.*, 1995), a introdução de ácido α -linolénico na dieta humana está relacionada com o aumento de lipoproteínas de elevada densidade (HDL) e diminuição de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), subseqüentemente diminuindo a morbidade e aumentando a longevidade de pacientes com doenças coronárias.

A vitamina E é um conjunto de compostos lipossolúveis que englobam os tocoferóis e os tocotrienóis, possuindo quatro tipos de conformações, nomeadamente trimetil (α -), dimetil (β - ou γ -) e monometil (δ -). Na Figura 7, apresenta-se um cromatograma representativo do perfil de tocoferóis da parte aérea da planta em estudo. A vitamina E funciona *in vivo* como um antioxidante, prevenindo a propagação dos danos dos radicais livres causados pelos radicais peróxido, protegendo particularmente os PUFA. Essa prevenção é possível pois tais radicais reagem 1000 vezes mais rápido com a vitamina E do que com PUFA (Leonard & Traber, 2019).

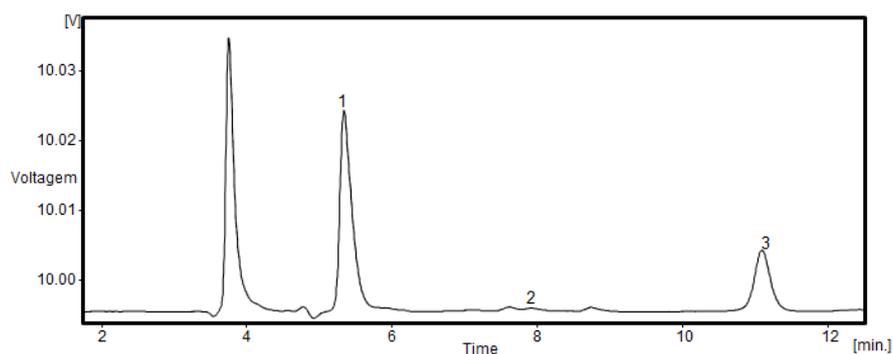


Figura 7. Cromatograma do perfil de tocoferóis por HPLC-FL da parte aérea de *Levisticum officinale*. 1 – Alfa-tocoferol, 2 – Gama-tocoferol e 3 – Tocol (padrão interno).

A ingestão de vitamina, tanto pelos alimentos ou por suplementos está relacionada com a modulação do sistema imune e interações das células inflamatórias com tecidos-alvo por meio de vários mecanismos incluindo a inibição da oxidação de LDL-colesterol, redução da libertação de citocinas, inibição da agregação plaquetária, alteração na proliferação das células do músculo liso e controlo do tónus vascular, bem como redução da interação do endotélio vascular com células do sistema imune e inflamatórias (Silva, 2014).

O nível recomendado de ingestão média diária para humanos de ambos os gêneros e distintas idades, segundo o painel de Alimentos e Nutrição (*Food and Nutrition Board*, FNB) da Academia Nacional de Ciências, pode ser visualizado na Tabela 7.

Tabela 7. Ingestão média diária adequada de Vitamina E na isoforma de α -Tocoferol.

Idade	AI (mg/dia)	EAR (mg/dia)	RDA (mg/dia)
0 - 6 meses	4		
7 -12 meses	5		
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
Gestação		12	15
Lactação		16	19

AI – (*Adequate Intake*), corresponde ao valor de consumo recomendável de ingestão de nutrientes para grupo de pessoas saudáveis; EAR – (*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; RDA – (*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.

As principais causas descritas de deficiência de Vitamina E estão relacionadas com anormalidades nas lipoproteínas, síndrome de má absorção devido a insuficiência pancreática, doença celíaca, doença de Crohn e desnutrição, entre outros (Cohen, Silva & Vannucchi, 2014). No entanto, as complicações causadas pela deficiência na ingestão de vitamina E são consideradas como sendo raras pois esta é encontrada num elevado número de alimentos.

Como se pode verificar pela análise das Tabelas 7 e 8, seria necessária a ingestão de grandes quantidades de *Levisticum officinale* para atingir os valores recomendados pela FNB, caso esta planta fosse a sua principal fonte. Por isso é aconselhável o consumo de *Levisticum officinale* no âmbito de uma dieta variada e equilibrada, sendo que a introdução desta planta na dieta alimentar irá contribuir para o aporte diário recomendado de vitamina E.

Para além da caracterização nutricional no que respeita os compostos hidrófilos (açúcares e ácidos orgânicos) e lipófilos (tocoferóis) realizada na planta *in natura*,

realizou-se também a determinação destes compostos em diferentes extratos obtidos da planta, que estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Açúcares livres, ácidos orgânicos e tocoferóis dos extratos preparados com a parte aérea da planta *Levisticum officinale* (média \pm DP, n=9).

Açúcares livres	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico	teste <i>t</i>-Student <i>p</i>-valor
Açúcares livres (mg/g extrato)			
Arabinose	nd	97 \pm 2	-
Glucose	nd	21 \pm 1	-
Sacarose	708 \pm 24	48 \pm 2	<0,001
Trealose	nd	32 \pm 1	-
Total de açúcares livres	708 \pm 24	199 \pm 1	<0,001
Ácidos orgânicos (mg/g extrato)			
Oxálico	82,8 \pm 0,7	87 \pm 1	<0,001
Quínico	83 \pm 1	66 \pm 2	<0,001
Málico	104 \pm 2	25 \pm 3	<0,001
Xiquimico	3,2 \pm 0,1	3,03 \pm 0,02	<0,001
Cítrico	47 \pm 2	nd	-
Fumárico	1,46 \pm 0,02	0,46 \pm 0,001	<0,001
Total de ácidos orgânicos	322 \pm 1	181 \pm 4	<0,001
Tocoferóis (μg/g extrato)			
α -Tocoferol	0,64 \pm 0,04	484 \pm 4	<0,001
γ -Tocoferol	nd	15,9 \pm 0,7	-
Total de tocoferóis	0,64 \pm 0,04	500 \pm 4	<0,001

nd – não detectado

Comparativamente com os resultados obtidos da planta *in natura*, todos os ácidos orgânicos foram identificados em ambos os extratos, com exceção do ácido cítrico que não foi detetado no extrato hidroalcoólico. Este facto pode ser justificado pela redução da solubilidade deste ácido na mistura etanol:água, visto que a adição de etanol reduz a polaridade do solvente promovendo um menor rendimento de extração de compostos muito hidrofílicos (Daneshfar *et al.*, 2012). A decocção, comparativamente à extração com a mistura hidroalcoólica, permitiu extrair uma quantidade significativamente superior de ácidos orgânicos totais ($p < 0,001$), sendo particularmente notória a diferença no que respeita o ácido málico, sendo o seu teor cerca de 4x superior no extrato aquoso. Tal pode ser devido à maior polaridade do solvente utilizado. Em relação à quantificação dos açúcares livres, no extrato hidroalcoólico observou-se a presença de todos os açúcares

previamente identificados na parte aérea da planta *in natura*. Já no extrato aquoso, não foi detetada a presença de glucose, trealose e arabinose. As diferenças significativas entre os resultados obtidos para os dois extratos pode estar relacionada com fatores descritos por Stalikas (2007), nomeadamente a agitação e o tempo de contacto da amostra com o solvente.

Adicionalmente, procedeu-se ainda à determinação de ácidos orgânicos e tocoferóis na raiz de *Levisticum officinale* (Tabela 9), dada a relevância dos primeiros para as características organolépticas e de ambos como compostos bioativos. Nesta parte da planta foram identificados três ácidos orgânicos, sendo o predominante o ácido oxálico. Em relação aos isómeros da vitamina E, tal como nas folhas, foi detetada a presença de duas diferentes isoformas, α -Tocoferol e γ -Tocoferol. Convertendo os valores dos ácidos orgânicos da parte aérea para g/100 g massa seca, comparativamente com as raízes, verifica-se um maior teor de ácidos orgânicos nas folhas, em particular para os ácidos oxálico (4,37 g/100 g vs. 2,23 g/100 g), málico (1,92 g/100 g vs. 1,48 g/100 g) e fumárico (0,03 g/100 g vs. 0,007 g/100 g).

Tabela 9. Ácidos orgânicos e tocoferóis identificados na raiz da planta *Levisticum officinale* (média \pm DP, n=9).

Ácidos orgânicos (g/100g massa seca)	
Oxálico	2,23 \pm 0,02
Málico	1,48 \pm 0,04
Fumárico	0,007 \pm 0,001
Total de ácidos orgânicos	3,7 \pm 0,1
Tocoferóis (mg/100g massa seca)	
α -Tocoferol	0,83 \pm 0,03
γ -Tocoferol	0,48 \pm 0,03
Total de tocoferóis	1,31 \pm 0,06

Convertendo os resultados dos tocoferóis da parte aérea de massa fresca para massa seca, verifica-se que o α -tocoferol apresenta uma maior abundância nas folhas (7,32 g/100 g folha vs. 0,83 g/100 g raiz), ao passo que o γ -tocoferol apresenta um teor superior na raiz (0,48 g/100g raiz vs. 0,26 g/100 g folha). Segundo Silva (2015), o teor superior de α -tocoferol na parte aérea pode estar relacionado com a presença de tecidos fotossintéticos.

4.1.2. Composição em compostos fenólicos

A caracterização do perfil de compostos fenólicos foi realizada por HPLC-DAD-ESI/MS, tendo-se obtido ou registrado diferentes dados, tais como tempo de retenção, λ_{max} , íão molecular e iões dos fragmentos principais observados no MS², permitindo a identificação tentativa e quantificação dos compostos fenólicos na parte aérea e na raiz de *Levisticum officinale*, conforme apresentado nas Tabelas 10 e 11, respetivamente. O perfil cromatográfico obtido para a parte aérea e raiz pode ser observado nas Figuras 8 e 9.

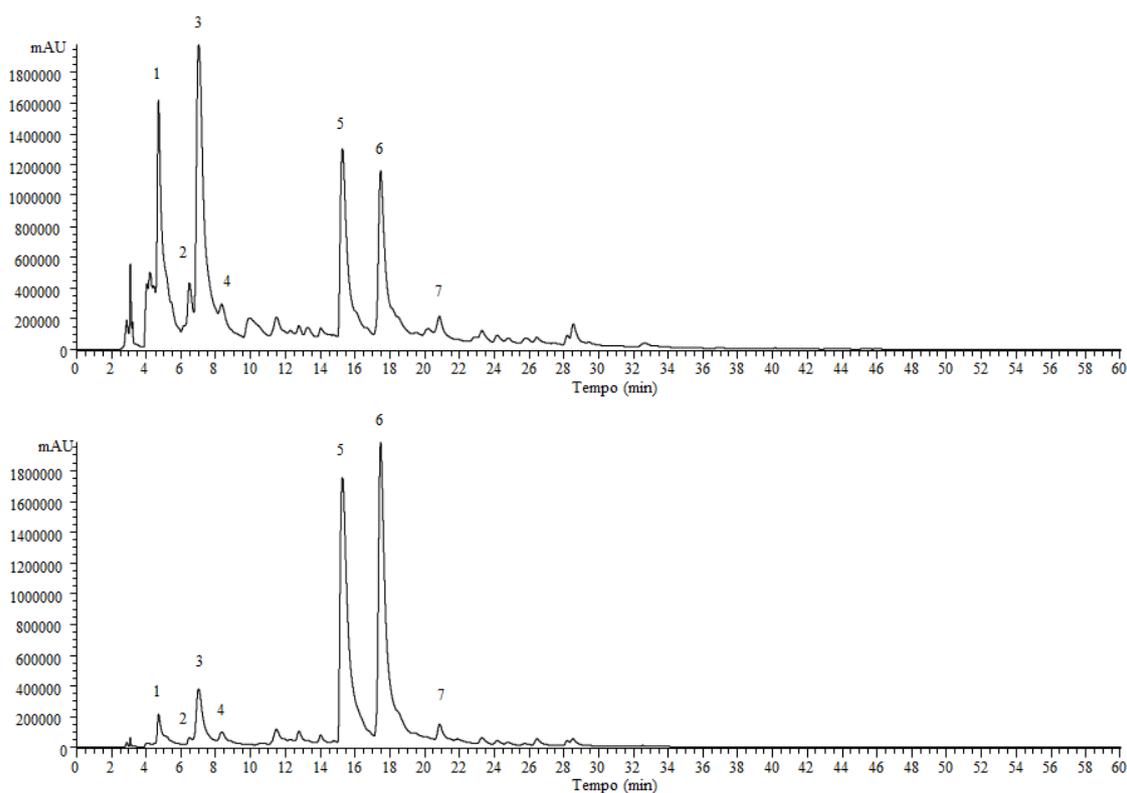


Figura 8. Perfil fenólico das folhas proveniente do extrato hidroalcoólico do *Levisticum officinale* registado a 280 nm (A) e 370 nm (B). A numeração dos picos é indicada conforme definido na Tabela 10.

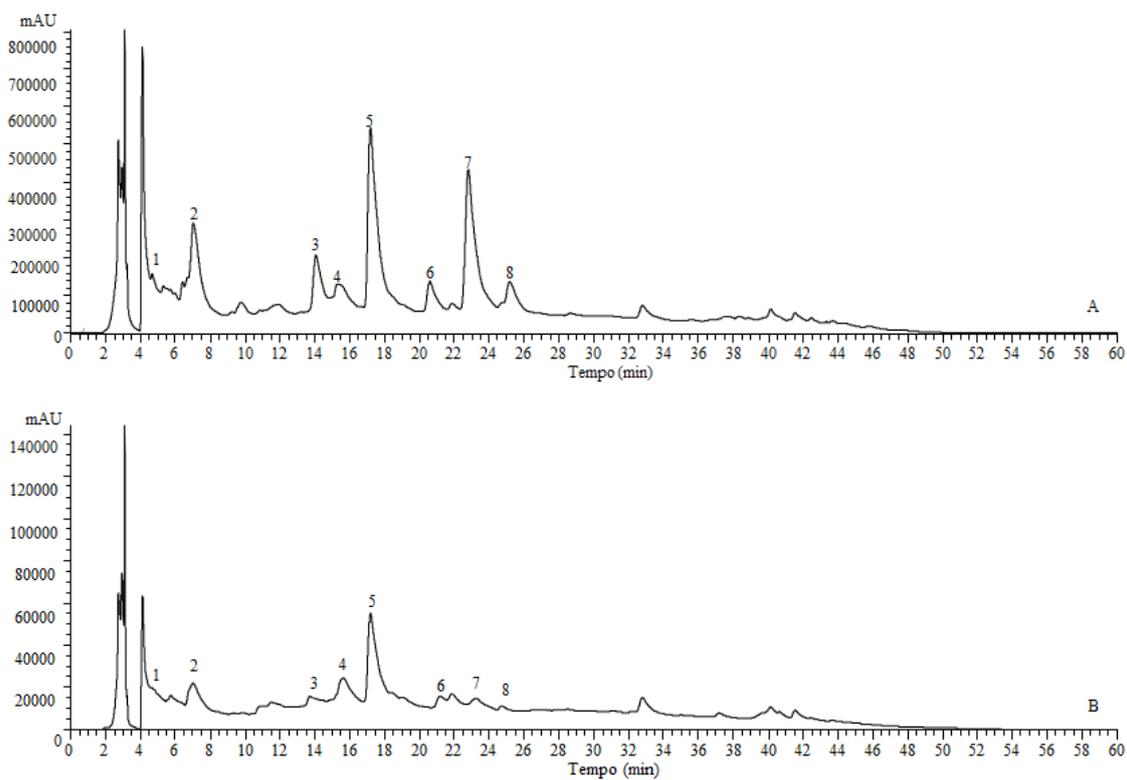


Figura 9. Perfil fenólico da raiz proveniente do extrato hidroalcoólico do *Levisticum officinale* registado a 280 nm (A) e 370 nm (B). A numeração dos picos é indicada conforme definido na Tabela 11.

Tabela 10. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ máx), dados espectrais de massa e tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na parte aérea de *Levisticum officinale*.

Pico	Rt (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Hidroalcoólico	Decocção	Teste t-Students p-valor	Referências
1 ^L	4,71	324	353	191(100),179(52),173(5),161(3),135(18)	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico ¹	17,2±0,1	9,5±0,1	<0,001	Clifford <i>et al.</i> , 2003
2 ^L	6,5	324	353	191(18),179(56),173(100),135(5)	Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquínico ¹	5,78±0,03	4,76±0,06	<0,001	Clifford <i>et al.</i> , 2003
3 ^L	7,03	326	353	191(100),179(14),161(3),135(5)	Ácido <i>cis</i> 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico ¹	43±1	7,2±0,1	<0,001	Clifford <i>et al.</i> , 2003
4 ^L	8,35	325	353	191(100),179(12),161(3),135(3)	Ácido <i>trans</i> 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico ¹	4,8±0,1	3,265±0,01	<0,001	Clifford <i>et al.</i> , 2003
5 ^L	15,28	234,264,314	423	303(100), 261(35), 243(22)	Maclurina-3- <i>C</i> -glucósido ²	79,3±0,9	50,9±0,9	<0,001	Beelders <i>et al.</i> , 2014
6 ^L	17,48	352	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> - rutinósido ³	77±1	36,71±0,03	<0,001	Spinola <i>et al.</i> , 2015
7 ^L	20,87	348	593	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> - rutinósido ³	6,3±0,2	5,31±0,06	<0,001	Spinola <i>et al.</i> , 2015
					TPA	71±1	24,7±0,1	<0,001	
					TF	163±2	93±1	<0,001	
					TPC	233±1	118±1	<0,001	

TPA - Ácidos fenólicos totais, TF - flavonoides totais, TPC - compostos fenólicos totais; nd - não detectados; nq- não quantificado; curvas de calibração utilizadas: 1 - ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$, $R^2 = 0,99$), 2- apigenina-6-*C*-glucósido ($y = 107025x + 61531$, $R^2 = 0,998$), 3 - quercetina-3-*O*-glucósido ($y = 34843x - 160173$, $R^2 = 0,999$).

Tabela 11. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos em raízes de *Levisticum officinale*.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Hidroalcoólico	Decocção	Teste t-Students p-valor	Referências
1 ^R	4,69	192, 258	341	179(100)	Hexosídeo de ácido cafeico ¹	nd	0,44±0,02	nd	Złotek <i>et al.</i> (2019)
2 ^R	7,04	288, 320	167	123(100)	Ácido vanílico ²	1,51±0,03b	19,7±0,4a	0,49±0,01c	Acimović (2017)
3 ^R	14,07	201, 225	533	515(5), 371(100), 353(13), 209(7), 191(5), 179(3)	Ácido di-cafeoilglutárico ¹	0,056±0,002b	0,6163±0,0004a	0,025±0,003c	Spinola & Castilho (2017)
4 ^R	15,44	200, 323	561	367(100), 193(26), 191(13), 173(100), 129(60), 111(2)	Ácido hidroferuloil-feruloilquinico ³	0,044±0,002*	0,582±0,006*	nd	Spinola & Castilho (2017)
5 ^R	16,79	307	935	926(10), 915(18), 897(10), 783(12), 633(100), 301(48)	Galoil-bis-HHDP-glucosídeo ⁴	0,984±0,001	nd	nd	Panthama <i>et al.</i> (2009)
6 ^R	17,20	324	547	529(8), 385(100), 367(27), 353(21), 335(3), 191(7), 179(3), 173(3)	Ácido cafeoil-feruloilquinico ³	0,171±0,005b	1,62±0,04a	0,089±0,002c	Silva & Batista (2017)
7 ^R	20,61	196, 233, 280	361	343(100), 325(2), 199(44), 181(3)	Catalpol ⁵	0,126±0,005b	0,66±0,02a	0,059±0,002c	Barreira <i>et al.</i> (2014) Cogne <i>et al.</i> (2003)
8 ^R	22,81	234, 282, 322	251	233(22), 207(100), 193(9), 179(28), 175(42), 153(2)	Não identificado	nq	nq	nq	
9 ^R	25,19	233, 281, 322	389	371(100), 341(25), 327(7), 193(38)	Metoxilariciresinol ⁵	0,171±0,006b	0,639±0,006a	0,0484±0,0005c	Olaru <i>et al.</i> (2015)
					TPA	1,78±0,04b	23,1±0,5a	0,61±0,01c	
					TF	0,298±0,001b	1,295±0,01a	0,108±0,002c	
					TPC	3,07±0,04b	24,3±0,5a	0,72±0,01c	

TPA - Ácidos fenólicos totais, TF - flavonoides totais, TPC - compostos fenólicos totais; nd - não detectados; nq - não quantificado; curvas de calibração utilizadas: 1- ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,998$); 2- ácido vanílico ($y = 29751x - 28661$, $R^2 = 0,999$); 3 - ácido ferúlico ($y = 633126x - 185462$, $R^2 = 0,999$); 4 - ácido elágico ($y = 26719x - 317255$, $R^2 = 0,99$); 5- ácido protocatéuico ($y = 214168x + 27102$, $R^2 = 0,999$).

De uma forma geral, os compostos *trans* ácido 5-*O*-cafeoilquínico (pico 4^L), quercetina 3-*O*-rutinósido (pico 11^L), canferol 3-*O*-rutinósido (pico 12^L) e ácido vanílico (pico 2^R) foram identificados positivamente de acordo com seu tempo de retenção, massa e características UV-Vis em comparação com padrões comerciais. O ácido 3-*O*-cafeoilquínico (pico 1^L), o ácido 4-*O*-cafeoilquínico (pico 2^L) e o ácido *cis*-5-*O*-cafeoilquínico (pico 3^L) foram identificados com base no padrão hierárquico de fragmentação descrito por Clifford *et al.* (2003). Além disso, o pico 1^L ([M-H]⁻ em *m/z* 341) libertou um fragmento com uma *m/z* 179 [ácido cafeico-H]⁻ (-162 u, perda de um resíduo hexosilo), sendo tentativamente identificado como um hexósido de ácido cafeico. O pico 9^L apresentou um ião pseudomolecular [M-H]⁻ com *m/z* 423, sendo tentativamente identificado como maclurina-3-*C*-glucósido, com base no espectro UV e padrão de fragmentação MS² descrito por Beelders *et al.* (2014).

A quercetina-3-*O*-rutinósido foi o flavonoide mais abundante, enquanto que o ácido 3-*O*-cafeoilquínico (clorogénico) foi o principal ácido fenólico. Tanto a decocção quanto o extrato etanólico apresentam o mesmo perfil de compostos fenólicos, porém o extrato etanólico revelou uma maior concentração de todos os compostos identificados.

Nas amostras de raízes, foram identificados nove compostos, no entanto uma das moléculas analisadas permaneceu desconhecida (Figura 9, Tabela 9). O pico 1^R ([M-H]⁻ em *m/z* 341) libertou um fragmento em *m/z* 179 [ácido cafeico-H]⁻ (-162 u, perda de um resíduo hexosil) e foi tentativamente identificado como hexósido do ácido cafeico. O ácido vanílico (pico 2^R) foi identificado de acordo com as suas características de tempo de retenção, espectros de massa e UV-Vis em comparação com um padrão comercial. O pico 3^R ([M-H]⁻ em *m/z* 533) foi tentativamente designado como ácido di-cafeoilglucárico, tendo em conta o padrão de fragmentação apresentado por Spinola & Castilho (2017). O pico 4^R apresentou um ião pseudomolecular em *m/z* 561 e foi identificado como ácido hidroferuloil-feruloilquínico. O pico 6^R mostrou um ião precursor em *m/z* 547 [M-H]⁻, sendo a primeira perda observada uma molécula de água ([M-18]⁻ em *m/z* 529); o ião fragmento em *m/z* 193 indicou a presença de um feruloilquinico e *m/z* 179 indicou um resíduo cafeoil, sendo portanto este composto tentativamente identificado como ácido cafeoil-feruloilquínico com base no padrão de fragmentação relatado por Silva e Batista (2017). O pico 5 ([M-H]⁻ em *m/z* 935) apresentou iões de fragmentação MS² em *m/z* 633 e 301, provavelmente devido a perda de dois resíduos HHDP (hexahidroxidifênico) e um glucósido, consistentes com um galoil-bis-HHDP-glucosídeo. O pico 7^R foi identificado

como pertencente à classe dos iridóides. Este composto apresentou uma molécula desprotonada em m/z 361 e foi tentativamente identificado como catalpol (MW 362), composto este que já foi previamente detectado na família Apiaceae (Cogne *et al.*, 2003). O composto correspondente ao pico 9^R, mostrou ser uma lenhana, uma vez que apresentou um ião pseudomolecular $[MH]^-$ em m/z 389, libertando um fragmento em m/z 341 ($[MH-48]$, perda de um resíduo metoxi, coerente com um larciresinol). Um composto similar, com um padrão de fragmentação idêntico, foi descrito por Olaru *et al.* (2015), pelo que este composto foi tentativamente designado como metoxilarciresinol.

Na raiz, é de salientar que o ácido vanílico como sendo o principal ácido fenólico encontrado em ambos os extratos, tendo a decocção sido o extrato que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais.

4.1.3. Compostos voláteis

A composição do óleo essencial extraído das folhas e raiz de *Levisticum officinale* por hidrodestilação em sistema de Clevenger é apresentada na Tabela 12. Na Figura 10 apresenta-se um cromatograma representativo da análise por GC-MS do óleo essencial dos dois tipos de amostra referidos.

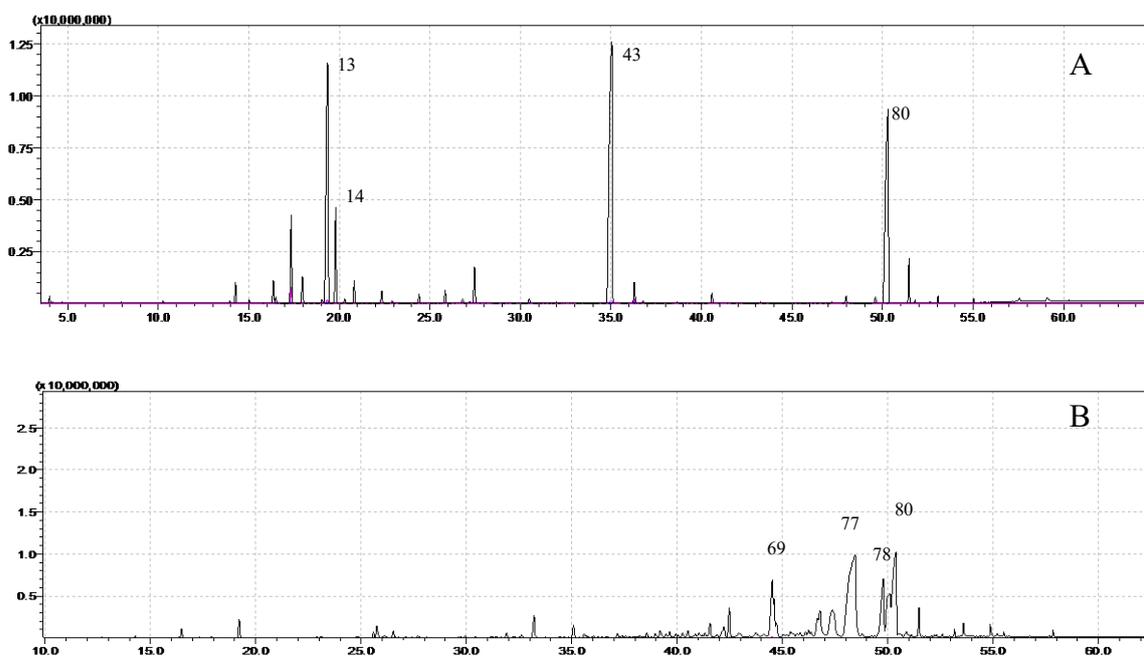


Figura 10. Cromatograma obtido por GC-MS relativo à análise do óleo essencial extraído das folhas (A) e da raiz (B) de *Levisticum officinale* (numeração dos compostos como na Tabela 13).

Tabela 12. Identificação dos componentes do óleo essencial de diferentes partes anatómicas de *Levisticum officinale*.

Número	Composto	RT	LRI ^a	LRI ^b	<i>Levisticum officinale</i> – Óleo essencial (%) ^d	
					Folhas	Raiz
1.	Heptanal	12,66	901	901	-	0,024±0,005
2.	α-Thujene	13,93	926	924	0,094±0,002	-
3.	α-Pineno	14,25	932	932	0,93±0,02	0,091±0,006
4.	Camphene	15,00	946	946	0,135±0,002	-
5.	Sabinene	16,34	972	969	1,05±0,02	-
6.	β-Pineno	16,47	974	974	0,270±0,007	0,59±0,04
7.	2-Pentil furano	17,31	991	984	-	0,073±0,004
8.	Mirceno	17,32	991	988	4,20±0,05	-
9.	n-Octanal	17,9	1002	998	-	0,046±0,002
10.	α-Felandreno	17,93	1003	1000	1,34±0,02	-
11.	3-Carene	18,25	1009	1008	0,059±0,002	-
12.	α-Terpineno	18,59	1015	1014	0,234±0,006	-
13.	p-Cimeno	19,01	1023	1020	20,53±0,09	0,028±0,003
14.	β-Felandreno	19,21	1027	1025	4,65±0,04	1,26±0,08
15.	(Z)-β-Ocimeno	19,75	1038	1032	0,224±0,003	-
16.	Cis-β-ocimeno	20,27	1048	1044	1,05±0,02	-
17.	γ-Terpineno	20,79	1058	1054	0,609±0,005	-
18.	Terpinoleno	22,32	1087	1086	0,093±0,001	-
19.	Linalol	22,91	1099	1095	0,055±0,001	0,079±0,001
20.	Nonanal	23,10	1102	1100	0,053±0,001	0,095±0,007
21.	β-Fenchol	23,57	1112	1118	-	0,02±0,01
22.	(E)-p-Menth-2-en-1-ol	23,91	1119	1117	0,43±0,01	-
23.	α-Canfolenal	24,19	1124	1122	-	0,015±0,003
24.	Allo-ocimeno	24,40	1129	1128	0,659±0,008	-
25.	trans-Pinocarveol	24,84	1137	1135	-	0,07±0,02
26.	Mentona	25,60	1153	1148	-	0,39±0,02
27.	Amylbenzeno	25,75	1156	1152	-	1,01±0,06
28.	5-pentyl-1,3-ciclohexadiene	25,83	1157	1156	0,181±0,001	-
29.	Pinocarvona	26,04	1162	1160	-	0,009±0,002
30.	Menthan-3-one	26,12	1163	1158	-	0,28±0,05
31.	Mentol	26,53	1172	1167	-	0,494±0,005
32.	Terpinen-4-ol	26,79	1177	1174	0,107±0,001	-
33.	Cryptone	27,20	1185	1183	1,90±0,02	-
34.	α-Terpineol	27,41	1189	1186	0,036±0,001	0,057±0,002
35.	Mirtenol + estragol	27,70	1195	1194	-	0,131±0,005
36.	n-Decanal	28,11	1204	1201	-	0,033±0,003
37.	Pulegona	29,75	1239	1233	-	0,073±0,001
38.	Carvona	29,97	1243	1239	0,051±0,001	0,115±0,002
39.	Geraniol	30,47	1254	1249	0,264±0,006	-

Número	Composto	RT	LRI ^a	LRI ^b	<i>Levisticum officinale</i> – Óleo essencial (%) ^d	
					Folhas	Raiz
40.	p-Menth-1-en-7-al	31,41	1274	1269	-	0,075±0,001
41.	E-Anetol	31,89	1284	1282 ^c	-	0,34±0,01
42.	ρ-Vinil-Guaiacol	33,21	1313	1309	-	1,80±0,01
43.	α-Terpinil acetato	35,01	1354	1346	33,6±0,2	-
44.	Valerofenona	35,07	1356	1359	-	0,96±0,03
45.	Ciclosativene	35,69	1369	1369 ^k	-	0,080±0,007
46.	α-Copaeno	36,04	1378	1374	-	0,066±0,002
47.	Geranil acetato	36,27	1383	1379	0,031±0,006	-
48.	β-Elemene	36,72	1393	1389	0,997±0,004	0,035±0,002
49.	α-Pompene	37,55	1412	1407	-	0,097±0,006
50.	α-Guaieno	38,23	1429	1431	-	0,109±0,006
51.	γ-Elemene	38,51	1436	1434	0,143±0,002	-
52.	Aromadendreno	38,77	1442	1444	-	0,061±0,003
53.	(E)-β-Farneseno	39,40	1457	1454	0,02±0,01	-
54.	α-Acoradieno	39,93	1469	1469	-	0,207±0,009
55.	10-epi-β-Acoradieno	40,24	1477	1474	-	0,37±0,02
56.	Ar-Curcumeno	40,51	1483	1479	-	0,49±0,02
57.	Germacreno-D	40,55	1484	1480	0,037±0,004	-
58.	β-Selineno	40,75	1489	1489	0,081±0,003	0,091±0,005
59.	4-epi-cis-Dihidro agarofurano	40,87	1492	1499	-	0,228±0,01
60.	α-Zingibereno	41,04	1496	1493	-	0,40±0,03
61.	α-Muuroleno	41,31	1503	1500	-	0,28±0,02
62.	Cupareno	41,55	1509	1504	-	1,07±0,07
63.	δ-Cadineno	42,22	1526	1522	-	0,84±0,04
64.	Kessane	42,47	1532	1529	0,024±0,001	2,1±0,1
65.	α-Calacoreno	43,01	1546	1544	-	0,149±0,009
66.	Elemol	43,24	1552	1548	0,057±0,001	-
67.	Elemicina	43,44	1557	1555	-	0,060±0,002
68.	Germacreno B	43,65	1562	1559	0,061±0,001	-
69.	Espatulol	44,41	1581	1577	0,02±0,001	6,3±0,2
70.	Globulol	44,71	1589	1590	-	0,96±0,05
71.	6,6-Dimethyl-cyclooct-4-enone	46,08	1625	1618	-	0,40±0,01

Número	Composto	RT	LRI ^a	LRI ^b	<i>Levisticum officinale</i> – Óleo essencial (%) ^d	
					Folhas	Raiz
72.	10-epi- γ -Eudesmol	46,24	1629	1622	-	0,59 \pm 0,02
73.	1-epi-Cubenol	46,35	1632	1627	-	0,41 \pm 0,02
74.	Hexahidro-3-butiltalida	46,66	1640	1647	-	1,86 \pm 0,08
75.	3-Butiltalida	47,19	1655	1647	0,018 \pm 0,001	6,8 \pm 0,3
76.	Neointermedeol	47,54	1664	1658	0,412 \pm 0,001	-
77.	Z-Butilideneftalida	47,98	1676	1671	0,031 \pm 0,001	29 \pm 2
78.	E-Butilideneftalida	49,59	1721	1717 ^c	0,320 \pm 0,011	8,3 \pm 0,5
79.	Neocnidilide	50,01	1745	1722	-	8,9 \pm 0,7
80.	Z-Ligustilida	50,10	1749	1736	22,2 \pm 0,1	8,5 \pm 0,3
81.	E-Ligustilida	51,49	1808	1796	1,67 \pm 0,01	1,87 \pm 0,09
82.	Z-Termine	52,2	1849	1844	0,027 \pm 0,003	0,26 \pm 0,03
83.	n-Hexadecanol	52,59	1881	1874	-	0,146 \pm 0,007
84.	Metil hexadecanoato	53,17	1927	1921	0,096 \pm 0,009	0,41 \pm 0,05
85.	Metil cis-6-octadecenoato	54,87	2097	1921	-	0,70 \pm 0,1
Total Identificados					99,1 \pm 0,1	88,4 \pm 0,3
Hidrocarbonetos monoterpênicos					37,3 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2
Monoterpenos contendo oxigênio					36,7 \pm 0,3	12 \pm 0,3
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos					0,62 \pm 0,01	5,3 \pm 0,3
Sesquiterpenos contendo oxigênio					0,102 \pm 0,002	3,4 \pm 0,1
Ftalidas					24,26 \pm 0,01	52,2 \pm 2,0
Outros					0,12 \pm 0,01	12,5 \pm 0,8

RT, tempo de retenção, ^a LRI, índice de retenção linear determinado numa coluna de sílica fundida DB-5 MS em relação a uma série de n-alcenos (C7-C40), ^b índice de retenção linear relatado na literatura (Adams, 2017), com exceção daqueles marcados como c, que se refere à NIST 2011, ^d % relativa, resultados apresentados como média \pm DP, n = 3. ^kAsuming, Beauchamp, et al., 2005 (1658), ^cAndriamaharavo, 2014.

No caso das folhas foram identificados 44 compostos diferentes, evidenciando-se a presença de monoterpênicos (73,97%) e ftalidas (24,26%). Já para as raízes, foram identificados 60 compostos diferentes, sendo o grupo das ftalidas (52,2%) o maioritário. Os monoterpênicos (hidrocarbonetos de fórmula química C₁₀H₁₆, formados por duas unidades isopreno, podendo ser cíclicos ou ramificados) são compostos que se encontram

presentes em muitas plantas, particularmente nas que contêm óleos essenciais. Entre os monoterpenos maioritários refira-se o α -terpenil acetato (33,6%) e o *p*-cimeno (20,5%) presentes nas folhas e espatuleno (6,3%) presente na raiz de *Levisticum officinale*.

As ftalidas, de forma molecular $C_8H_6O_2$ são um grupo relativamente pequeno de compostos naturais confinados a várias famílias de plantas e alguns géneros de fungos. Entre as diferentes famílias de plantas para as quais foram realizados vários estudos para caracterizar estes compostos, destaca-se a família Apiaceae (Delgado *et al.*, 2017). No presente trabalho, foram detetadas diferentes ftalidas, destacando-se nas folhas a (*Z*)-ligustilida (22,2%) e a (*Z*)-butilideneftalida nas raízes (29,4%).

A maioria dos trabalhos realizados até à presente data sobre o levístico, incidem sobretudo sobre a composição do óleo essencial extraído de várias estruturas botânicas da planta, o qual apresenta como principais compostos as ftalidas, diversos terpenóides e ácidos voláteis (Gijbels *et al.*, 1981; Gijbels *et al.*, 1982; Cu *et al.*, 1990; Hogg, 2001). Sertel *et al.* (2011) estudou o óleo essencial provenientes das folhas de *Levisticum officinale* cultivado no Reino Unido, o qual apresentou os monoterpenos como principal grupo de constituintes, sendo o α -terpinil acetato o composto mais abundante (48,15%), à semelhança do presente trabalho. Raal (2008) descreveu a composição do óleo essencial de folhas e raízes de *Levisticum officinale* provenientes da Estónia, extraídas por destilação-extração simultânea com hexano, tendo sido também analisadas raízes originárias da França, Bélgica, Holanda e Escócia, cujo óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. Para as amostras de óleo de raiz de *Levisticum officinale* estudadas, os autores descreveram a presença de 48 compostos, sendo os maioritários o β -felandreno (0-48,9%), fenilacetaldéido (0-17,2%), pentilciclohexadieno (0-12,3%), acetato de trans-sabinilo (0-12,1%), α -terpinil acetato (0-26,1%), (*Z*)-3-butilideneftalida (0,8-28,6%), (*Z*)-ligustilida (9,4-70,9%), ácido hexadecenoato de metilo (0-6,1%) e (*E*)-3-butilideneftalida (0,4 a 3,9%). No caso das folhas, os principais constituintes foram α -terpenil acetato (55,8%), (*Z*)-ligustilida (17%) e β -felandreno (11,3%). De referir que, à semelhança do presente trabalho, o teor de (*Z*)-ligustilida no óleo essencial da folha foi superior ao da raiz. Verifica-se ainda que, para além da variação qualitativa e sobretudo quantitativa verificada entre as amostras estudadas por Raal (2008) com diferentes origens, também a amostra estudada neste trabalho (com origem Portuguesa) apresenta diferenças na sua composição quando comparada com os resultados previamente publicados. Tal pode ser devido à influência de fatores que podem afetar a composição química da planta, tais

como fatores geográficos e edafoclimáticos (Mirjalili & Javanmardi, 2012). No mesmo sentido, refira-se o trabalho de Bylaitė *et al.* (1996) que analisou diversas partes botânicas de *Levisticum officinale* cultivado na Lituânia, tendo observado uma variação do teor de (Z)-ligustilida entre 4,4% e 11,7% nas folhas com diferentes tempos de crescimento.

Por último, os estudos disponíveis na literatura têm associado diferentes atividades biológicas a compostos pertencentes ao grupo das ftalidas. Em particular, a ftalida (Z)-ligustilida, presente no óleo essencial quer das folhas quer da raiz de *Levistico officinale*, demonstrou ter ação anti-inflamatória em ensaios *in vivo* realizados em ratos Wistar (Ma & Bai, 2013). Long *et al.* (2013) avaliou a atividade imunomodeladora e atividade antitumoral da ligustilida extraída de *Angelica sinensis*, concluindo que este composto conseguiu estimular o sistema imunitário, aumentando significativamente a fagocitose por parte de macrófagos, a proliferação de linfócitos no baço e a atividade de linfócitos T e células *natural killer* em ratos normais (não portadores de tumores). Su *et al.* (2013) investigou o potencial da ligustilida e de extratos de raiz de *Angelica sinensis*, ricos em ligustilida, em restaurar a expressão de determinados genes, tendo concluído que a modificação epigenética de genes contribui para a explicação de diversos benefícios deste extrato, incluindo o efeito anticancerígeno do extrato e da ligustilida. Com base em resultados prévios que sugeriam que a (Z)-ligustilida pode exercer uma neuroproteção significativa contra danos isquêmicos cerebrais em diversos modelos animais, Zhang *et al.* (2009) avaliaram a atividade antitrombótica da ligustilida e os seus efeitos no tempo de agregação plaquetária e coagulação. Os resultados obtidos sugerem que este composto apresenta atividade antitrombótica, tendo por isso um potencial relevante no tratamento de doenças isquêmicas.

4.2. Propriedades Bioativas

4.2.1 Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante para os extratos da parte aérea e raízes de levístico, apresentam-se nas Tabelas 13 e 14, respetivamente.

Na literatura encontram-se descritos vários ensaios baseados em diferentes mecanismos para a avaliação da capacidade antioxidante de alimentos e compostos químicos. Neste estudo, aplicaram-se cinco métodos distintos: captação de radicais livres (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno, inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). Para a atividade antioxidante, como se pode observar, verificam-se diferenças significativas entre os extratos, tanto para as folhas quanto para as raízes de *Levisticum officinale* (Tabelas 13 e 14), sendo evidente a atividade superior do extrato hidroalcoólico nas folhas da planta e do extrato de hidroalcoólico com resíduo de hexano nas raízes em relação aos outros extratos, visto apresentarem os valores mais baixos de EC₅₀.

Tabela 13. Atividades antioxidante dos extratos obtidos das folhas da planta *Levisticum officinale* (média±DP, n=9).

	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico	teste <i>t</i> -Student <i>p</i> -valor
Atividade antioxidante (EC₅₀; µg/mL)			
DPPH	124±7	119±3	0,335
Poder Redutor	148±1	66±1	<0,001
Inibição da descoloração do β -caroteno	609±36	570±7	<0,001
TBARS	74±5	87±6	0,075
OxHLIA (EC₅₀; µg/mL)			
$\Delta t = 60$ min	29,4±0,6	22,5±0,6	<0,001
$\Delta t = 120$ min	54±1	41±1	<0,001

A atividade antioxidante foi expressa em valores de EC₅₀, o que significa que valores elevados correspondem a baixo poder redutor ou potencial antioxidante. EC₅₀: corresponde à 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 inibição da descoloração do β -carotene), 23 µg/mL (TBARS), 19,6±0,6 µg/mL (OxHLIA $\Delta t = 60$ min) e 65,1±0,7 µg/mL (OxHLIA $\Delta t = 120$ min).

No caso das folhas, foram obtidos melhores resultados com o extrato hidroalcoólico em comparação com o extrato aquoso (com exceção do TBARS), o que pode estar relacionado com o teor elevado de compostos fenólicos deste extrato (Tabela 8),

possivelmente devido a uma melhor solubilidade dos compostos antioxidantes na mistura hidroalcoólica, dado a sua menor polaridade. Ainda no caso das folhas, refira-se contudo que a decocção apresenta também atividade antioxidante interessante, apesar de apresentar valores de EC₅₀ geralmente superiores aos do extrato hidroalcoólico. Desta forma, a utilização do levístico em pratos em que a água de cozedura é consumida, tais como sopas, arroz e estufados, é vantajoso do ponto de vista que trás benefícios para a saúde.

Até à presente data, são escassos os dados disponíveis no que respeita a atividade antioxidante do levístico. Chrpová *et al.* (2010) avaliaram a atividade antioxidante de 13 espécies aromáticas diferentes cultivadas na República Checa e chá verde através do ensaio de captação do radical DPPH, tendo verificado que o levístico foi a amostra que apresentou a menor atividade (34,1 mg equivalente em ácido ascórbico por grama de amostra seca). O mesmo não foi verificado no estudo realizados por Wojdyło *et al.* (2007), no qual a atividade antioxidante de 32 plantas (incluindo plantas aromáticas e plantas medicinais) foi estudada utilizando três metodologias diferentes, ABTS⁺, DPPH e FRAP, sendo os resultados expressos em µg de Trolox por 100 g de massa seca de planta. Os resultados variaram entre 1,75-346 µg Trolox/100 g, 7,34-2021 µg Trolox/100 g e 13,8-2133 µg Trolox/100 g, para os ensaios de ABTS, DPPH e FRAP, respetivamente, tendo o levístico apresentado valores de 18,9±0,4 µg Trolox/100 g (ABTS), 232±5,03 µg Trolox/100 g (DPPH) e 123±2,39 µg Trolox/100 g (FRAP). Apesar de o levístico não ter apresentado valores elevados no que respeita a atividade antioxidante, verificou-se que muitas outras das espécies estudadas apresentaram resultados inferiores (17 espécies no caso do ABTS e FRAP e 23 para DPPH).

No que respeita a atividade antioxidante avaliada em diferentes extratos da raiz (Tabela 14), é notório que o extrato hidroalcoólico preparado com o resíduo da extração com hexano, de uma forma geral obteve melhores resultados em relação aos demais extratos das raízes. Porém, é também de salientar que, para os ensaios de OxHLIA tal não aconteceu, tendo-se obtido melhores resultados para o extrato hidroalcoólico. No caso do extrato de hexano não são apresentados resultados para os ensaios de OxHLIA, pois não se conseguiu realizar a solubilização do extrato, levando a uma separação de fases, mesmo com a constante agitação das microplacas. Tal deve-se possivelmente ao facto do hexano extrair sobretudo compostos de natureza lipofílica.

Tabela 14. Atividades antioxidante dos extratos obtidos da raiz da planta *Levisticum officinale* (média±DP, n=9).

	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico	Extrato de Hexano	Extrato Hidroalcoólico do Resíduo de Hexano
Anti-oxidante (EC₅₀ µg/mL)				
DPPH	101±2c	148±5b	469±3a	58±1d
Poder Redutor	153±2b	153±2b	1665±64a	114±4b
Inibição da descoloração do β-caroteno	59±34b	166±6a	188±9a	57±4b
TBARS	179±11c	510±67b	3252±49a	198±14c
OxHLIA (IC₅₀; µg/mL)				
Δt = 60 min	56,0±0,8b	41,4±0,5c	nd	218±2a
Δt = 120 min	100±1b	65,1±0,7c	nd	343±5a

nd- não detectado. A atividade antioxidante foi expressa em valores de EC₅₀, o que significa que valores elevados correspondem a baixo poder redutor ou potencial antioxidante. EC₅₀: corresponde à 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 inibição da descoloração do β-caroteno), 23 µg/mL (TBARS), 19,6±0,6 µg/mL (OxHLIA Δt = 60 min) e 65,1±0,7 µg/mL (OxHLIA Δt = 120 min).

Num estudo realizado por Shafaghat (2011), é descrito o resultado da avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH para o extrato de hexano preparado com raízes de *Levisticum officinale* de origem Iraniana. O resultado de IC₅₀ foi de 235 µg/mL, o que indica uma atividade superior quando comparado com o mesmo tipo de extrato avaliado no presente trabalho (469 µg/mL). Tal pode relacionar-se com a diferente origem das amostras (sendo que a amostra analisada neste trabalho tem origem Espanhola) que muito provavelmente se reflete na diferente composição dos extratos.

Analisando de forma comparativa os resultados obtidos para a atividade antioxidante das duas partes estudadas da planta (parte aérea e raiz de *Levisticum officinale*), para o mesmo tipo de extrato observa-se que no geral são obtidos melhores resultados par as folhas, verificando-se contudo um melhor desempenho das raízes do que as folhas no ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno.

4.2.2 Atividade citotóxica

No que respeita os resultados da atividade antitumoral face a diversas linhas celulares cancerígenas e hepatotoxicidade em hepatócitos de porco (Tabelas 15 e 16) observa-se que, para o caso da amostra da parte aérea, apenas o extrato hidroalcoólico apresentou resultados positivos para a inibição da linha celular de cancro de fígado, com um resultado de GI₅₀ igual a 314±6 µg/mL. Ambos os extratos das folhas (decoção e hidroalcoólico) não inibiram as células de fígado de porco (células não tumorais), sugerindo que ambos apresentam um baixo potencial de causar danos em células saudáveis (Tabela 15).

Tabela 15. Atividade antitumoral e hepatotoxicidade dos extratos obtidos das folhas de *Levisticum officinale* (média±DP, n=9).

	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico
Atividade anti tumoral (GI₅₀ µg/mL)		
HeLa	>400	>400
NCI H460	>400	>400
MCF7	>400	>400
HepG2	>400	314±6
Hepatotoxicidade (GI₅₀ µg/mL)		
PLP2	>400	>400

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). Elípticas 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).

No caso das raízes (Tabela 16), apenas o extrato de *n*-hexano apresentou resultados significativos face a todas as linhas celulares tumorais testadas. Contudo, observou-se igualmente a inibição de células saudáveis da linha celular PLP2, o que indica que este extrato apresenta hepatotoxicidade. No entanto, refira-se que o valor de GI₅₀ é bastante superior (pelo menos cerca de 2x) para a linha celular PLP2 comparativamente às linhas celulares tumorais (Tabela 16). Assim, seriam necessários estudos adicionais, possivelmente envolvendo o fracionamento e identificação dos compostos ativos, por forma a entender melhor a ação e potencial deste tipo de extrato.

Tabela 16. Atividade antitumoral e hepatotoxicidade dos extratos obtidos das raízes de *Levisticum officinale* (média±DP, n=9).

	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico	Extrato de Hexano	Extrato Hidroalcoólico do Resíduo de Hexano
Atividade Anti tumoral (GI₅₀ µg/mL)				
HeLa	>400	>400	60±2	>400
NCI H460	>400	>400	69±3	>400
MCF7	>400	>400	48±2	>400
Hepg2	>400	>400	67±4	>400
Hepatotoxicidade (GI₅₀ µg/mL)				
PLP2	>400	>400	147±5	>400

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).

Como referido anteriormente, existem estudos que indicam que as ligustilidas possuem efeitos citotóxicos, podendo explicar a atividade verificada para os extratos hidroalcoólico das folhas e extrato n-hexano das raízes. No entanto, apenas o extrato de n-hexano foi analisado por GC-MS, confirmando a presença destes compostos (isômeros (Z) e (E)-ligustilida). Num estudo similar realizado por Abd El-Hamid *et al.* (2018), o óleo essencial de *Levisticum officinale* demonstrou atividade antitumoral contra células HepG2 e MCF7 (a 98% e 95%) na concentração de 100 µg/ml, apresentando fraca atividade a 50 µg/ml e não apresentando atividade em concentrações inferiores. No presente estudo não foi possível avaliar a atividade biológica do óleo essencial, dado os baixos rendimentos obtidos, quer para a folha quer para a raiz. No entanto, refira-se que em ambos os óleos essenciais foi identificada a presença de ligustilidas na análise realizada por GC-MS.

Ressalta-se ainda que os resultados de atividade anti-inflamatória não são apresentados, pois as concentrações dos extratos testadas na linha celular de macrófagos de rato RAW 264,7 não foram efetivas, correspondendo a resultados de GI₅₀ > 400.

4.2.3. Atividade antimicrobiana

Os perigos biológicos, que incluem microrganismos e as suas toxinas, devem ser controlados rigorosamente no âmbito da segurança alimentar visto que o risco associado à sua ingestão pode causar efeitos adversos na saúde do consumidor, podendo inclusivamente levar à morte. Segundo o *Center for Food Safety and Applied Nutrition* e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority*, EFSA) os microrganismos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* estão frequentemente envolvidos em doenças de origem alimentar.

Para a determinação da atividade antimicrobiana, as amostras da parte aérea e da raiz de *Levisticum officinale* foram submetidas a extrações com diferentes solventes, como referido anteriormente. Na Tabela 17 e 18 apresentam-se os resultados face a isolados clínicos Gram-positivo e Gram-negativo.

De um modo geral, constata-se que, para as concentrações testadas, os extratos provenientes das folhas da planta apresentam melhores resultados do que os extratos da raiz, conseguindo inibir o crescimento de todos os microrganismos testados, à exceção do extrato hidroalcoólico face a *Proteus mirabilis*. Para os extratos da raiz, apenas o extrato hidroalcoólico obtido a partir a amostra previamente extraída com n-hexano demonstrou conseguir inibir o crescimento de todos os microrganismos testados, contudo apresentando valores de MIC superiores (20 mg/mL) aos observados nos extratos da folha de levístico (2,5 a 20 mg/mL). Nenhum dos extratos apresentou atividade bactericida face aos microrganismos nas concentrações testadas. De uma forma geral, todos os extratos se mostraram mais eficientes contra as bactérias Gram-positivo, o que pode ser explicado pelo facto deste grupo de microrganismos ter uma parede celular menos complexa comparativamente a bactérias Gram-negativo. De salientar que neste trabalho foram utilizados microrganismos obtidos de isolados clínicos, que frequentemente apresentam maior resistência a antibióticos em comparação com estirpes comerciais.

Em estudos previamente realizados por Shafaghat (2011), foi descrita a atividade antimicrobiana do extrato de hexano proveniente das raízes de *Levisticum officinale*. A atividade antimicrobiana foi avaliada através do ensaio de inoculação à superfície e difusão em disco, sendo os resultados expressos em diâmetro de inibição (mm). Foi possível observar inibição face aos microrganismos *Bacillus subtilis* (19,7), *S. epidermidis*

(18,6), *S. aureus* (16,5) e *E. coli* (13,5). Ebrahimi *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Levisticum officinale* quando administrados juntamente com o antibiótico ciprofloxacina, tendo verificado que, de uma maneira geral, a MIC para o antibiótico é inferior quando na presença de extrato etanólico ou clorofômico de *Levisticum officinale*, verificando-se uma maior sinergia para o extrato etanólico.

Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos da parte aérea da planta *Levisticum officinale*.

	Extrato Aquoso		Extrato Hidroalcoólico		Ampicilina (20 mg/mL)		Imipenemo (1 mg/mL)		Vancomicina (1 mg/mL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Bactérias Gram-negativo										
<i>Escherichia coli</i>	5	>20	10	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	>20	10	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Morganella morganii</i>	5	>20	20	>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	10	>20	>20	>20	0,5	1	nt	nt
Bactérias Gram-positivo										
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,5	>20	10	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5	>20	5	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
MRSA	2,5	>20	10	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	0,25	0,5

nt - Não testado. MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MIC – Concentração mínima inibitória; MBC – Concentração mínima bactericida. Resultados expressos em mg/mL de extrato.

Tabela 18. Atividade antimicrobiana dos extratos (mg/mL) obtidos da raiz da planta *Levisticum officinale*.

	Extrato Aquoso		Extrato Hidroalcoólico		Extrato de Hexano		Extrato Hidroalcoólico do Resíduo de Hexano		Ampicilina (20 mg/mL)		Imipenemo (1 mg/mL)		Vancomicina (1 mg/mL)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Bactérias Gram-negativo														
<i>Escherichia coli</i>	>20	>20	20	>20	20	>20	20	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	20	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Morganella morganii</i>	>20	>20	20	>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	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	>20	20	>20	>20	>20	20	>20	>20	>20	0,5	1	nt	nt
Bactérias Gram-positivo														
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	>20	10	>20	10	>20	10	>20	<0,15	<0,15	nt	Nt	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	>20	10	>20	10	>20	20	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	nt	nt
MRSA	20	>20	10	>20	10	>20	10	>20	<0,15	<0,15	nt	Nt	0,25	0,5

nt - Não testado. MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MIC – Concentração mínima inibitória; MBC – Concentração mínima bactericida. Resultados expressos em mg/mL de extrato.

5. Conclusão

As plantas 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, químicas e bioativas da planta pertencente à família Apiaceae, *Levisticum officinale* W.D.J. Koch, com particular ênfase para a parte frequentemente consumida na culinária, a parte aérea (folhas e caules). Adicionalmente, foi ainda avaliada a composição em compostos bioativos e propriedades biológicas de extratos obtidos da raiz. Em ambos os casos foram adquiridas e estudadas amostras comerciais prontas para consumo.

A caracterização nutricional da amostra de folhas e caules de levístico de origem Portuguesa, incluiu a determinação da humidade, proteínas, lípidos, cinzas, glúcidos e valor energético. Os glúcidos e as proteínas foram os macronutrientes mais abundante na planta, evidenciando um baixo teor em gordura e valor calórico. Foram ainda analisados os açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e o perfil de ácidos gordos. A sacarose foi o açúcar livre mais abundante, foram identificados seis ácidos orgânicos na parte aérea da planta e quatro ácidos orgânicos nas raízes, com a predominância do ácido oxálico para ambas as partes anatômicas. A parte aérea edível apresentou uma predominância de ácidos gordos PUFA, em particular o ácido ómega-3 α -linolénico. Em ambas as partes botânicas estudadas foi detetada a presença dos dois vitâmeros de tocoferol, α e γ .

No que respeita o perfil em compostos fenólicos, foram identificados um total de 7 compostos para a as folhas, sendo o maioritário o ácido 5-*O*-cafeoilquínico no extrato hidroalcoólico e na decocção o 3-*O*-cafeoilquínico. Já para as raízes, foram tentativamente identificados 8 compostos fenólicos, sendo o maioritário o ácido vanílico.

Neste estudo foram identificados 85 compostos diferentes presentes no óleo essencial das duas partes botânicas estudadas da planta, tendo como principais grupos de compostos os monoterpenos e as ftalidas, sendo os primeiros maioritariamente presentes nas folhas e os segundos na raiz. No entanto, a (*Z*)-ligustilida, uma ftalída associada a diferentes propriedades bioativas, foi detetada em quantidade superior nas folhas (22,2%) do que na raiz (5,8%).

No que respeita ao potencial bioativo da planta estudada, ambas as partes anatômicas apresentaram atividade antioxidante nos cinco métodos testados e atividade

antimicrobiana face a diversas bactérias. De uma forma geral, todos os extratos se mostraram mais eficientes contra as bactérias Gram-positivo, contudo, nas concentrações testadas, nenhum dos extratos apresentou atividade bactericida face aos microrganismos utilizados. Para a atividade citotóxica, verificou-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de levístico apresentou atividade citotóxica contra células cancerígenas de fígado, não apresentando efeitos tóxicos contra células hepáticas de porco não cancerígenas (PLP2), sugerindo tratar-se de um extrato potencialmente seguro para utilização humana. Pelo contrário, o extrato hidroalcoólico obtido a partir do resíduo da raiz extraída com hexano, apesar de demonstrar atividade citotóxica contra as linhas cancerígenas testadas, apresentou efeitos inibitórios também para a linha celular PLP2. Futuramente, seria interessante prosseguir o estudo da composição detalhada deste extrato, proceder ao fracionamento e isolamento dos compostos presentes no extrato e avaliar a sua atividade citotóxica face às linhas celulares utilizadas neste trabalho.

No geral, a realização deste trabalho permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização nutricional, química e às propriedades bioativas de uma planta pouco estudada, mas com interesse comercial e utilizada em alguns pratos da culinária Portuguesa, ainda que de forma discreta. Atendendo à sua composição em compostos bioativos, tais como ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferóis, ácidos gordos ω -3 e ligustilida, o uso das folhas e caules de *Levisticum officinale* na dieta humana é de todo aconselhável no âmbito de uma dieta diversificada, sendo fonte de nutrientes e possibilitando efeitos positivos a saúde do consumidor. Adicionalmente, é de acrescentar que, dadas as suas características organolépticas pode ser uma interessante opção como substituto de temperos comerciais, frequentemente usados na culinária.

6. Referências

- Abd El-Hamid , YI Abeer, S. H. (2018). Anti-inflammatory, antioxidant, anti-tumor and physiological studies on *Levisticum officinale*-Koch plant. *Planta Medica*, 75, 4-5.
- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, 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.
- Aćimović, M., Kostadinovic, L., Popovic, S., & Dojcinovic, N. (2015). Apiaceae seeds as functional food. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 60, 237–246.
- Águila, M. B., Ibis, M., Apfel, R., & Mandarim-de-lacerda, C. A. (1997). Comparação Morfológica e Bioquímica entre Ratos Envelhecidos Alimentados com Dieta Hiperlipídica e com Óleo de Canola. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 68, 155–161.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66, 1–9. Retrieved from http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=pt&nrm=iso
- AOAC International (2016). Official Methods of Analysis of AOAC, 20th; George, W.L., Jr., Ed.; AOAC, International: Rockville, MD, USA, 2016.
- Ashwood-Smith MJ, Ceska O, Yeoman A, Kenny PG. (1992). *Photosensitivity from harvesting lovage (Levisticum officinale)*. *Contact Dermatitis*, 26, 356–357.
- Badalamenti, F. In Proceedings of the IFEAT International Conference (2004). The Essential Oils of the Mediterranean Region, Green C (ed.). International Federation of Essential Oil and Aroma Trades (FEAT), London, UK, 77–97.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Barata, A. M., Rocha, F., Lopes, V. R., Bettencourt, E., & Figueiredo, A. C. (2007). Medicinal and Aromatic Plants. *ResarchGate*, (January), 1–46.
- Barreira, J. C. M., Dias, M. I., Zivkovic, J., Stojkovic, D., Sokovic, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Phenolic profiling of Veronica spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments. *Food Chemistry*, 163, 275-283.

- Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT - Food Science and Technology*, *43*, 814–818.
- Barros, L., Duenas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, *132*, 841-848.
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops & Products*, *32*, 572–579.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, 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.
- Barroso, M. F., Ramalhosa, M. J., Alves, R. C., Dias, A., Soares, C. M. D., Oliva-Teles, M. T., & Delerue-Matos, C. (2016). Total antioxidant capacity of plant infusions: Assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods. *Food Control*, *68*, 153–161.
- Beelders, T., de Beer, D., Stander, M. A., & Joubert, E. (2014). Comprehensive Phenolic Profiling of *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. by LC-DAD-MS and -MS/MS Reveals Novel Xanthone and Benzophenone Constituents. *Molecules*, *19*, 11760-11790.
- Blank, I., & Schieberle, P. (1993). Analysis of the seasoning-like flavour substances of a commercial lovage extract (*Levisticum officinale* Koch.). *Flavour and Fragrance Journal*, *8*, 191–195.
- Bogucka-Kocka, A., Smolarz, H. D., & Kocki, J. (2008). Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines. *Fitoterapia*, *79*, 487–497.
- Burchfield, CM, Laws A, Benfante R. (1995). Combined effectes of HDL cholesterol, triglyceride, and total cholesterol concentration on 18-year risk of atherosclerotic disease. *Circulation*, *92*, 1430-6.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*, 223–253.
- Bylaitė, E., Venskutonis, P. R., Legger, A., & Roozen, J. P. (1996). Dynamic Headspace Gas Chromatography of Different Botanical Parts of Lovage (*Levisticum Officinale* Koch.). *Flavour Science*, 66–69.

- Bylaitė, E., Venskutonis, R. P., & Roozen, J. P. (1998). Influence of Harvesting Time on the Composition of Volatile Components in Different Anatomical Parts of Lovage (*Levisticum officinale* Koch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 3735–3740.
- Calbo, A. G., Moretti, C. L., & Henz, G. P. (2007). *Respiração de Frutas e Hortaliças. Comunicado Técnico (Vol. 46)*. Brasília.
- Chamorro, E.R., Silvia, N. Zambón, W. G. M., & Velasco, A. F. S. and G. A. (2008). Evaporators with induction heating and their applications. *Przeegląd Elektrotechniczny*, *84*, 32–35.
- Christensen, L. P., & Brandt, K. (2006). Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*, 683–693.
- Chrpová, D., Kouřimská, L., & Gordon, M. H. (2010). Antioxidant Activity of Selected Phenols and Herbs Used in Diets for Medical Conditions. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*, 317–325.
- 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.
- Cogne, A. L., Queiroz, E., Wolfender, J.-L., Marston, A., Mavi, S., & Hostettmann, K. (2003). On-line identification of unstable catalpol derivatives from *Jamesbrittenia fodina* by LC-MS and LC-NMR (Vol. 14).
- 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.
- Costa, G., Grangeia, H., Figueirinha, A., Figueiredo, I. V., & Batista, M. T. (2016). Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. *Industrial Crops and Products*, *83*, 738–745.
- Cu, J. Q., Pu, F., Shi, Y., Perineau, F., Delmas, M., & Gaset, A. (1990). The chemical composition of lovage headspace and essential oils produced by solvent extraction with various solvents. *Journal of Essential Oil Research*, *2*, 53–59.
- Dandlen, S. Anahi Dandlen, A., A. Sofi a Lima, B., Marta D. Mendes, B., M. Graça Miguel, A., M. Leonor Faleiro, M. João Sousa, D., Luis G. Pedro, B., ... Figueiredo, A. C. (2015). Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Archives of the Balkan Medical Union*, *50*, 613–615.

- 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.
- Daukšas, E., Venskutonis, P. R., & Sivik, B. (1999). Supercritical CO₂ extraction of the main constituents of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) essential oil in model systems and overground botanical parts of the plant. *Journal of Supercritical Fluids*, *15*, 51–62.
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, *5*, 165–180.
- Delgado, G., Del-a, M., Luis, A., & Leo, A. (2017). Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity (Vol. 104).
- 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.
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., & Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*, 1–41.
- Ebrahimi, A., Eshraghi, A., Mahzoonieh, M. R., & Lotfalian, S. (2016). Antibacterial and Antibiotic-Potential Activities of *Levisticum officinale* L. Extracts on Pathogenic Bacteria. *International Journal of Infection Control*, *4*, 2–5.
- Evans, W. C.; Trease and Evans' Pharmacognosy, 14th ed., WB Saunders Company: Londres, 1996, cap. 22
- Farmacopeia Européia 1996. Edição Oficial, Portugal
- Feng, Z., Lu, Y., Wu, X., Zhao, P., Li, J., Peng, B., Zhu, L. (2012). Ligustilide alleviates brain damage and improves cognitive function in rats of chronic cerebral hypoperfusion. *Journal of Ethnopharmacology*, *144*, 313–321.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and fragrance journal*, *23*, 213–226.
- Florão, A. (2006). Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de baccharis, asteraceae. Universidade Federal do Paraná.
- Fotakis, C., Tsigrimani, D., Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Strati, I. F., Makris, C., Zoumpoulakis, P. (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*, *211*, 963–971.

- Garvey, M. I., Rahman, M. M., Gibbons, S., & Piddock, L. J. V. (2011). Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *37*, 145–151.
- Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., & Baerheim Svendsen, A. (1982). Phthalides in the essential oil from roots of *Levisticum officinale* Koch (Umbelliferae). *Pharmaceutisch Weekblad*, *117*, 501–502.
- Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1981). Analysis of phthalides from umbelliferae by combined liquid-solid and gas-liquid chromatography. *Chromatographia*, *14*, 452–454.
- Governo Português. (2017). Estratégia Nacional para a Agricultura Biológica. Diário Da República, (144), 1–62.
- Hedges, L.J, Lister, C.E (2007). Nutritional attributes of allium species. Crop & Food Research Confidential report no. 1814. Christchurch, New Zealand Institute for Crop & Food Research Ltd. p. 44.
- Heidarpour, O., Souri, M. K., & Omidbaigi, R. (2013). Changes in Content and Constituents of Essential Oil in Different Plant Parts of Lovage (*Levisticum officinale* Koch. Cv. Budakalasz) Cultivated in Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *16*, 318–322.
- Hogg, C. (2001). Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from Lovage (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch). *The International Journal of Aromatherapy*, *11*, 9.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 1–24.
- Jalali-Heravi, M., Parastar, H., Sereshti, H. (2010). Towards obtaining more information from gas chromatography–mass spectrometric data of essential oils: an overview of mean field independent component analysis. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 4850–4861.
- Justesen, U., & Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of avonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, *73*, 245–25.
- Kettenring, M.M., Geeganage, M.V., (2010). Aroma-vital cuisine. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), Handbook of Essential Oils. *Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp. 863–880.

- Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 13–39.
- Lapeere, H., Boone, B., Verhaeghe, E., Ongenae, K., & Lambert, J. (2013). Contact dermatitis caused by lovage (*Levisticum officinalis*) essential oil. *Contact Dermatitis*, 69, 181–182.
- Leonard, S. W., & Traber, M. G. (2019). *Chapter 4 - Methods for assessment of Vitamin E. Laboratory Assessment of Vitamin Status. Elsevier Inc.*
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C.L., Pereira, C., Abreu, R.M.V., Calhelha, R.C., Alves, M.J., Barros, L., Bredol, M., Ferreira, I.C.F.R., (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503.
- Long, R., Yang, F., Du, J. R., Qian, Z. M., Wang, C. Y., & Chen, C. (2012). Effects of ligustilide on tumor growth and immune function in institute of cancer research mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11, 421–428.
- Lopez-Reyes JG, Spadaro D, Prella A, Garibaldi A, Gullino M.L. (2013). Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *Journal of Food Protection*, 76, 631–639.
- Lupe, F. A. (2007). Estudo Da Composição Química De Óleos Essenciais De Plantas Aromáticas Da Amazônia, 120.
- Ma, Z., & Bai, L. (2013). Anti-inflammatory Effects of Z-Ligustilide Nanoemulsion. *Inflammation*, 36, 294–299.
- Materska, M. (2010). Evaluation of the lipophilicity and stability of phenolic compounds in herbal extracts. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 9, 61–69.
- Menaker, M. Kravets, M. Koel, A. Orav. (2004). *Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs Comptes Rendus Chimie*, 7, pp. 629-633
- Mirjalili, M. H., & Javanmardi, J. (2012). Lovage. *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*, 2, 371–390.
- Moradalizadeh, M., Akhgar, M. R., Rajaei, P., Mountains, H., Branch, K., Branch, K., Medicine, T. (2012). OF *Levisticum officinale* Growing wild in Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 876–877.

- Najda, A. B., Baj, T., Wolski, T., & Dyduch, J. (2003). Determination of quantitative composition of polyphenolic compounds occur in anatomically different parts of *Levisticum officinale* Koch. *Electronic Journal of Olish Agricultural Universities*, 6–12.
- Nunes, I. S. (2007). Biotransformação e regeneração em culturas de raízes transgênicas de *Levisticum officinale*: efeito no crescimento e produção de voláteis. Biotransformação e regeneração em culturas de raízes transgênicas de *Levisticum officinale*: efeito no crescimento. Universidade de Lisboa.
- 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, 1–18.
- Olaru, O. T., Nițulescu, G. M., Orțan, A., & Dinu-Pîrvu, C. E. (2015). Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Profile of *Anthriscus sylvestris* as an Alternative Source for Anticancer Lignans. *Molecules*, 20, 15003-15022.
- Oliveira, D. C. R., & Soares, E. K. B. (2012). Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de produtos desidratados obtidos a partir de matérias-primas amplamente consumidas na Amazônia. *Scientia Plena*, 8, 1–7.
- Panthama, N., Kanokmedhakul, S., & Kanokmedhakul, K. (2009). Galloyl and hexahydroxydiphenoyl esters of phenylpropanoid glucosides, phenylpropanoids and phenylpropanoid glucosides from rhizome of *Balanophora fungosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57, 1352-1355.
- Paszkiwicz, M., Orlita, A., Dziabas, A., Gołe, M., Łojkowska, E., Stepnowski, P., Malin, E. (2008). Simplex Optimized LC Analysis of Plant Coumarins and Furanocoumarins. *Chromatographia*, 67, 653–657.
- Perineau, F., Ganou, L., & Vilarem, G. (1992). Studying production of lovage essential oils in a hydrodistillation pilot unit equipped with a cohobation system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 53, 165–171.
- Perini, L., Stevanato, B., Cyl, S., Eliete, J., Visentainer, L., Dalalio, O., Estadual, U. (2010). *Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune* (Vol. 23).
- Pimentel, C., Francki, V., & Gollücke, A. (2005). Alimentos funcionais - introdução às principais substâncias bioativa em alimentos (1st ed.). varela.
- Polunin, M., Robbins, C. (1993). A farmácia natural – guia de medicamentos naturais – Enciclopédia Ilustrada. Editora Civilização. Alemanha.

- Qi, H., Zhao, J., Han, Y., Lau, A. S. Y., & Rong, J. (2012). Z-ligustilide potentiates the cytotoxicity of dopamine in rat dopaminergic PC12 cells. *Neurotoxicity Research*, 22, 345–354.
- Raal, A., Arak, E., Orav, A., Kailas, T., & Mürisepp, M. (2008). Composition of the Essential Oil of *Levisticum officinale* W. D. J. Koch from Some European Countries. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 37–41.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., & Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 75–82.
- Ríos, J.-L. (2015). Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In V. R. Preedy (Ed.), *Essential oils in food preservation: flavor and safety* (1st ed., p. 930). Elsevier.
- Samiee, K., Akhgar, M. R., Rustaiyan, A., & Masoudi, S. (2006). Composition of the volatiles of *Ferulago carduchorum* boiss. Et hausskn. and *Levisticum officinale* koch. obtained by hydrodistillation and extraction. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 19–22.
- Santos, A. A. dos. (2013). Avaliação da bioatividade e caracterização química de uma espécie medicinal de uso tópico: *Juglans regia* L. Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- 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.
- Sayed-ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). Industrial Crops & Products The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops & Products*, 109, 661–671.
- Schinkovitz, M. Stavri, S. Gibbons, F. Bucar. (2008), Antimycobacterial polyacteylenes from *Levisticum officinale* Phytother. *Phytotherapy Research*, 22, 681-684.
- Sell, C. (2010). Chemistry of essential oils. In: Bas,er KH, Buchbauer G, editors. *Handbook of essential oils. Science, technology, and applications*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 121–50.
- Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., & Efferth, T. (2011). Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb, *Levisticum officinale*, against UMSCC1 head and neck squamous carcinoma cells. *Anticancer Research*, 31, 185–191.

- Shafaghat, A. (2011). Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of the hexane extract from root and seed of *Levisticum persicum* Freyn and Bornm. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5, 5127–5131.
- Shah, D., Sajjad, N., Ali, R., & Nazir, N. (2019). Sugar Regulates Plant Growth and Development Under *In Vitro* Conditions. *Plant Signaling Molecules*. Elsevier Inc.
- Sharma, P., & Singh, R. P. (2013). Evaluation of Antioxidant Activity in Foods with Special Reference to TEAC Method. *American Journal of Food Technology*, 10, 221–247.
- Silva JAB. (2014). *Regulação da biossíntese da vitamina E em tomateiro (Solanum lycopersicum L.): da diversidade natural à manipulação do metabolismo*. São Paulo: Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo.
- Silva, E. D., & 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.
- Silva, J. A. B. (2015). *Regulação da biossíntese da vitamina E em tomateiro (Solanum lycopersicum L.): da diversidade natural à manipulação do metabolismo*. Universidade de São Paulo.
- Smith, M., Ceska, O., Yeoman, A., & Kenny, P. G. (1992). Photosensitivity from harvesting lovage (*Levisticum officinale*).
- Soares, S. E. (2001). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71–81. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/phenolic-compounds-biological-activity/regulatory-mechanism-of-skeletal-muscle-glucose-transport-by-phenolic-acids>
- Sonwa, M.M., 2000. Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*. Ph.D. degree, University of Hamburg, Germany.
- Spinola, V., & Castilho, P. C. (2017). Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (*in vitro*). *Phytochemistry*, 143, 29-35.

- Spinola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, *173*, 14-30.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, *30*, 3268–3295.
- Stuart, M. (1989) *The Encyclopedia of Herbs and Herbalism*. Macdonald & Co., London.
- Su, Z. Y., Khor, T. O., Shu, L., Lee, J. H., Saw, C. L. L., Wu, T. Y., Kong, A. N. T. (2013). Epigenetic reactivation of Nrf2 in murine prostate cancer TRAMP C1 cells by natural phytochemicals Z-ligustilide and radix angelica sinensis via promoter CpG demethylation. *Chemical Research in Toxicology*, *26*, 477–485.
- Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 531–537.
- Taylor, P., & Namiki, M. (1990). Antioxidants / Antimutagens in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *29*, 273–300.
- Teixeira, A. M. R., Lima, I. K. C., Xavier, M. R., Pereira, R. L. S., Gonçalves, B. G., de Sena, D. M., Toledo, T. A. (2018). Vibrational spectroscopy study of essential oils from *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng and *Vanillosmopsis arborea* Baker. *Vibrational Spectroscopy*, *98*, 22–29.
- Tuncturk, M., & Özgökce, F. (2015). Chemical composition of some Apiaceae plants commonly used in herby cheese in Eastern Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *39*, 55–62.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*, 40–53.
- Vallarino, J. G., & Osorio, S. (2019). *Organic Acids. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc.
- Venskutonis, R. P. (n.d.). *Essential Oils in food preservation, flavor and safety*. (V. R. Preedy, Ed.) (1st ed.). London- UK: Elsevier.
- Villavicencio, A. L. C. H., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Santos-buelga, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). 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.

- Wojdyło, A., Oszmianowski, R. C. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, *105*, 940–949.
- Zealand, H. N. (2007). *Nutritional attributes of herbs* (Vol. 1).
- Zhang, L., Du, J.-R., Wang, J., Wang, J., Yu, D.-K., Chen, Y.-S., ... Wang, C.-Y. (2009). Z-ligustilide extracted from *Radix Angelica Sinensis* decreased platelet aggregation induced by ADP ex vivo and arterio-venous shunt thrombosis in vivo in rats. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, *129*, 855–859.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, (September 2000).
- Złotek, U., Szymanowska, U., Pecio, Ł., Kozachok, S., & Jakubczyk, A. (2019). Antioxidative and Potentially Anti-inflammatory Activity of Phenolics from Lovage Leaves *Levisticum officinale* Koch Elicited with Jasmonic Acid and Yeast Extract. *Molecules*, *24*, 1441.
- Zorbel, A. M., & Brown, S. A. (1991). Dermatits-inducing psoralens on the surfaces of seven medicinal plant species, *10*, 223–231.