

# ESTUDOS DE PROPAGAÇÃO IN VITRO, CARACTERIZAÇÃO E VALORIZAÇÃO DE CARQUEJA (*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk)

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA ALIMENTAR

Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho

**ORIENTADORA:** Doutora Margarida Gomes Moldão Martins (ISA-ULisboa)

**COORIENTADORES:** Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves (IPCB-ESA)

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves (Professor Auxiliar, ISA-ULisboa)

## Júri

**Presidente:** Reitor da Universidade de Lisboa

**Vogais:** Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora Catedrática aposentada,  
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves, Professor Coordenador,  
Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco

Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar com agregação,  
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação,  
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Doutora Isabel Maria Rôla Coelho, Professora Auxiliar,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu, Investigadora Auxiliar,  
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Lisboa  
2015



Este trabalho foi parcialmente financiado pelo programa PROTEC 2 (Programa especial de apoio à formação avançada de docentes do ensino superior politécnico).



***À memória de minha mãe***



## AGRADECIMENTOS

A terminar esta tese e havendo espaço para umas simples palavras, embora não consiga converter em escrita o que me vai na alma, queria agradecer com a mais sincera e profunda gratidão à Professora Doutora Margarida Moldão-Martins, minha orientadora, ao Professor Doutor José Carlos Gonçalves e ao Professor Doutor Vítor Alves, meus co-orientadores. Agradeço por todo o incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, por todas as sugestões, pela disponibilidade e pelo seu elevado profissionalismo.

Ao Instituto Politécnico de Castelo Branco pelo apoio à formação dos docentes e à Escola Superior Agrária de Castelo Branco pelas condições proporcionadas à realização de parte experimental do trabalho.

Ao CERNAS (Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade) pelo apoio financeiro aos investigadores através dos projetos PEst-OE/AGR/UI0681/2011 e PEst-OE/AGR/UI0681/2014.

Ao LEAF (Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem) pelas condições proporcionadas para a execução de parte do trabalho experimental, designadamente na obtenção os extratos aquosos, na avaliação da atividade antioxidante e na aplicação de revestimentos comestíveis bioativos em conservação pós-colheita de cereja.

Ao Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco por ter permitido a realização da liofilização das amostras.

Pela ajuda no trabalho de campo, nos inquéritos de Enobotânica, na manutenção das culturas *in vitro* e pela companhia, agradeço à Eng<sup>a</sup> Graça Diogo, à Eng<sup>a</sup> Fátima Seco e ao Eng<sup>o</sup> Paulo Rodrigues. Uma palavra de apreço em especial à Eng<sup>a</sup> Graça Diogo pelo trabalho que continua a desenvolver na micropropagação da espécie em estudo.

À Mestre Catarina Pimenta e Mestre Cláudia Cordeiro pela ajuda na otimização do processo de extração.

Ao painel de provadores que me ajudou na avaliação sensorial das cerejas com revestimentos comestíveis.

Aos Técnicos dos Laboratórios de Microbiologia, Solos, Nutrição, Química e SIG/CAD da ESACB, agradeço a colaboração prestada em partes do trabalho experimental.

À minha colega Cristina Pintado agradeço a sua contribuição e sugestões na realização dos ensaios de atividade antimicrobiana.

À minha colega Cristina Canavarro pelo constante incentivo e pela ajuda prestada em parte do tratamento de dados.

À minha colega Isabel Figueiredo agradeço a revisão do Abstract.

À Professora Doutora Rosário Bronze, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela ajuda prestada na identificação de compostos fenólicos.

Ao Professor Doutor Manuel Coimbra, da Universidade de Aveiro e ao professor Doutor Vítor Martins do Instituto Politécnico de Bragança, pela colaboração na análise da componente glucídica.

À Professora Doutora Ana Ramos, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela sua contribuição na determinação do peso molecular médio dos polissacáridos solúveis.

Aos meus filhos, Beatriz e Alfredo, e ao Paulo, meu marido, agradeço todo o apoio, compreensão e paciência ao longo destes anos. Espero que o empenho e esforço que coloquei neste trabalho possam servir de estímulo aos meus filhos!

À minha irmã pela constante motivação e pelos bons momentos que me proporcionou aquando das deslocações a Lisboa! Ao meu pai pelo apoio familiar.

Por último, agradeço a todos quantos, aqui não mencionados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E como me sinto um pouco albicastrense termino com um grande BEM-HAJAM!



## RESUMO

Pretendeu-se com este trabalho desenvolver metodologias para a micropropagação e extração de compostos com propriedades bioativas de carqueja (*Pterospartum tridentatum* L.), silvestre e micropropagada, como forma de valorização desta espécie. A micropropagação revelou-se eficaz para propagação em larga escala, com taxas de multiplicação de 1,6 a 43,9; número de rebentos de 1,5 a 10,4 e enraizamento superior a 96,7%. O rendimento de extração aquosa variou de 10,5 a 19,4 e de 12,2 a 30,1% (m/m) para plantas silvestres e explantes micropropagados, respetivamente. Os extratos aquosos apresentaram elevados teores de fenóis totais, 203,4 a 369,2 e 104,1 a 121,3 mg eq ácido gálico g<sup>-1</sup> m.s, e atividade antioxidante FRAP: 256 a 856 e 160 a 260 mmolFe<sup>2+</sup>100g<sup>-1</sup> m.s; DPPH: 1433 a 1551 e 1503 a 1509 mM Trolox 100g<sup>-1</sup> m.s para plantas silvestres e micropropagadas, respetivamente. Os extratos não revelaram atividade antifúngica, tendo no entanto evidenciado inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. A aplicação de revestimentos de quitosano bioativos com incorporação de extratos permitiu melhorar a capacidade de conservação pós colheita em cereja. Os resultados obtidos permitem propor estas metodologias para obtenção de extratos com propriedades bioativas a partir de material micropropagado, sem a exploração indiscriminada dos recursos naturais.

**Palavras-chave:** *Pterospartum tridentatum*, etnobotânica, micropropagação, extratos aquosos, atividade biológica

**TITLE:** *In vitro* propagation studies, characterization and valorisation of gorse

## **ABSTRACT**

The aim of this work was to develop methodologies for micropropagation and extraction of bioactive compounds from both wild gorse (*Pterospartum tridentatum* L.) and micropropagated gorse explants, as a means of valorisation of this species.

Micropropagation was very effective on large scale propagation, having multiplication rates ranging from 1.6 to 43.9; number of shoots ranging from 1.5 to 10.4 and rooting above 96.7%.

The extraction yield of aqueous extraction varied from 10.5 to 19.4 and 12.2 to 30.1% (w/w) for wild gorse and micropropagated gorse explants, respectively. Aqueous extracts showed high levels of total phenols, from 203.4 to 369.2 and 104.1 to 121.3 mg gallic acid eq g<sup>-1</sup> ms, and FRAP antioxidant activity: 256-856 and 160-260 mmolFe<sup>2+</sup> 100g<sup>-1</sup> ms; DPPH: 1433-1551 and 1503-1509 mM Trolox 100g<sup>-1</sup> ms for wild gorse and micropropagated gorse explants, respectively.

Extracts showed no antifungal activity. However, these extracts showed inhibition of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Chitosan bioactive coatings with gorse extracts improved cherry postharvest preservation ability. The results allow to propose these methodologies to obtain extracts with bioactive properties from micropropagated material, without depleting natural resources.

**Keywords:** *Pterospartum tridentatum*, ethnobotany, micropropagation, aqueous extracts, biological activity.

# Índice

---

Agradecimentos	Pág. vii
Resumo	ix
Abstract	x
Índice	xi
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xviii
 Introdução, objetivos e estrutura da tese	 3
Outputs da dissertação	5
 1. Enquadramento teórico	 11
1.1. Plantas como fonte de compostos bioativos	11
1.1.1. Atividade biológica	12
1.1.2. Utilização e legislação	17
1.1.3. Fontes de antioxidantes naturais	19
1.2. Produção e comercialização de PAM	22
1.3. A carqueja ( <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk)	23
1.3.1. Caracterização botânica	23
1.3.2. Utilizações e estudos em carqueja	25
1.4. Porquê a propagação <i>in vitro</i> ?	27
1.5. Revestimentos comestíveis na conservação pós-colheita de frutos	30
1.5.1. Definição e funções dos revestimentos comestíveis	30
1.5.2. O quitosano como material para revestimentos comestíveis	31
1.5.3. Revestimentos comestíveis como veículos de compostos bioativos	32
1.5.4. Revestimentos comestíveis em hortofrutícolas	35
1.6. Referências bibliográficas	36
 2. Estudo etnobotânico de carqueja	 47
Objetivo	47
2.1. Considerações gerais sobre etnobotânica	47
2.2. Recolha de informação etnobotânica	50
2.3. Utilização da carqueja	57
2.4. Materiais e métodos	59
2.4.1. Área de estudo e recolha da informação	59
2.4.2. Tratamento dos resultados	60
2.5. Resultados e discussão	61
2.5.1. Caracterização dos informantes	61
2.5.2. Conhecimento tradicional e utilização da carqueja	64
2.6. Considerações intercalares	73
2.7. Referências bibliográficas	74
 3. Material vegetal em estudo	 79
3.1. Locais e épocas de colheita do material vegetal	79
3.2. Caracterização climática dos locais de colheita	82
3.3. Caracterização da componente mineral do material vegetal	84
3.4. Referências bibliográficas	86
 4. Micropropagação de <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk.	 89
Objetivo	89

4.1. Introdução	89
4.2. Materiais e métodos	99
4.2.1. Material vegetal	99
4.2.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	100
4.2.3. Fase de multiplicação	101
4.2.4. Enraizamento e aclimatização	102
4.2.5. Análise estatística dos resultados	104
4.3. Resultados e discussão	105
4.3.1. Estabelecimento <i>in vitro</i>	105
4.3.2. Fase de multiplicação	108
4.3.3. Fases de enraizamento e aclimatização	117
4.4. Considerações intercalares	124
4.5. Referências bibliográficas	125
5. Obtenção e caracterização de extratos aquosos de carqueja	131
Objetivo	131
5.1. Extração de compostos bioativos	131
5.2. Caracterização dos extratos	136
5.2.1. Quantificação do teor de fenóis totais e perfil fenólico	136
5.2.2. Determinação da capacidade antioxidante	139
5.2.3. Atividade antimicrobiana	143
5.3. Materiais e métodos	146
5.3.1. Obtenção de extratos aquosos	146
5.3.2. Rendimento de extração	147
5.3.3. Teor de fenóis totais e perfil fenólico	147
5.3.4. Caracterização da componente glucídica	148
5.3.4.1. Determinação do peso molecular médio	148
5.3.4.2. Composição química	149
5.3.5. Caracterização da humidade e da componente mineral	149
5.3.6. Atividade antioxidante	150
5.3.6.1. Método DPPH	150
5.3.6.2. Método FRAP	151
5.3.7. Atividade antimicrobiana	152
5.3.8. Análise estatística dos resultados	154
5.4. Resultados e discussão	155
5.4.1. Rendimento de extração	155
5.4.2. Teor de fenóis totais e perfil fenólico	157
5.4.3. Caracterização da componente glucídica	167
5.4.3.1. Peso molecular médio	167
5.4.3.2. Composição em monossacáridos	168
5.4.4. Caracterização da componente mineral	171
5.4.5. Atividade antioxidante	172
5.4.5.1. Método DPPH	172
5.4.5.2. Método FRAP	174
5.4.6. Atividade antimicrobiana	178
5.5. Considerações intercalares	180
5.6. Referências bibliográficas	181
6. Revestimentos comestíveis bioativos na conservação pós-colheita de cereja	189
Objetivo	189
6.1. A cereja	189
6.1.1. Caracterização botânica	189
6.1.2. Produção nacional	190
6.1.3. Conservação pós-colheita	191
6.2. Revestimentos comestíveis	193

6.3. Materiais e métodos	195
6.3.1. Preparação das soluções de revestimento	195
6.3.2. Caracterização dos revestimentos sob a forma de película	196
6.3.2.1. Preparação das películas	196
6.3.2.2. Propriedades óticas	196
6.3.2.3. Morfologia	197
6.3.3. Aplicação de revestimentos em cereja	197
6.3.4. Estudo de conservação	198
6.3.4.1. Controlo analítico dos frutos	198
6.3.4.2. Avaliação sensorial	201
6.4. Resultados e discussão	202
6.4.1. Caracterização dos revestimentos sob a forma de película	202
6.4.1.1. Propriedades óticas das películas obtidas	202
6.4.1.2. Morfologia	202
6.4.2. Estudo de conservação	204
6.4.2.1. Controlo físico-químico dos frutos	205
6.4.2.2. Avaliação sensorial	214
6.5. Considerações intercalares	219
6.6. Referências bibliográficas	220
7. Conclusões gerais e perspectivas futuras	225
Anexos	229

# Índice de Figuras

---

	Pág.
<b>Introdução, objetivos e estrutura da tese</b>	
Figura 1. Estrutura da tese.	4
<b>1. Enquadramento teórico</b>	
Figura 1.1. Inflorescência de carqueja da localização Orvalho.	24
Figura 1.2. Inflorescência de carqueja da localização Malcata.	24
Figura 1.3. Inflorescência de carqueja da localização Gardunha.	24
<b>2. Estudo etnobotânico de carqueja</b>	
Figura 2.1. Sexo dos informantes.	61
Figura 2.2. Idade média dos informantes para cada género.	61
Figura 2.3. Idade máxima e mínima dos informantes em cada um dos sexos.	61
Figura 2.4. Escalões etários dos informantes.	62
Figura 2.5. Escolaridade dos informantes.	63
Figura 2.6. Atividade/ocupação desempenhada pelos informantes.	64
Figura 2.7. Meio pelo qual os informantes conheceram a planta.	65
Figura 2.8. Zonas de colheita da espécie referida pelos informantes.	66
Figura 2.9. Época do ano em que o informante realiza a colheita.	66
Figura 2.10. Parte da carqueja utilizada pelos informantes.	67
Figura 2.11. Modo de conservação de carqueja por parte dos informantes.	67
Figura 2.12. Área de aplicação da carqueja pelos informantes.	68
Figura 2.13. Usos medicinais da carqueja referidos pelos informantes.	69
Figura 2.14. Modo de preparação da carqueja para fins medicinais.	71
Figura 2.15. Frequência de utilização da carqueja por parte dos informantes.	72
<b>3. Material vegetal em estudo</b>	
Figura 3.1. Locais de colheita do material vegetal no distrito de Castelo Branco.	79
Figura 3.2. Zona de colheita na serra da Gardunha.	80
Figura 3.3. Zona de colheita na serra da Malcata.	80
Figura 3.4. Zona de colheita no Orvalho.	80
Figura 3.5. Tipo de solo para cada local de colheita.	81
Figura 3.6. Precipitação média anual nos locais de colheita do material vegetal.	83
Figura 3.7. Temperatura média anual nos locais de colheita do material vegetal.	84
<b>4. Micropropagação de <i>Pterospartum tridentatum</i></b>	
Figura 4.1. Material vegetal de <i>P. tridentatum</i> colhido no campo. (A) Malcata, (B) Orvalho, (C) Gardunha.	99
Figura 4.2. Plantas silvestres de <i>P. tridentatum</i> envasadas (A) e pormenor de rebentos jovens desenvolvido em condições laboratoriais (seta) (B).	100
Figura 4.3. Rebentos de <i>P. tridentatum</i> no processo de desinfeção com hipoclorito de sódio a baixa temperatura.	101
Figura 4.4. Imersão basal dos rebentos de <i>P. tridentatum</i> da Serra da Malcata em	

auxina para indução radicular.	103
Figura 4.5. Percentagem de explantes viáveis utilizando bicloreto de mercúrio como desinfetante.	105
Figura 4.6. Percentagem de explantes viáveis utilizando hipoclorito de sódio 1:3 durante 10 minutos.	106
Figura 4.7. Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>P. tridentatum</i> . (A) Gardunha, (B) Orvalho, (C) Malcata.	106
Figura 4.8. Resultados obtidos após o primeiro subcultivo para cada uma das populações em estudo.	107
Figura 4.9. Explantes de <i>P. tridentatum</i> ao fim de 2 meses de estabelecimento. (A) Orvalho; (B) Gardunha; (C) Malcata.	107
Figura 4.10. Aspeto das culturas de <i>P. tridentatum</i> ao fim de 3 meses de estabelecimento. (A) Orvalho, (B) Gardunha, (C) Malcata.	108
Figura 4.11. Percentagem de explantes viáveis, infetados e mortos no ensaio de multiplicação de <i>P. tridentatum</i> para o local Gardunha.	108
Figura 4.12. Percentagem de explantes viáveis, infetados e mortos no ensaio de multiplicação de <i>P. tridentatum</i> para o local Orvalho.	109
Figura 4.13. Percentagem de explantes viáveis, infetados e mortos no ensaio de multiplicação de <i>P. tridentatum</i> para o local Malcata.	109
Figura 4.14. Número de rebentos formados em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.	112
Figura 4.15. Comprimento médio do maior rebento em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.	113
Figura 4.16. Comprimento médio do menor rebento em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.	113
Figura 4.17. Número de segmentos em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.	114
Figura 4.18. Rebentos de <i>P. tridentatum</i> do local de recolha Orvalho no final da fase de multiplicação, que estiveram no meio de cultura MS suplementado com $1 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP.	114
Figura 4.19. Rebentos de <i>P. tridentatum</i> do local de recolha Gardunha no final da fase de multiplicação, que estiveram no meio de cultura MS suplementado com $1 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB.	115
Figura 4.20. Rebentos de <i>P. tridentatum</i> do local de recolha Malcata no final da fase de multiplicação, que estiveram no meio de cultura MS suplementado com $1 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIB.	115
Figura 4.21. Aspeto dos rebentos de <i>P. tridentatum</i> de origem Malcata no final da fase de enraizamento.	118
Figura 4.22. Aspeto de rebentos de <i>P. tridentatum</i> no final da fase de enraizamento após indução em AIB $2 \text{ gL}^{-1}$ durante 60 (A) e 30 seg (B). (O traço na vertical representa 2 cm).	119
Figura 4.23. Aspeto de rebentos de <i>P. tridentatum</i> no final da fase de enraizamento após indução em AIB $1 \text{ gL}^{-1}$ durante 60 (A) e 30 seg (B). (O traço na vertical representa 2 cm).	119
Figura 4.24. Aspeto de rebentos de <i>P. tridentatum</i> no final da fase de enraizamento após indução em AIB $0,5 \text{ gL}^{-1}$ durante 60 (A) e 30 seg (B). (O traço na vertical representa 2 cm).	120
Figura 4.25. Pormenor do sistema radicular desenvolvido em condições <i>ex vitro</i> de rebentos de <i>P. tridentatum</i> após indução em AIB $2 \text{ gL}^{-1}$ durante 60 segundos. (O traço na vertical representa 2 cm).	120
Figura 4.26. Aspeto de rebentos de <i>P. tridentatum</i> durante a fase de aclimatização.	121

## 5. Obtenção e caracterização dos extratos aquosos de carqueja

Figura 5.1. Aparelho de Clevenger utilizado nas extrações aquosas.	146
Figura 5.2. Rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado.	155
Figura 5.3. Rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º ano de avaliação.	156
Figura 5.4. Rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.	156
Figura 5.5. Teor de fenóis totais (mg equiv. ácido gálico/g m.s.) para o material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado.	158
Figura 5.6. Teor de fenóis totais (mg equiv. ácido gálico/g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º ano de avaliação.	159
Figura 5.7. Teor de fenóis totais (mg equiv. ácido gálico/g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.	159
Figura 5.8. Perfil fenólico (a 280 nm) do extrato aquoso de caules de carqueja recolhidos na serra da Gardunha na época da floração.	162
Figura 5.9. Perfil fenólico (a 280 nm) do extrato aquoso de flor de carqueja recolhida na Malcata.	163
Figura 5.10. Comparação de perfis cromatográficos (a 280 nm) dos extratos de plantas silvestres das duas origens em estudo nos diferentes estádios vegetativos e das plantas micropropagadas.	166
Figura 5.11. Massa total de monossacáridos de extratos de plantas silvestres da Malcata e da Gardunha em diferentes fases do ciclo vegetativo bem como de plantas micropropagadas.	169
Figura 5.12. Atividade antioxidante pelo método DPPH (mM Trolox/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado.	172
Figura 5.13. Atividade antioxidante pelo método DPPH (mM Trolox/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º ano de avaliação.	173
Figura 5.14. Atividade antioxidante pelo método DPPH (mM Trolox/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.	173
Figura 5.15. Atividade antioxidante pelo método FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado.	175
Figura 5.16. Atividade antioxidante pelo método FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º de avaliação.	175
Figura 5.17. Atividade antioxidante pelo método FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.	176
Figura 5.18. Halos de inibição obtidos para <i>Bacillus subtilis</i> na presença do extrato de flor da Malcata (A) e Gardunha (B).	179



## **6. Revestimentos comestíveis bioativos na conservação pós-colheita de cereja**

Figura 6.1. Imagens da superfície das películas obtidas por microscopia eletrônica de varrimento, com uma ampliação de 1000x (1: R, 2: RC; 3: RCE).	203
Figura 6.2. Imagens da secção dos cortes das películas obtidas por microscopia eletrônica de varrimento, com uma ampliação de 700x (1: R, 2: RC; 3: RCE).	204
Figura 6.3. Perda de massa (%) das amostras de cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	205
Figura 6.4. Firmeza (N) dos frutos com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	207
Figura 6.5. Cor dos frutos: parâmetro $h^a$ da cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	208
Figura 6.6. Cor: parâmetro $C^*$ da cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	208
Figura 6.7. Cor: parâmetro $L^*$ da cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	209
Figura 6.8. Diferença total de cor da cereja com e sem revestimento comestível, ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	210
Figura 6.9. Teor de sólidos solúveis (Grau Brix) da cereja com e sem revestimento comestível, ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	211
Figura 6.10. pH da cereja com e sem revestimento comestível, ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.	211
Figura 6.11. Frutos infetados com bolores visíveis ao fim de 7 dias de conservação a 4°C.	212
Figura 6.12. Atividade antioxidante das cerejas no final do período de armazenamento a 4 °C.	214
Figura 6.13. Avaliação sensorial das cerejas ao 1º dia de armazenamento a 4 °C.	215
Figura 6.14. Avaliação sensorial das cerejas ao 4º dia de armazenamento a 4 °C.	216
Figura 6.15. Avaliação sensorial das cerejas ao 7º dia de armazenamento a 4 °C.	216
Figura 6.16. Avaliação sensorial das cerejas ao 11º dia de armazenamento a 4 °C.	217
Figura 6.17. Avaliação sensorial das cerejas ao 13º dia de armazenamento a 4 °C.	217
Figura 6.18. Apreciação global e intenção de compra em cada uma das datas de avaliação.	219

# Índice de Tabelas

---

	Pág.
<b>1. Enquadramento teórico</b>	
Tabela 1.1. Trabalhos realizados em plantas como fonte de compostos bioativos.	21
Tabela 1.1. (Continuação). Trabalhos realizados em plantas como fonte de compostos bioativos.	22
Tabela 1.2. Extratos naturais de plantas usados como aditivos em revestimentos comestíveis.	34
<b>2. Estudo etnobotânico de carqueja</b>	
Tabela 2.1. Plantas utilizadas para misturar com a carqueja.	72
<b>3. Locais de colheita de carqueja e sua caracterização</b>	
Tabela 3.1. Coordenadas geográficas e altitude dos locais de colheita do material vegetal.	79
Tabela 3.2. Precipitação e temperaturas médias para os anos 2011 a 2013.	82
Tabela 3.3. Humidade e composição mineral (na matéria seca) de carqueja silvestre das três origens e fases do ciclo vegetativo e carqueja micropropagada.	85
<b>4. Micropropagação de <i>Pterospartum tridentatum</i></b>	
Tabela 4.1. Meios de cultura utilizados em fase de multiplicação.	102
Tabela 4.2. Concentração de AIB e tempos de exposição para indução radicular.	103
Tabela 4.3. Parâmetros da fase de multiplicação para os 3 locais de origem de <i>P. tridentatum</i> .	110
Tabela 4.4. Parâmetros da fase de multiplicação para as diferentes combinações de meio de cultura e suplementos de reguladores de crescimento de <i>P. tridentatum</i> .	111
Tabela 4.5. Parâmetros da fase de enraizamento para as diferentes concentrações de AIB e tempos de exposição para indução radicular de <i>P. tridentatum</i> .	118
<b>5. Obtenção e caracterização dos extratos aquosos de carqueja</b>	
Tabela 5.1. Siglas utilizadas na identificação dos extratos.	147
Tabela 5.2. Meios de cultura utilizados para o crescimento dos microrganismos.	153
Tabela 5.3. Identificação de compostos no extrato de caules e folhas na época de floração da planta silvestre de origem Gardunha.	164
Tabela 5.4. Identificação de compostos no extrato da flor da planta silvestre de origem Malcata.	164
Tabela 5.5. Compostos fenólicos identificados nos extratos das plantas silvestres e micropropagadas das origens Gardunha e Malcata.	165
Tabela 5.6. Peso molecular médio em peso ( $M_w$ ) e polidispersão ( $PD = M_w / M_n$ ) das folhas e caules na época de repouso e na época de floração para as plantas silvestres de origem Gardunha e Malcata.	168
Tabela 5.7. Massa de monossacarídeos em mg/g de amostra (média de duas	

réplicas).	169
Tabela 5.8. Percentagens molares dos monossacarídeos (média de duas réplicas).	170
Tabela 5.9. Composição mineral de extratos de carqueja micropropagada e silvestre.	171
Tabela 5.10. Concentrações do extrato de carqueja, das origens Malcata e Gardunha em que se verifica inibição do microrganismo utilizando o método 1.	179
 <b>6. Revestimentos comestíveis bioativos na conservação pós-colheita de cereja</b>	
Tabela 6.1. Produção de cereja em Portugal Continental (por NUTS II).	190
Tabela 6.2. Soluções de revestimento aplicadas em cereja.	197
Tabela 6.3. Diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre as cartolinas de cor e as películas sobre as cartolinas.	202
Tabela 6.4. Unidades formadoras de colónias por grama de produto (UFC/g) obtidas ao 7º e 22º dia do ensaio de conservação a 4 °C.	213



---

## ***Introdução, objetivos e estrutura da tese***

---



## Introdução, objetivos e estrutura da tese

---

As plantas aromáticas e medicinais (PAM) são um universo complexo e vasto, abrangendo uma elevada quantidade de espécies, com múltiplas utilizações. As PAM são utilizadas principalmente pela indústria farmacêutica, química, cosmética ou alimentar e podem ser utilizadas diretamente ou transformadas, das formas mais simples às mais elaboradas.

A utilização das PAM prende-se com propriedades antioxidantes devidas a compostos fenólicos (Oboh *et al.*, 2008; Bahramikia *et al.*, 2009), propriedades anti-mutagénica e anti-cancerígena (Kampa *et al.*, 2004), cardioprotetora (Caccetta *et al.*, 2000), atividade anti-inflamatória (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2006) e atividade antimicrobiana (Hayouni *et al.*, 2008, Stanojević *et al.*, 2010).

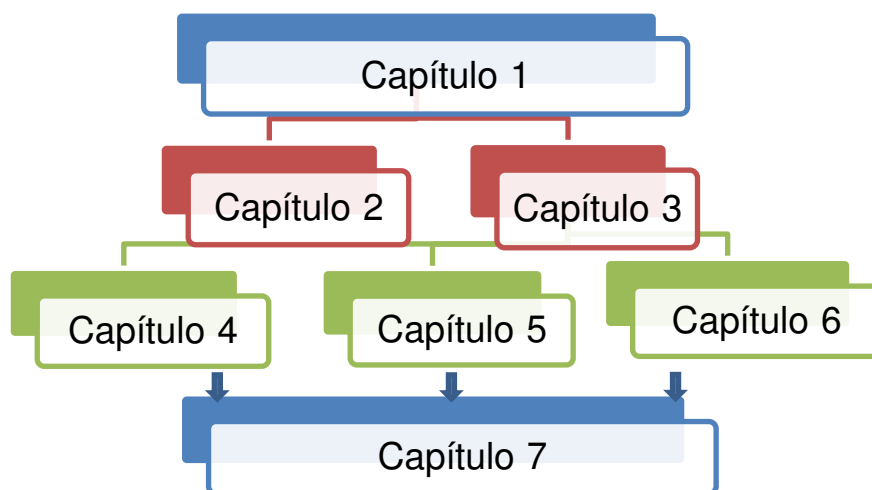
A atividade antimicrobiana associada à atividade antioxidante dos óleos essenciais ou outros extratos de PAM, utilizados diretamente ou incorporados em revestimentos comestíveis, pode permitir uma melhoria na conservação pós-colheita de frutos. Neste domínio a investigação sobre compostos naturais com atividade biológica reveste-se de grande interesse, pois alguns dos compostos anteriormente homologados deixaram de o ser recentemente, pelo que se assiste a uma forte carência de produtos para prolongar o período de vida útil de frutos no pós-colheita. Acresce ainda que muitos desses compostos para além de contribuírem para uma melhor conservação de frutos podem conduzir a um aumento de bioatividade dos mesmos.

Em Portugal, a zona da Cova da Beira possui um enorme potencial para produção de frutos frescos, em especial a cereja, em épocas em que a produção em muitos países europeus não consegue satisfazer a procura existente. Com a possibilidade de exportação, e sabendo que a cereja é um fruto altamente perecível torna-se necessário o controlo de doenças pós-colheita, nomeadamente as provocadas por fungos. Algumas alternativas aos fungicidas sintéticos estão a ser investigadas para aplicação em cerejas, utilizando compostos naturais de origem vegetal.

Constituiu objetivo principal da presente Dissertação de Doutoramento a caracterização da espécie *Pterospartum tridentatum* L. Willk, muito disseminada na região da Beira Interior e o estudo da sua propagação *in vitro* de modo a assegurar a manutenção/preservação do património vegetal natural. Para tal impuseram-se os seguintes objetivos específicos:

- Recolher informação etnobotânica existente sobre a carqueja de modo a perceber qual o seu interesse no meio envolvente e o porquê da sua tradicional utilização;
- Estudar a propagação *in vitro*;
- Caracterizar os extratos aquosos obtidos da planta silvestre em diferentes fases do ciclo vegetativo e diferentes locais de colheita bem como do material vegetal micropropagado, no que respeita a:
  - ✓ Rendimento de extração
  - ✓ Teor de fenóis totais e perfil fenólico
  - ✓ Caracterização da componente glucídica
  - ✓ Componente mineral
  - ✓ Atividade antioxidante
  - ✓ Atividade antimicrobiana
- Estudar o impacto da incorporação dos extratos em revestimentos comestíveis para prolongar o período de vida útil pós-colheita de cereja.

Atendendo aos objetivos mencionados anteriormente, a tese está estruturada em 7 capítulos, articulados da seguinte forma (Fig. 1.):



**Figura 1.** Estrutura da tese.

- **Capítulo 1** – Enquadramento teórico sobre os principais vetores da tese, a saber:
  - (i) plantas aromáticas e medicinais como fonte de compostos com atividade bioativa importante sob o ponto de vista tecnológico e de saúde e bem-estar do



consumidor; (ii) especial referência à carqueja; (iii) importância da propagação *in vitro*; (iv) revestimentos comestíveis na conservação pós-colheita de frutos;

- **Capítulo 2** – Estudo etnobotânico;
- **Capítulo 3** – Caracterização: (i) dos locais de colheita; (ii) épocas de colheita; (iii) componente mineral do material vegetal;
- **Capítulo 4** – Micropropagação da espécie – fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento;
- **Capítulo 5** – Obtenção dos extratos aquosos de carqueja e caracterização no que respeita o rendimento de extração, teor de fenóis totais e perfil fenólico, caracterização da componente glucídica; componente mineral; atividade antioxidante e atividade antimicrobiana;
- **Capítulo 6** – Estudo do impacto da incorporação de extratos de carqueja em revestimentos comestíveis na conservação de cereja;
- **Capítulo 7** – Conclusões gerais e perspectivas futuras.

## Outputs da dissertação

O trabalho desta tese já foi publicado em revistas internacionais e apresentado em encontros internacionais e nacionais.

### Publicações em revistas internacionais

Diogo, M.G., Seco, M.F., Moldão-Martins, M., Alves, V., Coelho, M.T., Gonçalves, J.C. and Canavarro, M.C. (2013). Micropropagation of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk – Multiplication Phase. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 990, 391-396.  
[http://www.actahort.org/books/990/990\\_49.htm](http://www.actahort.org/books/990/990_49.htm)

Maria Teresa Coelho, José Carlos Gonçalves, Vítor Alves, Margarida Moldão-Martins (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Science*, 1, 1454 -1458. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.215

### Aceite para publicação “Journal of Food Science and Technology” (em revisão pelos autores)

Bojana Balanč, Ana Kalušević, Ivana Kostić, Maria Teresa Coelho, Verica Djordjević, Vítor Alves, Isabel Sousa, Margarida Moldão-Martins, Vesna Rakić, Viktor Nedović & Branko Bugarski. Calcium-alginate-inulin microbeads as carriers for aqueous carqueja extract.

## Em preparação

- Coelho, M.T., Diogo, M.G., Alves, V., Moldão-Martins, M. & Gonçalves, J.C. Micropropagated shoots of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. as a source of bioactive compounds. (a submeter a Journal of Plant Research).
- Coelho, M.T., Gonçalves, J.C.; Alves, V. & Moldão-Martins, M. Bioactive edible coatings with *Pterospartum tridentatum* extracts for cherries postharvest preservation (*Prunus avium* L.). (a submeter a Postharvest Biology and Technology).
- Coelho, M.T., Gonçalves, J.C.; Moldão-Martins, M & Alves, V. Antimicrobial and antioxidant activities of *Pterospartum tridentatum* extracts (a submeter a Food Chemistry).
- Coelho, M.T., Diogo, M.G., Alves, V., Moldão-Martins, M. & Gonçalves, J.C. An ethnobotanical study of *Pterospartum tridentatum* in Beira Interior region. (a submeter a Journal of Ethnofarmacology).

## Participação em congressos e reuniões internacionais

### Apresentações orais

- Coelho, M.T., Diogo, M.G., Martins, V.R., Coimbra, M.A., Alves, V.D., Gonçalves, J.C. & Moldão-Martins, M. (2013) A comparative study of phenolic content, sugar composition and antioxidant activity of aqueous extracts of micropropagated shoots and wild plants of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. 8th International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. *Abstract Book*, p. 85. Portugal.
- Coelho, M. T., Pimenta, A.C., Gonçalves, J. C., Alves, V. & Moldão-Martins, M. (2012). Natural extracts from *Pterospartum tridentatum* at different vegetative stages: extraction yield, phenolic content and antioxidant activity. *Proceedings of 6th Central European Congress On Food*, 24-28. Serbia.

### Apresentações em poster

- Teresa Coelho, Adriana Godinho, Margarida Moldão-Martins & Vítor D. Alves (2015). *Bioactive multicomponent edible coatings for the preservation of post-harvest cherries*. 3rd International Symposium, International Meeting on Packaging Material / Bioproduct Interactions (MATBIM 2015), Spain.
- Coelho, M. T., Gonçalves, J. C., Diogo, M.G., Canavarro, M.C., Moldão-Martins, M., Alves, V. & Seco, M.F. (2012) Micropropagation of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk – Multiplication Phase. Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone. *Abstract Book*, p. 136. Belgium.
- Bojana Isailović, Ana Kalušević, Nataša Žuržul, Maria Teresa Coelho, Verica Đorđević, Vítor D. Alves, Isabel Sousa, Margarida Moldão-Martins, Branko Bugarski & Viktor Nedović. (2012). Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. *Proceedings of 6th Central European Congress On Food*, 1075-1081. Serbia.

Maria Teresa Coelho, José Carlos Gonçalves, Vítor Alves & Margarida Moldão-Martins (2011). Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. 11th International Congress on Engineering and Food. *Congress Proceedings*, Vol III, 2061-2062. Greece.

## **Participação em congressos e reuniões nacionais**

### **Apresentações orais**

Adriana Godinho, Teresa Coelho, Sara Silva, Bernardo Ribeiro, Margarida Moldão-Martins & Vítor D. Alves (2014). Post-harvest preservation of cherries using bioactive edible coatings. 12º Encontro de Química dos Alimentos. *Abstract Book*, 59. Lisboa.

### **Apresentações em poster**

Maria Teresa Coelho, Graça Diogo, Vítor R. Martins, Manuel A. Coimbra, Vítor D. Alves, José Carlos Gonçalves & Margarida Moldão-Martins (2014). Sugar composition, phenolic content and antioxidant activity of *P. tridentatum* aqueous extracts: micropropagated shots vs wild plants. 12º Encontro de Química dos Alimentos. *Abstract Book*, 45. Lisboa.

Maria Teresa Coelho, Catarina Pimenta, José Carlos Gonçalves, Vítor Alves & Margarida Moldão-Martins (2012). Extractos aquosos de *Pterospartum tridentatum* L.: teor de compostos fenólicos e actividade antioxidante. 11º Encontro de Química dos Alimentos. Instituto Politécnico de Bragança.

## **Referências bibliográficas**

Bahramikia, S., Ardestani, A. & Yazdanparast, R. (2009). Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chemistry*, 115, 37–42.

Caccetta, R.A.A., Croft, K.D., Beilin, L.J. & Puddey, I.B. (2000). Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 67–74.

Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., Mandic, A.I. & Canadanovic, V.M. (2006). Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 667–673.

Hayouni, E.A., Bouix, M., Abedrabba, M., Leveau, J.Y. & Hamdi, M. (2008). Mechanism of action of *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Gaertu) Sm. essential oil on six LAB strains as assessed by multiparametric flow cytometry and automated microtiterbased assay. *Food Chemistry*, 111, 707–718.

Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A. & Hetzoglou, A. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, 6, 63–74.

- Oboh, G., Raddatz, H. & Henle, T. (2008). Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. *Journal of Science and Food Agriculture*, 88, 2486–2492.
- Stanojević, D., Comić, L.J., Stefanović, O. & Solujić-Sukdolak, S. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8, 109–115.

***Enquadramento teórico***

---



# 1. Enquadramento teórico

---

## 1.1. Plantas como fonte de compostos bioativos

Todas as plantas sintetizam inúmeros metabolitos secundários que não estão diretamente envolvidos no metabolismo da planta, mas que têm funções associadas à sobrevivência da mesma (Joseph *et al.*, 2009). Os sistemas vegetais quando expostos a um tipo de stress abiótico reforçam a atividade de defesa através da biossíntese de substâncias protetoras (Barka, 2001). Estes compostos bioativos naturais são denominados “fitoquímicos” ou “fitonutrientes” e são estes compostos orgânicos biologicamente ativos que conferem a cor, o sabor, o aroma e a proteção contra danos nas plantas e têm um papel importante no organismo humano na proteção contra o *stress* oxidativo, através de mecanismos que reduzem o risco de doenças crónicas (Brody *et al.*, 2008).

A extração de compostos farmacologicamente ativos (ácidos orgânicos, alcaloides, glúcidos, esteróis, etc.) teve o seu início em finais do século XVII e tem vindo a aumentar com o desenvolvimento dos métodos extrativos e a sistemática prospeção farmacológica que se tem vindo a fazer em plantas principalmente de floras tropicais. Tem sido importante a descoberta de compostos existentes nas plantas que, por possuírem estruturas desconhecidas para os químicos, lhes têm servido de modelo para o desenvolvimento de fármacos sintéticos com novas possibilidades terapêuticas (Cunha & Roque, 2009).

O valor das plantas medicinais está pois relacionado com os seus componentes fitoquímicos, metabolitos secundários, tais como os óleos essenciais e os compostos fenólicos (Mohammedi & Atik, 2011). Os óleos essenciais, compostos voláteis naturais caracterizados por um forte odor (Bakkali *et al.*, 2008) são extraídos de várias plantas aromáticas geralmente localizadas em países de clima temperado a quente como países tropicais e mediterrânicos, onde representam uma parte importante da farmacopeia tradicional.

Estes compostos produzidos pelas plantas podem ser sintetizados por todos os seus órgãos desde flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008). Os extratos obtidos podem variar em quantidade, qualidade e, normalmente, na composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e fase do ciclo vegetativo (Angioni *et al.*, 2006).

Uma elevada proporção de flavonoides são heterósidos hidrossolúveis e são consumidos diariamente na nossa dieta, encontrando-se em frutas, legumes, sementes,

flores, assim como na cerveja, vinho, chá verde, chá preto, soja e nos extratos das plantas, como é o caso do extrato de ginkgo, cardo-mariano, pirliteiro, melissa, etc. Os flavonoides são moléculas de baixo peso molecular que se encontram largamente distribuídas no reino vegetal, estando presentes em toda a parte aérea das plantas, formando um vasto grupo de metabolitos secundários com atividades biológicas muito diversas. Todos têm por base a estrutura da flavona (2-fenil-benzopirona) e dependendo das suas estruturas químicas assim possuem diferentes atividades farmacológicas (Cunha & Roque, 2009). Muitas das plantas medicinais incluem nos seus extratos um variado número de flavonoides e nas últimas duas décadas a farmacognosia tem validado alguns deles.

### 1.1.1. Atividade biológica

Algumas evidências sugerem que a ação biológica dos compostos bioativos de origem vegetal está relacionada com a sua atividade antioxidante (Ghasemzadeh *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos são os principais contribuintes para a capacidade antioxidante dos produtos vegetais frescos (Wang *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2002). Estes, para além de antioxidantes naturais (Oboh *et al.*, 2008; Bahramikia *et al.*, 2009) possuem também propriedades anti-mutagénica e anticancerígena (Kampa *et al.*, 2004), cardioprotetora, atividade anti-inflamatória (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2006) e atividade antimicrobiana (Stanojević *et al.*, 2010).

Em humanos, o *stress* oxidativo resultante de radicais livres contribui para mais de uma centena de doenças, incluindo a aterosclerose, artrite, isquemia com lesão de diversos tecidos, lesões no sistema nervoso central, gastrite e cancro (Pourmorad *et al.*, 2006). Os extratos aquosos de plantas silvestres, sob a forma de infusões ou como decocção, têm sido utilizados desde a antiguidade no combate a doenças humanas e de animais (Kaufman *et al.*, 2006). Pinela *et al.* (2011) referem que as infusões medicinais e decocções são largamente utilizadas para problemas respiratórios, gastrointestinais e cutâneos bem como para controlo de diabetes e distúrbios do sistema metabólico, tais como colesterol e gota. Nos últimos tempos, a medicina moderna está cada vez mais focada em utilizar princípios ativos de origem vegetal. A valorização dos extratos de plantas que contêm os metabolitos secundários destas, tradicionalmente usados pela população é devido ao interesse pelo seu potencial como fonte de antioxidantes naturais e de outros compostos biologicamente ativos (Celiktaş *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial ainda continue a utilizar as plantas medicinais em necessidades primárias de saúde (WHO, 2011).

Os antioxidantes podem ser definidos como moléculas que protegem um alvo biológico do dano oxidativo e que podem ser classificados em dois grandes grupos:



enzimático e não enzimático. Alguns destes antioxidantes são produzidos endogenamente (enzimas, moléculas de baixo peso molecular e cofatores enzimáticos) e muitos dos antioxidantes não-enzimáticos são obtidos através das fontes alimentares. Os antioxidantes enzimáticos constituem o primeiro nível de defesa contra os radicais livres, ocorrem naturalmente no organismo e não são obtidos através da alimentação. Esses radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um elétron desemparelhado na sua orbital mais externa, sendo moléculas extremamente instáveis para poderem emparelhar o seu elétron. Assim, tanto podem ganhar um elétron (comportando-se como oxidantes) como ceder um elétron (comportando-se como redutores). Quando um radical livre reage com uma molécula normal, desencadeia-se imediatamente uma reação em cascata, originando um número de novos radicais livres que só terminam na presença de substâncias antioxidantes.

Os antioxidantes obtidos de fontes alimentares são divididos em vários grupos, sendo o grupo dos polifenóis o maior. Outras classes de antioxidantes provenientes da alimentação englobam as vitaminas, carotenoides, compostos organossulfurados e os minerais. Os compostos fenólicos incluem os ácidos fenólicos, os taninos, os estilbenos, as cumarinas e os flavonoides (Halliwell, 2011).

Da definição genérica, consideram-se compostos fenólicos todas as estruturas que possuem pelo menos um núcleo benzénico com um ou mais hidroxilos, livres ou fazendo parte de ésteres, éteres ou heterósidos. No entanto, esta definição possui inúmeras exceções por muitos compostos com um ou mais anéis benzénicos serem incluídos em grupos fitoquímicos bem distintos (alcaloides, terpenos, etc.) muitas vezes com origem biossintética diferente. É aceite como definição de compostos fenólicos todos aqueles que não sendo azotados têm um ciclo ou ciclos aromáticos e são principalmente derivados do metabolismo do ácido siquímico e/ou de um poliacetato. Destacam-se pela sua atividade farmacológica, os ácidos fenólicos, os compostos cumarínicos, os flavonoides, os taninos e os compostos quinónicos. Os compostos fenólicos pela acidez do hidroxilo fenólico possuem uma enorme reatividade para além da sua capacidade de formação de novas moléculas pela união oxidativa (ligação homolítica) e pela facilidade com que o núcleo aromático se oxida (Cunha & Roque, 2009).

Os polifenóis e particularmente flavonoides são largamente apreciados pelo seu potencial efeito benéfico na saúde, como antioxidantes ou pela atividade anticancerígena (Alim *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2009).

Os polifenóis, no geral, são conhecidos pela sua capacidade de prevenir a degradação oxidativa dos ácidos gordos e fornecer uma defesa contra o stress oxidativo causado por agentes oxidantes e radicais livres (Slusarczyk *et al.*, 2009). No entanto, o mecanismo de absorção digestiva e a biodisponibilidade dos flavonoides não estão ainda completamente explicados. Mesmo assim, os estudos epidemiológicos têm demonstrado os

benefícios da ingestão de flavonoides de origem natural na prevenção de determinadas doenças. Alguns trabalhos têm demonstrado a atividade dos flavonoides, devido a uma ligação a recetores específicos, que no caso das flavonas lhes atribui atividade ansiolítica, depressora do sistema nervoso central. Também se sabe que podem agir de modo a complexar o ferro, suprimindo assim um dos processos catalisadores da oxidação da vitamina C e dos lípidos.

As isoflavonas, do grupo dos isoflavonoides são os constituintes mais representativos usados com atividade “*estrogénio-like*”, sendo a genisteína e a daidzeína os mais estudados e comercializados sob a forma de 7-*O*-glucósidos. O aumento da esperança de vida das mulheres pode levar ao aumento de doenças associadas a alterações hormonais e prevê-se que em 2020, 20% da população total sejam mulheres com mais de 65 anos e que metade da vida ativa da mulher seja passada em período pós-menopausa. Assim sendo, poderá ser importante a terapêutica hormonal de substituição, quer recorrendo às moléculas de síntese química quer às moléculas com atividade “*estrogénio-like*”, merecendo a devida atenção da comunidade científica e da comunidade farmacêutica e médica, de modo a colmatar o mal-estar e as patologias induzidas pela baixa de estrogénios na mulher após a menopausa (Cunha & Roque, 2009).

No caso dos compostos fenólicos, para além da sua função antioxidante, apresentam também outras propriedades biológicas, nomeadamente propriedades anti-histamínica, anti-inflamatória, antibacteriana e antiviral (Perron & Brumaghim, 2009).

Aos compostos fenólicos são também atribuídas outras atividades, destacando-se:

- Atividade antiperoxidativa a nível das membranas celulares do fígado;
- De entre os compostos fenólicos, os flavonoides são relativamente pouco tóxicos para o homem e induzem o *interferon* (atividade antiviral), inibem a atividade da tirosina quinase dos produtos oncogénicos e inibem a síntese do DNA nas células tumorais, inibindo assim a proliferação celular anormal;
- Atividade antidiarreica;
- Protetores solares;
- Atividade estrogénica de algumas isoflavonas;
- Atividade “*benzodiazepina-like*” de flavonas derivadas da luteolina que interagem com os respetivos GABA<sub>A</sub> (Cunha & Roque, 2009).

A produção endógena de radicais livres deveria ser contrabalançada pelos sistemas de defesa, no entanto, numerosas situações podem desencadear o aparecimento de um excesso de radicais livres, os quais podem ultrapassar a capacidade protetora dos agentes antioxidantes, resultando num desequilíbrio entre a sua produção e a sua inativação.

Para fazer face ao aumento de radicais livres no nosso organismo existem os sistemas de defesa antioxidantes e de reparação. O “stress oxidativo” resulta da perturbação do equilíbrio entre a produção de radicais livres e metabolitos reativos - os denominados oxidantes ou espécies reativas de oxigénio (*ROS*), provocando efeitos deletérios nas biomoléculas e nas células, com impacto ao nível do organismo. A maior parte das *ROS* são produzidas ao nível celular, na cadeia respiratória mitocondrial. Durante as reações metabólicas endógenas, as células aeróbicas produzem *ROS*, como o anião superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ) e peróxidos orgânicos como produtos normais da redução da molécula de oxigénio. Quando as condições são de hipoxia, a cadeia respiratória também produz óxido nítrico (ON), que por sua vez gera espécies reativas de azoto (*RNS*). As *RNS* levam à formação de outras espécies reativas como aldeídos-malodialdeídos, induzindo a peroxidação lipídica.

Os radicais livres também podem ter ação sobre os polissacáridos (despolimerização do ácido hialurónico), proteínas (modificações químicas dos aminoácidos cruciais para as funções enzimáticas, fragmentação das cadeias peptídicas), ácidos nucleicos (alterações cromossómicas), etc. A modificação destas moléculas pode aumentar o risco de mutagénese. Aquando da exposição a um ambiente de *stress*, as *ROS* são geradas durante longos períodos de tempo, o que significa que o dano que ocorre ao nível da estrutura celular e funcional pode levar a mutações somáticas e transformações neoplásicas. De facto, o início e progressão do cancro estão ligados ao *stress* oxidativo, pelo aumento das mutações do ADN, que implicam instabilidade genómica e proliferação celular (Reuter *et al.*, 2010).

Segundo Cunha e Roque (2009) os principais fatores determinantes no aparecimento dos radicais livres são: exposição cumulativa às radiações solares; intoxicação com determinados produtos químicos ou medicamentosos; peroxidação ou reoxigenação intensa em determinados tecidos privados de oxigénio; processos inflamatórios; obesidade; nutrição deficiente; stress; hábitos tabágicos e alcoolismo.

Os radicais livres ativos, em conjunto com outros fatores são responsáveis pelo envelhecimento celular e podem, em situações de desequilíbrio biológico extremos, serem responsáveis pela morte.

Os lípidos membranares também são um alvo privilegiado para os radicais livres levando à sua “peroxidação”.

Na falta de sistemas de defesa, as lesões poderão surgir provocadas pelo ataque de coenzimas, neurotransmissores e macromoléculas – ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, glúcidos, com prejuízo das respetivas funções e das estruturas que constituem. Muitos investigadores estão convencidos de que os efeitos acumulados dos radicais livres de espécies reativas de oxigénio têm a maior importância no aparecimento de doenças tão

diversas como o cancro, a artrite reumatoide, a aterosclerose, isquemia cardiovascular e a doença de Parkinson.

No decorrer da atividade metabólica normal também há formação de radicais livres, existindo mesmo células especializadas na sua produção. Em particular, os radicais oxigenados ativos desempenham um papel importante nas reações anti-inflamatórias, carcinogénese, aterosclerose, isquemia cerebral e cardíaca, lesões do trato gastrointestinal e envelhecimento.

Resumidamente, segundo Pokorný & Trojáková (2001) os antioxidantes para além de captarem radicais livres apresentam a capacidade de inibir ou retardar a oxidação por mecanismos não relacionados com a captação de radicais livres. Estes mecanismos incluem a sua união a metais, captação de oxigénio, conversão de hidroperóxidos em espécies não radicais, absorção da radiação UV e desativação de singletos de oxigénio. Normalmente, neste caso, só possuem atividade antioxidante na presença de um segundo componente minoritário, o que se pode verificar no caso de agentes sequestradores, tal como o ácido cítrico que só é efetivo na presença de iões metálicos e agentes redutores, e como o ácido ascórbico que é mais efetivo na presença de tocoferóis ou outros antioxidantes primários.

É evidente a importância de combater os radicais livres e sabe-se que muitas plantas aromáticas e medicinais são ricas em compostos fenólicos e por esse motivo poderão ser uma potencial fonte de antioxidantes e produtos inibidores de oxidação dos lípidos.

Existe atualmente, um grande interesse no potencial que os fitoquímicos parecem ter na melhoria da função cognitiva, nomeadamente na memória e na aprendizagem, ao exercer poder antioxidante e atividade anti-inflamatória e redução da neurodegeneração. Existem estudos (Joseph *et al.*, 2009) que indicam que alimentos ricos em fitoquímicos como os frutos vermelhos e os espinafres são efetivos em reduzir os défices associados ao envelhecimento relacionados com a memória espacial e a função motora. Em conjunto com a atividade antioxidante a anti-inflamatória no cérebro, os polifenóis têm vindo, também, a ser associados a um aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro, auxiliando na reversão da atrofia neuronal (Gomez-Pinilla *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante associada aos constituintes fenólicos em geral está amplamente disseminada, revestindo-se de crucial importância o caso dos flavonoides pela sua estrutura química. Daí advém o interesse em compreender os mecanismos e descobrir substâncias que os possam regular e constituir uma terapia destas patologias. O interesse pelo estudo dos antioxidantes tem vindo a crescer dado o seu potencial como profiláticos e agentes terapêuticos em doenças causadas por radicais livres.

O efeito quimiopreventivo de polifenóis tem sido frequentemente associado à sua atividade antioxidante. Segunda Pietta (2000) a quercetina é um antioxidante muito eficaz e

parece ser ativo na prevenção de diversas doenças, tais como cancro, doenças cardiovasculares (Yoshizumi *et al.*, 2001) e transtornos neurodegenerativos (Schroeter *et al.*, 2001).

Viuda-Martos *et al.* (2009) confirmam que os flavonoides exibem uma ampla gama de atividades biológicas, tais como agentes antibacterianos, antivirais, anti-inflamatórios, antialérgicos e com ação vasodilatadora para além de inibirem a peroxidação dos lípidos, a agregação de plaquetas, a fragilidade capilar e a atividade de sistemas enzimáticos.

No trabalho de Paulo *et al.* (2008) foi avaliada a atividade da isoquercetina em ratos e os autores sugerem que a mesma pode ser uma molécula vantajosa no tratamento antidiabético pós-prandial (a seguir a uma refeição).

O número de trabalhos de investigação que visam caracterizar e conhecer a bioacessibilidade e biodisponibilidade dos antioxidantes no organismo tem vindo a aumentar, indo para além dos estudos epidemiológicos que mostram a associação entre doença e consumo de alimentos ricos em antioxidantes (Williamson & Manach, 2005; Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Existem vários fatores que podem interferir na bioacessibilidade (quantidade de um nutriente ingerido e que está disponível para absorção) e biodisponibilidade dos antioxidantes: matriz alimentar, interações químicas e porção de antioxidantes que é digerida, absorvida e utilizada no metabolismo normal (Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

### **1.1.2. Utilização e legislação**

Os alimentos são importantes como fonte de antioxidantes, mas adicionalmente, numerosos antioxidantes sintéticos têm sido desenvolvidos e alguns deles têm sido utilizados como exemplo, em aditivos alimentares, suplementos alimentares e medicamentos. Dos antioxidantes sintéticos os compostos fenólicos são muito usados, como por exemplo o butil-hidroxianisol conhecido como BHA, o butil-hidroxitolueno (BHT), o t-butil-hidroquinona (TBHQ) e os ésteres de ácido gálico. Estes antioxidantes sintéticos têm sido extensivamente adicionados aos alimentos, embora o seu uso comece a ser questionado devido à sua potencial toxicidade (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2006). Por esse motivo, há um considerável interesse por parte da medicina preventiva e da indústria alimentar em desenvolver antioxidantes naturais obtidos especialmente de plantas silvestres (Djilas *et al.*, 2003) dado o seu potencial para captar radicais livres e a investigação tem-se centrado na busca de produtos naturais com este tipo de atividade (Pourmorad *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007; Tawaha *et al.*, 2007; Aiyegoro *et al.*, 2009).

Os consumidores têm-se mostrado preocupados com os resíduos químicos nos alimentos, exigindo alimentos mais seguros, daí o crescente interesse sobre os compostos

naturais, tais como os óleos essenciais e outros extratos de PAM, frutos e vegetais. Os referidos extratos surgem como alternativa a conservantes alimentares, uma vez que possuem propriedades antimicrobianas ou antifúngicas (Revajová *et al*, 2010). Os compostos bioativos de plantas para além destas propriedades possuem também propriedades antioxidantes que satisfazem as exigências dos consumidores e proporcionam alguns benefícios extras aos alimentos e consumidor (Moradi *et al*, 2012).

Somente os antioxidantes que satisfaçam os requisitos estabelecidos pelo Comité Científico da Alimentação podem ser utilizados nos géneros alimentícios. Tendo em conta as mais recentes informações científicas e toxicológicas sobre essas substâncias, algumas delas devem ser admitidas apenas em determinados géneros alimentícios e sob certas condições de utilização. Por outro lado, uma grande variedade de antioxidantes de recursos naturais podem ser adicionados a todos os produtos alimentares, com a exceção de fórmulas para fins especiais (tais como para crianças) (Miková, 2001).

Em resposta ao consumidor cada vez mais exigente muitas indústrias pretendem substituir o uso de aditivos alimentares sintéticos por produtos naturais, considerados promotores de saúde e bem-estar. No entanto, Wootton-Beard & Ryan (2011) são de opinião que ainda não é responsável considerar isoladamente os antioxidantes como promotores para a saúde até existir evidência científica completa e inequívoca sobre a sua bioacessibilidade e biodisponibilidade no organismo.

O novo Regulamento (UE) n.º 432/2012 estabelece uma lista positiva de 222 alegações de saúde (AS) a utilizar nos alimentos, aplicado desde 14 de Dezembro de 2012 para todos os operadores da indústria alimentar na U.E. Desde essa data, apenas as AS da referida lista são permitidas. A regulamentação prevê que qualquer alegação que promova os benefícios para a saúde esteja cientificamente comprovada e formulada para que não cause dúvidas ao consumidor. A clarificação legislativa não garante que o consumidor se interesse pela leitura do rótulo e que entenda os componentes nutricionais do alimento e a alegação que lhes está atribuída (Tarabella & Burchi, 2012). As alegações de saúde, relativas à proteção antioxidante necessitam de forte sustentação científica, no entanto, existe uma clara evidência de que a ingestão de frutos e hortícolas é importante para a prevenção de doenças crónicas e para a manutenção da saúde, principalmente pelo seu teor de compostos antioxidantes (Scordino *et al.*, 2011). Contudo, o que é bastante difícil e que não reúne (ainda) consenso é a definição do que é (e quanto é) “*rico em antioxidantes*” (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Existem estudos que demonstram que acrescentando alegações de saúde aos produtos aumenta a perceção de “saudável” pelo consumidor, mas o impacto na decisão de compra e consumo é moderado a baixo. Contudo, existem exceções que mostram que esta perceção não é real, podendo existir outros fatores que influenciam a decisão do

consumidor nomeadamente a familiaridade da marca ou produto, quantidade de informação disponível, o léxico utilizado e mesmo as diferenças culturais, tradições e hábitos alimentares (Lähteenmäki, 2013). A compreensão do consumidor sobre os constituintes do rótulo do produto alimentar pode ser um fator chave para o entendimento das alegações de saúde e para a escolha de produtos com este tipo de alegações (Sabbe *et al.*, 2009). No entanto, a informação relativa à compreensão do consumidor comum sobre as alegações de saúde é ainda escassa (Wills *et al.*, 2012).

A indústria alimentar ao utilizar um determinado antioxidante deverá ter em atenção que o aditivo alimentar não poderá apresentar qualquer toxicidade, deverá ser efetivo em baixas concentrações, fácil de incorporar de forma a obter-se uma mistura homogénea, resistir a altas temperaturas e estar disponível a um preço relativamente baixo. Como é difícil encontrar um antioxidante que reúna todas estas características é possível a combinação de dois ou mais aditivos de modo a conseguir reunir os benefícios de cada composto adicionado permitindo sinergismos.

Para Herken & Guzel (2010) o teor de compostos bioativos pode vir a tornar-se um parâmetro de qualidade a ser mencionado no rótulo e atestar a qualidade nutricional do produto podendo vir a ser um fator decisório no momento da compra. No entanto, Boer *et al.* (2014) apresentam um estudo de caso em antioxidantes, em que consideram a necessidade de desenvolver critérios que estejam de acordo com os novos conhecimentos científicos. Para estes autores, será fundamental haver um envolvimento entre todas as partes interessadas, tais como industriais, consultores de entidades reguladoras, investigadores e representantes dos consumidores, bem como envolver a ciência nutricional.

### **1.1.3. Fontes de antioxidantes naturais**

As agro-indústrias estão a dar especial atenção a fontes residuais das indústrias agrícolas, para além das plantas aromáticas e medicinais, e a subprodutos remanescentes do processamento de frutas e legumes, os quais ainda contêm uma grande quantidade de compostos fenólicos (Ignat *et al.*, 2011). Uma das fontes mais ricas são as cutículas da uva, subproduto da vinificação (Lapornik *et al.*, 2005). Dependendo de fatores varietais e do processamento, as águas residuais dos lagares bem como as folhas de oliveira são outros subprodutos do sector do azeite que tem sido explorado como fonte de compostos fenólicos (Obied *et al.*, 2005). A indústria de citrinos também produz grandes quantidades de resíduos, em especial cascas e sementes, que podem ser utilizados como fontes de compostos fenólicos já que possuem teores mais elevados de compostos fenólicos totais em comparação com as porções comestíveis (Balasundram *et al.*, 2006). Os subprodutos obtidos do processamento de alcachofra, couve-flor, cenoura, aipo e cebola também já

foram investigados por Larrosa *et al.* (2002). As cascas de várias outras frutas, como por exemplo, cascas de maçã também foram estudadas por apresentarem maiores quantidades de compostos fenólicos que a polpa (Wolfe & Liu, 2003). O repiso de tomate foi também considerado uma fonte mais rica em compostos fenólicos do que a polpa (George *et al.*, 2004).

As bebidas, tais como sumos de frutas, diversos chás/infusões e vinhos também são importantes fontes de fenóis na dieta humana. Como amplamente aceite pela comunidade científica, o vinho é uma das fontes mais importantes de antioxidantes polifenólicos dietéticos, tendo o vinho tinto sido considerado mais protetor sobre a saúde do que outras bebidas alcoólicas (Alén-Ruiz *et al.*, 2009), possivelmente porque os polifenóis que contém ajudam a prevenir doenças relacionadas com o stress oxidativo. O café, sumos de laranja e maçã também fornecem uma fonte significativa de antioxidantes na dieta sendo fontes abundantes de compostos fenólicos naturais. Os compostos fenólicos para além de amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas, e grande parte encontrar-se nos frutos, também nos cereais e leguminosas se podem encontrar em concentrações consideráveis bem como no azeite, cerveja, entre outros (Prado, 2009).

Na Tabela 1.1 apresentam-se alguns trabalhos realizados com espécies vegetais, potenciais fonte de compostos bioativos bem como a sua atividade biológica. Como se pode verificar os estudos abrangem uma ampla variedade de espécies vegetais com grande incidência sobre PAM e frutos.



**Tabela 1.1.** Trabalhos realizados em plantas como fonte de compostos bioativos.

Planta em estudo	Estudo efetuado	Autores
<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Identificação dos compostos fenólicos e avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas.	Araújo <i>et al.</i> (2014)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Matricaria recutita</i> L. <i>Coriandrum sativum</i> L. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. <i>Cassia angustifolia</i> Vahl	Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de soja com extratos de plantas.	Cordeiro <i>et al.</i> (2013)
<i>Lavandula viridis</i> L'Hér.	Perfil metabólico e atividade biológica em óleos essenciais e extratos polares.	Costa <i>et al.</i> (2013)
<i>Chaenomeles</i> spp.	Análise química e atividade antioxidante em frutos.	Du <i>et al.</i> (2013)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Cistus albidus</i> L. <i>Centaurium erythraea</i> Rafn. <i>Lavandula viridis</i> L'Hér. <i>Myrtus communis</i> L. <i>Olea europaea</i> L. <i>Paronychia argentea</i> Lam. <i>Pistacia lentiscus</i> L. <i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk. <i>Ruscus aculeatus</i> L. <i>Thymus lotocephalus</i> G. López & R. Morales	Propriedades antioxidantes.  Teor de fenóis e atividade antioxidante em infusões de plantas medicinais Mediterrânicas.	Gallego <i>et al.</i> (2013)  Gonçalves <i>et al.</i> (2013)
<i>Arbutus unedo</i> L. <i>Prunus spinosa</i> L. <i>Rosa canina</i> L. <i>Rosa micrantha</i> L.	Caracterização dos compostos fenólicos.	Guimarães <i>et al.</i> (2013)
Cereais (trigo, arroz, milho, sorgo e cevada)	Biossíntese de flavonoides e benefícios para a nutrição humana.	Liu <i>et al.</i> (2013a)
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Determinação simultânea de seis flavonóides bioativos.	Liu <i>et al.</i> (2013b)
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Variações nos perfis de óleos essenciais e compostos fenólicos, em folhas e flores, e seus efeitos sobre a atividade antioxidante.	Riahi <i>et al.</i> (2013)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. var. <i>typicus</i> Batt.	Alterações na composição do óleo essencial e da fração fenólica, na floração e estado vegetativo e influência na atividade antioxidante.	Yosr <i>et al.</i> (2013)
<i>Pelargonium graveolens</i> L'Her.	Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos aquosos.	Ćavar & Maksimović (2012)
<i>Teucrium polium</i> L.	Atividade antioxidante.	De Marino <i>et al.</i> (2012)
<i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk.	Capacidade antioxidante e avaliação toxicológica em extratos de flores.	Ferreira <i>et al.</i> (2012)
<i>Thymus lotocephalus</i> G. López & R. Morales	Atividade antioxidante em plantas silvestres e <i>in vitro</i> .	Pérez-Tortosa <i>et al.</i> (2012)

**Tabela 1.1.** (Continuação). Trabalhos realizados em plantas como fonte de compostos bioativos.

Planta em estudo	Estudo efetuado	Autores
<i>Tuberaria lignosa</i> (Sweet) Samp.	Atividade antioxidante e composição fitoquímica.	Pinela <i>et al.</i> (2012)
<i>Barleria noctiflora</i> L.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .	Yadav <i>et al.</i> (2012)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. <i>Dittrichia viscosa</i> (L.) W. Greuter <i>Origanum vulgare</i> L. <i>Salvia officinalis</i> L. <i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav. <i>Thymus camphoratus</i> Hoffmanns. & Link <i>Thymus carnosus</i> Boiss. <i>Thymus mastichina</i> L.	Atividade antioxidante e anti-inflamatória.	Albano & Miguel (2011)
<i>Actinidia deliciosa</i> (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson	Atividade antioxidante e teor de polifenóis em extratos aquosos.	Bursal & Gülçin (2011)
<i>Capsicum annuum</i> L.	Compostos fenólicos, ácido ascórbico e atividade antioxidante.	Ghasemnezhad <i>et al.</i> (2011)
19 especiarias de consumo comum na China	Capacidade antioxidante e principais compostos fenólicos.	Lu <i>et al.</i> (2011)
<i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i>	Atividade antioxidante em vários extratos e óleo essencial.	Ozen <i>et al.</i> (2011)
<i>Origanum vulgare</i> L. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Melissa officinalis</i> L.	Capacidade antioxidante e teor de fenóis totais.	Spiridon <i>et al.</i> (2011)
<i>Salvia lanigera</i> Poir.	Propriedades antimicrobianas e antioxidantes no óleo essencial.	Tenore <i>et al.</i> (2011)

## 1.2. Produção e comercialização de PAM

As plantas aromáticas e medicinais (PAM) sempre foram conhecidas e utilizadas pelo Homem, mas só recentemente se assistiu, em Portugal Continental, ao interesse pela sua produção de forma organizada e conduzida. Em 2012, o Gabinete de Planeamento e Política (GPP), do Ministério da Agricultura e do Mar, realizou um inquérito com o apoio de produtores e associações ligadas ao sector. Segundo o referido Gabinete, as explorações de PAM terão aumentado nos últimos 3 anos, passando de 93 segundo o Recenseamento Agrícola de 2009 para 147 e, em termos de área, aumentou de 80 ha para 180 ha. Um terço dos produtores vende a produção em verde e os restantes vendem a planta seca; 10% dedica-se à extração de óleos essenciais e um quarto dos inquiridos são viveiristas. No segmento dos verdes é determinante o modo de produção convencional e no seco domina o biológico. Embora concentradas na zona costeira, as PAM estão disseminadas por todo o território (Ministério da Agricultura e do Mar, GPP, 2013).

A produção é vendida essencialmente para o mercado interno, com a venda direta ao consumidor mas também em feiras e casas da especialidade (Bio) ou em zonas demarcadas das grandes superfícies, não esquecendo o mercado externo onde está igualmente presente. Os preços observados podem apresentar grandes amplitudes, de acordo com a forma de venda, a granel ou embalado, planta inteira ou apenas a folha, a um intermediário ou diretamente ao consumidor, para o mercado interno ou para o externo. O setor também dá resposta à procura de PAM para ornamentação ou para a culinária caseira, normalmente sob a forma de vasos. Este setor tem um potencial de crescimento elevado mas a situação apresenta-se algo complexa para este segmento. A avaliação do ponto de vista económico mostra fragilidades que se podem tornar insustentáveis. As explorações de PAM são, no geral, mão-de-obra e capital-intensivas, e exigentes do ponto de vista técnico, a que se adicionam as dificuldades de escoamento, podendo constituir-se como fatores limitantes ou adversos. As PAM estão num mercado em desenvolvimento a nível comunitário e mundial para quase todos os tipos de utilização (Ministério da Agricultura e do Mar, GPP, 2013).

### **1.3. A carqueja (*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.)**

#### **1.3.1. Caracterização botânica**

A *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. (Willk & Lange, 1877) é um arbusto vulgarmente conhecido por carqueja ou carqueija, endémica europeia pertencente à família Leguminosae (=Fabaceae), subfamília Papilionoideae. Este arbusto perene cresce aproximadamente até aos 100 cm podendo apresentar um porte ereto mas também prostrado, sendo muito comum em zonas de montanha no Norte de Portugal, por vezes em matos baixos sobre rochas ácidas ou associado no sub-bosque com *Arbutus unedo* L., *Pinus pinaster* Aiton e florestas de *Eucalyptus* e em locais abandonados com solos ácidos (Franco, 1971).

O género *Pterospartum* apresenta caules alternos e alados, coriáceos, persistentes que desempenham a função fotossintética. As folhas são muito reduzidas, por vezes quase inexistentes, com um único folíolo que forma um tridente com as suas duas estípulas. As inflorescências axilares apresentam-se em glomérulos ou rácimos curtos, por vezes umbeliformes e as flores são pediceladas com corola amarela e estandarte com dorso glabro a seríceo. A floração pode ocorrer de fevereiro a julho e o fruto é uma vagem pubescente com 10 a 12 mm (Flora Ibérica, 1999).

Neste trabalho, as plantas de carqueja foram identificadas pela Flora Ibérica, sendo as plantas provenientes da zona do Orvalho identificadas como *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. subsp. *lasianthum* (Spach) Talavera & P.E.Gibbs (Fig. 1.1) e na zona da Malcata (Fig. 1.2) e Gardunha (Fig. 1.3) como *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. subsp. *cantabricum* (Spach) Talavera & P.E.Gibbs.



**Figura 1.1.** Inflorescência de carqueja da localização Orvalho.



**Figura 1.2.** Inflorescência de carqueja da localização Malcata.



**Figura 1.3.** Inflorescência de carqueja da localização Gardunha.

Pela Flora Ibérica a espécie *Pterospartum tridentatum* possui outra sinonímia, a *Genista tridentata* L. (Sp. Pl. 710 (1753)).

Relativamente às subespécies, pela Flora Ibérica, também apresentam sinonímias, nomeadamente:

Para *Pterospartum tridentatum* subsp. *cantabricum* (Spach) Talavera & P.E. Gibbs:

- *Genista cantabrica* Spach in Ann. Sci. Nat., Bot. ser. 3 3: 149 (1845)

- *Pterospartum cantabricum* (Spach) Willk. in Willk. & Lange, Prodr. Fl. Hispan. 3: 441 (1877)
- *Genista tridentata* subsp. *cantabrica* (Spach) Greuter in Willdenowia 15: 428 (1986), comb. superfl.
- *Genistella tridentata* subsp. *cantabrica* (Spach) Holub in Folia Geobot. Phytotax. 12: 429 (1974)

Para *Pterospartum tridentatum* subsp. *lasianthum* (Spach) Talavera & P.E. Gibbs:

- *Genistella lasiantha* (Spach) Holub in Folia Geobot. Phytotax. 12: 429 (1974)
- *Genista lasiantha* Spach in Ann. Sci. Nat., Bot. ser. 3 3: 147 (1845)
- *Pterospartum lasianthum* (Spach) Willk. in Willk. & Lange, Prodr. Fl. Hispan. 3: 440 (1877)
- *Genista tridentata* subsp. *lasiantha* (Spach) Greuter in Willdenowia 15: 428 (1986)

Para *Pterospartum tridentatum* subsp. *tridentatum* (L.) Willk.:

- *Genistella tridentata* (L.) Samp., Man. Fl. Portug. 221 (1911)
- *Pterospartum tridentatum* var. *tridentatum* (L.) Cout., Fl. Portugal 389 (1939)
- *Chamaespartium tridentatum* (L.) P.E. Gibbs in Feddes Repert. 79: 54 (1968)
- *Cytisus tridentatus* (L.) Vuk. in Rad Jugoslav. Akad. Znan. 31: 104 (1875)

A subespécie *tridentatum* apresenta uma distribuição maioritariamente litoral, a subespécie *cantabricum* é frequente nas montanhas de clima temperado (NW) e a subespécie *lasianthum* nas montanhas e planaltos interiores de clima mediterrânico (Flora Ibérica, 1999).

A diferença entre a subespécie *lasianthum* e a subespécie *cantabricum* baseia-se essencialmente nas flores, em que na subsp. *lasianthum* o dorso do estandarte é seríceo e a inflorescência possui 6-10 flores com pedicelos até 3 mm e na subsp. *cantabricum* o estandarte é glabro ou com alguns pelos confinados à nervura média do dorso e a inflorescência possui 4-6 (8) flores e os pedicelos entre 1 e 2,5 mm (Flora Ibérica, 1999).

### 1.3.2. Utilizações e estudos em carqueja

A carqueja é bastante utilizada como planta medicinal, no tratamento de doenças do aparelho digestivo e diabetes bem como para fins culinários, no entanto, os estudos sobre esta planta são escassos.

O primeiro estudo sobre a composição química e propriedades farmacológicas da espécie *Pterospartum tridentatum* foi efetuado em 2004, por Vítor *et al.*, em que foram identificados alguns constituintes do extrato aquoso, o qual mostrou capacidade de prevenir o dano oxidativo às células endoteliais. A caracterização química do extrato revelou a presença de alcaloides, compostos fenólicos (incluindo os flavonoides) e terpenoides glicosilados. Nesse trabalho, com flor de carqueja proveniente de Cinfães, norte de Portugal, foram identificados como principais constituintes do extrato aquoso, três derivados de genisteína (4',5,7-trihidroxisoflavona) e as isoflavonas, sissotrina, genistina e prunetina (Vítor *et al.*, 2004). Foi ainda identificada outra isoflavona, a 5,5'-dihidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O- $\beta$ -glucósido bem como a isoquercetina. As isoflavonas são flavonoides característicos da família das Leguminosas (Harborne, 1994). Vitor *et al.* (2004) mostraram pela primeira vez que a isoquercetina previne o dano oxidativo endotelial, dependendo da dose e sendo utilizada em concentrações não tóxicas (0,1-1 mM). Concluíram também que as flores de *P. tridentatum* podem ter efeitos benéficos nos pacientes com diabetes uma vez que os extratos aquosos mostraram capacidade para prevenir o dano oxidativo às células endoteliais o que pode prevenir ou minimizar o desenvolvimento de complicações vasculares.

Grosso *et al.* (2007) considerando os óleos essenciais como uma alternativa aos conservantes químicos, caracterizaram o óleo essencial de *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. recolhida no Ribatejo e Beira Alta, verificando a existência de variabilidade química.

Paulo *et al.* (2008) avaliaram a atividade da isoquercetina de flores silvestres de *P. tridentatum* recolhidas em Cinfães (norte de Portugal) em ratos, tendo sugerido que a mesma pode ser uma molécula vantajosa no tratamento antidiabético pós-prandial (a seguir a uma refeição).

Em 2009, Luís *et al.* determinaram a atividade antioxidante de extratos de *P. tridentatum* (L.) Willk., *Cytisus scoparius* (L.) Link e *Erica* spp. recolhidas na Serra da Estrela, concluindo que esses extratos apresentavam atividade antioxidante relevante, havendo uma correlação linear positiva entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais.

Silva (2009) realizou um estudo com extratos de folhas e flores da espécie *P. tridentatum* (recolhida na zona de Castelo de Paiva) na concentração de 10 mg/kg e após administração em ratos concluiu que estes extratos para esta concentração não induzem alterações histopatológicas significativas ao nível do fígado, baço e rim. Após administração de CCl<sub>4</sub>, os extratos nas concentrações de 5mg/kg e 10 mg/kg demonstraram ter um efeito protetor nestes órgãos, tendo sugerido que a atividade protetora se devia à presença de compostos bioativos como os compostos fenólicos.



Segundo Luís *et al.* (2011) o principal composto fenólico presente em extratos de folhas e caules de *P. tridentatum* (L.) Willk., provenientes da serra da Estrela, é o ácido vanílico na concentração de 32.2 mg/g m.s.

Martínez *et al.* (2012) em extrato de folha de *Pterospartum tridentatum* subsp. *tridentatum* recolhida em Pontevedra, Espanha, identificaram a isoflavona genisteína. A genisteína é um fitoestrogénio com uma ampla variedade de efeitos farmacológicos em células animais, incluindo inibição da tirosina quinase, atividade antioxidante, quimioprevenção dos cancros da mama e próstata e de doenças cardiovasculares (Dixon & Ferreira, 2002).

Estão a ser realizados trabalhos no sentido de otimizar técnicas de extração e proteção dos compostos biologicamente ativos. Tylkowski *et al.* (2010) e Isailovic *et al.* (2012) procederam ao microencapsulamento de antioxidantes naturais de *Pterospartum tridentatum* em alginato e inulina, tendo verificado que a atividade antioxidante dos extratos foi preservada.

Pimenta (2012), caracterizou os extratos aquosos de carqueja relativamente ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, concluindo que os extratos aquosos apresentam elevada atividade antioxidante.

Fernandes (2012) procedeu à determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de *P. tridentatum* (L.) Willk., recolhida na Serra da Estrela, concluindo que os extratos de caules, folhas e flores têm capacidade de diminuir a velocidade inicial da atividade enzimática da enzima 5-LOX.

Ferreira *et al.* (2012) realizaram estudos de citotoxicidade nesta espécie, em extratos florais de plantas provenientes de Castro Daire, concluindo que as flores são inócuas, podendo ser utilizadas em culinária ou na medicina tradicional para tratamento de doenças associadas ao stress oxidativo, pelo menos para terapias de curto prazo.

Gonçalves *et al.* (2013) estudaram o teor de fenóis e a atividade antioxidante em infusões de dez plantas medicinais Mediterrânicas recolhidas no Algarve, entre as quais a carqueja, e todos os métodos utilizados revelaram atividade antioxidante dos extratos e demonstraram que estas plantas podiam ser utilizadas em medicina popular, especialmente para a prevenção e tratamento de doenças que são conhecidas por serem causadas ou aceleradas pelo stress oxidativo.

#### **1.4. Porquê a propagação *in vitro*?**

A Flora Portuguesa é particularmente rica em espécies aromáticas e medicinais. Das cerca de 3800 espécies que compõem a cobertura vegetal do Continente, Açores e Madeira,

cerca de 500 são consideradas aromáticas e/ou medicinais (Figueiredo *et al.*, 2007). Em alguns locais, pelos estudos etnobotânicos, verifica-se ainda uma forte utilização destas plantas e, em especial, um crescente interesse das aromáticas para substituição do uso de sal na alimentação. De forma a minimizar colheitas massivas e consequentes destruições dos habitats naturais, parece importante desenvolver metodologias que permitam o seu cultivo, quer *in vivo* quer *in vitro*.

Hoje em dia, a cultura de células vegetais e a micropropagação podem tornar-se úteis, em especial para a indústria farmacêutica, dado o seu crescente interesse na obtenção de determinados compostos ativos, já que estas têm de recorrer a matérias-primas provenientes de plantas silvestres ou de cultura e, nestas circunstâncias, poderão deparar-se com algumas dificuldades. Segundo Cunha (2009), uma das dificuldades para a indústria farmacêutica poderá ser a impossibilidade de obter o material vegetal em quantidade suficiente ou economicamente viável para satisfazer a procura já que algumas plantas poderão ser pouco abundantes e mesmo de difícil cultura. Por outro lado, havendo abundância também não se deverá destruir o património genético existente nas plantas espontâneas.

Outra questão importante é a produção da matéria-prima vegetal depender das condições climáticas, de doenças e pragas nas plantações, variações nos métodos de recolha e secagem, etc, pelo que pode haver quebras de produção e mesmo alterações na qualidade. Segundo Cunha (2009), quando um novo medicamento é obtido de compostos isolados de plantas, o país de origem dessa matéria-prima pode tentar explorar essa situação, criando dificuldades na exportação de plantas ou aumentando o seu preço ao fazer processamento no próprio país. Como consequência destas dificuldades, a indústria farmacêutica está a interessar-se cada vez mais pela cultura de células podendo sempre ajustar a produção às necessidades da indústria e assegurar um produto de qualidade.

Por outro lado, o aparecimento frequente em culturas de células vegetais de compostos não detetados na planta original leva à investigação no sentido de se induzir a formação de novas vias metabólicas que conduzam à obtenção de moléculas farmacologicamente ativas. Foi o que sucedeu em culturas de células de *Catharanthus roseus* que originaram dímeros de vimblastina e da vincristina, importantes alcaloides antineoplásicos (Cunha, 2009).

A cultura de plantas medicinais também envolve alguns custos já que se deverá ter em conta todos os aspetos agronómicos gerais, os económicos, para além dos específicos da espécie em causa. Para cada espécie a cultivar, os parâmetros em relação ao clima, solo, irrigação, método de propagação, colheita e controlo de infestantes, de pragas e de doenças devem ser tidos em consideração, para além da necessidade de ser feita uma adaptação da variedade selecionada ao local de cultivo. Algumas espécies só produzem



certos compostos quando submetidas a determinadas condições de stress como por exemplo, uma reduzida disponibilidade a certos nutrientes. No entanto, algumas vezes poderá haver necessidade de reforçar os solos ou a irrigação com um determinado nutriente, para se poder aumentar a quantidade de um dado componente ativo, como por exemplo, a adição de compostos azotados ou de certos aminoácidos que aumentam a quantidade de alcaloides ou de um determinado alcaloide (Cunha *et al.*, 2010).

A agricultura biológica também é uma prática corrente na cultura de plantas medicinais, em particular as usadas na preparação de infusões. No entanto, este tipo de agricultura tem algumas limitações, exigindo rotação do terreno de cultura e uma adubação orgânica (estrumes de pecuária biológica, resíduos de culturas, compostagem, húmus de minhoca, etc), o que no caso da cultura de plantas em larga escala para a extração de compostos bioativos é por vezes difícil já que se devem respeitar os apropriados tempos de quarentena para os produtos orgânicos usados antes da colheita (Cunha *et al.*, 2010).

Dadas as dificuldades mencionadas e sendo o cultivo dependente de parâmetros climáticos (temperatura, precipitação, insolação e altitude) bem como do tipo de solo, poder-se-á proceder à sua multiplicação em condições laboratoriais controladas. A propagação *in vitro* ou micropropagação, realizada em condições assépticas e controlando fatores físicos, químicos, hormonais e nutritivos poderá ser um complemento para multiplicação de plantas em larga escala e a cultura de tecidos vegetais poderá ser uma alternativa para a produção de metabolitos secundários. Embora estes fatores se possam controlar em condições laboratoriais, este processo de regeneração *in vitro* é, no entanto, fortemente influenciado pelo genótipo, estado fisiológico e idade do explante, condições do ambiente *in vitro*, em especial os regimes de luz e temperatura, e ainda pela formulação dos meios de cultura, em especial concentrações hormonais. A micropropagação poderá também apresentar algumas dificuldades já que algumas espécies ainda têm fraca capacidade regenerativa, as taxas de multiplicação nem sempre são as desejadas por forma a tornarem o processo rentável, a indução do sistema radicular adventício funcional nem sempre é conseguido, a adaptação das plantas às condições ambientais naturais é por vezes difícil e com elevada mortalidade e a metodologia em si é um pouco dispendiosa.

No entanto, muitas são as vantagens que a micropropagação oferece, comparativamente a processos de propagação convencionais, destacando-se a maior rapidez do processo, a possibilidade de multiplicar espécies difíceis ou mesmo impossíveis de multiplicar *in vivo*, o espaço necessário para a cultura e armazenamento ser reduzido, a ausência de agentes patogénicos contaminantes e a eliminação do efeito de sazonalidade. Uma vez que as plantas estão em condições laboratoriais também esta metodologia pode fornecer material vegetal para outro tipo de estudos, como é o caso de estudos fisiológicos, no campo do melhoramento, manipulação genética e obtenção de plantas transformadas.

## 1.5. Revestimentos comestíveis na conservação pós-colheita de frutos

### 1.5.1. Definição e funções dos revestimentos comestíveis

Revestimento comestível é definido como qualquer material que envolve os alimentos, com o objetivo de aumentar a sua vida útil podendo ser ingerido em conjunto com este. A sua espessura deverá ser inferior a 0,3  $\mu\text{m}$ , e pode encontrar-se na superfície ou em finas camadas entre diferentes componentes do alimento. Quanto aos componentes usados na produção deste tipo de revestimentos, devem estar em conformidade com os regulamentos que se aplicam ao produto alimentar que está a revestir (Vargas *et al.*, 2008; Pavlath & Orts, 2009). Os componentes base dos revestimentos comestíveis são normalmente polissacáridos, proteínas, lípidos ou misturas (Mchugh, 2000).

O desenvolvimento de revestimentos à base de polissacáridos aumentou significativamente o leque de aplicações que prolongam a vida útil de frutos e vegetais, devido à permeabilidade seletiva dos mesmos para gases ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{C}_2\text{H}_4$ ), modificando o ambiente interno dos frutos o que altera a fisiologia e retarda a senescência (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

As principais funções dos revestimentos comestíveis prendem-se com:

- Barreira semipermeável aos gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ) e ao vapor de água. Esta barreira semipermeável regula a composição da atmosfera, evitando a desidratação e, no caso de frutos e vegetais controla a atividade respiratória. A redução da disponibilidade de  $\text{O}_2$  e o aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  nos frutos e legumes reduz consequentemente a taxa de respiração e a perda de água, aumentando a vida útil dos mesmos (Weiss, 2012). Assim, os frutos e legumes preservam a qualidade por um período mais longo e sua vida útil poderá ser em muitos casos mais do dobro (Dhall, 2013);
- Veículo de aditivos;
- Proteção aos danos mecânicos;
- Controlo da atividade microbiológica.

A utilização dos revestimentos parece pois muito vantajosa no campo de preservação de frutos e na redução da taxa de respiração e a sua utilização já foi descrita para uvas, maçãs e melão, entre outros. Em geral, revestimentos com formulações que minimizam a perda de massa também mantêm a firmeza, uma vez que este atributo é

altamente influenciado pelo teor de água (Sa *et al.*, 2011), embora a perda de firmeza também seja causada por degradação enzimática das cadeias pécicas.

Em resumo, na tecnologia pós-colheita as grandes vantagens da utilização de revestimentos comestíveis são a diminuição da taxa respiratória, o aumento do período de armazenamento e manutenção da firmeza (Fan *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2011), conseguindo os efeitos de uma atmosfera controlada que se pode prolongar para além da abertura das câmaras.

Uma outra função do revestimento comestível é a sua capacidade de incorporação de princípios ativos na matriz, podendo incorporar antioxidantes, antimicrobianos ou outros ingredientes funcionais (Dhall, 2013), sais minerais, vitaminas, cores ou sabores, podendo ser aplicados ao alimento por vários métodos, como por exemplo imersão e pulverização.

### **1.5.2. O quitosano como material para revestimentos comestíveis**

Um dos materiais mais utilizados na preparação de revestimentos comestíveis é o quitosano que é um polissacárido obtido através da desacetilação alcalina da quitina a elevadas temperaturas. A quitina é extraída do exoesqueleto de crustáceos, sendo uma forma de aproveitamento dos resíduos dos mesmos que são abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, reduzindo assim o impacto ambiental causado pela sua acumulação.

O quitosano é um polímero de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose, de fórmula geral  $[C_6H_{11}O_4N]_n$  constituído maioritariamente por glucosamina. A molécula de quitosano tem três grupos funcionais reativos: um grupo amina, na posição C-2, e dois grupos hidroxilo, nas posições C-3 e C-6. O grande número de grupos amina ao longo da sua cadeia (que são grupos extremamente reativos) torna a molécula bastante suscetível a alterações, fazendo variar as suas características, como é o caso das alterações na sua solubilidade (Pillai *et al.*, 2009).

Este polímero versátil tem uma aderência especial para superfícies biológicas, devido à sua carga positiva e, por conseguinte, é capaz de formar películas estáveis (Dutta *et al.*, 2009; Moradi *et al.*, 2010).

O quitosano apresenta um vasto potencial de aplicações em revestimentos na indústria alimentar devido às suas propriedades físico-químicas, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade com tecidos humanos, toxicidade nula e, especialmente, pelas suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Aider, 2010).

O quitosano tem sido amplamente utilizado em películas e revestimentos sobretudo devido à sua capacidade de inibir o crescimento de algumas bactérias e fungos (Romanazzi *et al.*, 2002). No entanto, o mecanismo de ação antimicrobiana do quitosano ainda não é completamente conhecido e têm surgido várias hipóteses mas acredita-se que a carga

positiva das moléculas de quitosano interaja com as membranas celulares carregadas negativamente dos microrganismos, causando uma alteração na permeabilidade celular e consequentemente uma fuga de constituintes celulares (Olivas & Cánovas, 2009).

As propriedades antioxidantes do quitosano e seus derivados também já foram estudadas mas a maioria dos produtos alimentares pode beneficiar destas propriedades também quando o quitosano é convertido num filme em que podem ser incorporados aditivos antioxidantes e antimicrobianos (Moradi *et al.*, 2012).

Uma das desvantagens dos revestimentos e filmes de quitosano reside na sua elevada permeabilidade ao vapor de água e na possibilidade de causar alergias em alguns consumidores. Perdones *et al.* (2012) adicionaram óleo essencial de limão em revestimentos à base de quitosano para melhorar as suas propriedades de barreira ao vapor de água. Também Velickova *et al.* (2013) aplicaram um revestimento com base de quitosano e cera de abelha sob morangos e verificaram os seus efeitos benéficos na perda de massa, na atividade antifúngica, na taxa respiratória, na manutenção da firmeza e cor, no pH, nos sólidos solúveis e açúcares.

Em geral, os polissacáridos e proteínas são conhecidos por formarem películas com boas propriedades mecânicas, mas com baixa permeabilidade a gases quando não hidratados, enquanto que os lípidos formam películas frágeis, mas incrementam a permeabilidade aos gases. Por conseguinte, os revestimentos estão a focar-se na combinação da matriz hidrofílica com um componente hidrofóbico (Navarro-Tarazaga *et al.*, 2008; Zúñiga *et al.*, 2012). Em alguns estudos, a produção de revestimentos comestíveis e biodegradáveis, combinando vários polissacáridos, proteínas e lípidos tem como objetivo retirar vantagens das propriedades de cada composto mas também da sinergia entre eles. As propriedades mecânicas e de barreira destes revestimentos não dependem apenas dos compostos utilizados na matriz polimérica, mas também da sua compatibilidade (Silva *et al.*, 2009).

### **1.5.3. Revestimentos comestíveis como veículos de compostos bioativos**

Existem estudos que demonstram que as propriedades físicas e químicas dos filmes e revestimentos comestíveis podem ser modificadas quando são adicionados extratos ricos em polifenóis (Weiss, 2012), ou seja, a interação dos compostos ativos naturais com a matriz polimérica pode não só afetar a sua libertação para alimentos, mas alterar as propriedades físicas e químicas, tais como a solubilidade, barreira à luz e gases (Bifani *et*

*al.*, 2007). Estudos de Gómez-Guillén *et al.* (2007) e López-de-Dicastillo *et al.* (2012) também demonstraram que os aditivos naturais de plantas podem melhorar as propriedades de revestimentos e filmes, tais como, barreira aos UV, ao vapor de água, ao dióxido de carbono e oxigênio. Assim sendo, os aditivos naturais de extratos vegetais e compostos bioativos isolados começaram a ser incorporados em embalagens, revestimentos e filmes comestíveis e existem estudos que apoiam esta interessante opção de usar revestimentos comestíveis como veículos destes compostos naturais (Sánchez-González *et al.*, 2011).

A par das propriedades mecânicas e de barreira dos revestimentos comestíveis, tem sido estudada a sua atividade biológica natural e incrementada pela incorporação de compostos biológicos de diferentes origens. Alguns estudos têm demonstrado o aumento do poder antioxidante juntamente com as propriedades de barreira à luz de revestimentos comestíveis com a adição de *Origanum vulgare* L. rico em polifenóis ou extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis* L. (Gómez-Estaca *et al.*, 2009).

Os revestimentos comestíveis estão a proporcionar um grande interesse e versatilidade principalmente no que respeita à incorporação dos compostos bioativos de plantas que podem atuar como agente antioxidante ou antimicrobiano. Recentes pesquisas têm vindo a ser realizadas e novas formulações têm sido propostas através da mistura de quitosano com óleos essenciais ou extratos de plantas. Sánchez-González *et al.* (2010) concluíram que filmes de quitosano e óleos essenciais da planta do chá têm efeito sobre *Listeria monocytogenes*. A sua atividade antibacteriana foi também demonstrada por Liu *et al.* (2009) onde se verificaram zonas de inibição por difusão em disco em agar contendo *Escherichia coli* O157: H7.

Vários estudos foram efetuados com extratos vegetais naturais e utilizados como aditivos em filmes comestíveis sendo aplicados em alimentos, tais como os que se encontram na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2.** Extratos naturais de plantas usados como aditivos em revestimentos comestíveis.

Aditivo natural	Biopolímero	Efeito do aditivo natural no alimento	Referência
Polifenóis de chá e extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Quitosano	Reduz a deterioração microbiana, melhora as propriedades sensoriais em comparação com a amostra de controlo.	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>Cammelia sinensis</i> (L.) Kutntze (extrato aquoso)	Quitosano	Melhora as propriedades antimicrobianas e antioxidantes do filme em salsichas de carne de porco: inibe a oxidação lipídica e crescimento microbiano, prolonga a vida de prateleira.	Siripatrawan & Noipha (2012)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Olea europaea</i> L.	Quitosano	Proteção antimicrobiana e antioxidante sem perda da aceitabilidade sensorial.	Ponce <i>et al.</i> (2008)
<i>Origanum vulgare</i> L. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Quitosano	Controlo da oxidação lipídica e atividade antimicrobiana em sardinhas.	Gómez-Estaca <i>et al.</i> (2007)
Extratos de folhas de <i>Ugni molinae</i> Turcz	Carboximetil-celulose	Reduz a perda de massa e mantém a cor; aumento da vida útil em alperces.	Ihl <i>et al.</i> (2006)

A incorporação de compostos bioativos em filmes e revestimentos pode resultar em alterações estruturais dos biopolímeros, bem como na modificação das propriedades mecânicas e funcionais. Perante as vantagens e desvantagens são necessárias mais pesquisas (Wang *et al.*, 2012) quer para avaliar o efeito da incorporação de aditivos naturais em filmes e revestimentos bem como os seus efeitos sobre o alimento (Wang *et al.*, 2013). Há também que avaliar se as alterações nas propriedades funcionais e bioatividade são devido à sua estrutura química, à concentração do composto ativo nos extratos e/ou devido a um efeito sinérgico dos compostos do extrato vegetal (Weiss, 2012).

Os filmes comestíveis e os revestimentos com propriedades antimicrobianas inovaram o conceito de embalagens ativas, tendo sido desenvolvidos para reduzir, inibir ou impedir o crescimento de microrganismos em superfícies de alimentos. Hoje em dia os filmes comestíveis têm diferentes aplicações, e prevê-se expansão da sua utilização com o desenvolvimento de sistemas de revestimento ativos. Esta segunda geração de materiais de revestimento pode ser usada como veículo de aditivos, de uma forma muito direcionada e tecnologicamente mais prática e funcional. Neste sentido, os óleos essenciais ou outros extratos em combinação com polímeros estruturais, podem ser uma fonte promissora, e em alguns trabalhos foi evidenciada a sua eficácia como antimicrobiano e fonte de antioxidantes (Sánchez-González *et al.*, 2010). Taqi *et al.* (2013) realizaram um estudo em filmes comestíveis à base de mandioca/pectina, com utilização dos óleos de *Laurus nobilis* L. e

*Nigella sativa* L. e o seu significativo efeito como agente antimicrobiano e efeito nas propriedades físicas dos alimentos.

A pesquisa atual está centrada na funcionalidade das películas comestíveis relacionada com a sua bioatividade (tais como poder antioxidante e antimicrobiano), a sua função (como barreira ao vapor de água, oxigénio, dióxido de carbono e luz UV-VIS), as propriedades mecânicas (como a tensão e alongamento) e outras propriedades físicas (como a cor) (Silva-Weiss *et al.*, 2013).

#### **1.5.4. Revestimentos comestíveis em hortofrutícolas**

A utilização de revestimentos comestíveis em frutos e vegetais não é recente mas ultimamente tem motivado algum interesse por parte de investigadores e produtores, pois trata-se de uma técnica de conservação pós-colheita que pode garantir a qualidade e aumentar a durabilidade dos produtos.

Um dos desafios da indústria de hortofrutícolas está precisamente relacionado com o prolongamento do período pós-colheita dos produtos em fresco. Para além disto, a utilização de materiais convencionais de embalagem, tais como plásticos e seus derivados, apesar de serem eficazes para a conservação de alimentos, nem sempre são facilmente adaptáveis a frutos e hortofrutícolas frescos, dado continuarem biologicamente ativos, para além de criarem sérios problemas ambientais (Aider, 2010). Há pois necessidade de desenvolver novos métodos de armazenamento e conservação pós-colheita que ajudem também a atingir novos mercados (Le *et al.*, 2011).

Os revestimentos comestíveis não são usados em qualquer fruto ou vegetal, devendo ser otimizado para cada caso específico. São particularmente indicados para frutos muito sensíveis, desempenhando funções de proteção de extrema importância como por exemplo em cerejas (*Prunus avium* L.) já que os frutos são muito sensíveis a danos mecânicos, apresentando um curto período de vida pós-colheita.

Os revestimentos podem ser aplicados sobre vegetais frescos e frutos inteiros, como por exemplo maçã, toranja, maracujá, abacate, laranja, limão, pêssego, pepino, pimentão, melão e tomate. Também são utilizados em alguns produtos minimamente processados já que são altamente perecíveis, como é caso da maçã, pêra e pêssego cortados e descascados e em cenoura, alface, repolho, cebola, melão, tomate e batata minimamente processados (Dhall, 2013).

Em relação às propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos óleos essenciais, estes têm sido extensivamente analisados, embora os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não estejam claramente identificados, mas parecem estar relacionados com a sua natureza hidrofóbica. A aplicação destes compostos naturais no pós-colheita de

frutos e vegetais pode ser uma potencial alternativa, mas os seus custos de aplicação e outros problemas, tais como o seu intenso aroma e potencial toxicidade limita a sua utilização na área.

Na indústria hortofrutícola, a seleção e aplicação dos extratos vegetais vai depender das suas propriedades bioativas: antioxidante e antimicrobiana, disponibilidade bem como o custo-eficácia (Perumalla & Hettiarachchy, 2011). Sendo a qualidade sensorial uma característica com grande importância na decisão de compra torna-se essencial avaliar também o impacto da aplicação do revestimento na qualidade sensorial do produto alimentar.

Os revestimentos comestíveis continuam em fase de investigação; as empresas ainda não possuem a tecnologia necessária e, no momento, o seu uso é restrito a produtos de alto valor acrescentado. A maioria dos estudos sobre aplicações em frutos e vegetais foi realizada à escala laboratorial e no futuro pretendem-se desenvolver novas aplicações de revestimentos com melhor funcionalidade e alto desempenho sensorial (Dhall, 2013).

## 1.6. Referências bibliográficas

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- Aiyegoro, A., Afolayan, J. & Okoh, A. (2009). *In vitro* antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 462-467.
- Albano, S.M. & Miguel, M.G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33, 338-343.
- Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E. & Simal-Gándara, J. (2009). Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, 113, 53-60.
- Alim, A., Goze, I., Goze, H. & Tepe, B. (2009). *In vitro* antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 413-419.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F. & Duarte, A. (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Industrial Crops and Products*, 30, 165-167.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4364-4370.
- Araújo, K., Lima, A., Silva, J., Rodrigues, L., Amorim, A., Quelemes, P., Santos, R., Rocha, J., Andrades, É., Leite, J., Mancini-Filho, J. & Trindade, R. (2014). Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia tirucalli* L. *Antioxidants*, 3, 159-175.
- Bahramikia, S., Ardestani, A. & Yazdanparast, R. (2009). Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chemistry*, 115, 37-42.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.



- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Barka, E.A. (2001). Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 785-791.
- Bifani, V., Ramírez, C., Ihl, M., Rubilar, M., García, A. & Zaritzky, N. (2007). Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1473-1481.
- Boer, A., Vos, E. & Bast, A. (2014). Implementation of the nutrition and health claim regulation - the case of antioxidants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68, 475-87.
- Brody, A.L., Bugusu, B., Han, J.H., Sand, C.K. & Mchugh, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*, 73, 107-116.
- Bursal, E. & Gülçin, İ. (2011). Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44, 1482-1489.
- Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., Mandic, A.I. & Canadanovic, V.M. (2006). Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 667-673.
- Ćavar, S. & Maksimović, M. (2012). Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food Control*, 23, 263-267.
- Celiktas, O.Y., Bedir, E. & Sukan, F.V. (2007). *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101, 1457-1464.
- Cordeiro, A.M., Medeiros, M.L., Silva, M.A., Silva, I.A., Soledade, L.E., Souza, A.L., Queiroz, N. & Souza, A.G. (2013). Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 114, 827-832.
- Costa, J.C., Honrado, J., Monteiro-Henriques, T., Neto, C. & Aguiar, C. (2008). Sobre as comunidades de *Pterospartum tridentatum sensu lato* em Portugal continental. *Silva Lusitana*, 16(1), 123-127.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P.B. & Romano, A. (2013). Accumulation of phenolic compounds in *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 69-74.
- Cunha, A.P. (2009). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.). Lisboa.
- Cunha, A. & Roque, O. (2009). *A Farmacognosia nos estudos farmacêuticos* In *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.). Lisboa. p. 3-15 e 89-107.
- Cunha, A.P., Teixeira, F., Silva, A. & Roque, O. (2010). *Plantas na Terapêutica, Farmacologia e Ensaio Clínicos*. Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.). Lisboa. p. 15-40.
- De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., Evangelista G. & Iorizzi, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133, 21-28.
- Dhall, R.K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435-450.
- Dixon, R.A. & Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60, 205-211.
- Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M., Cetkovic, G.S. & Tumbas, V.T. (2003). *Antioxidative activity of some herbs and species - review of ESR studies* In *Magnetic Resonance in Food Science*. Belton, P.S., Gill, A.M., Webb, G.A. & Rutledge, D. (Eds.). Cambridge. p. 110-120.
- Du, H., Wu, J., Li, H., Zhong, P.-X., Xu, Y.-J., Li, C.-H., Ji, K.-X & Wang, L.-S. (2013). Polyphenols and triterpenes from *Chaenomeles* fruits: chemical analysis and antioxidant activities assessment. *Food Chemistry*, 141, 4260-4268.

- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K. & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food application. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L. & Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria×ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 84-90.
- Fernandes, J. (2012). *Determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de Pterospartum tridentatum*. Universidade da Beira Interior. Covilhã. Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
- Ferreira, F.M., Dinis, L.T., Azedo, P., Galhano, C.I.C., Simões, A., Cardoso, S., Domingues, M.R., Pereira, O., Palmeira, C. & Peixoto, F. (2012). Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts. *CyTA – Journal of Food*, 10, 92-102.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. & Pedro, L.G. (Eds.) (2007). *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 3ª ed.
- Flora Ibérica (1999). LXXXVIII. *Leguminosae*. In Plantas vasculares de la Peninsula Iberica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid. 7, 133-137.
- Franco, J. A. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Sociedade Astória, Lda. Lisboa. 1, 308-313.
- Gallego, M.G., Gordon, M.H., Segovia, F.J., Skowrya, M. & Almajano, M.P. (2013). Antioxidant properties of three aromatic herbs (Rosemary, Thyme and Lavender) in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 1559-1568.
- Garcia, L.C., Pereira, L.M., Luca Sarantópoulos, C.I. & Hubinger, M.D. (2010). Selection of an edible starch coating for minimally processed strawberry. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 834-842.
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D.S. & Kapoor, H.C. (2004). Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 84, 45-51.
- Ghasemnezhad, M., Sherafati, M. & Payvast, G.A. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3, 44-49.
- Ghasemzadeh, A., Omidvar, V. & Jaafar, H.Z.E. (2012). Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 2971-2976.
- Gil, M.I., Conesa, M.A. & Artes, F. (2002). Quality changes in fresh cut tomato as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 199-207.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Gimenez, B. & Gómez-Guillen, M.C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105, 511-520.
- Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M.C., Alemán, A. & Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112, 18-25.
- Gómez-Guillén, C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A. & Montero, P. (2007). Edible films made from Tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murtilla ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21, 1130-1143.
- Gomez-Pinilla, F. & Nguyen, T.T.J. (2012). Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience*, 15, 127-133.
- Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P. & Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43, 465-471.

- Grosso, A.C., Costa, M. Ganço, L., Pereira, A. Teixeira, G., Lavado, J., Figueiredo, A., Barroso, J. & Pedro, L. (2007). Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal. *Food Chemistry*, 102, 1083-1088.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Queiroz, M.J.R., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I.C.F. (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, 3721-3730.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 125-130.
- Harborne, J.B., 1994. *Phytochemistry of the Leguminosae*. In: *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. Bisby, F.A., Buckingham, J. & Harborne, J.B. (Eds.). Vol. I. Chapman & Hall, London. p. 20-23.
- Herken, E.N. & Guzel, S. (2010). Total antioxidant capacity and total phenol contents of selected commercial fruit juices in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 13, 1373-1379.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Ihl, M., Bifani, C., Ramírez, C., Rubilar, M., Motomura, Y., Menses, C., Infante, R. & Seguel, I. (2006). Preliminary study on edible film with a natural plant extract to improve quality of fresh fruit for supply chains. *Acta Horticulturae* (ISHS), 712, 617-622.
- Isailovic, B., Kaluševi, A., Žuržul, N., Coelho, M.T., Verica, Đ., Alves, V.D., Sousa, I., Moldão-Martins, M., Bugarski, B. & Nedovi, V. (2012). Microencapsulation of natural antioxidants from *Pterospartum tridentatum* in different alginate and inulin systems. In *Proceedings of 6th Central European Congress on Food*, 1075-1081.
- Joseph, J., Cole, G., Head, E. & Ingram, D. (2009). Nutrition, brain aging and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 29, 12795-12801.
- Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A. & Hetzoglou, A. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, 6, 63-74.
- Kaufman, P.B., Kirakosyan, A., McKenzie, M., Dayanandan, P., Hoyt, J.E. & Li, C. (2006). *The use of plant natural products by humans and risks associated with their use*. In *Natural Products From Plants*. Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A. & Briemann, H.L. (Eds.). 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton. p. 441-473
- Lähteenmäki, L. (2013). Claiming health in food products. *Food Quality and Preference*, 27, 196-201.
- Lapornik, B., Prosek, M. & Wondra, A.G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Larrosa, M., Llorach, R., Espin, J.C. & Tomas-Barberan, F.A. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 532-542.
- Le, T., Yu, H., Wang, X., Ngom, B., Guo, Y. & Bi, D. (2011). Development and validation of an immunochromatographic test strip for rapid detection of doxycycline residues in swine muscle and liver. *Food and Agricultural Immunology*, 22, 235-246.
- Li, T., Hu, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J. & Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control*, 25, 101-106.
- Liu, F., Qin, B., He, L. & Song, R. (2009). Novel starch/chitosan blending membrane: antibacterial, permeable and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 78, 146-150.
- Liu, Z., Liu, Y., Pu, Z., Wang, J., Zheng, Y., Li, Y. & Wei, Y. (2013a). Regulation, evolution, and functionality of flavonoids in cereal crops. *Biotechnology Letters*, 35, 1765-1780.
- Liu, E.-H., Zhao, P., Duan, L., Zheng, G.-D., Guo, L., Yang, H. & Li, P. (2013b). Simultaneous determination of six bioactive flavonoids in Citri Reticulatae Pericarpium by rapid resolution liquid

- chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141, 3977-3983.
- López-de-Dicastillo, C., Gómez-Estaca, J., Catalá, R., Gavara, R. & Hernández-Muñoz P. (2012). Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, 131, 1376-1384.
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M. & Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*, 44, 530-536.
- Luís, Â., Domingues, F., Gil, C. & Duarte, A.P. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 886-893.
- Luís, A., Domingues, F. & Duarte, A.P. (2011). Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some portuguese shrub species extracts. *Natural Product Communications*, 6, 1863-1872.
- Martínez, A., Estévez, J. C. & Silva-Pando, F. J. (2012). Antioxidant activity, total phenolic content and skin care properties of 35 selected plants from Galicia (NW Spain). *Frontiers in Life Science*, 6 (3-4), 77-86.
- Mchugh, T.H. (2000). Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung*, 44, 148-151.
- Miková, K., (2001). *The regulation of antioxidants in food*. In *Antioxidants in Food*. CRC Press, Boca Raton. p. 267-284.
- Ministério da Agricultura e do Mar, Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP). (2013). *As plantas aromáticas, medicinais e condimentares*. Portugal Continental. 2012. 85 p.
- Mohammedi, Z. & Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* L. Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 609-615.
- Moradi, M., Tajik, H., No, H.K., Rohani, S.M., Oromiehie, A.R. & Ghasemi, S. (2010). Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. *Journal of Chitin and Chitosan*, 15, 35-45.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J. & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 477-484.
- Navarro-Tarazaga, M.L., Sothornvit, R. & Pérez-Gago, M.B. (2008). Effect of plasticizer type and amount on hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible film properties and postharvest quality of coated plums (cv. Angeleno). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9502-9509.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K. & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 823-837.
- Oboh, G., Raddatz, H. & Henle, T. (2008). Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2486-2492.
- Olivas, G.I. & Barbosa-Cánovas, G. (2009). *Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables*. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Huber, K.C. & Embuscado, M.E. (Eds.). Springer. New York. p. 211-244.
- Ozen, T., Demirtas, I. & Aksit, H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124, 58-64.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J.F. & Gonzalez-Aguilar, G.A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76, R6-R15.

- Paulo, A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A., Costa, M., Teixeira, A. & Mota-Filipe, H. (2008). The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on oral glucose tolerance in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 539-543.
- Pavlath, A.E. & Orts, W. (2009). *Edible Films and Coatings: Why, What and How? In* Edible Films and Coatings for Food Applications. Huber, K.C. & Embuscado, M.E. (Eds.). Springer. New York. p. 1-23.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A. & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32-41.
- Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer, M.A. & Calderón, A.A. (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, 130, 362-369.
- Perron, N.R. & Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75-100.
- Perumalla, A.V.S. & Hettiarachchy, N.S. (2011). Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44, 827-839.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. & Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.
- Pimenta, A.C. (2012). *Extractos aquosos de Pterospartum tridentatum L.. Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante*. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. Tese de Mestrado. 52 p.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M. & Ferreira, F.R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983-2989.
- Pinela, J., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I.C.F. (2012). Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples: effects of drying and oral preparation methods. *Food Chemistry*, 135, 1028-1035.
- Pokorný, J. & Trojáková M., L. (2001). *El uso de antioxidantes naturales en alimentos de origen vegetal. In: Antioxidantes de los alimentos*. Pokorny, J., Yanishlieva N. & Gorson M. - Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza.
- Pokorný, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food. Practical applications*. CRC Press, Boca Raton (USA).
- Ponce, A.G., Roura, S.I., del Valle, C.E. & Moreira, M.R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 294-300.
- Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S. & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1142-1145.
- Prado, A. (2009). *Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais*. Universidade de S. Paulo. Tese de Mestrado. 107 p.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. & Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1603-1616.
- Revajová, V., Pistl, J., Levkut, M., Marcin, A. & Levkutová, M. (2010). Influence of oregano and salvia extracts on lymphocyte subpopulation and functional activity of blood phagocytes and lymphocytes in chickens. *Food and Agricultural Immunology*, 21, 307-316.

- Riahi, L., Chograni, H., Elferchichi, M., Zaouali, Y., Zoghalmi, N. & Mliki, A. (2013). Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 46, 290-296.
- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 438-447.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Venere, D. & Salerno, M. (2002). Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67, 1862-1867.
- Sa, L., Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3, 1-16.
- Sabbe, S., Verbeke, W., Deliza, R., Matta, V. & Van Damme, P. (2009). Effect of a health claim and personal characteristics on consumer acceptance of fruit juices with different concentrations of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Appetite*, 53, 84-92.
- Sanchez-Gonzalez, L., Gonzalez-Martinez, C., Chiralt, A. & Chafer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98, 443-452.
- Sanchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. & Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 57-63.
- Schroeter, H., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C. & Williams, R.J. (2001). Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochemical Journal*, 358, 547-557.
- Scordino, M., Sabatino, L., Belligno, A., & Gagliano, G. (2011). Flavonoids and furocoumarins distribution of unripe chinotto (*Citrus × myrtifolia* Rafinesque) fruit: beverage processing homogenate and juice characterization. *European Food Research and Technology*, 233, 759-767.
- Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J. & Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
- Silva, V. (2009). Acção de extractos de *Pterospartum tridentatum* em ratinhos expostos a CCl<sub>4</sub>. Universidade de Aveiro. Tese de Mestrado. 67 p.
- Silva, M.A., Bierhalz, A.C.K. & Kieckbusch, T.G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736-742.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P.J.A., Gómez-Guillén, M.C. & Bifani, V. (2013). Natural additives in bioactive edible films and coatings: Functionality and applications in foods. *Food Engineering Reviews*, 5, 200-216.
- Siripatrawan, U. & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27, 102-108.
- Slusarczyk, S., Hajnos, M., Skalicka-Wozniak, K. & Matkowski, A. (2009). Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chemistry*, 113, 134-138.
- Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C.A., Bodirlau, R. & Armatu, A. (2011). Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Natural Product Research*, 25, 1657-1661.
- Stanojević, D., Comic, L.J., Stefanović, O. & Solujic-Sukdolak, S. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8, 109-115.

- Talavera, S. & Gibbs, P.E. (1996) in *Lagascalia*, 18, 266.
- Taqi, A., Askar, K.A., Mutihac, L. & Stamatin, I. (2013). Effect of *Laurus nobilis* L. oil, *Nigella sativa* L. oil and oleic acid on the antimicrobial and physical properties of subsistence agriculture: the case of cassava/pectin based edible films. *Food and Agricultural Immunology*, 24, 241-254.
- Tarabella, A. & Burchi, B. (2012). The role of nutrition and health claims in consumers perception. Creating educational paths to resolve information asymmetries caused by promotion and marketing activities regarding foodstuffs. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 46, 2173-2177.
- Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M. & El-Elmat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian species. *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.
- Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D. & Senatore, F. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 238-243.
- Tylkowski, B., Trusheva, B., Bankova, V., Giamberini, M., Peev, G. & Nikolova, A. (2010). Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 348, 124-130.
- Vargas, M.; Pastor, C.; Chiralt, A.; McClements, D.J. & González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 48, 496-511.
- Velickova, E., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Alves, V.D. & Moldão-Martins, M. (2013). Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 52, 80-92.
- Vítor, R., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A., Teixeira, A. & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 363-370.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y. Fernandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J.A. (2009). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Food Science*, 73, 117-124.
- Vu, K.D., Hollingsworth, R.G., Leroux, E., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44, 198-203.
- Wang, H., Cao, G. & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.
- Wang, S., Marcone, M.F., Barbut, S. & Lim, L-T. (2012). Review: Fortification of dietary biopolymers based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*, 49, 80-91.
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J. & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32, 35-41.
- Weiss, A. (2012). Development of edible coatings and films based on hydrocolloid blends with polyphenol-rich extract: rheology and functionality. Universidad de la Frontera. Chile. Doctoral Thesis.
- WHO (2011). *Global status report on noncommunicable diseases*. Report downloaded from [whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf) 9 January, 2012.
- Williamson, G. & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 243s-255s.
- Willk. & Lange (1880). *Prodr. Fl. Hisp.* 3, 441.
- Wills, J.M., Bonsmann, S.S.G., Kolka, M. & Grunert, K.G. (2012). European consumers and health claims: attitudes, understanding and purchasing behaviour. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71, 229-236.

- Wolfe, K.L. & Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676-1683.
- Wootton-Beard, P.C. & Ryan, L. (2011). Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44, 3135-3148.
- Yadav, S.A., Raj, A.J. & Sathishkumar, R. (2012). *In vitro* antioxidant activity of *Barleria noctiflora* L. f. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, S716-S722.
- Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Kirima, K., Kyaw, M., Suzaki, Y. & Tamaki, T. (2001). Quercetin inhibits Shc- and Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun Nterminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*, 60, 656–665.
- Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T. & Mohamed, B. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 43, 412-419.
- Zúñiga, G.E., Junqueira-Gonçalves, M.P., Pizarro, M., Contreras, R., Tapia, A. & Silva, S. (2012). Effect of ionizing energy on extracts of *Quillaja saponaria* to be used as an antimicrobial agent on irradiated edible coating for fresh strawberries. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 64–69.



***Estudo etnobotânico de carqueja***

---



## 2. Estudo etnobotânico de carqueja

---

### Objetivo

Este estudo surgiu da necessidade de aprofundar o conhecimento da espécie sobre a qual incidiu a presente investigação e, simultaneamente, tentar recuperar e registar o saber tradicional que, dadas as novas conjunturas socioeconómicas, poderão condicionar a sua transmissão e a manutenção dos habitats naturais e agrossistemas. Pretende-se pois, conservar o conhecimento etnobotânico desta espécie, valorizar o seu uso e incentivar a conservação dos recursos biológicos destes locais da Beira Interior, o que poderá ajudar na gestão do património natural numa tentativa de encontrar soluções para um desenvolvimento rural mais sustentável.

### 2.1. Considerações gerais sobre etnobotânica

A Etnobotânica surgiu como disciplina académica a partir de 1896, pelo botânico americano John W. Harshberger, que numa publicação intitulada “*The purposes of Ethnobotany*”, consagrou este termo para englobar “os estudos relativos ao uso das plantas pelos povos aborígenes e primitivos” (Gomes, 2009).

Schultes & Von Reis (1995), Alexiades (1996) e Carvalho (2005) definem a etnobotânica como uma ciência interdisciplinar que agrega objetivos, conceitos e metodologias de diversas disciplinas como a antropologia, a etnografia, a história, a botânica ou a farmacologia, tendo como âmbito a perceção, uso e gestão do universo vegetal num determinado contexto cultural.

O termo “etnobotânica”, de um modo geral, é definido como o estudo das interações entre plantas e pessoas. No entanto, o termo é muitas vezes usado em relação ao estudo da utilização de plantas por pessoas antes do início da industrialização. As plantas sempre desempenharam um papel central em diferentes culturas e o conhecimento de determinadas espécies úteis é a chave para uma adaptação cultural com a finalidade de conseguir viver bem em determinados ecossistemas. Assim, o estudo do uso da planta também pode revelar muito sobre as sociedades do passado (Bill Freedman, 2008).

Desde sempre os diferentes povos foram selecionando as plantas úteis, pela observação e pela experimentação, através do método da tentativa e erro, para suprir as necessidades alimentares, de vestuário, de construção de habitações, de combustíveis, de fabrico de utilidades domésticas, de produção de objetos de arte e adorno, de produção de venenos para a caça e de preparação de remédios, entre outras. O conhecimento empírico

de substâncias medicinais e do seu potencial tóxico foi passando tradicionalmente por via oral através de gerações, sendo estas metodologias também integrantes do método científico ocidental (Gomes, 2009).

O Homem desde sempre utilizou os produtos naturais, em particular as plantas, como meio de tratamento das suas doenças e, ainda hoje, o emprego de medicamentos à base de plantas é muito importante em algumas regiões do mundo (Índia, China e em muitos países de África). O estudo sistemático dos produtos naturais tem hoje uma importância enorme e, no caso das plantas, em relação ao seu uso tradicional no combate às doenças, tem originado uma pesquisa importante, não só em regiões tropicais, mas também em zonas rurais de povos mais evoluídos. A recolha de informações sobre o uso tradicional faz hoje parte de programas que têm a colaboração de pessoas que ainda retêm dados sobre esse uso tradicional mas também botânicos, farmacologistas e farmacognosistas. De destacar o importante emprego das plantas na terapêutica nos países em desenvolvimento, onde a população devido não só ao elevado preço dos medicamentos clássicos, mas à sua ligação a costumes ancestrais, continua a usá-las como principal medicamento. Este facto tem levado a Organização Mundial de Saúde a promover reuniões internacionais e a propor diretivas no sentido de que este tipo de medicamentos tenha maior qualidade, segurança e eficácia (Gomes, 2009).

No passado, o uso das plantas na medicina caseira era muito comum e para muitas populações seria a única forma de acesso a meios de cura. Hoje em dia, nas sociedades ditas mais desenvolvidas, é relativamente fácil o acesso à chamada Medicina Convencional e a muitos e variados fármacos, assumindo a medicina popular um papel secundário.

A Etnobotânica assume grande importância no mundo atual pois a maioria dos alimentos consumidos são direta ou indiretamente derivados de plantas. Similarmente, muitos medicamentos são produzidos a partir de plantas e a própria madeira é um material importante na construção e em produtos manufaturados. Parece, portanto, haver uma dependência intrínseca entre pessoas e plantas quer vivam em modernas cidades ou vivam em selvas tropicais (Bill Freedman, 2008).

No caso dos países ocidentais, o comércio de fármacos e produtos terapêuticos de origem vegetal tem aumentado, à medida que aumenta a procura de metodologias alternativas para combater as enfermidades resultantes, pelo menos parcialmente, do desenvolvimento tecnológico e da complexidade social da civilização ocidental. Provavelmente, o maior contributo económico que os estudos etnobotânicos podem dar à sociedade e à ciência ocidental reside na área da farmacologia. A indústria farmacêutica ocidental utiliza matérias-primas de origem vegetal cuja descoberta foi inicialmente feita por curandeiros, dentro dos sistemas tradicionais de exploração e gestão dos fito-recursos (Carvalho, 2006).

Algumas das mais importantes substâncias bioativas da medicina ocidental, como a atropina, a efedrina, a tubocuranina, a digitalina ou a reserpina, foram introduzidas após estudos desenvolvidos a partir da medicina popular. A indústria farmacêutica ainda utiliza produtos derivados de plantas (morfina, taxol, quinidina) como protótipos experimentais para a síntese de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos (Myers, 1983; Farnsworth, 1988). A reserpina, a digitalina, o ácido salicílico e o curare representam quatro substâncias ativas de importância superior para a farmacopeia ocidental e indígena.

Um aspeto da multidisciplinaridade que necessita ser aprofundado é o estudo químico das plantas medicinais e psicoativas *in situ* já que a maioria das análises químicas são feitas com plantas secas. A química das plantas secas é, frequentemente, diferente da encontrada no material fresco ou na decocção de misturas de plantas (em geral frescas) preparadas pelas comunidades tradicionais onde a fitoterapia é utilizada. Por outro lado, a análise individual das plantas não permite estudar as reações que têm lugar quando os compostos químicos provenientes de diferentes plantas se misturam e interagem (Prance, 1995).

No nosso país ainda existe um vasto manancial de conhecimentos acerca dos usos populares e tradicionais das plantas, embora a utilização das plantas em remédios caseiros seja uma prática cuja importância vai diminuindo, mesmo nas comunidades rurais. Hoje em dia tem-se maior facilidade na assistência médica e existe um progressivo afastamento do modo de vida rural pelo que as pessoas não sentem necessidade, interesse e incentivo para aprender os saberes ancestrais dos usos dos recursos vegetais. Desta forma, os saberes tradicionais, que são parte integrante do património cultural de um povo, tendem a extinguir-se a médio prazo. Torna-se assim importante fazer o máximo de recolhas etnobotânicas enquanto ainda é tempo (Figueiredo *et al*, 2007).

O desenvolvimento científico da etnobotânica inicia-se com a inventariação dos conhecimentos tradicionais relativamente aos diferentes usos dados às plantas, sejam espontâneas ou cultivadas, de modo a não se perder informação ou porque esses recursos naturais se podem degradar ou desaparecer por alterações introduzidas que não respeitem a conservação das espécies. Esta colheita de dados é designada de inquérito etnobotânico e deverá incidir sobre todo o processo relativo à utilização das plantas usadas, tais como, nome tradicional local, parte da planta utilizada, uso em fresco ou seco, método de secagem, modo de preparação da receita tradicional, modo de administração, doses aproximadas e se são conhecidos efeitos adversos ou contraindicações. Este tipo de inquérito deverá ser acompanhado de colheita de material vegetal para realização de estudos botânicos (herbário) e possivelmente para estudos laboratoriais (Gomes, 2009).

Em Portugal, apenas nos últimos anos se iniciaram estudos etnobotânicos com metodologia científica, contrariamente a outras regiões do globo (Figueiredo *et al.*, 2007).

O interesse na etnobotânica aumentou substancialmente a partir dos anos 90 e a partir de 2000 muitas universidades a nível mundial começaram a oferecer programas nesta área. Além disso, a indústria farmacêutica continuou a investigação em plantas utilizadas por culturas indígenas em busca de novos medicamentos mais eficazes (Dupler, 2011).

A nível mundial, estão a realizar-se cada vez mais estudos etnobotânicos e cerca de 40% desses estudos estão a ser conduzidos na América do Norte, mas também no Brasil, Colômbia, Alemanha, França, Inglaterra, Índia, China e o Quênia (Dupler, 2011).

A recolha de informação etnobotânica resulta da combinação de métodos distintos e dirigidos a determinados informantes, tendo em conta as características das comunidades e dos indivíduos, assim como as possibilidades e as limitações das técnicas de recolha empregues (Alexiades, 1996).

O método mais utilizado pelos etnobotânicos ibéricos para a recolha direta dos conhecimentos no campo tem sido a “entrevista etnobotânica” (Carvalho, 2005; Camejo-Rodrigues, 2006), podendo optar por um inquérito com questionário ou pela conversa informal (Camejo-Rodrigues, 2006). Esta entrevista é uma etapa fundamental da investigação etnobotânica, durante a qual se recolhem os elementos para posterior análise e avaliação. Segundo Heinrich *et al.* (2009), a recolha dessa informação etnobotânica deve obedecer a requisitos mínimos de ordem ética e metodológica já que é necessário um suporte de modo a serem respeitados certos padrões facilmente reconhecidos pela comunidade científica nacional e internacional. Esta recolha de informação etnobotânica baseia-se no cruzamento de métodos e técnicas características de várias áreas científicas, como por exemplo, a botânica, a ecologia, a antropologia, a fitofarmacologia e a estatística (Martin, 1995; Alexiades, 1996).

## **2.2. Recolha de informação etnobotânica**

A entrevista, nas suas variadas formas, constitui a base de recolha de dados em etnobotânica e consiste num processo dinâmico envolvendo duas ou mais pessoas numa conversa conduzida de uma forma simples. O modo como decorre a entrevista, como são construídas e apresentadas as questões e como são guardadas as respostas pode ter um impacto significativo na qualidade, quantidade e no significado dos dados recolhidos. Deve-se tentar conhecer as regras locais de conversação, ter uma postura correta, estabelecer um contacto visual com o entrevistado, ser simpático e calmo, entre outras. A pessoa que recolhe a informação deverá desenvolver sensibilidade e respeitar os indivíduos quando estes apresentam uma certa vergonha ou sejam renitentes na resposta a determinados

assuntos. A arte de entrevistar depende do balanço delicado entre curiosidade e respeito tentando encontrar um equilíbrio entre o interesse em recolher informação e a quantidade de questões a formular. Por vezes, a melhor informação é obtida depois de um período longo de conversação em que já se estabeleceu uma confiança mútua entre as duas partes (Alexiades, 1996). O tempo excessivo de entrevista também poderá ter inconvenientes já que a tendência dos informantes é falar de outros temas, desviando a conversa, até porque em zonas rurais o povo mantém a crença de que se deve manter em segredo certos conhecimentos sobre as plantas silvestres e sobre os remédios ou mezinhas realizados com essas plantas. O entrevistador deverá conduzir a entrevista evitando os desvios do tema, mas deixando fluir a conversa em tom casual utilizando uma linguagem simples e adequada à linguagem dos informantes.

O investigador não deve colocar perguntas que já contêm a resposta, pois pode conduzir o informante a confirmar determinado pressuposto que o investigador acredita ser o indicado e viciar os resultados da entrevista e a qualidade final da informação. Como regra geral, os informantes também não devem ser sujeitos ao contraditório, o que não significa que, por vezes, não seja necessário o uso de questões adequadas e necessárias à clarificação de algumas informações que o inquirido forneceu (Alexiades, 1996). Em situações em que o informante mantém um discurso ininterrupto, a entrevista deverá ser conduzida com a necessária diplomacia ditada pelas circunstâncias e pelo bom senso. No decurso da entrevista, o investigador também não deve interromper a resposta do informante, pois a interrupção pressupõe uma impaciência latente e a necessidade de uma intervenção subsequente, o que nunca é justificável numa entrevista etnobotânica. A interrupção é uma manifestação de desrespeito, que pode originar uma quebra de empatia entre os intervenientes (Whyte, 1982). Durante a entrevista, o investigador não deverá, direta ou indiretamente, manifestar a sua desaprovação ou qualquer outro tipo de julgamento do informante ou da informação que o mesmo lhe fornece, já que nas áreas rurais, existe a convicção de que a cultura urbana, e os seus representantes, questionam as tradições rurais com um elevado número de preconceitos. A manifestação de excessivo interesse, deverá também ser evitada, para não comprometer a recolha de informação que se pretende empreender (Alexiades, 1996).

O ponto de partida para a realização das entrevistas numa dada comunidade deverá iniciar-se com uma visita prévia informal, acompanhada de pessoas do local ou bem conhecidas da zona e possuidoras das informações mais relevantes. Durante esta visita, o entrevistador deverá apresentar-se e explicar os motivos e os objetivos do trabalho bem como marcar as referidas entrevistas (Carvalho, 2005).

Depois do primeiro contacto com a comunidade, o entrevistador deverá organizar um guião da entrevista (Carvalho, 2005) ou do inquérito que poderá ser dinâmico se nas

questões colocadas surgirem outros itens não considerados inicialmente mas que se revelem importantes.

Segundo Carvalho (2005) do guião da entrevista deverão constar, entre outros, os seguintes itens:

- **Identificação do informante**

Deverá ser indicado o nome, idade e sexo, estado civil, escolaridade, profissão e a história de vida na aldeia.

- **Utilização das plantas**

**Medicinal - Indicações**

- Aparelho circulatório (circulação, hipertensão, colesterol, coração, hemorragias).
- Aparelho digestivo (espasmos, flatulência, diarreia, prisão de ventre, parasitas, purgantes, vomitórios, hemorroidas, estômago, higiene bucal, digestivos, outra).
- Aparelho respiratório (constipação, catarro, tosse, inflamações garganta, gripe, pneumonia, asma, dificuldades respiratórias, outra).
- Aparelho excretor (diurético, vias urinarias, doenças renais).
- Reumatismo, dores musculares, articulações.
- Aparelho reprodutor (abortivo, contraceptivo, ciclo menstrual, parto, aleitamento, menopausa, doenças ginecológicas femininas e masculinas).
- Doenças e acidentes dermatológicos. Picada de insetos e irritação provocada por plantas; mordeduras de cobra, cães, lobos; calos e calosidades, furúnculos e verrugas, acne, feridas e cortes; desinfetantes, cicatrizantes.
- Doenças oftalmológicas (inflamações, treçolhos).
- Doenças metabólicas (diabetes, ácido úrico, febre, avitaminoses, fígado, vesícula).
- Problemas do foro neurológico (depressão, enxaqueca, dor de cabeça, estimulante, calmante).
- Suplementos vitamínicos.
- Panaceias.

**Alimentação humana**

- Temperos, adobes, cura.
- Saladas, sopas e pratos cozinhados.
- Merendas e “mata-bicho”.
- Produção de pão, cuscus, folares, biscoitos e bolos.



- Produção de compotas e doces, marmelada, geleias, sobremesas, guloseimas.
- Produção de vinho e aguardente.
- Conservas doces e salgadas.
- Bebidas e licores.
- Suplementos alimentares.
- Tisanas.

- **Informação específica sobre a planta citada**

#### **Estatuto**

- Silvestre.
- Cultivada (adquirida, trocada ou propagada, trazida da serra/lameiro/mato).
- Introduzida.
- Autóctone.

#### **Local de colheita ou de ocorrência**

- Horta, quintal, pátio.
- Serra, bosque.
- Matos.
- Rio, ribeira.
- Campos cultivados
- Lameiros

#### **Parte consumida ou colhida**

Raiz, caule, folha, fruto, semente, ramos, gomos, rebentos, parte aérea, toda a planta, exsudados.

#### **Tipo de utilização**

Infusão, decocção, aplicação direta, maceração, emplastro, outra.

#### **Processamento**

Manuseio das plantas para os diferentes modos de aplicação, tempo, processo e ingredientes (mel, azeite, sebo, álcool, outro) de preparação.

## **Outras informações**

Época de colheita. Modo de conservação. Gastronomia. Receituário. Tradição.

Não obstante este guião de entrevista ser muito completo alguns autores ainda lhe acrescentam outros pontos, tal como Alexiades (1996), que considera que também se deverá questionar outro tipo de informação etnobotânica, como por exemplo, o nome comum da planta, mas tendo em atenção que é necessário distinguir entre o nome atribuído à planta inteira e o nome atribuído a determinada parte da planta, órgão ou produto. No sentido da identificação da planta também será importante o modo como o informante reconhece a mesma, se varia nas suas propriedades ou características e até aspetos relacionados com a colheita, tais como a parte colhida, quem, como, quando e onde colhe, como armazena, entre outros (Alexiades, 1996).

Algumas informações também podem ser obtidas de forma casual, devido a comentários informais e visitas inesperadas de vizinhos, familiares ou amigos que se vão juntando à conversa.

A recolha de informação pode basear-se em entrevistas, mas segundo Carvalho (2005) também se poderá basear em:

- Observação participante, observando os informantes no seu trabalho e mantendo com eles uma convivência próxima com a finalidade de estimular e intensificar as relações pessoais facilitando a comunicação.
- Discussões de grupo, com a finalidade destas reuniões proporcionarem trocas de informação, esclarecimento de algumas questões, conhecimento de lugares de colheita das plantas silvestres, entre outros.
- Confrontação da informação com dados sobre plantas herborizadas ou colhidas pelo investigador ou por este em conjunto com o informante ou colaborador, a fim de identificar corretamente a espécie.
- Recolha de testemunhos que facilitem a identificação botânica e que documentem usos e aplicações das plantas (Martin, 1995; Alexiades, 1996)

No decorrer dos estudos desenvolvidos no campo, há muitas variáveis com as quais o investigador interage e para as quais terá que estar preparado para dar resposta em tempo útil. Estas variáveis podem estar enquadradas nas dificuldades naturais inerentes à natureza dos estudos etnobotânicos mas nem sempre são previsíveis. Segundo Carvalho (2006) estas situações resultam do facto de o informante ser em si mesmo um intérprete e, como tal, a informação que fornece ao investigador ser já uma interpretação que o mesmo fez da realidade, ou seja, durante a recolha da informação, o investigador não é a única

entidade que interpreta a informação. Assim sendo, toda a informação recolhida é uma interpretação efetuada pelo investigador mas também o resultado da interpretação e seleção realizada pelo informante. Por este motivo, há que proceder à seleção adequada dos informantes para que toda a informação recolhida seja a mais fiel à tradição local (Carvalho, 2006).

Para início dos trabalhos de recolha de informação, o investigador deverá promover a discussão de temas mais comuns e consensuais para criar empatia entre ambos, fortalecendo a relação, para posteriormente possibilitar a abordagem de outros tópicos mais sensíveis, mas referindo periódica e claramente quais os seus objetivos e as suas motivações. O investigador deverá desenvolver uma atitude modesta para com o informante e reconhecer que este é o detentor da informação e, como tal, mais conhecedor do tema. Este princípio orientador ao longo do trabalho permitirá uma boa prossecução dos trabalhos, mantendo um excelente relacionamento e um posicionamento ético humanista (Alexiades, 1996).

A seleção dos informantes geralmente é feita de forma não aleatória, iniciando por contactos fornecidos por técnicos de entidades públicas, tais como Juntas de Freguesia, Instituto da Conservação da Natureza, entre outras. A procura de informantes em locais sem contactos prévios costuma iniciar-se em locais públicos como lares da terceira idade, mercados locais, cafés e restaurantes (Novais *et al.*, 2004; Carvalho, 2005). Normalmente os informantes são pessoas reconhecidas pela população local como detentores da informação, não obstante que não sejam ouvidos os contactados aleatoriamente. Os contactos iniciais também podem produzir uma rede de outros contactos que possibilitam chegar a informantes que, originalmente, não tenham sido referenciados por nenhum grupo.

Segundo Carvalho (2005) o informador idóneo é todo aquele que sendo oriundo ou vivendo na zona há pelo menos dez anos, tenha referido informação relevante sobre o conhecimento e uso tradicional das plantas. Para o mesmo autor podem-se definir três tipos de informantes:

- Informantes-chave (já reconhecidos por Alexiades (1996)), pessoas que pelas suas qualidades, interesses e amplos conhecimentos sobre as plantas são considerados pelos vizinhos especialistas na matéria;
- Informantes gerais, aqueles que não são informantes-chave nem fortuitos;
- Informantes fortuitos, aqueles que têm uma participação esporádica.

Após a obtenção da informação no campo, os dados etnobotânicos podem também ser complementados através de pesquisa bibliográfica, estudo de coleções em museus e herbários e em estudos arqueológicos de achados que demonstrem alguma evidência da relação do homem com as plantas no passado (Jain, 1987). Estes métodos possibilitam a

redescoberta de plantas usadas em tempos passados na agricultura e que poderão eventualmente ser reintroduzidas.

No final, a validação da informação etnobotânica é fundamental para obter dados representativos e fidedignos. No decorrer dos inquéritos/entrevistas os informantes poderão não revelar toda a informação que detêm, de uma forma voluntária ou involuntária e, por vezes, o seu estado emocional e personalidade, a sua vontade de agradar ao entrevistador, entre outros fatores, podem eventualmente originar incorreções na informação.

Para confirmar a validade da informação podem-se seguir várias técnicas, nomeadamente, testá-la através da triangulação, ou seja, colocando a mesma questão a vários informantes, sob diferentes formas, em distintas etapas da investigação (Whyte, 1982).

Segundo Alexiades (1996) a metodologia mais fiável para validar a informação é a observação no campo feita pelo investigador junto do informante, sobre o uso da planta para determinado fim. A grande vantagem de ser no campo é a do informante reconhecer as plantas no seu ambiente natural, podendo-se realizar registos fotográficos, colher exemplares para herborizar, levando o informante a identificar a planta convenientemente e a entrevista em si poderá levar à descoberta e à discussão de novas questões importantes.

Os estudos de etnobotânica, atualmente, pretendem valorizar mais os aspetos quantificáveis por se entender serem mais fiáveis que os aspetos de carácter qualitativo, embora esta quantificação possa simplificar a realidade e conduzir a conclusões falsas. De qualquer forma é consensual que a quantificação dos dados é uma forma de avaliar e comparar os dados etnobotânicos (Carvalho, 2005).

Na bibliografia verifica-se que os diversos autores apresentam diferentes métodos de tratamento quantitativo dos dados etnobotânicos, na tentativa de melhorar os aspetos menos favoráveis de determinados métodos já utilizados. Carvalho (2005) cita os métodos de tratamento quantitativo de dados propostos por Zent (1996), considerando-os dispendiosos, morosos e demasiado intrusivos na vida quotidiana dos informantes. Outros autores como Begossi (1996) e Amorozo (2002) utilizam índices de diversidade, considerando como ferramentas de medida da diversidade, por exemplo, a riqueza etnobotânica que expressa o número de espécies por unidade de área, o número de informantes por espécie ou a frequência de citação de um determinado uso.

Carvalho (2006), no registo das informações não utilizou critérios quantitativos estritos, ou seja, algumas das informações que considerou mais relevantes foram apenas referidas por um número restrito de informantes, considerando que a etnobotânica é uma ciência em que o domínio qualitativo da informação é de superior importância. O mesmo autor refere que algumas informações foram referidas por indivíduos que são os últimos representantes de uma profissão, ou de uma atividade, o que lhes permite ter um

conhecimento privilegiado sobre o uso de algumas plantas, pelo que considera importante não ignorar informação, já que se pode tratar da última referência de usos e saberes que se estão a perder. Outros autores consideram válidos apenas os resultados fornecidos por mais de três informantes (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Novais *et al.*, 2004).

No que respeita à informação relativa aos usos das plantas, esta pode-se agrupar de forma artificial em categorias e subcategorias para permitir o ordenar e associar dados. Vários autores (Blanco y Morales, 1994; Cook, 1995) propõem diferentes formas de classificar e hierarquizar os usos das plantas que podem facilitar o agrupar de plantas com a mesma utilidade bem como a comparação entre zonas distintas. No trabalho de Carvalho (2005) o autor refere que o planeamento dessas categorias foi sendo alterado no decorrer do trabalho e que tentou evitar a complexidade do sistema de Cook (1995) ou a simplificação restritiva da classificação definida na proposta do Grupo de Etnobotânica Ibérica para o catálogo da Etnoflora Ibérica 1997.

### 2.3. Utilização da carqueja

Em estudos etnobotânicos sobre o património natural transmontano Ribeiro *et al.* (2000) referenciam a carqueja como aconselhada para constipações, dores de estômago, problemas digestivos e intestinais, problemas de fígado, inflamações da vesícula biliar, para dissolver cálculos biliares, doenças de rins, bexiga e reumático.

Rodrigues (2001), no trabalho “Contributo para o estudo etnobotânico das plantas medicinais e aromáticas no parque natural da Serra de S. Mamede” atribui à carqueja:

- Uso medicinal para constipações, gripe, tuberculose, pneumonia, catarral, inflamações, pressão arterial, tosse, colesterol, bronquite, má disposição, estômago, barriga, diabetes;
- “Para todos os males do organismo”;
- Uso como condimentar nos pratos de coelho com os raminhos.

Camejo-Rodrigues (2003), no estudo realizado no Parque Natural da Serra de S. Mamede, refere que a carqueja é utilizada no tratamento de problemas, tais como: frio, gripe, tosse, mal-estar e problemas de estômago.

Novais *et al.* (2004), no trabalho “Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park (Portugal)”, refere o uso popular da carqueja como hipoglicemiante, anti-hipertensivo, anti-hipercolesterolémico, digestivo, para constipações, antitússico, circulação sanguínea, protetor hepático, analgésico gástrico, anti-inflamatório intestinal, para a gota, para o ácido úrico, sedativo, antiespasmódico renal e cicatrizante.

Oliveira (2004), no relatório de fim de curso “Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural da Serra da Estrela”, referencia a carqueja para fins medicinais, tais como: analgésico, antipirético, aparelho respiratório, cardiovascular, digestivo, sistema endócrino e nervoso. Para usos não medicinais a carqueja é utilizada como condimentar/alimentar.

Carvalho (2005), no seu catálogo etnobotânico realizado no Parque Natural de Montesinho (Nordeste de Portugal), atribui-lhe os seguintes usos:

- Medicinal: aparelho respiratório, dores de cabeça, sistema nervoso, diabetes, aparelho excretor, hipertensão, afeções do coração, xarope para a tosse, dermatologia e panaceia, analgésico, calmante e relaxante, anti-inflamatório, diurético, hipotensor, cardiotónico, antisséptico e balsâmico;
- Industrial e artesanal: combustível;
- Agropastorícia: pastos de caprinos e ovinos; cama para o gado, fertilizantes, queima;
- Alimentação humana: condimento de caça, coelho e galinhas domésticas. Verdura para arroz;
- Alimentação animal: caules e rebentos tenros. Melíferas.

Camejo-Rodrigues (2006), no seu catálogo de plantas com usos medicinais, realizado no Algarve, nos concelhos de Aljezur, Lagos e Vila do Bispo, atribui-lhe os seguintes usos: para o colesterol, diabetes, constipações, gripe, baixar a tensão, sangue, rins, ácido úrico, coração, estômago, criar sangue novo, fígado, vesícula, vias urinárias, diabetes e hemorroidas.

Frazão-Moreira (2008), no estudo de “Etnobotânica do Nordeste Português: saberes, plantas e usos”, referencia o uso da carqueja na aldeia do Parque Natural de Montesinho como combustível, medicinal, condimentar e para alimentação animal.

Na região da Beira Interior, em especial nos concelhos de Penamacor, Sabugal, Fundão e Oleiros, onde incidiu o nosso estudo, a carqueja é muito popular e muito utilizada como medicinal, condimentar e alimentar mas as referências quanto à sua utilização são escassas. Assim sendo, pretendeu-se recolher informação ainda existente sobre a carqueja, contribuindo para conservar o património natural bem como valorizar esta espécie tão popularmente conhecida nestes locais.

## 2.4. Materiais e métodos

### 2.4.1. Área de estudo e recolha de informação

A recolha de informação para o estudo etnobotânico da espécie *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. efetuou-se entre os concelhos de Penamacor, Sabugal, Fundão e Oleiros.

Foram envolvidos dois tipos de interlocutores: os que foram reconhecidos pela população local como detentores da informação e aqueles que foram contactados aleatoriamente em locais públicos, como cafés, praças, quintais, etc. A localização dos informantes do primeiro grupo foi feita por contactos prévios com as Junta de Freguesia, Lar de idosos e através de alunos da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, que disponibilizaram o contacto de avós ou familiares mais idosos, cuja vida quotidiana está ligada às práticas agrícolas e a um modo de vida com ligações muito fortes a práticas tradicionais ou, mesmo não mantendo essas práticas as mantinham presentes na sua memória por terem sido utilizadas pelos seus antepassados. Foram também incluídos informantes que no momento da recolha de informação se encontravam a trabalhar junto do indivíduo inquirido e que referiram aspetos que foram considerados interessantes, e que não deveriam ser rejeitados já que completavam informações lacunosas de alguns informantes, numa tentativa da informação ser o mais fiel às tradições locais.

As saídas de campo realizaram-se em dias de semana mas também aos fins de semana, feriados ou dias de festa nas aldeias, tendo-se iniciado no final de 2011 e estendendo-se a 2012. O registo da informação teve lugar sempre que possível durante a realização de algumas atividades dos informantes, tais como, a alimentação dos animais, na rega das suas hortas, na eliminação de infestantes ou até em locais públicos onde estavam sentados ao sol a conversar ou mesmo à porta de casa comentando o dia-a-dia com familiares e vizinhos.

Neste estudo foram incluídos 107 informantes, com os quais foi efetuada uma breve apresentação no início do contacto, seguida de um esclarecimento dos objetivos e do modo como o informante poderia ajudar mas também quais os pontos do inquérito que podiam ser revelados ou quais consideravam como pessoais. Para criar um clima de empatia foi referido à pessoa em causa que tinha sido referenciada pela comunidade como sendo detentora de conhecimentos tradicionais de qualidade e em quantidade sobre esta espécie específica, sempre com vista à sua valorização e conservação.

A metodologia empregue neste estudo segue as recomendações de alguns autores (Alexiades, 1996; Camejo-Rodrigues, 2006; Carvalho, 2006) e a recolha da informação foi

realizada através de um inquérito/entrevista (Anexo 1) elaborado previamente, no qual foram solicitadas informações sobre a caracterização do informante, conhecimento da planta e seus usos.

Para o inquiridor foi elaborado um guião (Anexo 2) com as ideias e temas a serem abordados por todos os participantes durante as entrevistas com a finalidade de recolher o máximo de informação possível.

As questões colocadas foram simples e claras bem como adaptadas à realidade cultural dos locais e, sempre que possível, a informação foi recolhida no decorrer das atividades quotidianas do informante. Como já foi referido, nesses locais, por vezes, juntavam-se outros indivíduos que forneciam informação, permitindo que a mesma fosse avaliada pelos presentes e muitas vezes discutida entre todos, o que permitiu aumentar a qualidade e a fiabilidade da informação recolhida. No entanto, alguma informação recolhida junto de informantes muito idosos teve de ser rejeitada, uma vez que o estado emocional e de saúde não permitiram o registo de informação fiável, já que as respostas foram muitas vezes contraditórias e o que afirmavam num momento era negado momentos depois.

Alguma da informação foi confirmada através da triangulação, ou seja, foram colocadas as mesmas questões a vários informantes, sob diferentes formas, a fim de assegurar a qualidade da informação.

#### **2.4.2. Tratamento dos resultados**

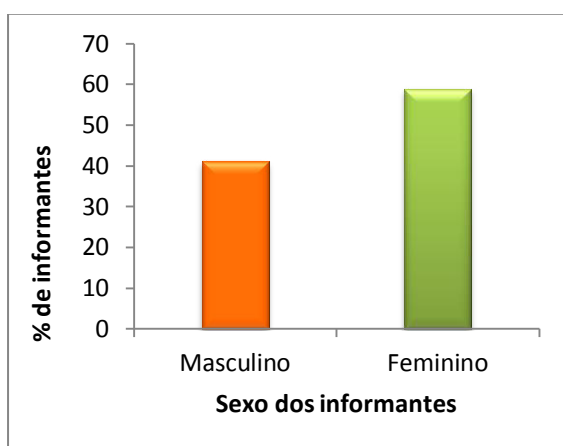
No tratamento dos dados foram usadas as ferramentas estatísticas incluídas no Excel, versão 2010. Considerando a metodologia utilizada e a natureza dos registos obtidos, foi realizada uma análise quantitativa, baseada em frequências de citações de um determinado parâmetro e percentagens. Para os dados relativos à caracterização dos informantes bem como para os conhecimentos sobre a planta e sua utilização, houve necessidade de agregar os dados por classes de informação (por exemplo: idade, habilitações, profissão, partes da planta colhida, locais de colheita, épocas do ano em que colhe, conservação, usos, preparação).



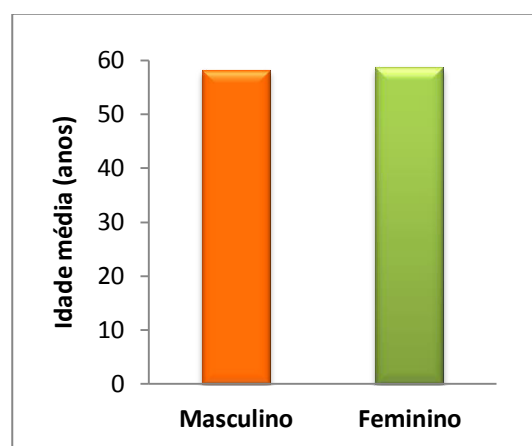
## 2.5. Resultados e discussão

### 2.5.1. Caracterização dos informantes

Dos 107 informantes, 41,1% pertencem ao sexo masculino (Fig. 2.1) com idade média de 58 anos (Fig. 2.2) e 58,9% ao sexo feminino (Fig. 2.1) com idade média de 59 anos (Fig. 2.2). A percentagem de mulheres é mais elevada já que nestes locais as mulheres são consideradas como detentoras de maior informação sendo esta espécie muito utilizada pelas mesmas. Tal como para Ribeiro (2013) também nos foi mais fácil selecionar as mulheres já que estas manifestam mais disponibilidade para serem inquiridas e conversar sobre o assunto.

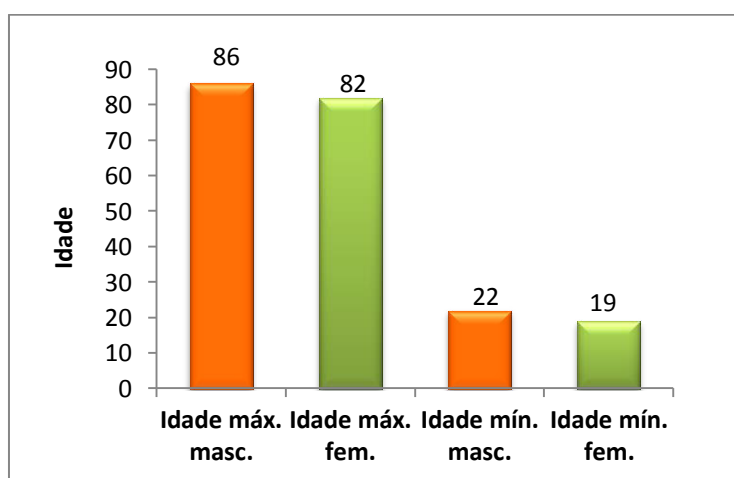


**Figura 2.1.** Sexo dos informantes.



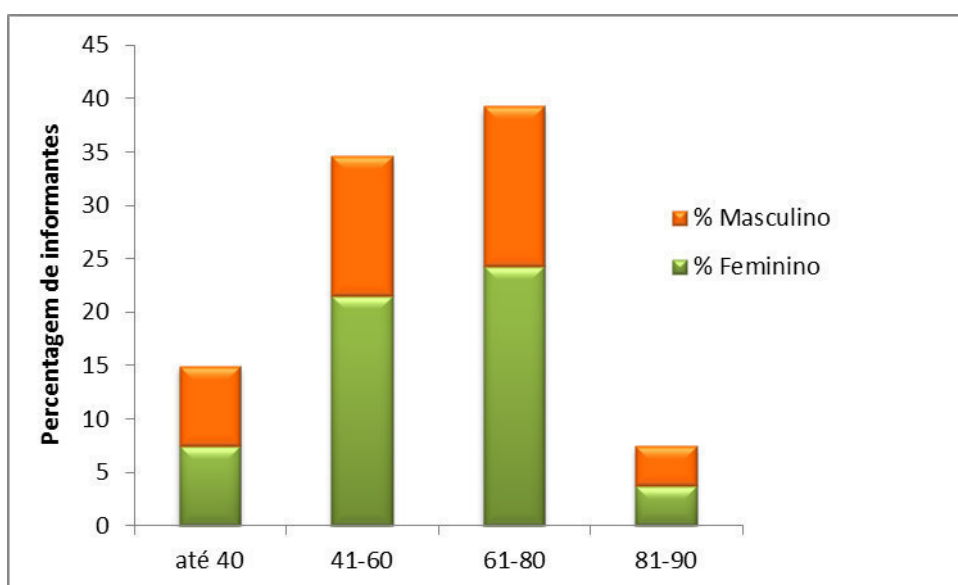
**Figura 2.2.** Idade média dos informantes para cada género.

O inquirido mais idoso possuía 86 anos e o mais novo 22 anos e a inquirida mais idosa possuía 82 anos e a mais nova 19 anos (Fig. 2.3).



**Figura 2.3.** Idade máxima e mínima dos informantes em cada um dos sexos.

Os informantes foram divididos por classes etárias verificando-se que as informações etnobotânicas estão fundamentalmente concentradas em pessoas com idades compreendidas entre os 61 e os 80 anos (39,3%) (Fig. 2.4), em que 24,3% são mulheres e 15,0% são homens. A faixa etária entre os 41 e os 60 anos representou 34,6%, em que 21,5% pertencem ao sexo feminino e 13,1% são informantes masculinos. Embora uma pequena percentagem dos inquiridos esteja inserida numa faixa etária abaixo dos 40 anos (15%), estes foram também considerados elementos com informação importante, em que os inquiridos femininos e masculinos representaram 7,5% cada. Cerca de 7,4% representaram uma faixa de informantes mais idosos, entre os 81 e os 90 anos, representados com 3,7% para cada género e 4 inquiridos não quiseram responder à questão da idade.



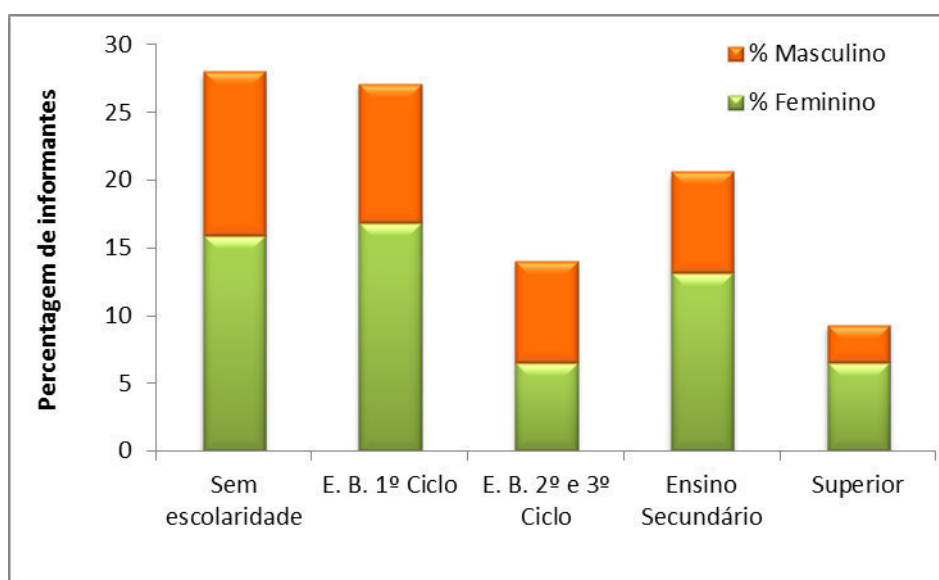
**Figura 2.4.** Escalões etários dos informantes.

De referir que nos locais onde se realizaram os inquéritos há problemas de desertificação humana e a população rural apresenta-se envelhecida e poderá, porventura, ser a última geração que ainda detém conhecimentos ancestrais de matriz etnobotânica. Algumas práticas quotidianas destas populações ainda incluem a utilização desta planta e ao que parece têm passado estes conhecimentos aos elementos mais novos da comunidade.

O perfil de informantes é semelhante ao perfil dos informantes de alguns trabalhos de etnobotânica realizados (Novais, 2002; Carvalho, 2005; Camejo-Rodrigues, 2006). A concentração da informação em pessoas mais idosas é comum em estudos etnobotânicos consultados (Agelet & Vallés, 2001, 2003a e 2003b; Pardo de Santayana, 2003; Novais, 2004) já que estas pessoas detêm um grande conhecimento empírico acumulado e uma grande experiência de vida.

Foram registadas outras variáveis sociológicas relativas aos informantes e, no que respeita à escolaridade, a grande maioria dos informantes, aproximadamente 55%, não tem escolaridade ou terminou o ensino básico - 1º ciclo (Fig. 2.5).

Dos informantes sem escolaridade (28%), 15,9% pertencem ao sexo feminino e 12,1% ao sexo masculino (Fig. 2.5). Relativamente aos informantes que terminaram o ensino básico – 1º ciclo (27%) 16,8% são do sexo feminino e 10,3% ao sexo masculino.

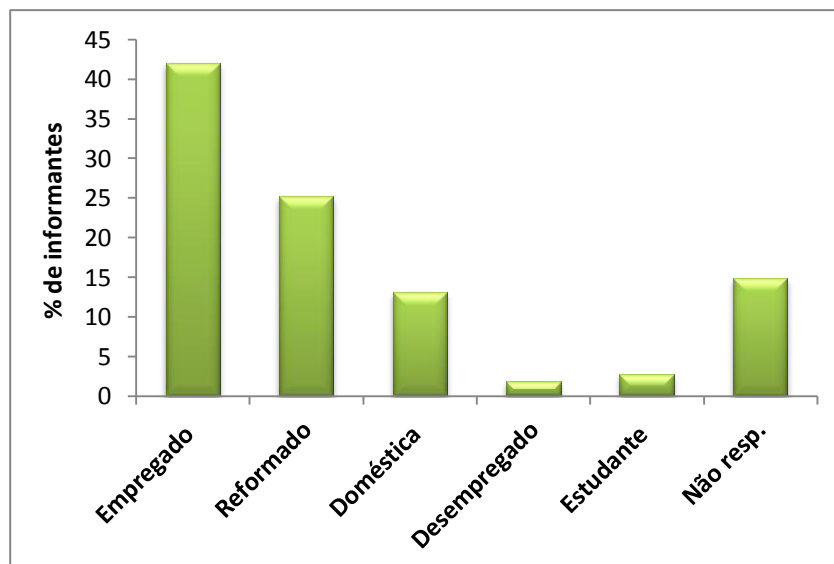


**Figura 2.5.** Escolaridade dos informantes.

Apenas 14,0% do total dos informantes possuem o 2º e 3º ciclo, sendo 6,5% mulheres e 7,5% homens. Concluíram o ensino secundário aproximadamente 21%, sendo 13,1% mulheres e 7,5% homens. Cerca de 9% possuem outro grau de ensino mais elevado, em que 6,5% são mulheres e 2,8% homens (Fig. 2.5). Um dos inquiridos não quis responder a esta questão.

A percentagem de informantes sem escolaridade é superior nas mulheres mas em relação às qualificações académicas mais avançadas são as mulheres que as detêm, quer para o primeiro ciclo quer para o ensino secundário e ensino superior.

Relativamente à atividade/ocupação que desempenham, 42% estão empregados e 43% dos informantes estão reformados, são domésticas, desempregados e estudantes (Fig. 2.6).



**Figura 2.6.** Atividade/ocupação desempenhada pelos informantes.

Dezasseis informantes (15%), não quiseram registrar qual a sua atividade/ocupação, mas são pessoas que têm a sua atividade ligada à agricultura, bem como a quase totalidade dos reformados, domésticas e desempregados. Relativamente aos 42% de empregados, 8,4% são agricultores de profissão e os restantes exercem uma atividade profissional paralelamente a uma forte ligação à agricultura, na qual trabalham ao fim do dia e nos fins de semana nos terrenos à volta da residência. Pode-se afirmar que a grande maioria dos inquiridos possui um estilo de vida rural e mantém um modelo tradicional de atividades agrícolas e de pecuária.

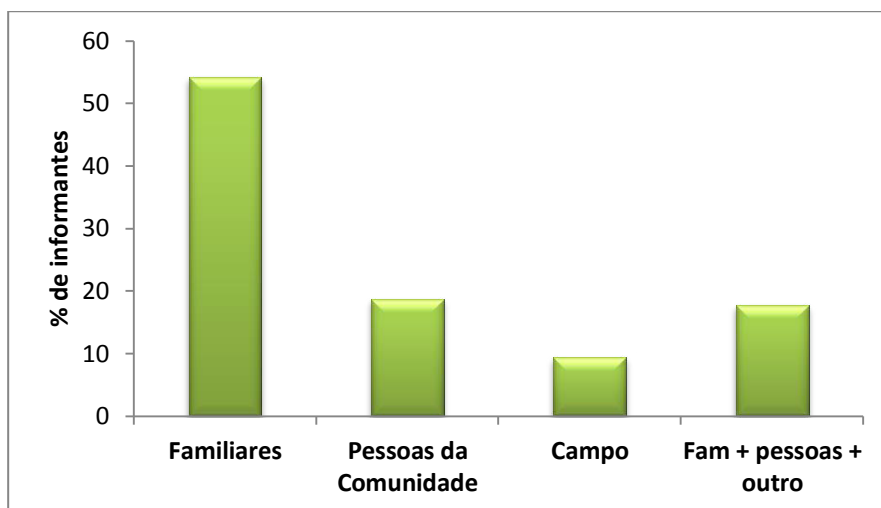
Nos trabalhos de Blanco (1996) e Tardio *et al.* (2002) os informantes também desempenham profissões quase todas ligadas à natureza e à agricultura. Nos trabalhos de Carvalho (2005) os informantes com mais de 80 anos embora detentores de muito conhecimento sobre as plantas silvestres, já se encontravam incapacitados para realizar as tarefas agrícolas, pecuárias e de colheita de plantas. Os mais novos já exerciam atividades alternativas ou modernizaram a agricultura que os seus antepassados lhes deixaram. Embora manifestem muito interesse nos usos tradicionais das plantas já não dependem desta atividade para sobreviverem.

### 2.5.2. Conhecimento tradicional e utilização da carqueja

A grande maioria dos informantes deste trabalho afirmaram reconhecer a planta pelo nome vulgar de carqueja, mas também a reconhecem por “carquejinha” ou “carqueijinha”.

Pode-se constatar que os inquiridos conheceram a carqueja por informação transmitida pelos familiares (54,2%) de geração em geração, em particular com as suas

mães e avós; 18,7% através de elementos da comunidade; 9,3% pelo contacto com a planta no campo e 17,8% responderam que conheceram a planta quer através da família quer pelas pessoas da comunidade ou outro meio, como por exemplo, através de livros (Fig. 2.7).

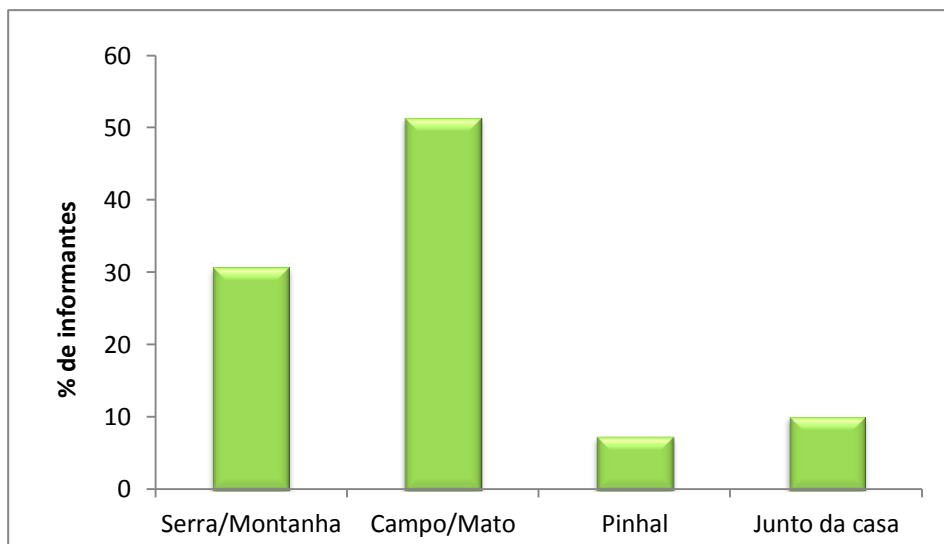


**Figura 2.7.** Meio pelo qual os informantes conheceram a planta.

Dos 107 inquiridos 87,9% utiliza a carqueja e 12,1% identifica a utilização por parte de familiares, avós, sogras, mães ou esposas.

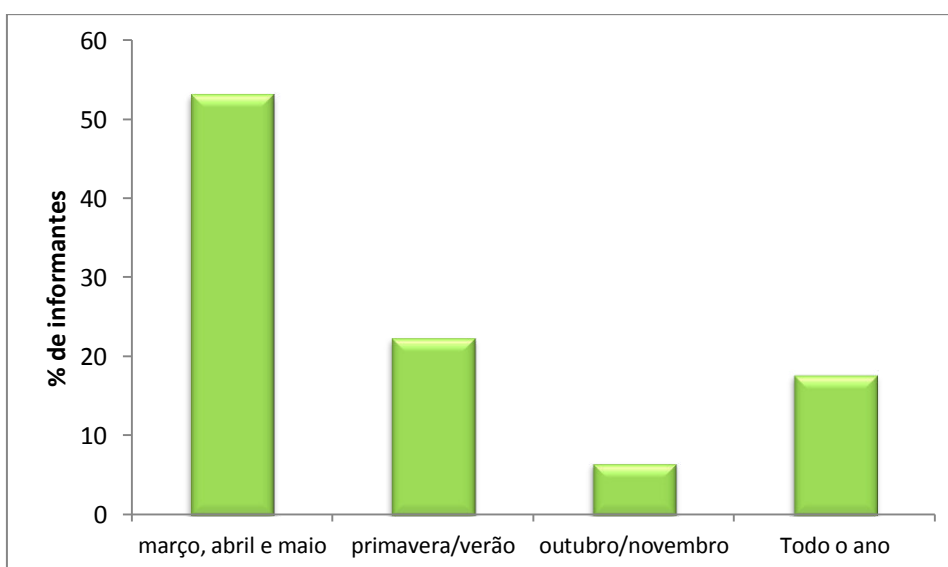
Esta planta não sendo uma espécie cultivada é colhida nas zonas envolventes à residência (10,3%) ou em zonas não muito afastadas e que os inquiridos identificaram como serra/montanha (30,8%), campo/mato (51,4%), especialmente mato de urze, esteva e giesta e especificamente em zona de pinhal (7,5%) onde os informantes consideram que a planta se desenvolve muito bem e que frequentemente está associada a esta espécie (Fig. 2.8).

Ribeiro (2013), no seu trabalho no Parâmio, em Trás-os-Montes, refere que os urzais com carqueja predominam em zonas de maior altitude e com solos degradados.



**Figura 2.8.** Zonas de colheita da espécie referida pelos informantes.

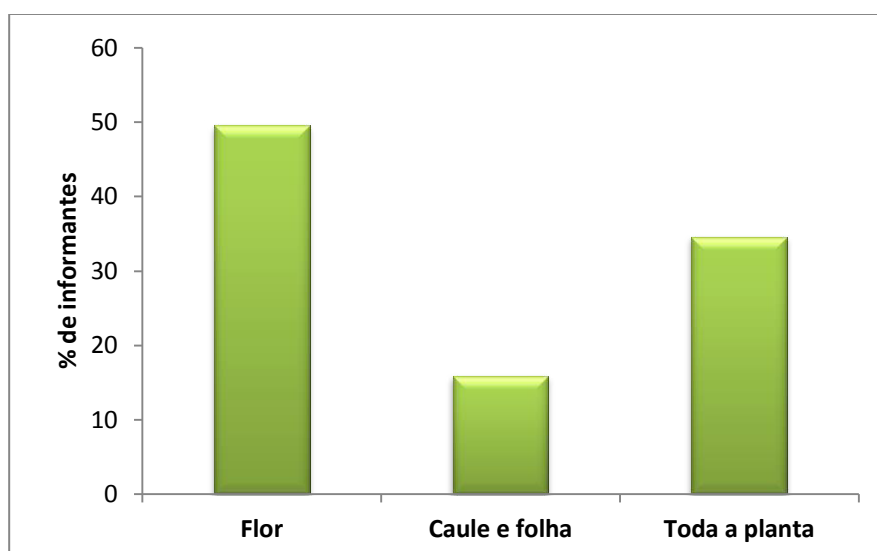
A grande maioria dos informantes (53,3%) indicou os meses de março, abril e maio como a época preferencial de colheita desta planta; 22,4% responderam que a época de colheita se arrasta da primavera até pleno verão para que as plantas se encontrem secas no final de agosto e seja mais fácil a sua conservação; 6,5% prefere a época de outubro/novembro, dada a utilização adicional como fonte de aquecimento e 17,8% respondeu que colhe a planta em qualquer época do ano (Fig. 2.9).



**Figura 2.9.** Época do ano em que o informante realiza a colheita.

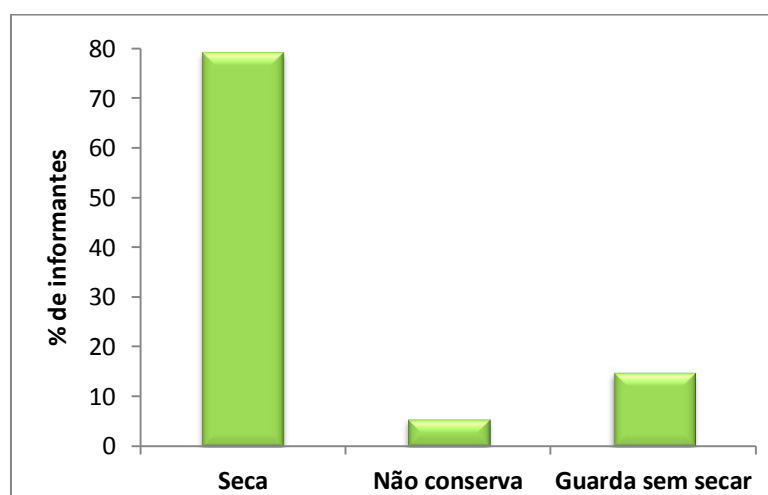
Relativamente à parte da planta mais utilizada a maioria dos informantes (49,5%) respondeu que utiliza a flor; 15,9% utiliza a parte aérea sem a flor e 34,6% respondeu que aproveita toda a planta (Fig. 2.10). Sendo a flor a parte mais utilizada, compreende-se

facilmente que a época da colheita corresponda aos meses em que ocorre a floração da carqueja, entre março a junho.



**Figura 2.10.** Parte da carqueja utilizada pelos informantes.

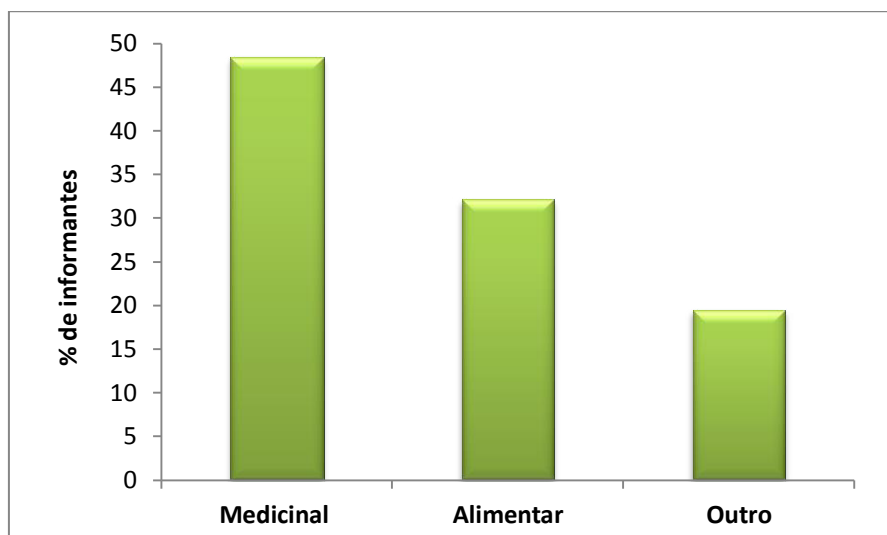
A grande maioria dos inquiridos (79,4%) (Fig. 2.11), no que respeita ao modo como conserva a planta, referiu a secagem à sombra, em local seco e arejado.



**Figura 2.11.** Modo de conservação da carqueja por parte dos informantes.

Normalmente, as pessoas referem que a secagem é realizada num alpendre ao redor da casa. Uma pequena percentagem de 5,6% referiu que não conserva a planta pois logo que a colhe utiliza-a em fresco. Normalmente, o armazenamento da planta seca é efetuado em sacos de pano, em lugar seco e com pouca luz ou menos frequentemente em frasco de vidro. Ribeiro *et al.* (2000) também indica a flor como a parte da planta mais utilizada, referindo o cuidado de que esta seja seca à sombra.

Foram registradas 190 citações para a utilização da planta, das quais 48,4% dos inquiridos referiram que se destinava a uso medicinal (92 citações, frequência 0,5); 32,1% para parte alimentar como aromática ou condimentar (61 citações, frequência 0,3) e 19,5% para outra utilização (37 citações, frequência 0,2) (Fig. 2.12).



**Figura 2.12.** Área de aplicação da carqueja pelos informantes.

Apesar do seu uso principal se enquadrar na categoria medicinal, a planta também é muito utilizada para fins culinários e condimentares, principalmente para confeccionar coelho com carqueja e arroz de carqueja, dois pratos tradicionais que fazem parte da ementa de muitos restaurantes locais.

As restantes utilizações não deixam de ser interessantes como é o caso da sua utilização como combustível, para ajudar a acender quer a lareira quer o forno de lenha, para “musgar” os porcos nas tradicionais matanças, dar “sabor a mato” à carne mansa, servir de cama para animais, para arranjos florais, divisórias de casas e na preparação de licores.

Ribeiro *et al.* (2000) também referenciou a carqueja como condimento nos pratos de coelho. Carvalho (2000) indicou que os ramos de carqueja são secos e vulgarmente utilizados como lenha nos fornos tradicionais das aldeias já que são altamente combustíveis e simultaneamente transmitem ao pão um agradável aroma. Oliveira (2004) no seu estudo menciona o uso da carqueja como condimentar/alimentar. Carvalho (2005) referiu o seu uso em agropastorícia, para pastos de caprinos e ovinos, cama para o gado, fertilizantes e queima. Carvalho (2005) também a referenciou na alimentação humana, como condimento de caça, coelho e galinha domésticas e como verdura para arroz. Frazão-Moreira (2008)

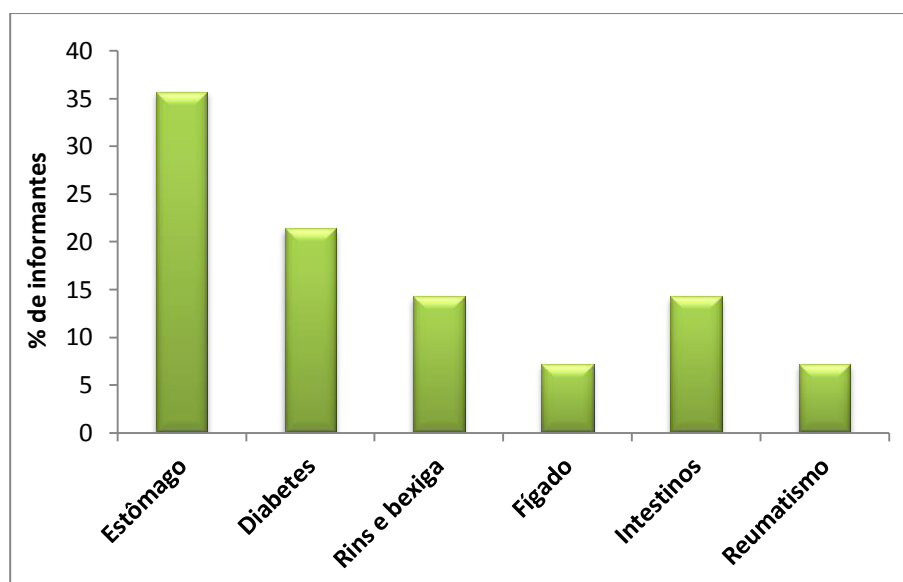


mencionou o uso da carqueja como combustível, medicinal, condimentar e para alimentação animal.

As populações rurais, no passado, encontravam-se muito dependentes dos recursos vegetais para obterem o combustível necessário às diversas atividades domésticas, nomeadamente, para cozinhar e aquecer as habitações nos meses mais frios. Carvalho (2006) também refere no seu trabalho que atualmente continuam a ser utilizados estes recursos para o aquecimento das habitações e, com alguma frequência, ainda é utilizada a carqueja para aquecer os fornos onde se coze o pão e onde se cozinha o cabrito.

Presentemente o uso da planta como medicinal ainda está muito disseminada nestas populações rurais, muito embora haja uma situação de compromisso entre a modernidade e a tradição. Os informantes respeitam e valorizam as modernas práticas médicas, mas ao primeiro sinal de doença recorrem primeiramente às plantas medicinais e, caso não consigam resolver a situação, então recorrem ao médico. Contam os informantes que em tempos não muito longínquos, certas aldeias não possuíam Centro Médico próximo e as condições sanitárias eram muito precárias, pelo que era muito comum a utilização das plantas para fins medicinais.

Dos informantes que referiram a utilização da carqueja para fins medicinais 35,7% atribuíram o seu uso ao tratamento de doenças do aparelho digestivo, em especial, para o estômago; 21,4% para diabetes; 14,3% para rins e bexiga; 7,1% para o fígado; 14,3% para intestinos e 7,1% para tratamento do reumatismo (Fig. 2.13).



**Figura 2.13.** Usos medicinais da carqueja referidos pelos informantes.

Em consonância com o presente trabalho, os informantes de Camejo-Rodrigues (2006) também utilizam as flores para fins medicinais semelhantes a este estudo.

Estas utilizações como planta medicinal já foram referenciadas noutros estudos de etnobotânica referidos anteriormente, tais como Carvalho (2005) no seu catálogo etnobotânico realizado no Parque Natural de Montesinho (Nordeste de Portugal), atribuindo-lhe também o uso medicinal para diabetes e aparelho excretor. Ribeiro *et al.* (2000) indica a carqueja como aconselhada para constipações, dores de estômago, problemas digestivos e intestinais, problemas de fígado, inflamações da vesícula biliar, para dissolver cálculos biliares, doenças de rins e bexiga e reumático. Rodrigues (2001) indica o uso medicinal para constipações, gripe, estômago, barriga e diabetes. Camejo-Rodrigues (2003) refere a utilização da carqueja no tratamento de problemas, tais como: gripe, tosse, problemas de estômago. Novais *et al.* (2004) refere o uso popular da carqueja como hipoglicemiante, digestivo, para constipações, protetor hepático, analgésico gástrico, anti-inflamatório intestinal, para a gota, para o ácido úrico, antiespasmódico renal e cicatrizante. Oliveira (2004) também indica a carqueja como utilizada para fins medicinais, tais como: sistema digestivo e endócrino. Vítor *et al.* (2004) refere que a carqueja é utilizada em medicina popular, sendo-lhe atribuída propriedades digestivas e atividade na pressão sanguínea elevada, colesterol, diabetes e obesidade. Camejo-Rodrigues (2006) atribui-lhe os seguintes usos: para o colesterol, diabetes, constipações, gripe, rins, ácido úrico, estômago, fígado, vesícula, vias urinárias e diabetes.

Relativamente ao modo de preparação da planta, o uso alimentar da planta engloba a sua utilização como aromática e condimentar, em especial para carnes mansas.

Na descrição da preparação/uso da planta convém aqui referir a definição, por parte do informante, de alguns conceitos mais referenciados:

- No caso do **chá/tisana**, o informante refere-se à fervura do material vegetal durante alguns minutos, geralmente menos de 5 minutos ou até 10 minutos.

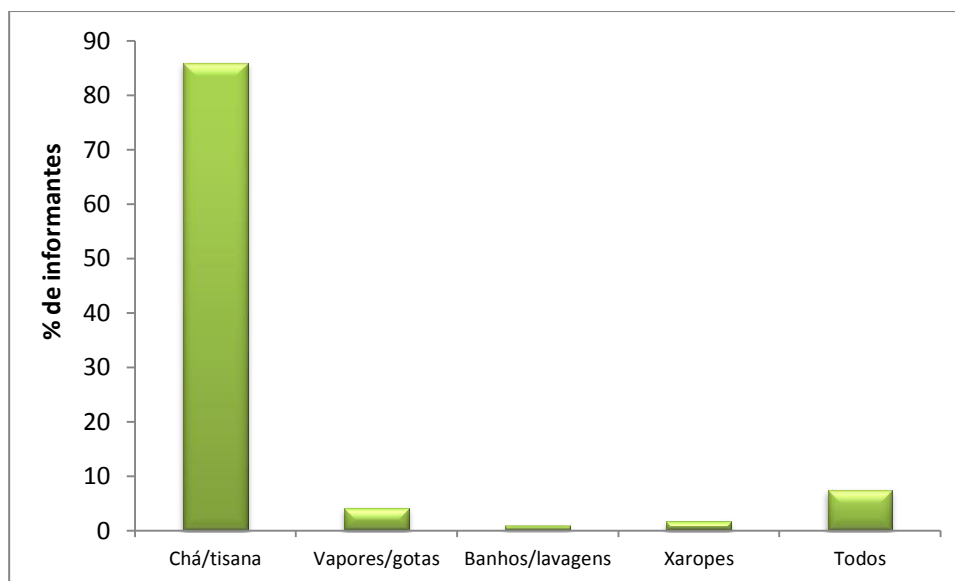
- No caso da **infusão** é aquecida água até ferver e posteriormente colocada por cima do material vegetal que se encontra num recipiente (por exemplo, uma chávena), e que se pode deixar repousar por breves minutos.

- Para as **lavagens e banhos** os informantes referem uma fervura bastante prolongada (largos minutos) do material vegetal (muito mais prolongada do que a fervura rápida do chá/tisana) e, com essa água a uma temperatura suportável fazem-se lavagens na zona do corpo afetada ou mergulha-se a zona afetada nessa água. Este método pode ser usado em paralelo, ou seja, lavar e imergir a zona do corpo.

- Para fazer **xarope**, o material vegetal é fervido juntamente com mel ou açúcar, resultando num líquido espesso que normalmente é tomado às colheradas (de sopa ou de chá), uma ou várias vezes ao dia, durante um determinado período até a pessoa se sentir melhor.

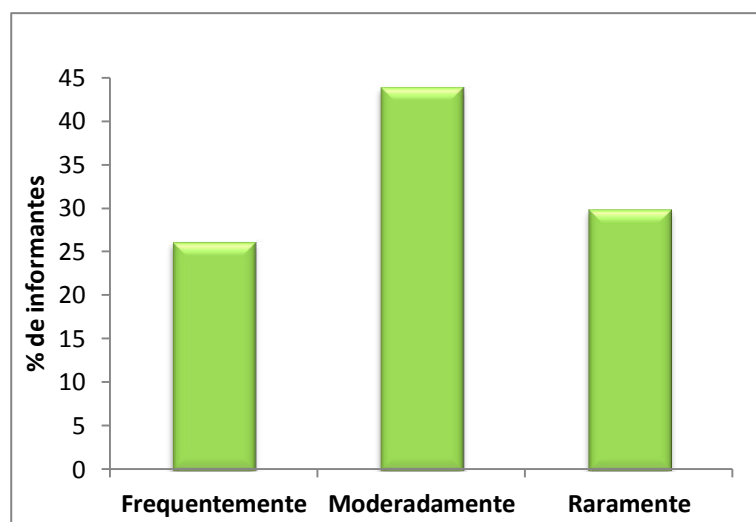
- Para fazer **vapores** o material vegetal é fervido prolongadamente e essa água é colocada num recipiente. A pessoa coloca a cabeça por cima desse recipiente e recebe os vapores libertados por essa água.

No que respeita à preparação em chá/tisana, vapores/gotas, banhos/lavagens, xaropes ou utilizando todos, a grande maioria dos indivíduos (86%) referiu que o modo de preparação mais comum é o chá/tisana (Fig. 2.14) (104 citações, frequência 0,9) com utilização da parte floral.



**Figura 2.14.** Modo de preparação da carqueja para fins medicinais.

Pode-se considerar esta planta como fazendo parte das rotinas dos indivíduos destes locais, já que é utilizada frequentemente, ou seja, duas a três vezes por semana por 26,2% dos indivíduos; utilizada moderadamente, o que corresponde a pelo menos uma vez por semana por 43,9% e raramente utilizada (menos de uma vez por semana) por 29,9% (Fig. 2.15). Neste estudo pode-se concluir que mais de 70% dos indivíduos utilizam a carqueja com muita frequência, ou seja, entre uma a três vezes por semana.



**Figura 2.15.** Frequência de utilização da carqueja por parte dos informantes.

Questionados sobre a utilização desta planta juntamente com outras espécies, aproximadamente 76% responderam que não misturam com outras espécies e 24% dos inquiridos responderam que misturam algumas vezes com as plantas referidas na Tabela 2.1 ou com outras plantas aromáticas.

**Tabela 2.1.** Plantas utilizadas para misturar com a carqueja.

Nome vulgar	Nome científico
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Chá-príncipe	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Staf.
Erva-cidreira	<i>Melissa officinalis</i> L.
Erva-de-São-Roberto	<i>Geranium robertianum</i> L.
Erva-pata	<i>Oxalis pes-caprae</i> L.
Esteva	<i>Cistus ladanifer</i> L.
Laranjeira	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Marmeleiro	<i>Cydonia oblonga</i> Miller
Oliveira	<i>Olea europaea</i> L.
Hipericão	<i>Hypericum perforatum</i> L.
Lúcia-lima	<i>Verbena citriodora</i> Cav.
Neveda	<i>Calamintha baetica</i> Boiss. & Reuter
Rosmaninho	<i>Lavandula</i> sp.
Sabugueiro	<i>Sambucus nigra</i> L.
Tília	<i>Tilia</i> sp.

A mistura de plantas não sendo utilizada na preparação do chá/tisana, é frequente nas utilizações alimentares.

Este estudo etnobotânico incidiu apenas sobre a espécie em estudo, *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., pelo que não se pode calcular o índice de etnobotanicidade, já que este índice pondera o número de espécies usadas relativamente ao total de espécies conhecidas numa dada região, sendo uma medida da riqueza etnobotânica dos locais.

Todos os informantes responderam que a planta é utilizada para fins domésticos e não a comercializam.

Foram feitas algumas tentativas para os informantes fornecerem algumas receitas tradicionais onde a carqueja seja utilizada, mas apesar de mais de metade dos inquiridos referir que tem receitas, as mesmas não foram reveladas. A conversa foi quase sempre desviada para outros assuntos ou para a referência do modo de preparação tão popular como o chá/tisana que é utilizado rotineiramente. Conseguiu-se apenas a informação de que o arroz de carqueja é cozinhado em tisana da mesma.

Para complementar a informação pretendeu-se ainda saber se os informantes conheciam alguns provérbios, lendas, músicas, etc, relacionadas com esta espécie. A frase mais referida foi “És mais velho que a carqueja”, sendo referida a existência de uma música tradicional com o nome de “A carquejinha”.

Por último, foi referido que na localidade Malcata, junto à serra da Malcata, todos os anos, durante o mês de maio é celebrada uma festa dedicada a esta planta designada de “Festa da Carqueja”.

## **2.6. Considerações intercalares**

O estudo etnobotânico desenvolvido incidiu em diversos locais dos concelhos de Penamacor, Sabugal, Fundão e Oleiros onde tradicionalmente a carqueja é utilizada por pessoas com grande conhecimento empírico da mesma, confirmando-se que o uso da mesma ainda está muito disseminado e que os conhecimentos tradicionais sobre esta planta têm vindo a ser transmitidos de geração em geração.

A planta não é cultivada sendo colhida desde os locais mais próximos da habitação até locais mais afastados das povoações, reconhecidos como campo/mato e em locais de maior altitude como a serra da Gardunha e a serra da Malcata. A época de colheita situa-se preferencialmente nos meses de primavera e início do verão, o que corresponde ao período de floração da planta silvestre já que a flor é a parte mais utilizada. Sendo muito utilizada, no mínimo uma vez por semana, e sendo a colheita realizada em populações naturais torna-se necessário avaliar o impacto desta atividade de forma a manter a sustentabilidade destes recursos.

A parte da planta mais utilizada é a flor, seca à sombra e em local arejado, sob a forma de chá/tisana. A carqueja continua a ser utilizada, principalmente como planta medicinal com finalidades muito diversas.

## 2.7. Referência bibliográficas

- Agelet, A. & Vallès, J. (2001). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the Region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part. I. Medicinal uses of non-vascular plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 57-70.
- Agelet, A. & Vallès, J. (2003a). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the Region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part. II. Medicinal uses of non-vascular plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 211-227.
- Agelet, A. & Vallès, J. (2003b). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the Region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part. III. Medicinal uses of non-vascular plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 229-234.
- Alexiades, M.N. (1996). *Collecting ethnobotanical data: an introduction to basic concepts and techniques*. In Selected guidelines for ethnobotanical research: a field manual. Alexiades, M.N. (Ed.). The New York Botanical Garden. p. 53-94.
- Amorozo, M.C.M. (2002). Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo António do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasileira*, 16, 189-203.
- Blanco, E. & Morales, R. (1994). Etnobotánica. *Revista de Dialectología y Tradiciones Populares*, 49, 295-222.
- Blanco, E. (1996). Ideas metodológicas relativas al trabajo de campo etnobotánico. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba*, 3, 89-91.
- Begossi, A. (1996). Use of ecological methods in Ethnobotany: diversity índices. *Economic Botany*, 50, 280-289.
- Bill Freedman (2008). *Ethnobotany*. In The Gale Encyclopedia of Science. Lerner, K.L. & Lerner, B.W. (Eds). Detroit. Vol. 2. 4<sup>th</sup> ed. p. 1630-1632.
- Carvalho, A.M.P. (2005). *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho, Plantas, Tradicion Y Saber Popular en un Territorio del Nordeste de Portugal*, Universidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral. 468 p.
- Carvalho, L. (2006). *Estudos de Etnobotânica e Botânica Económica no Alentejo*. Universidade de Coimbra. Dissertação de Doutoramento. 566 p.
- Camejo-Rodrigues, J.S., Ascensão, L., Bonet, M.A. & Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the natural park of “Serra de São Mamede” Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 199-209.
- Camejo-Rodrigues, J.S. (2006). *Recolha dos “Saber-fazer” tradicionais das plantas aromáticas e medicinais. Concelhos de Aljezur, Lagos e Vila do Bispo*, AFLOSUL, Associação de produtores florestais do sudoeste algarvio. Bordeira. 253 p.
- Cook, F.E.M. (1995). *Economic Botany data collection standard*. Prepared for the International Working Group on Taxonomic Databases for Plant Sciences (TDWG). Royal Botanic Gardens, Kew. London.
- Dupler D. (2011). *Ethnobotany*. In Ethnobotany, Environmental Encyclopedia. Cengage Learning, Detroit. Vol. 1. 4<sup>th</sup> ed. p. 626-629.

- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. & Pedro, L.G. (2007). *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal. Lisboa. 3ª ed. p. 168-174.
- Farnsworth, N.R. (1988). *Screening Plants for New Medicines*. In Biodiversity. Wilson, E.O. (Ed.). National Academic Press. Washington DC. p. 83-97.
- Frazão-Moreira, A. & Carvalho, A.M. (2008). Relatório Final das atividades desenvolvidas no decorrer do projeto de investigação "Etnobotânica do Nordeste Português: saberes, plantas e usos" (POCI/ANT/59395/2004//PPCDT/ANT/59395/2004).
- Gomes, E. (2009). *Etnobotânica e Etnofarmacologia*. In Farmacognosia e Fitoquímica. Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.). Lisboa. p. 37-55.
- Heinrich, M., Edwards S., Moerman, D.E. & Leonti M. (2009). Ethnopharmacological field studies: A critical assessment of their conceptual basis and methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 1-17.
- Jain, S. (1987). *A Manual of Ethnobotany*. Scientific Publishers. Jodhpur. 228 p.
- Martin, G.J. (1995). *Ethnobotany: a methods manual*. Chapman & Hall. London.
- Myers (1983). *A Wealth of Wild Species*. Westview Press. Boulder.
- Novais, M. (2002). *Plantas Aromáticas e/ou Medicinais no Parque Natural da Arrábida*. Universidade de Évora. Tese de Licenciatura. 233 p.
- Novais, M.I., Santos, S., Mendes, C. & Pinto-Gomes (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 183-195.
- Oliveira, A. (2004). *Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural da Serra da Estrela – Seus Usos Tradicionais*. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia dos Recursos Naturais e Ambiente.
- Pardo De Santayana, M. (2003). *Las plantas en la cultura tradicional de la antigua Merindad de Campoo*. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral. 381 p.
- Prance, G.T. (1995). *Ethnobotany Today and in the Future*. In Ethnobotany Evolution of a Discipline. Schultes, R.E. & Reis, S.V. (Eds.). Dioscorides Press, Portland, Oregon. p. 60-68.
- Ribeiro, J.A., Monteiro, A.M. & Silva, M.L. (2000). *Etnobotânica. Plantas Bravias, Comestíveis, Condimentares e Medicinais*. João Azevedo Editor. Mirandela.
- Ribeiro, L.M. (2013). *Conhecimento tradicional, agroecossistemas e atividades alternativas em meio rural. Estudo de caso no Parâmio, Trás-os-Montes, Portugal*. Instituto Politécnico de Bragança. Escola Superior Agrária. Tese de Mestrado. 95 p.
- Rodrigues, J. (2001). *Contributo Para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas no Parque Natural da Serra de S. Mamede*. ICN – PNSSM, FCUL. Relatório de estágio. 249 p.
- Schultes, R.E. & Reis, S.V. (Eds.) (1995). *Ethnobotany. Evolution of a Discipline*. Chapman & Hall. London.
- Tardio, J., Pascual, H. & Morales, R. (2002). *Alimentos Silvestres de Madrid. Guía de plantas e setas de uso alimentário tradicional en la comunidade Madrid*. Ediciones La Librería, Madrid, p. 21.
- Whyte, W.F. (1982). *Interviewing in Field Research*. In Field Research: A Sourcebook and Field Manual. Burgess, R.G. (Ed.). George Allen & Unwin, London. p. 111-122.
- Vítor, R., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A., Teixeira, A. & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 363-370.
- Zent, S. (1996). *Behavioral orientations toward ethnobotanical quantification*. In Selected guidelines for ethnobotanical research: a field manual. Alexiades, M.N. (Ed.). The New York Botanical Garden. p. 53-94.





***Material vegetal em estudo***

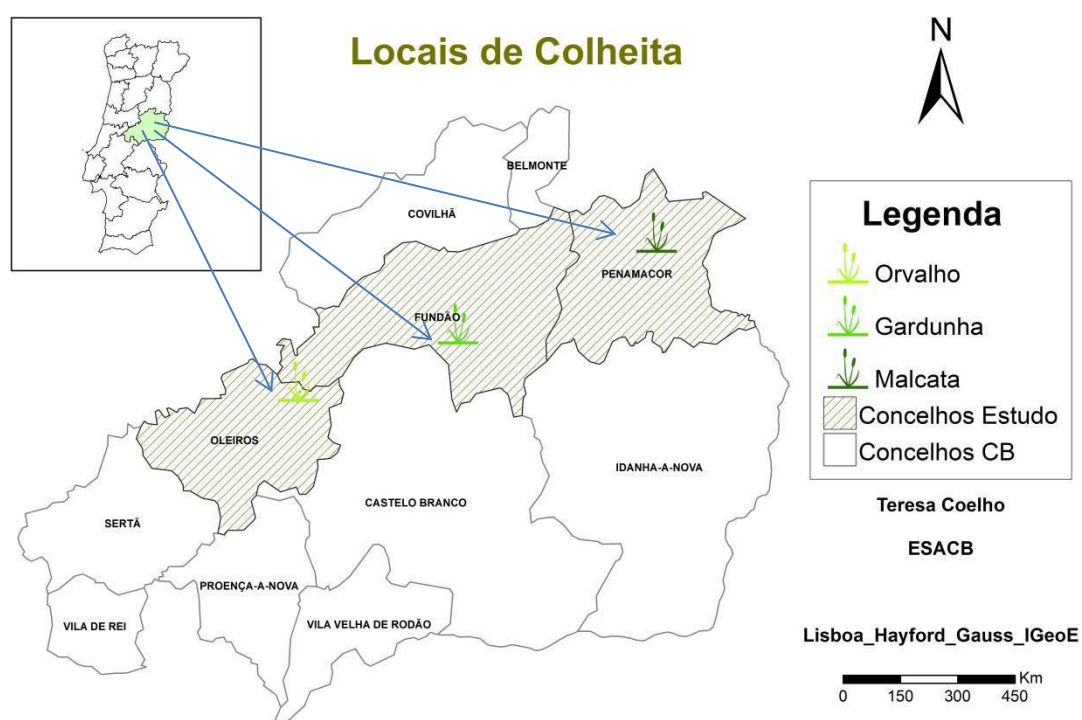
---



### 3. Material vegetal em estudo

#### 3.1. Locais e épocas de colheita do material vegetal

Os locais de colheita do material vegetal foram escolhidos aleatoriamente no Distrito de Castelo Branco, nomeadamente na serra da Gardunha, concelho do Fundão; serra da Malcata, concelho de Penamacor e Orvalho no concelho de Oleiros (Fig. 3.1), cujas coordenadas e altitude estão registadas na Tabela 3.1.



**Figura 3.1.** Locais de colheita do material vegetal no distrito de Castelo Branco.

**Tabela 3.1.** Coordenadas geográficas e altitude dos locais de colheita do material vegetal.

Locais de colheita	Orvalho	Serra da Malcata	Serra da Gardunha
Coordenadas geográficas	40° 01' 39.92°N 7° 46' 33.624°W	40° 14' 05.942°N 7° 06' 52.804°W	40° 06' 27.822°N 7° 28' 52.241°W
Altitude (m)	~ 624	~ 743	~ 916

A zona de colheita com maior altitude é a serra da Gardunha seguida da serra da Malcata e o ponto de menor altitude situou-se na zona do Orvalho.

As plantas no seu habitat natural (Fig. 3.2, Fig. 3.3 e Fig. 3.4) encontram-se muito associadas a zonas de pinhal e mato em associação com espécies dos géneros *Erica* sp., *Arbutus* sp. e *Cistus* sp.



**Figura 3.2.** Zona de colheita na serra da Gardunha.

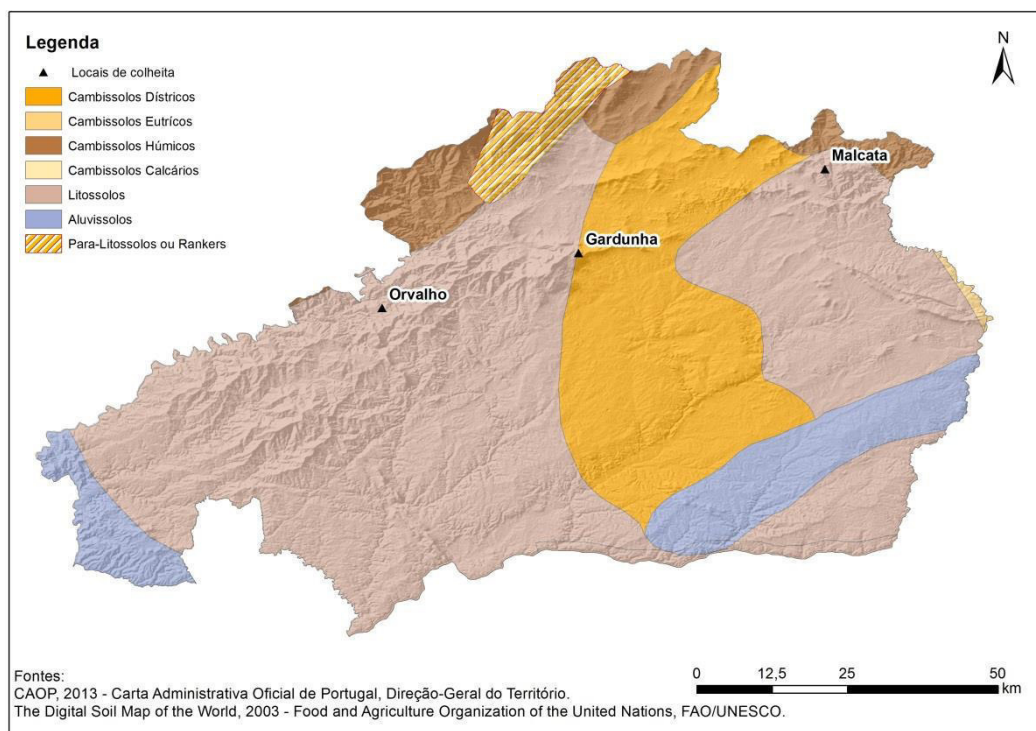


**Figura 3.3.** Zona de colheita na serra da Malcata. **Figura 3.4.** Zona de colheita no Orvalho.

Na zona do Orvalho as plantas apresentavam aproximadamente um metro de altura; na zona da Malcata as plantas encontravam-se em zonas de mato e apresentavam uma altura inferior a um metro e na zona da Gardunha as plantas possuíam entre 1 a 1,2 metros. De acordo com a classificação fisionómica de Raunkjaer, as plantas agrupam-se nas Fanerófitas (plantas perenes providas de gemas de renovo a mais de 25 cm do solo) e dentro deste grupo incluem-se nas Nanofanerófitas que compreendem subarbustos e pequenos arbustos cujas gemas de renovo se situam entre 25 cm e 2 m.

De acordo com a Carta Administrativa Oficial de Portugal, da Direção-Geral do Território (2013) (Fig. 3.5), os solos das zonas de colheita da Malcata e Orvalho pertencem

aos Litossolos e a zona de colheita na Gardunha encontra-se numa zona de transição entre os Litossolos e Cambissolos dístricos.



**Figura 3.5.** Tipo de solo para cada local de colheita.

Os Litossolos são solos incipientes, derivados de rochas consolidadas, de espessura efetiva normalmente inferior a 10 cm. Não apresentam horizontes genéticos definidos e são quase sempre pobres em matéria orgânica dada a sua diminuta espessura e de fraca aptidão cultural.

Os Cambissolos são solos pouco desenvolvidos, que ainda apresentam características do material originário (rocha) evidenciado pela presença de minerais primários. São solos com horizonte B câmbico e variam de solos pouco profundos a profundos, sendo normalmente de baixa permeabilidade. A textura é franco arenosa ou mais fina e no mínimo com 8% de argila. Sem propriedades hidromórficas até 50 cm de profundidade e com rocha dura a mais de 50 cm de profundidade. Os Cambissolos dístricos possuem horizonte A ócrico, ou seja, horizonte mineral superficial, com baixo teor de matéria orgânica (MO) ou pouco espesso (Martins & Lourenço, 2012) e com textura grosseira.

As épocas de recolha foram as seguintes:

- fevereiro (repouso vegetativo)
- maio (à floração)
- outubro (início do repouso)

### 3.2. Caracterização climática dos locais de colheita

Atendendo à média dos três anos em estudo no que respeita aos valores da precipitação (Tab. 3.2) verifica-se que em média os valores mínimos ocorreram no mês de julho (média 8,3 mm) e os valores máximos no mês de outubro (média 139,1 mm). No entanto, regista-se a ocorrência de condições de precipitação muito diversas em cada um dos anos. No caso do ano de 2012, verifica-se para os meses de janeiro, fevereiro e março uma precipitação média mensal muito inferior relativamente aos anos de 2011 e 2013, e precipitação média superior para os referidos anos, nos meses de abril, maio e junho.

**Tabela 3.2.** Precipitação e temperaturas médias para os anos 2011 a 2013.

Precipitação e Temperatura médias														
Continente														
A NORTE DO TEJO	Ano	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez	
<b>Precipitação média (mm)</b>														<b>Total Ano</b>
Total do mês	2011	129,9	120,2	72,7	66,3	58,3	6,0	5,4	24,0	30,0	107,8	181,6	55,9	858,1
	2012	19,5	2,5	13,9	96,3	90,8	24,1	8,8	27,5	45,6	115,9	134,3	134,7	713,9
	2013	196,3	74,6	254,4	82,4	38,3	17,2	10,6	0,5	70,0	193,7	23,1	171,6	1132,7
	<b>Média 3 anos</b>	115,2	65,8	113,7	81,7	62,5	15,8	8,3	17,3	48,5	139,1	113,0	120,7	
<b>Temperatura do ar (°C)</b>														
Média do mês	2011	8,0	9,1	10,5	16,5	18,1	19,4	20,6	21,4	19,9	18,1	11,2	8,5	<b>Média Anual</b>
	2012	7,5	7,0	12,4	10,8	16,6	19,0	20,5	20,8	20,7	15,0	10,0	8,8	15,1
	2013	8,2	7,6	9,8	12,3	13,6	18,5	23,1	22,8	21,1	16,3	10,4	8,0	14,1
	<b>Média 3 anos</b>	7,9	7,9	10,9	13,2	16,1	19,0	21,4	21,7	20,6	16,5	10,5	8,4	14,3

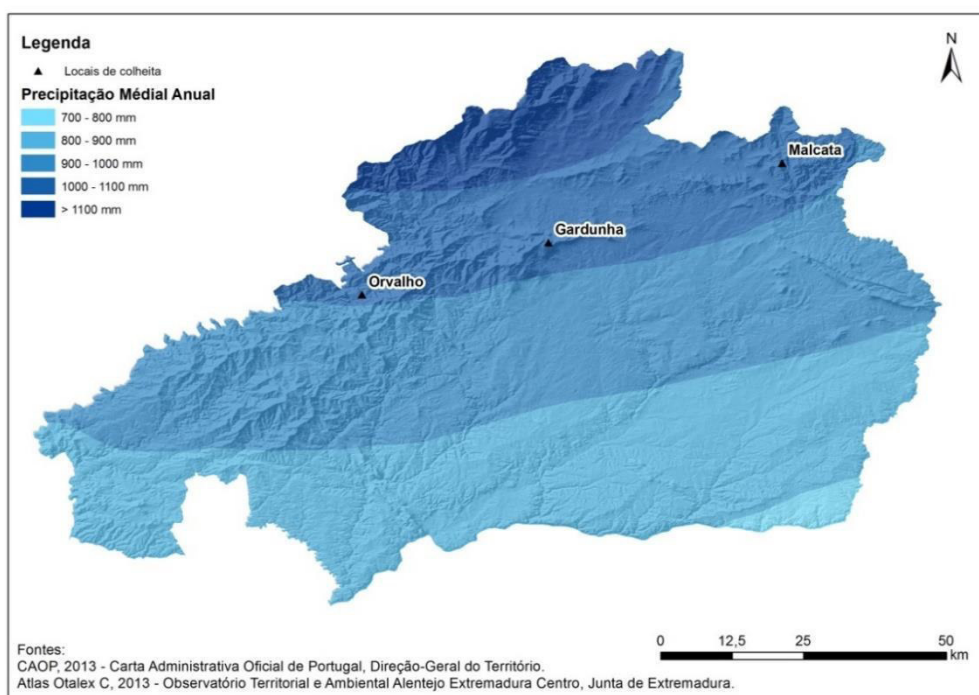
Fonte: Instituto Português do Mar e da Atmosfera, IP Portugal.

A média dos três anos no que respeita à temperatura média do ar oscilou entre 7,9 °C para os meses de janeiro e fevereiro (meses mais frios) e 21,7 °C em agosto (mês mais quente) (Tab. 3.2). Verifica-se também que a temperatura média nos meses de abril, maio, junho, outubro e novembro foi superior no ano de 2011 relativamente a 2012 e 2013 e a temperatura média mais baixa ocorreu nos meses de janeiro e fevereiro no ano de 2012.

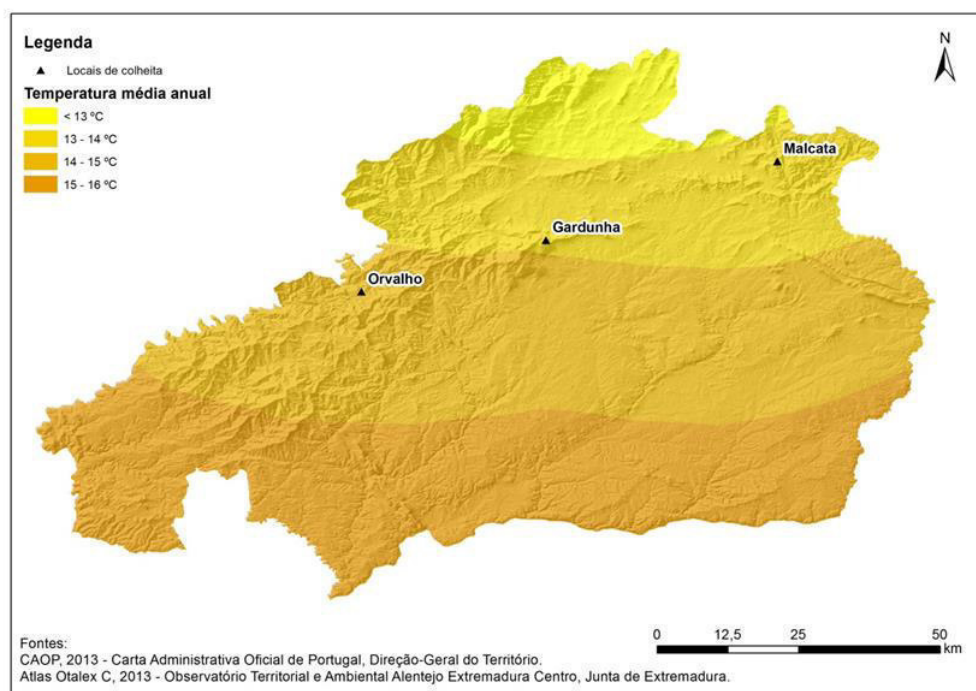


O valor da precipitação média anual é idêntico para os três locais de colheita e varia entre 900 a 1000 mm (Fig. 3.6) embora o Orvalho se situe numa zona de transição em que a precipitação média anual é ligeiramente inferior, entre 800 a 900 mm. Pela Tabela 3.2 verifica-se que em termos de precipitação o ano de 2012 apresentou valores inferiores (713,9 mm no total do ano) aos restantes anos e que o ano de 2013 foi o ano mais chuvoso (1132,7 mm no total do ano).

A temperatura média anual está compreendida entre 13-14 °C para as zonas da Gardunha e Malcata e a zona do Orvalho encontra-se numa faixa cuja temperatura média anual é ligeiramente superior, situando-se entre os 14-15 °C (Fig. 3.7) pelos que os valores da temperatura média anual ocorrida em cada um dos três anos de ensaios, entre 14,1 e 15,1 °C (Tab. 3.2) situam-se entre estes valores.



**Figura 3.6.** Precipitação média anual nos locais de colheita do material vegetal.



**Figura 3.7.** Temperatura média anual nos locais de colheita do material vegetal.

### • *Caracterização bioclimática*

Os parâmetros bioclimáticos e índices usados nesta caracterização fazem parte do modelo bioclimatológico de Rivas-Martínez (2007) e foram usados de acordo com o descrito por Honrado (2003).

Os três locais de colheita estão integrados no macrobioclima Mediterrânico. O clima Mediterrânico é um tipo de clima extratropical em que, coincidindo com o Verão, existe um período de aridez igual ou superior a dois meses. Aceita-se que um mês tem caracter árido ou seco quando a precipitação total desse mês (em mm) é inferior ao dobro do valor da temperatura média mensal ( $^{\circ}\text{C}$ ):  $P_i < 2T_i$ . Pela Tabela 3.2 verifica-se que em média, para os três anos considerados ocorre esta situação nos meses de junho, julho e agosto.

O macrobioclima Mediterrânico divide-se em bioclimas que são determinados a partir dos valores dos índices ombrotérmico ( $Io$ ) e de continentalidade ( $Ic$ ) pelo que os locais de colheita se enquadram no Mediterrânico pluvi-estacional oceânico.

### **3.3. Caracterização da componente mineral do material vegetal**

As plantas provenientes dos três locais de colheita, nos três momentos do ciclo vegetativo bem como o material vegetal micropropagado foram avaliadas em termos de:



- Humidade (secagem até massa constante);
- Fósforo (espectrofotometria de absorção molecular – colorimetria); potássio, cálcio e magnésio (espectrofotometria de absorção atómica);
- Ferro, cobre, sódio, zinco, manganês, crómio, cádmio, níquel e chumbo (espectrofotometria de absorção atómica);

Os valores (média de 3 repetições) referentes a esta avaliação apresentam-se na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Humidade e composição mineral (na matéria seca) de carqueja silvestre das três origens e fases do ciclo vegetativo e carqueja micropropagada.

Épocas e locais de recolha	H (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Fe (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Na (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)
OMic	93,8	0,2	4,2	1,1	0,2	189,0	1,4	1267,0	63,6	218,0	< LD	< LD	< LD	< LD
MMic	88,5	0,2	3,0	0,9	0,1	93,2	2,4	1757,0	52,8	146,0	< LD	< LD	< LD	< LD
GMic	88,9	0,2	3,6	1,3	0,2	106,0	1,4	1371,0	47,3	257,8	< LD	< LD	< LD	< LD
OR	44,5	0,0	0,3	0,1	0,1	57,5	2,3	181,8	18,6	270,2	< LD	< LD	< LD	< LD
MR	17,4	0,0	0,4	0,2	0,1	64,9	2,8	158,0	22,8	249,5	< LD	< LD	1,3	< LD
GR	51,3	0,0	0,3	0,2	0,1	44,5	2,2	110,7	21,5	154,9	< LD	< LD	< LD	< LD
OIR	21,2	0,0	0,2	0,2	0,1	52,6	2,9	355,8	32,2	155,1	< LD	< LD	< LD	< LD
MIR	40,9	0,0	0,3	0,2	0,1	48,3	3,0	258,2	26,9	212,1	< LD	< LD	1,2	< LD
GIR	23,2	0,0	0,3	0,3	0,1	255,3	11,4	230,6	25,3	228,5	< LD	< LD	2,5	< LD
OCF	65,4	0,1	2,0	0,2	0,2	36,2	6,2	252,1	33,3	277,5	< LD	< LD	2,6	< LD
MCF	45,7	0,0	0,3	0,2	0,1	81,9	2,2	118,1	22,4	222,7	< LD	< LD	< LD	< LD
GCF	11,6	0,0	0,5	0,3	0,1	70,7	3,8	277,5	33,1	261,9	< LD	< LD	1,2	< LD
OF	19,3	0,1	0,5	0,2	0,2	66,1	3,8	249,6	26,5	311,9	< LD	< LD	1,3	< LD
MF	88,7	0,1	1,2	0,2	0,2	57,0	2,9	147,0	24,1	272,8	< LD	< LD	3	< LD
GF	81,7	0,1	1,2	0,2	0,1	35,8	2,9	218,5	26,6	271,5	< LD	< LD	1,8	< LD

Legenda: OMic - Orvalho, material vegetal micropropagado; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado; OR - Orvalho, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GR - Gardunha, repouso vegetativo; OIR - Orvalho, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso; GIR - Gardunha, início do repouso; OCF - Orvalho, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GCF - Gardunha, caules à floração; OF - Orvalho, flores; MF - Malcata, flores; GF - Gardunha, flores. LD (limite de deteção); Cr – LD (0,6), Cd – LD (0,4), Ni – LD (1,1) e Pb – LD (0,6).

Como se pode verificar pela Tabela 3.3 as plantas silvestres nas diferentes fases do ciclo vegetativo apresentam um teor de humidade variável, que por norma implica necessidade de secagem prévia quando se pretende conservar a planta para posterior utilização. O material vegetal micropropagado apresenta um teor de humidade próximo de 90% (m/m).

Uma análise global dos resultados permite observar que o local ou época de colheita não implicam variações substanciais na composição mineral da planta. De um modo geral, o material vegetal micropropagado apresenta valores superiores de fósforo, potássio, cálcio,

sódio, ferro e zinco, possivelmente devido à composição do meio de cultura de micropropagação.

Pelos teores de crómio, cádmio, níquel e chumbo podemos verificar no geral que as plantas não apresentam contaminação destes elementos.

### 3.4. Referências bibliográficas

- Atlas Otalex C (2013). Observatório Territorial e Ambiental Alentejo e Extremadura Centro. Junta de Extremadura.
- Carta Administrativa Oficial de Portugal (2013). Direção-Geral do Território.
- Honrado, J. 2003. Flora e Vegetação do Parque Nacional da Peneda-Gerês. Universidade do Porto. Tese de Doutoramento.
- Martins, A. & Lourenço, J. (2012). *Carta dos solos e carta da aptidão da terra do nordeste de Portugal*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Rivas-Martinez, S. (2007). Mapa de series, geoseries y geopermaseries de vegetacion de Espana. *Itinera Geobotanica*, 17, 5-436.

***Micropropagação de  
Pterospartum tridentatum (L.) Willk.***

---



## 4. Micropropagação de *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.

---

### Objetivo

Com vista à valorização e preservação da espécie em estudo pretendeu-se desenvolver uma metodologia de propagação *in vitro*, na tentativa de multiplicar o material vegetal e em simultâneo estudar o seu potencial fitoquímico comparativamente ao das plantas silvestres. Assim sendo, foram realizados um conjunto de ensaios na tentativa de obtenção de um sistema de micropropagação a partir de segmentos nodais retirados de rebentos provenientes de plantas silvestres recolhidas em três locais: Orvalho, Gardunha e Malcata.

Para além do estabelecimento e multiplicação *in vitro* procedeu-se também à fase de enraizamento *ex vitro* e respetiva aclimatização a fim de avaliar a capacidade da espécie em regenerar uma planta completa e autónoma.

### 4.1. Introdução

A propagação de plantas por micropropagação poderá ser uma ferramenta para a propagação *ex situ*, já que é possível obter milhares de plantas a partir de um único explante num período de tempo relativamente curto. Estas plantas obtidas *in vitro* podem também ser utilizadas para a realização de outros estudos em condições laboratoriais, evitando a sua colheita massiva no habitat natural. A preservação das populações vegetais espontâneas é de extrema importância quer pelo facto de manter os habitats naturais, evitando a extinção das espécies, quer pelo facto de existirem quimiótipos, que poderão vir a ser usados na descoberta de novos compostos.

De todas as substâncias avaliadas como agentes terapêuticos cerca de 30% são derivados de produtos origem natural (Veiga-Junior & Mello, 2008) e foi a sua toxicidade que revelou a potencial bioatividade que hoje é aproveitada na terapia. A exploração desordenada dos recursos que tem levado a que algumas espécies passem a ter o estatuto de plantas protegidas, tem de ser evitada mas para isso torna-se necessário desenvolver a sua produção em larga escala com possibilidade de satisfazer a procura do mercado o que poderá ser realizada através de técnicas de micropropagação.

A Organização Mundial de Saúde refere que uma grande percentagem da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, continua a confiar nos produtos à base de plantas medicinais para tratamento das suas doenças ou utilizam a medicina

tradicional (ou alternativa, não convencional). Apesar dos potenciais riscos, algumas espécies continuam a ser colhidas indiscriminadamente e a serem muito utilizadas, pelo que se afigura importante conhecer um pouco mais destas plantas e tentar encontrar alternativas à sua propagação em condições *ex situ*.

A grande maioria das plantas medicinais e aromáticas propaga-se por via seminal, no entanto, algumas destas plantas possuem baixas taxas germinativas e longos períodos de germinação (Rodrigues & Almeida, 1996) pelo que a micropropagação poderá ser uma potencial alternativa.

Ao contrário da maior parte das células animais, as células vegetais são totipotentes, isto é, as plantas possuem o potencial de regenerar plantas inteiras a partir de células individuais ou grupos de células de um tecido ou órgão, expressando todo o genoma da planta (Thorpe, 1994) desde que em condições de cultura adequadas, obtendo-se um elevado número de plantas. A micropropagação ou propagação clonal *in vitro* fazendo uso desse potencial tem por objetivo a multiplicação de indivíduos geneticamente iguais por reprodução assexuada em que cada clone é uma população de plantas derivadas do mesmo indivíduo.

Resumidamente, o processo de micropropagação envolve em primeiro lugar a escolha da planta-mãe e do tipo de material vegetal a ser utilizado, tais como meristemas, gemas, segmentos nodais, folhas, flores, entre outros. Para o sucesso de um protocolo de micropropagação a qualidade do explante é fundamental, sendo que a escolha é feita em função da espécie e cultivar, do objetivo da micropropagação, do método da cultura de tecidos e das condições específicas das plantas de origem. Muitas vezes há que proceder a uma longa experimentação com a fonte do explante, o tipo, o tamanho e qual o tratamento de desinfecção superficial (Loberant & Altman, 2010) para ultrapassar a fase inicial de estabelecimento *in vitro*.

Todo o material vegetal de partida (explante) é desinfetado superficialmente já em condições de laboratório e em ambiente esterilizado, utilizando por exemplo, hipoclorito de sódio, álcool, ou outros tratamentos de desinfecção com produtos químicos, cuja concentração, tempos de desinfecção e procedimentos diferem de acordo com o material vegetal. Em seguida procede-se ao estabelecimento da cultura *in vitro* em condições assépticas em meio de cultura esterilizado. Os explantes colocados em meio de cultura são mantidos em salas de cultura ou crescimento, sob condições controladas de temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo.

Muitos estudos são iniciados com base em diferentes formulações, isto é, testando diferentes meios de cultura já que diferentes espécies necessitam de requisitos específicos (Heller, 1953; Quoirin & Lepoivre, 1977; McCown & Lloyd, 1981; Driver & Kuniyuki, 1984) sendo o meio de Murashige e Skoog (MS) (1962) um dos meios mais utilizado.

O meio de cultura a utilizar terá que ser estabelecido de acordo com as exigências nutricionais específicas da espécie, contendo todos os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento dos explantes, desde macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, inositol bem como uma fonte de carbono (nomeadamente sacarose ou glucose) e a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura para permitir obter as respostas desejadas, sendo necessário também a otimização do pH.

O passo seguinte é focalizar os estudos no efeito de diferentes reguladores de crescimento, incluindo especialmente, citocininas e auxinas, no que diz respeito aos seus principais efeitos nas culturas *in vitro*, formação de novos rebentos e no desenvolvimento adventício de raízes, respetivamente.

O balanço entre diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento é importante para regular a desdiferenciação, para produção de *calli*, para embriogénese, para formação de rebentos adventícios e/ou multiplicação bem como para indução e desenvolvimento de raízes. O explante pode passar primeiro pelo processo de desdiferenciação que é seguido por nova divisão celular ativa. Este aumento da atividade mitótica é induzido por processos em resposta ao corte e exposição a novos componentes nutricionais e hormonais bem como a novas condições ambientais. Estes processos incluem expressão de genes induzidos por feridas, expressão de fatores de crescimento de moléculas específicas associados a ferida e moléculas sinalizadoras (por exemplo, o ácido jasmónico), mudanças no equilíbrio hormonal endógeno do tecido, ativação metabólica, entre outras. Este processo é seguido por proliferação contínua de *callus* e/ou regeneração (Lobert & Altman, 2010).

#### • **Reguladores de crescimento e sua importância nas culturas *in vitro***

Nas plantas superiores a coordenação do metabolismo, crescimento e morfogénese depende de mensageiros químicos que comunicam entre várias partes da planta (Taiz & Zeiger, 2002). Foi assim que, comparativamente ao que acontece nas células animais, em 1887, Julius von Sachs propôs que esses mensageiros químicos, que designou de fitohormonas, fossem os responsáveis pelo crescimento de diferentes órgãos da planta. As fitohormonas são substâncias de baixo peso molecular que, em concentrações muito baixas desempenham efeitos específicos no crescimento e diferenciação das plantas, sem se alterarem quimicamente.

As auxinas são sintetizadas no ápice caulinar e radicular, sendo posteriormente transportadas ao longo de todo o eixo da planta. A principal auxina presente nas plantas é o ácido indol-3-acético (AIA) (Kende & Zeevaert, 1997) embora existam outros compostos com atividade auxínica, como o ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético

(2,4-D) e o ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA). A utilização de auxinas nos sistemas *in vitro* é feita durante a fase de multiplicação, normalmente associadas a citocininas, mas é na formação de raízes que elas se tornam indispensáveis (Gaspar & Coumans, 1987).

A presença de citocininas *in vitro* é essencial para a indução da divisão celular (George *et al.*, 2008), mas ao contrário das auxinas, níveis elevados de citocininas inibem a formação de raízes adventícias (Malá *et al.*, 2009). As citocininas mais utilizadas nos meios de culturas são a cinetina (Ki), a 6-benzilaminopurina (BAP), a 2-isopenteniladenina (2-iP) e a 6-( $\delta$ -metil- $\gamma$ -hidroximetilalilamino)-purina (Zeatina). As citocininas promovem a proliferação de rebentos axilares em oposição à dominância apical promovida pelas auxinas e apresentam um conjunto variado de efeitos nos processos fisiológicos e de desenvolvimento das células, incluindo na senescência foliar, na mobilização de nutrientes, na dominância apical, na formação e atividade dos meristemas apicais do caule, no desenvolvimento floral, na quebra da dormência apical e na germinação de sementes. As citocininas possuem também a capacidade de induzir as divisões celulares em culturas *in vitro* na presença de uma auxina (Taiz e Zieger, 2002).

Quando se utilizam diferentes combinações entre auxinas e citocininas é possível promover o crescimento diferenciado e a organogénese. Um rácio elevado entre auxina e citocinina favorece a formação de raízes, enquanto o contrário induz a formação de caules e valores intermédios promovem a proliferação do *callus*. Contudo, a utilização de concentrações muito elevadas de auxinas nos meios de cultura pode provocar o crescimento de estruturas deficientes ou inibir por completo o crescimento celular. Quando a concentração da auxina é baixa, normalmente é favorecida a formação de raízes. Estes dados não podem ser aplicados a todas as plantas e as concentrações utilizadas variam de espécie para espécie (Thorpe, 1994). No caso da indução por organogénese esta é influenciada pela natureza do próprio explante, as condições em que a planta dadora se desenvolveu e as condições de cultura (Canhoto, 1994) bem como a perda da capacidade de regeneração das plantas devido ao envelhecimento das culturas e o aparecimento de plantas vitrificadas.

#### • **Metodologias em micropropagação**

Existem principalmente três metodologias de micropropagação para gerar novas plantas *in vitro*:

- Por desenvolvimento de gomos axilares
- Por organogénese
- Por embriogénese somática



A proliferação por gomos axilares, *in vitro*, é geralmente considerada uma via conveniente para a micropropagação, mesmo que as taxas de multiplicação normalmente obtidas possam ser consideravelmente menores do que pelas outras vias. O desenvolvimento de gomos axilares não inclui a fase de *callus* e a probabilidade de variação somaclonal é menor, sendo considerado um sistema “mais seguro” para a preservação das características clonais. Esta via não envolve a regeneração de novos gomos já que apenas promove o desenvolvimento de meristemas diferenciados ou em diferenciação existentes nas axilas das folhas e nos ápices caulinares (Thorpe, 1994; Bhojwani & Razdan; 1996). O ápice caulinar também já contém muitos gomos axilares em diferentes estágios de desenvolvimento, podendo ser excisado e colocado em meio de cultura, levando à proliferação massiva e alongamento de rebentos laterais (Loberant & Altman, 2010).

No caso da organogénese há formação *de novo* de rebentos e/ou raízes, iniciando-se com um grupo de células meristemáticas diretamente a partir do interior do explante ou a partir do *callus* que mais tarde se transforma num rebento ou num meristema radicular (Thorpe, 1994). O tipo de explante, a composição do meio de cultura (especialmente o balanço de reguladores de crescimento) e as condições de cultura, podem afetar a formação de um rebento ou de um meristema radicular. Uma vez organizados, o rebento ou o meristema radicular começam a desenvolver-se formando pequenos rebentos ou raízes. Outras etapas de organização, diferenciação e crescimento incluem a formação de conexões vasculares funcionais entre os rebentos em desenvolvimento e as raízes dando origem a plântulas (Loberant & Altman, 2010). Posteriormente, estas plântulas serão colocadas em aclimatização e futuramente cultivadas em estufa ou no campo.

A embriogénese somática é um processo pelo qual células haploides ou diploides somáticas se desenvolvem através de diferentes fases embriogénicas dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Na embriogénese somática *in vitro* ou induzida, células haploides ou diploides (somáticas) em diferentes estados de diferenciação podem, se adequadamente induzidas por estímulos ambientais ou químicos, serem reprogramadas e adquirirem novas competências morfogenéticas. A embriogénese somática difere da organogénese já que naquela a regeneração é bipolar, isto é, uma célula progenitora divide-se de forma desigual, formando simultaneamente um meristema caulinar e um meristema radicular, dando origem a um grupo de células conhecidas como massas celulares pró embrionárias. A indução destas massas é frequentemente favorecida por uma exposição inicial do tecido ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético ou outra auxina, embora a indução embriogénica de uma célula somática não esteja exclusivamente dependente do uso de reguladores de crescimento, podendo ser utilizados choques térmicos, variações nos níveis de pH e utilização de outros produtos químicos. Em seguida, as massas são transferidas

normalmente para um meio sem auxina ou com concentração reduzida, muitas vezes em meio líquido sob agitação, em que os embriões somáticos irão proliferar (Thorpe, 1994).

Em vez da utilização de frascos de vidro com meio de cultura agarizado, poder-se-á também utilizar biorreatores, que são equipamentos para cultura sob imersão temporária ou permanente de células, gomos, embriões ou outro tipo de explante que se pretenda utilizar em micropropagação e muitos têm sido os trabalhos publicados, em diferentes espécies, dando conta da significativa importância da sua utilização (Escalona, 2003; Paek *et al.*, 2005; Arencibia *et al.*, 2008; Debnath, 2009; Aragón *et al.*, 2010; Debnath, 2010; Jin *et al.*, 2013). Os biorreatores utilizam meio de cultura líquido, permitem a renovação do ar durante a cultura, bem como se pode proceder à monitorização de alguns parâmetros essenciais ao crescimento do propágulo, tais como pH, oxigénio dissolvido, temperatura, concentração de iões, etc. Hoje em dia, os biorreatores são utilizados para cultura de células, tecidos, gomos e plântulas, tendo como objetivo final a produção em larga escala. No entanto, podem surgir problemas quando se tenta transpor o trabalho em frasco para uma escala maior, podendo a viabilidade celular ser baixa já que a célula vegetal é altamente sensível ao stress provocado pelo atrito entre as células, podendo ocorrer lise como consequência da agitação do meio de cultura.

#### • Enraizamento

O enraizamento adventício é uma resposta multifatorial levando à formação de novas raízes na base dos rebentos e ao estabelecimento de uma planta completa e autónoma.

Para promover o enraizamento a auxina endógena produzida no ápice do rebento, e transportada basipetamente até à superfície de corte pode não ser suficiente e, normalmente é complementada pela aplicação da fitohormona exógena melhorando assim a resposta de enraizamento (Pop *et al.*, 2011). O tipo de auxina, a concentração, o modo e tempo de aplicação, são aspetos que influenciam marcadamente este processo (Gaspar & Coumans, 1987; Blakesley, 1994). Dentro do grupo das auxinas, as mais utilizadas são o ácido indol butírico (AIB), o ácido indol acético (AIA) e o ácido naftalenoacético (ANA). Quanto ao modo de aplicação, elas podem ser incorporadas ao meio de cultura quer durante todo o processo de rizogénese, quer durante um período curto de exposição, que pode ir desde algumas horas até vários dias. Outro processo de aplicação consiste na imersão da base dos rebentos em soluções concentradas de auxina durante curtos períodos de tempo, de alguns segundos a poucos minutos.

O enraizamento adventício tem essencialmente duas fases principais: (a) a indução, em que poderão ser requeridas elevadas concentrações de auxina; (b) a expressão e desenvolvimento radicular, que é inibida por elevadas concentrações de auxina e na qual as

mudanças anatómicas têm lugar (Costa *et al.*, 2013). A fase de indução envolve reprogramação das células alvo para o estabelecimento de meristemóides na fase de iniciação. Frequentemente, durante o desenvolvimento de meristemóides e primórdios radiculares as concentrações de auxina e compostos fenólicos são baixas mas observa-se uma elevada atividade da peroxidase (Gonçalves *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2008).

A fase de expressão corresponde ao crescimento dos primórdios radiculares através do tecido do caule e ao estabelecimento de conexões vasculares entre o primórdio radicular e o rebento. Este acontecimento é de extrema importância já que uma fraca conexão pode levar a uma raiz não funcional com consequências negativas para a sobrevivência do rebento (Gonçalves *et al.*, 1998; Schwambach *et al.*, 2008; Ahkami *et al.*, 2009).

### • **Aclimatização**

Após a fase de enraizamento, torna-se necessário proceder à adaptação das plantas desenvolvidas em condições de heterotrofia para sobreviverem em condições autotróficas. Nesta fase podem-se considerar determinantes alguns fatores físicos, tais como luz, humidade e temperatura, que são gradualmente alterados a fim de permitir à planta a gradual autossuficiência fotossintética. Para algumas espécies vegetais esta fase é muito crítica já que uma elevada percentagem de plantas micropropagadas não sobrevivem ou o seu desenvolvimento não é de forma alguma o desejado. Por vezes, as plantas micropropagadas podem apresentar estomas não funcionais, uma fraca conexão vascular entre a parte aérea e a parte radicular não havendo um controlo efetivo da transpiração, associada a uma débil capacidade fotossintética inicial o que poderá contribuir para o insucesso desta fase (Dubuc & Desjardins, 2007). Inicialmente, as plantas são colocadas em substratos adequados à espécie, em ambiente controlado em termos de luz e temperatura e a uma humidade elevada, e no final deste período de transição gradual para condições naturais, espera-se que as plantas readquiram processos fisiológicos que lhes permitam a passagem para as condições autotróficas, a fim de não perder todo o investimento colocado neste processo.

### • **Micropropagação em espécies da família *Fabaceae***

Até à data não foram publicados trabalhos sobre micropropagação desta espécie pelo que se apresentam alguns trabalhos de micropropagação noutras espécies da mesma família da carqueja, em que são feitas tentativas de otimização de procedimentos de estabelecimento e multiplicação *in vitro* e que nos deram orientações para os ensaios a desenvolver com a *P. tridentatum* (L.) Willk.

Singh & Tiwari (2010) obtiveram um protocolo para multiplicação em larga escala de uma planta medicinal, a *Clitoria ternatea* L. O protocolo utilizado permitiu regeneração direta a partir de explantes do nó cotiledonar e, segundo os autores, são produzidas plantas viáveis, uniformes e saudáveis com uma elevada taxa de sobrevivência, podendo ser utilizadas para produção comercial, sendo importante para a extração de compostos bioativos. O meio de cultura que permitiu melhor desempenho foi o meio MS e das três citocininas utilizadas (benzilaminopurina, cinetina e tidiazurão) a BAP ( $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) foi a citocinina mais efetiva na proliferação dos rebentos. O número máximo de raízes e o enraizamento a 100% em *Clitoria ternatea* L. foi obtido por imersão basal dos rebentos em solução de  $500 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB, durante 5 minutos e posteriormente subcultivados em meio MS com redução dos macronutrientes, tendo as plantas regeneradas sido aclimatizadas com sucesso (Singh & Tiwari, 2010).

Para a espécie *Cassia siamea* Lam., foi desenvolvido um método eficiente de propagação *in vitro*, usando o nó cotiledonar que foi colocado em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, cinetina e tidiazurão separadamente e também utilizadas em combinação com auxinas (Parveen *et al.*, 2010). Nos tratamentos apenas com citocininas, a aplicação de BAP a  $1 \text{ }\mu\text{M}$  revelou ser a concentração ótima para regeneração, mas a frequência de regeneração aumentou com a aplicação conjunta de uma auxina, tendo os autores obtido os melhores resultados em termos de regeneração, número de rebentos por explante e comprimento máximo do rebento no meio MS suplementado com  $1 \text{ }\mu\text{M}$  de BAP e  $0,5 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA (Parveen *et al.*, 2010). Estes resultados obtidos, em termos de adição de baixas concentrações de auxinas juntamente com citocininas na promoção da regeneração de rebentos também foram obtidos em *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. (Anis *et al.*, 2010) e *Mucuna pruriens* (L.) DC. (Faisal *et al.*, 2006). No trabalho de Parveen *et al.* (2010), os rebentos foram ainda enraizados com sucesso utilizando meio de cultura MS, com os nitratos reduzidos a metade e suplementado com  $2,5 \text{ }\mu\text{M}$  de AIB, tendo sido demonstrado que baixas concentrações de auxina são preferíveis às altas concentrações já que estas favorecem a formação de *callus* na parte basal antes da indução radicular, o que pode resultar em conexões vasculares deficientes entre o rebento e as raízes induzidas, afetando posteriormente a percentagem de sobrevivência das plantas. Estes resultados são similares a outros trabalhos em leguminosas como por exemplo em *Pterocarpus marsupium* Roxb. (Chand & Singh, 2004), *Cassia angustifolia* (Agrawal & Sardar, 2006), *Pterocarpus santalinus* L. (Prakash *et al.*, 2006) e *Clitoria ternatea* L. (Shahzad *et al.*, 2007) em que a utilização de baixas concentrações de AIB no enraizamento apresentou os melhores resultados.

Para a espécie *Pterocarpus santalinus* L., utilizando explantes de ápices caulinares, a maior percentagem de regeneração de rebentos (83,3%) foi obtida utilizando o meio de

cultura de Murashige e Skoog suplementado com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP juntamente com  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de tidiazurão (TDZ) após 45 dias de cultura (Balaraju *et al.*, 2011). Os autores afirmam que este sistema de micropropagação utilizando explantes de ápices caulinares, poderá servir de base para desenvolver protocolos para um fornecimento contínuo de *P. santalinus* L. para fazer face à crescente procura desta valiosa lenhosa com propriedades farmacológicas e medicinais.

Para *Albizia lebbbeck* (L.) Benth., foi desenvolvido um eficiente e reprodutível protocolo para regeneração de rebentos *in vitro* usando explantes radiculares (Perveen *et al.*, 2011). Estes explantes radiculares foram provenientes de plântulas jovens, com 15 dias de idade e foram colocados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP, Ki e 2-iP isoladamente ou em combinação com ANA. A taxa mais elevada de multiplicação ( $16 \pm 1,87$  para o número médio de rebentos e  $5,16 \pm 0,38 \text{ cm}$  para comprimento da parte aérea) foi alcançada em meio MS suplementado com  $7,5 \text{ }\mu\text{M}$  BAP e  $0,5 \text{ }\mu\text{M}$  ANA. O enraizamento foi obtido usando  $1/2\text{MS}$  e suplementado com  $2 \text{ }\mu\text{M}$  de AIB (com uma média de raízes de  $5,20 \pm 0,83$  e comprimento médio da maior raiz de  $4,4 \pm 0,67 \text{ cm}$ ) tendo sido atingida uma taxa de sobrevivência de 80%.

Em *Desmodium gangeticum* (L.) DC, foram utilizados segmentos nodais colocados em meio de cultura base de MS, suplementado com várias concentrações de cinetina e benziladenina, tendo sido obtida a melhor taxa de multiplicação na concentração de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de BA (Puhan & Rath, 2012). Nesse mesmo trabalho, os rebentos regenerados foram colocados em enraizamento, em meio de cultura com diferentes concentrações de auxina, tendo havido 100% de enraizamento no meio MS suplementado com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB. Os autores consideraram este protocolo como muito útil e eficiente quer para utilização em plantações em larga escala com material de qualidade quer para programas de conservação de germoplasma.

Um protocolo eficaz de multiplicação *in vitro* a partir de explantes folheares também foi conseguido em *Acacia caesia* (L.) Willd., onde para a regeneração dos rebentos foi utilizando meio MS suplementado com AIB, BAP, TDZ e GA3 em várias concentrações e para o enraizamento dos mesmos foi utilizado  $1/2 \text{ MS}$  suplementado com diferentes concentrações de AIB, AIA e Ki. O meio mais eficaz na indução de rebentos foi o meio de MS suplementado com uma combinação de AIB e TDZ nas concentrações de 2 e  $5 \text{ mgL}^{-1}$  respetivamente. O meio de MS com redução dos nitratos para metade com AIB e Ki nas concentrações de 2 e  $0,4 \text{ mgL}^{-1}$  respetivamente induziu ao melhor desempenho em termos de enraizamento e comprimento da maior raiz (Thambiraj & Paulsamy, 2012).

Em *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Kuçukoduk (Tekdal & Cetiner, 2014), uma espécie que está em vias de extinção na Turquia, foram utilizados explantes folheares colocados em meio de cultura MS suplementado com uma combinação de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA

e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de zeatina obtendo valores de regeneração elevados (93,3%). As plântulas regeneradas foram enraizadas em meio de cultura contendo  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB com surgimento de raízes no final da segunda semana.

Dos trabalhos feitos em todas estas espécies, podemos verificar que a formulação de Murashige e Skoog (1962) foi a mais utilizada e com muito sucesso quer para a fase de estabelecimento/multiplicação quer para a fase de enraizamento. Também a variante desta formulação com a redução dos nitratos a metade foi algumas vezes referenciada. No que diz respeito aos reguladores de crescimento é notória a importância e o efeito das citocininas no estabelecimento/multiplicação, em particular da benzilaminopurina, isoladamente ou associada a uma auxina, neste caso ácido indol acético. Já no enraizamento, a formulação de Murashige e Skoog (1962) é de novo a mais citada, suplementada com ácido indol butírico como indutor da rizogénese.

Na ausência de formulações e combinações hormonais para a micropropagação da *P. tridentatum* (L.) Willk., foi selecionada a formulação de Murashige e Skoog (1962) para o estabelecimento e para a multiplicação desta espécie, também com a variante dos nitratos reduzidos a metade e associadas a várias combinações de reguladores de crescimento. No enraizamento optou-se por tentar desenvolver uma metodologia com menores custos associados o que em termos comerciais poderá ser uma mais-valia para a possível propagação em larga escala desta espécie.

De acordo com o que foi referido anteriormente e, resumidamente, o objetivo deste trabalho de micropropagação em *P. tridentatum* (L.) Willk. foi o de desenvolver um sistema de propagação *in vitro* replicável e o mais eficiente possível por forma a viabilizar a sua utilização em termos comerciais. Para isso foram testados vários protocolos que a seguir se descrevem em Materiais e Métodos.

## 4.2. Materiais e métodos

### 4.2.1. Material vegetal

O material vegetal foi colhido nos três locais já descritos no ponto 3.1., junto com o material vegetal para os diversos ensaios, nos meses de outubro, fevereiro e maio. As plantas de carqueja foram identificadas pela Flora Ibérica, sendo as plantas provenientes da zona do Orvalho identificadas como *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. subsp. *lasianthum* (Spach) Talavera & P.E.Gibbs (Fig. 1.1) e na zona da Malcata (Fig. 1.2) e Gardunha (Fig. 1.3) como *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. subsp. *cantabricum* (Spach) Talavera & P.E.Gibbs.

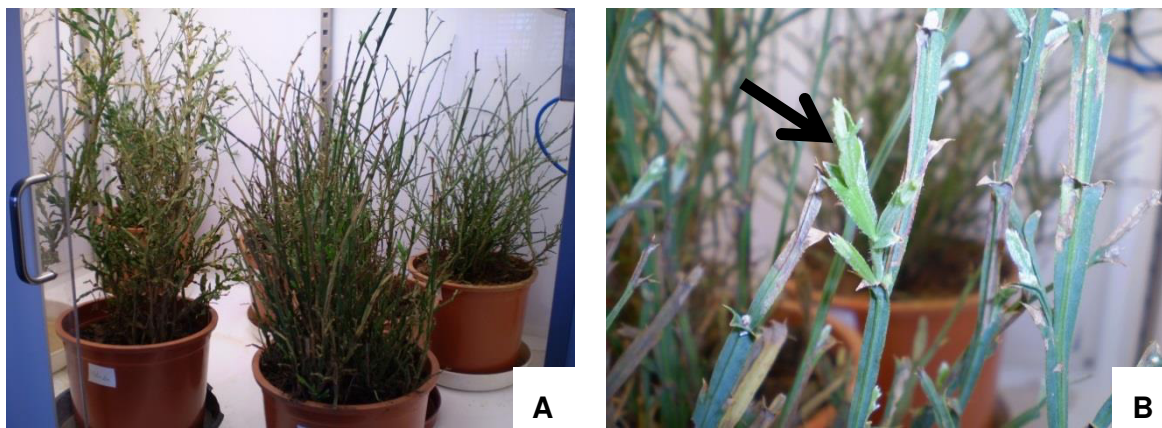
Inicialmente foram utilizados como explantes partes aéreas/estacas das plantas silvestres (Fig. 4.1) que após diversas metodologias de desinfecção não permitiram a obtenção dos explantes diretamente dos gomos abrolhados da planta silvestre já que todo o material infetou.



**Figura 4.1.** Material vegetal de *P. tridentatum* colhido no campo. (A) Malcata, (B) Orvalho, (C) Gardunha.

Tendo recolhido plantas no seu habitat natural, em cada um dos três locais, as mesmas foram envasadas (Fig. 4.2) e colocadas em estufim (ARALAB, Fitoclima 500EH) em condições controladas de luz, humidade e temperatura para que fosse promovido o abrolhar dos gomos. Apenas do material vegetal colhido em fevereiro foi possível obter rebentos dos gomos vegetativos sem infeções para continuação do ensaio de estabelecimento (Fig. 4.2 B).





**Figura 4.2.** Plantas silvestres de *P. tridentatum* envasadas (A) e pormenor de rebentos jovens desenvolvidos em condições laboratoriais (seta) (B).

#### 4.2.2. Estabelecimento *in vitro*

Os rebentos provenientes dos gomos abrolhados, em condições laboratoriais, foram lavados em água corrente durante 30 minutos e sujeitos a uma pré-desinfecção com fungicida Benlate (Du Pont) na concentração de  $2 \text{ gL}^{-1}$  durante 15 minutos. Após esse período foram seccionados segmentos nodais e iniciou-se um procedimento de desinfecção já em condições assépticas e realizada em câmara de fluxo laminar horizontal que consistiu em:

- Imersão em álcool a 70% durante 30 segundos;
- Imersão em solução de hipoclorito de sódio (1:3 e 1:4, v:v) com duas ou três gotas de Tween 20 durante 15 minutos;
- Passagem por água destilada esterilizada (operação repetida 3 vezes, ficando os segmentos nodais na 4ª água destilada esterilizada).

Este procedimento de desinfecção inicial não se mostrou eficaz uma vez que infetaram 100% dos explantes. Assim sendo, foram realizados outros procedimentos de desinfecção superficial com novas proporções de hipoclorito de sódio (1:2 e 1:3) e com tempos de imersão entre 10 e 20 minutos. Durante a permanência dos explantes em hipoclorito de sódio, estes foram mantidos a baixa temperatura (Fig. 4.3) de modo a que a libertação do cloro da solução fosse minimizada, uma vez que a temperatura baixa inibe a decomposição do hipoclorito de sódio em cloreto de sódio e, assim, a desinfecção fosse mais eficaz.



Paralelamente procedeu-se à desinfecção de explantes com substituição do hipoclorito de sódio por bicloreto de mercúrio ( $\text{Cl}_2\text{Hg}$ ) a 0,05%, 0,08% e 0,1% durante 1, 2, 3 e 4 minutos.



**Figura 4.3.** Rebentos de *P. tridentatum* no processo de desinfecção com hipoclorito de sódio a baixa temperatura.

Os explantes foram estabelecidos em tubos de ensaio (150xØ25mm) contendo cada um 15 mL de meio base (macronutrientes, micronutrientes e vitaminas de Murashige e Skoog (1962)) (Anexo 3) suplementado com 30  $\text{gL}^{-1}$  de sacarose, 2  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP (6-Benzilaminopurina) + 0,5  $\text{mgL}^{-1}$  de AIB (Ácido indol-3-butírico). O pH foi ajustado entre 5,5 e 5,6 com HCl 1N ou NaOH 1N sendo posteriormente adicionado agar (marca Sigma), numa concentração de 7  $\text{gL}^{-1}$ . A esterilização dos meios foi feita em autoclave a 121°C, 1 atm e durante 20 minutos. Após inoculação do material vegetal, as culturas foram mantidas numa sala de cultura com 25 °C dia e 22 °C noite ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 16h. A iluminação foi feita por lâmpadas fluorescentes, tipo “cool white” com intensidade luminosa de  $45\pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As repicagens seguintes, para obtenção de população stock, efetuadas cada quatro semanas, durante 3 repicagens sucessivas, foram feitas em frascos (85xØ65mm) com 50 mL de meio de cultura base suplementado com 1  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP juntamente com 0,5  $\text{mgL}^{-1}$  de AIB contendo sete explantes por frasco.

#### 4.2.3. Fase de multiplicação

Para os ensaios da fase de multiplicação foram utilizados explantes secundários com  $10\pm 2$  mm de comprimento, tendo sido colocados em meio de cultura base ou com redução de nitratos a metade ( $\text{MS}(1/2\text{NO}_3)$ ). Os meios foram suplementados com BAP ou com AIB em diferentes concentrações e também em utilização conjunta (Tab. 4.1).

**Tabela 4.1.** Meios de cultura utilizados em fase de multiplicação.

Meio	Citocinina (BAP, mgL <sup>-1</sup> )	Auxina (AIB, mgL <sup>-1</sup> )
MS	-	-
MS	1	-
MS	-	0,5
MS	1	0,5
MS(1/2NO <sub>3</sub> )	-	-
MS(1/2NO <sub>3</sub> )	1	-
MS(1/2NO <sub>3</sub> )	-	0,5
MS(1/2NO <sub>3</sub> )	1	0,5

Legenda: MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); MS(1/2NO<sub>3</sub>) - Meio de Murashige e Skoog (1962) com redução de nitratos a metade; BAP - 6-Benzilaminopurina; AIB - Ácido indol-3-butírico.

O meio foi solidificado com 7 gL<sup>-1</sup> de agar (Sigma) e o pH foi ajustado entre 5,5 e 5,6 com HCl 1N ou NaOH 1N antes de autoclavar a 121°C, 1 atm, durante 20 minutos. Foram utilizados frascos (85x65mm) com 50 mL de meio de cultura e 7 explantes por frasco, tendo as condições de cultura sido idênticas às descritas para a fase de estabelecimento.

Para cada um dos três locais de recolha (Malcata, Orvalho e Gardunha) e para cada uma das oito modalidades, foram utilizados 40 explantes (segmentos nodais) e a experiência foi repetida três vezes, num total de 2880 explantes (3x8x40x3).

Nesta fase e após 4 semanas de cultura, foi avaliada quantitativamente (sem análise estatística) a percentagem de explantes viáveis, a percentagem de explantes infetados e a percentagem de explantes mortos (inviáveis) para cada um dos locais de origem do material vegetal e para cada uma das combinações do meio de cultura (nutrientes e reguladores de crescimento). Em termos quantitativos e com análise estatística foram avaliados o número de rebentos produzidos (NReb), o comprimento do maior rebento (CMReb), o comprimento do menor rebento (CmReb) e a taxa de multiplicação (TxM) (número de explantes secundários possíveis de utilizar no subcultivo seguinte).

#### 4.2.4. Enraizamento e aclimatização

Para estudar a capacidade de enraizamento dos rebentos provenientes do processo de multiplicação foram utilizados rebentos com origem na Serra da Malcata, com cerca de 5 cm ( $\pm 1$  cm) de comprimento, provenientes da população stock nas condições de cultura descritas anteriormente. A razão de se apresentarem apenas resultados de enraizamento com o material vegetal proveniente da Serra da Malcata resultou do facto dos ensaios que foram estabelecidos com as outras origens (Orvalho e Gardunha) terem decorrido num período em que se registaram graves problemas de funcionamento da sala de cultura que inviabilizaram a obtenção de resultados credíveis.

A indução radicular foi feita em condições não asséticas, *ex vitro*, por imersão dos 15 mm basais do rebento em solução hidroalcoólica de auxina (Fig. 4.4), em diferentes concentrações e em diferentes tempos de exposição à mesma (Tab. 4.2), sendo efetuado um controlo sem indução auxínica.



**Figura 4.4.** Imersão basal dos rebentos de *P. tridentatum* da Serra da Malcata em auxina para indução radicular.

**Tabela 4.2.** Concentração de AIB e tempos de exposição para indução radicular.

Concentração de AIB (g L <sup>-1</sup> )	Tempo de exposição ao AIB (segundos)
0	-
0,5	30
0,5	60
1	30
1	60
2	30
2	60

Legenda: AIB - Ácido indol-3-butírico.

Os rebentos após indução foram colocados em caixas de poliestireno expandido de 80x40x17 cm com substrato de turfa:perlite (1:2, v:v) humedecido a 70% com solução nutritiva de ½MS ¼NO<sub>3</sub> e esterilizado a 121 °C durante 1 hora. As caixas foram tapadas com tampa acrílica transparente, onde os rebentos permaneceram durante 4 semanas para expressão e desenvolvimento radicular.

Foram utilizados 15 rebentos por modalidade e foram feitas 2 repetições num total de 210 rebentos (1x7x15x2) sendo colocados na sala de cultura nas condições já descritas para estabelecimento e multiplicação. Após o período de quatro semanas foram quantificados os seguintes parâmetros: percentagem de enraizamento (% Enr), número de

raízes (NRaizes), comprimento da maior raiz (CMRaiz), comprimento da menor raiz (CmRaiz) e comprimento do rebento enraizado (CReb).

As plântulas enraizadas foram transplantadas para sacos de plástico com volume de 500 cm<sup>3</sup> contendo uma mistura de turfa, substrato e terra (3:1:1, v/v). Foram colocadas em estufim de aclimatização sob intensidade luminosa de 250±10 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas (lâmpadas fluorescentes “cool white”) com redução gradual da humidade relativa de 95% até 50% ao longo de 4 semanas.

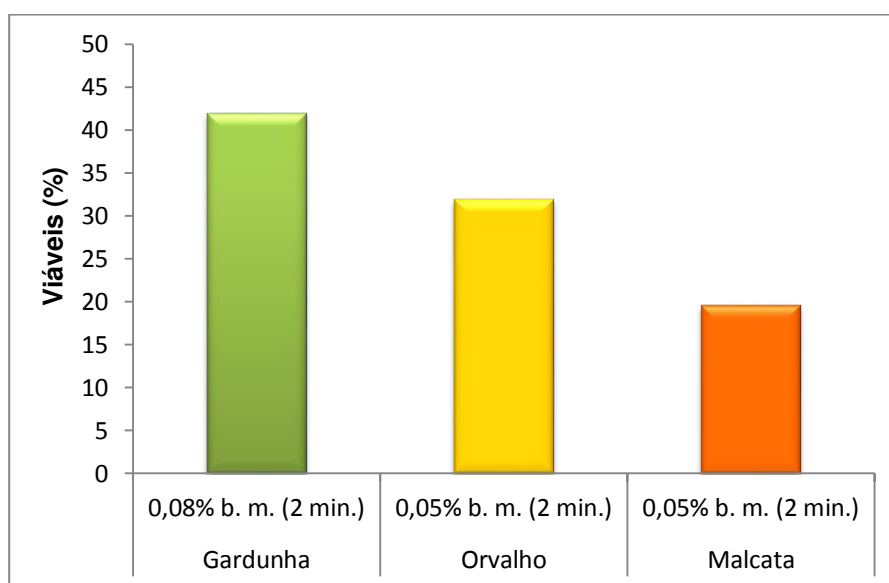
#### **4.2.5 Análise estatística dos resultados**

Para os parâmetros quantificados nas fases de multiplicação e enraizamento o efeito dos tratamentos realizados foi analisado por análise de variância (ANOVA) no programa *Statistica*, Versão 7. Para valores de *F* significativos ( $p < 0,05$ ) foi aplicado o teste de comparação de médias de Duncan sendo que nas figuras e tabelas, colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes.

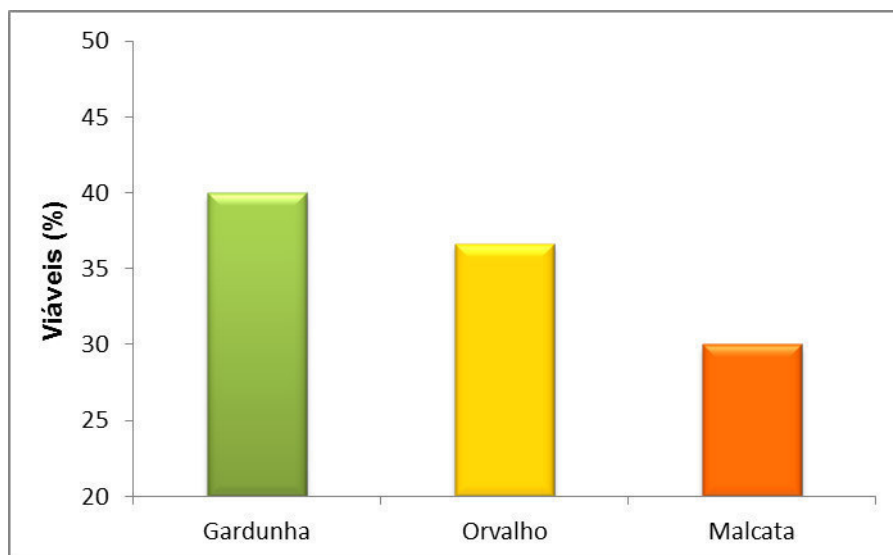
## 4.3. Resultados e discussão

### 4.3.1. Estabelecimento *in vitro*

De todas as modalidades testadas para desinfecção do material vegetal, a utilização do bicloreto de mercúrio e do hipoclorito de sódio a baixa temperatura, foram as que permitiram obter os melhores resultados na desinfecção do material vegetal e, consequentemente permitir a viabilidade de explantes para estabelecimento. No caso do bicloreto de mercúrio as combinações de 0,05% durante 2 minutos para o Orvalho e para a Malcata e 0,08% durante 2 minutos para a Gardunha, permitiram percentagens de explantes viáveis entre 20% a 42% (Fig. 4.5). Já no caso do uso do hipoclorito de sódio, a combinação de 1:3 (v:v) durante 10 minutos a baixa temperatura permitiu a obtenção de 30 a 40% de explantes viáveis (Fig. 4.6).



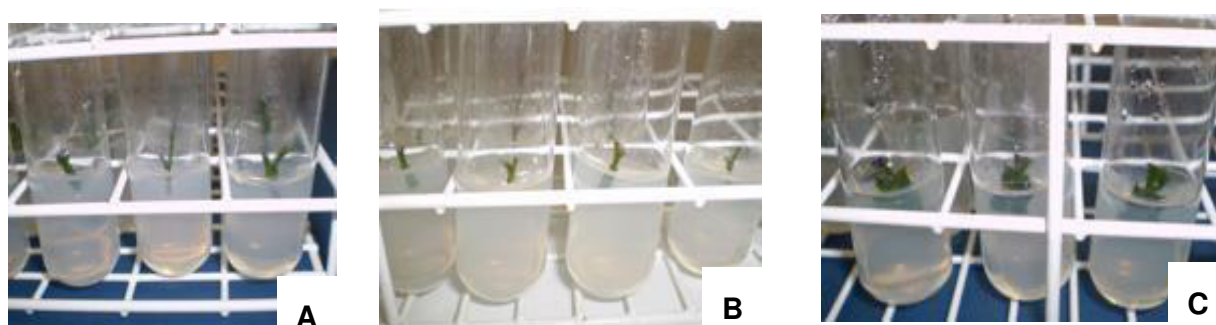
**Figura 4.5.** Percentagem de explantes viáveis utilizando bicloreto de mercúrio (b.m.) como desinfetante.



**Figura 4.6.** Percentagem de explantes viáveis utilizando hipoclorito de sódio 1:3 durante 10 minutos.

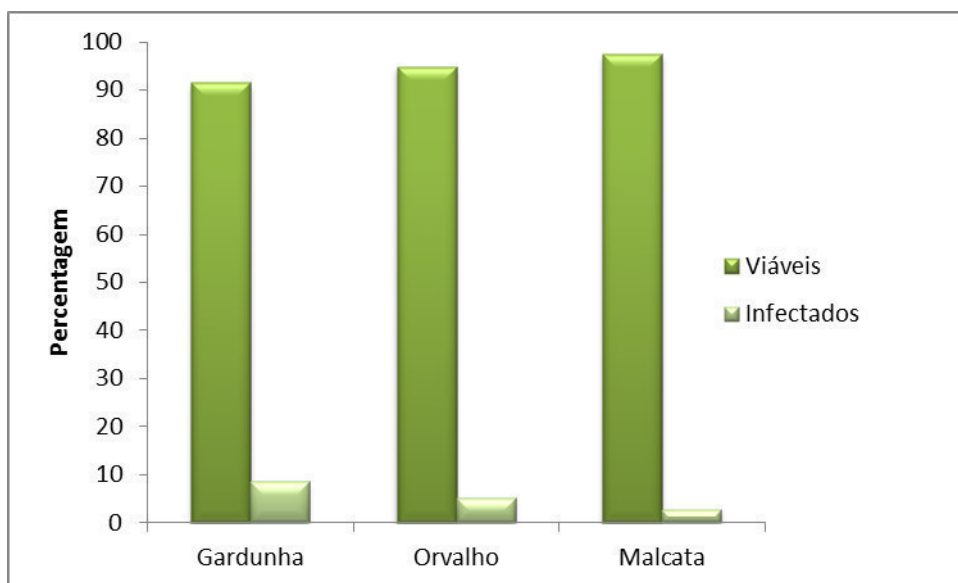
Estes resultados demonstram a dificuldade de estabelecer *in vitro* material vegetal proveniente diretamente do campo, face aos elevados níveis de contaminantes superficiais que este tipo de material apresenta. A bibliografia com referência a percentagens de sucesso nesta fase é escassa, mas vários são os autores que referem dificuldades nesta primeira fase da micropropagação, daí recorrerem a agentes desinfetantes com maior toxicidade mas que se podem apresentar, muitas vezes, como a única alternativa de viabilizar o processo (Parkinson *et al.*, 1996; Moutia & Dookun, 1999; Singh *et al.*, 2006; Holobiuc *et al.*, 2009).

Na Figura 4.7, apresentam-se explantes na fase de estabelecimento em meio MS, suplementado com 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB.



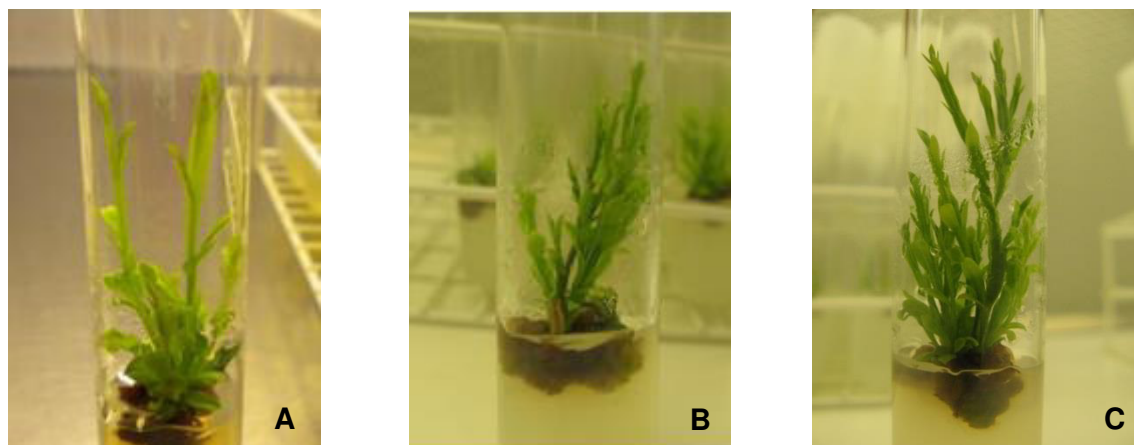
**Figura 4.7.** Estabelecimento *in vitro* de *P. tridentatum*. (A) Gardunha, (B) Orvalho, (C) Malcata.

Ao fim de quatro semanas, procedeu-se ao subcultivo dos explantes verificando-se uma elevada viabilidade (entre 92 e 97%) e uma baixa percentagem de novas infeções (entre 3 e 9%) (Fig. 4.8).



**Figura 4.8.** Resultados obtidos após o primeiro subcultivo para cada uma das populações em estudo.

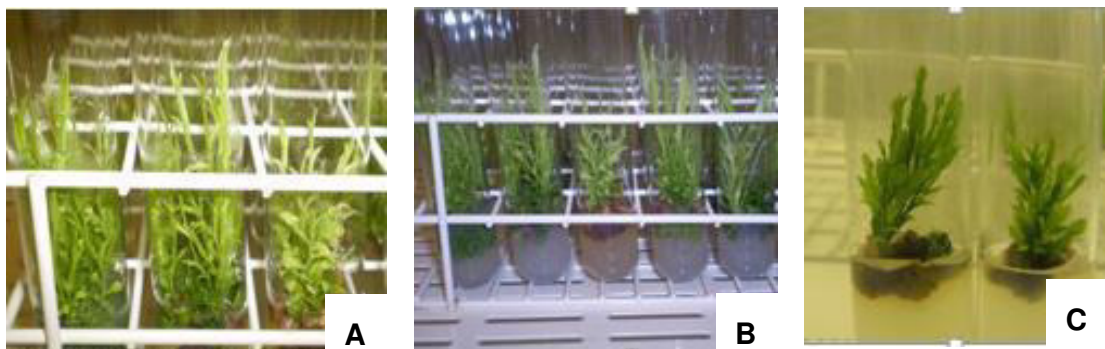
Iniciou-se então um ciclo de repicagens a fim de obter uma população stock que permitisse o delinear dos ensaios de multiplicação. Ao fim dos dois meses em estabelecimento os explantes apresentavam um aspeto vigoroso, com forte rebentamento axilar embora com algumas diferenças morfológicas entre si (Fig. 4.9).



**Figura 4.9.** Explantes de *P. tridentatum* ao fim de 2 meses de estabelecimento. (A) Orvalho, (B) Gardunha, (C) Malcata.

Durante o estabelecimento *in vitro* nenhum dos explantes em tubo de ensaio apresentou libertação de fenóis para o meio de cultura, mostrando-se sempre com coloração verde e sem vitrificação (Fig. 4.10).



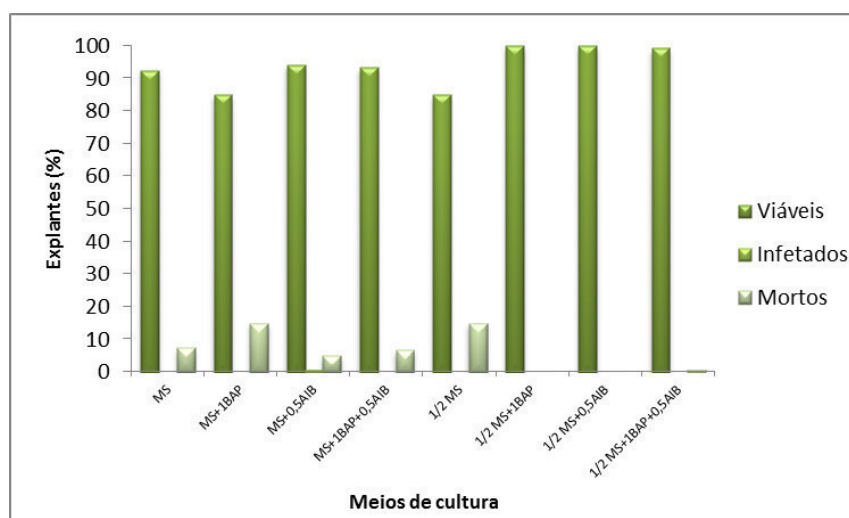


**Figura 4.10.** Aspeto das culturas de *P. tridentatum* ao fim de 3 meses de estabelecimento. (A) Orvalho, (B) Gardunha, (C) Malcata.

### 4.3.2. Fase de multiplicação

Nesta fase foi avaliada quantitativamente a % de rebentos viáveis, a % de explantes infetados e a % de explantes mortos (inviáveis) para cada um dos locais de origem do material vegetal e para cada uma das combinações do meio de cultura (nutrientes e reguladores de crescimento). Em termos estatísticos foram avaliados a influência do local de origem do material vegetal e da composição do meio de cultura (nutrientes e reguladores de crescimento) na promoção de rebentos axilares, no seu comprimento bem como na taxa de multiplicação.

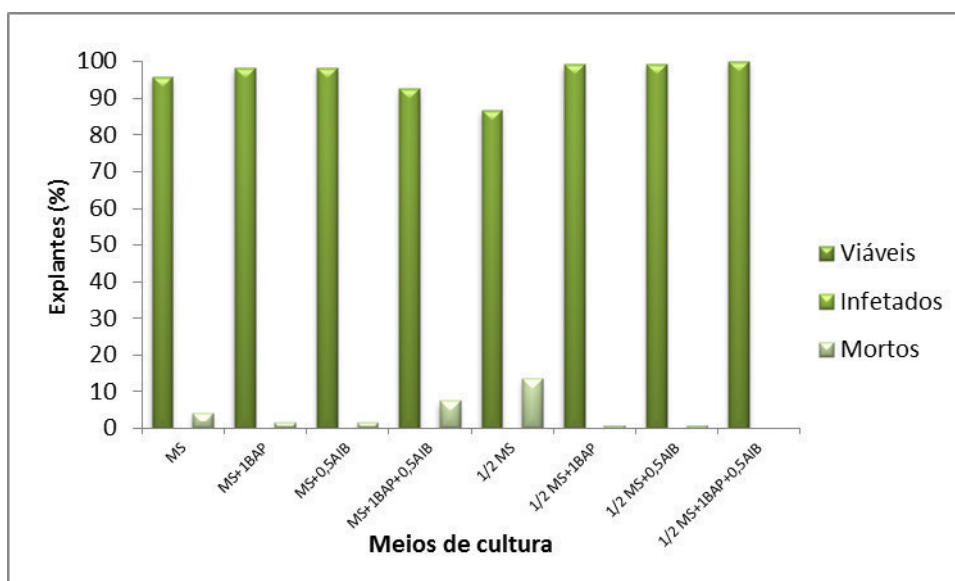
Nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 apresentam-se os resultados obtidos para a viabilidade, infeções e mortalidade dos explantes, respetivamente para os locais Gardunha, Orvalho e Malcata. Como se pode verificar, a viabilidade apresenta o valor mais baixo para a Malcata no meio de cultura MS suplementado com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP (82%) e nos restantes a viabilidade é sempre superior a 85%.



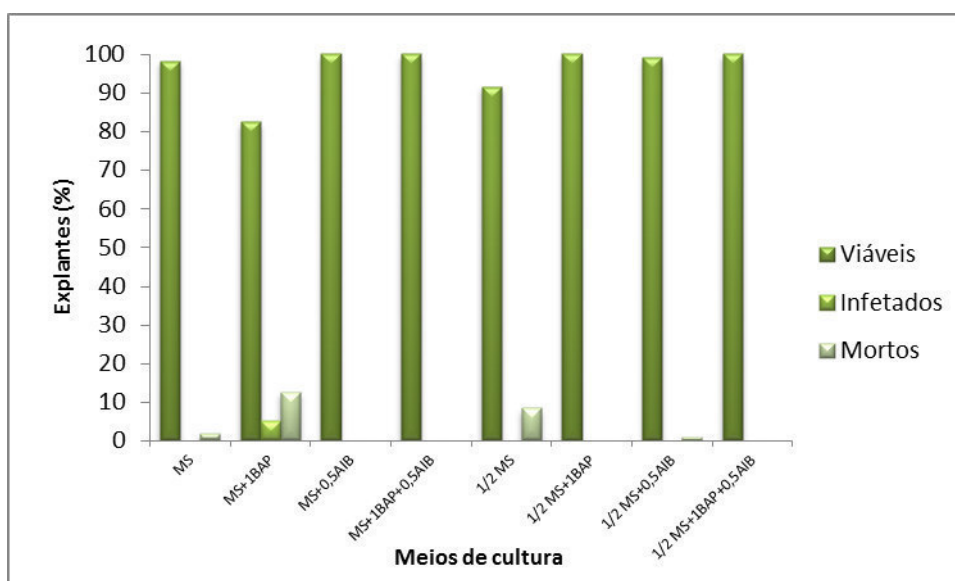
**Figura 4.11.** Percentagem de explantes viáveis, infetados e mortos no ensaio de multiplicação de *P. tridentatum* para o local Gardunha.



Verifica-se também para qualquer um dos locais que a percentagem de infeções é diminuta bem como o número de mortos.



**Figura 4.12.** Percentagem de explantes viáveis, infetados e mortos no ensaio de multiplicação de *P. tridentatum* para o local Orvalho.



**Figura 4.13.** Percentagem de explantes viáveis, infetados e mortos no ensaio de multiplicação de *P. tridentatum* para o local Malcata.

Na análise dos resultados obtidos com os diferentes ensaios de multiplicação para os parâmetros quantificadores verifica-se que o fator local de origem e combinações de meio de cultura provocam efeitos com diferenças significativas. Assim, no caso do local de origem do material vegetal, para os três locais estudados, Malcata, Gardunha e Orvalho, verifica-se que o material proveniente do Orvalho apresenta os valores mais altos para o número de

rebentos (4,4) e para a taxa de multiplicação (12,4) seguindo-se o material da Gardunha, com média de 4 novos rebentos e uma taxa de multiplicação de 7,8 não diferindo estatisticamente da taxa de multiplicação obtida para o material da Malcata (Tab. 4.3).

**Tabela 4.3.** Parâmetros da fase de multiplicação para os 3 locais de origem de *P. tridentatum*.

Local	NReb	CMReb	CmReb	TxM
		(cm)	(cm)	
Malcata	3,4 c	3,8 a	1,38 a	7,7 b
Gardunha	4,0 b	2,8 c	1,17 b	7,8 b
Orvalho	4,4 a	3,6 b	1,32 a	12,4 a

Legenda: NReb – número de rebentos; CMReb – comprimento do maior rebento; CmReb – comprimento do menor rebento; TxM – taxa de multiplicação.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Quando se analisam os parâmetros da fase de multiplicação e de que forma foram influenciados pelo tipo de meio utilizado pode-se afirmar que a presença de reguladores de crescimento é condição indispensável para a reatividade do material em cultura. De facto, quer na formulação de MS quer na formulação de MS(1/2NO<sub>3</sub>) a ausência de reguladores de crescimento originou culturas com desenvolvimentos muito incipientes e com os piores resultados para todos os parâmetros quantificados (Tab. 4.4). Também é possível referir que a formulação completa de MS se mostrou mais favorável na promoção do desenvolvimento das culturas, comparativamente com a formulação de MS com os nitratos reduzidos a metade (no caso do número de rebentos para a formulação de MS registaram-se valores entre 2,2 e 7,1 e para a formulação com nitratos a metade valores entre 1,6 e 4,2, o mesmo se passando para os restantes parâmetros). O meio MS com redução dos nitratos e sem adição de reguladores de crescimento apresentou os valores mais baixos, em todos os parâmetros e para todas as localizações, mas não inibiu o crescimento dos rebentos e a sua proliferação, embora os rebentos se considerassem muito pouco alongados para continuarem em repicagens subsequentes (Tab. 4.4).

**Tabela 4.4.** Parâmetros da fase de multiplicação para as diferentes combinações de meio de cultura e suplementos de reguladores de crescimento de *P. tridentatum*.

Meio	RegCresc		NReb	CMReb	CmReb	TxM
	BAP (mgL <sup>-1</sup> )	AIB (mgL <sup>-1</sup> )				
MS	---	---	2,2 e	2,7 e	1,4 bc	3,4 e
	1,0	---	7,5 a	4,6 b	1,6 a	23,2 a
	---	0,5	3,5 c	3,3 d	1,6 a	7,4 d
	1,0	0,5	7,1 a	5,6 a	1,5 ab	19,4 b
MS(1/2NO <sub>3</sub> )	---	---	1,6 f	1,6 g	0,9 d	1,7 f
	1,0	---	3,0 d	2,5 f	0,8 d	3,8 e
	---	0,5	2,2 e	2,6 ef	1,3 c	2,9 ef
	1,0	0,5	4,2 b	4,3 c	1,3 c	10,9 c

Legenda: MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); MS(1/2NO<sub>3</sub>) - Meio de Murashige e Skoog (1962) com redução de nitratos a metade; RegCresc - regulador de crescimento; BAP - 6-Benzilaminopurina; AIB - Ácido indol-3-butírico; NReb - número de rebentos; CMReb - comprimento do maior rebento; CmReb - comprimento do menor rebento; TxM - taxa de multiplicação.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes (p<0,05).

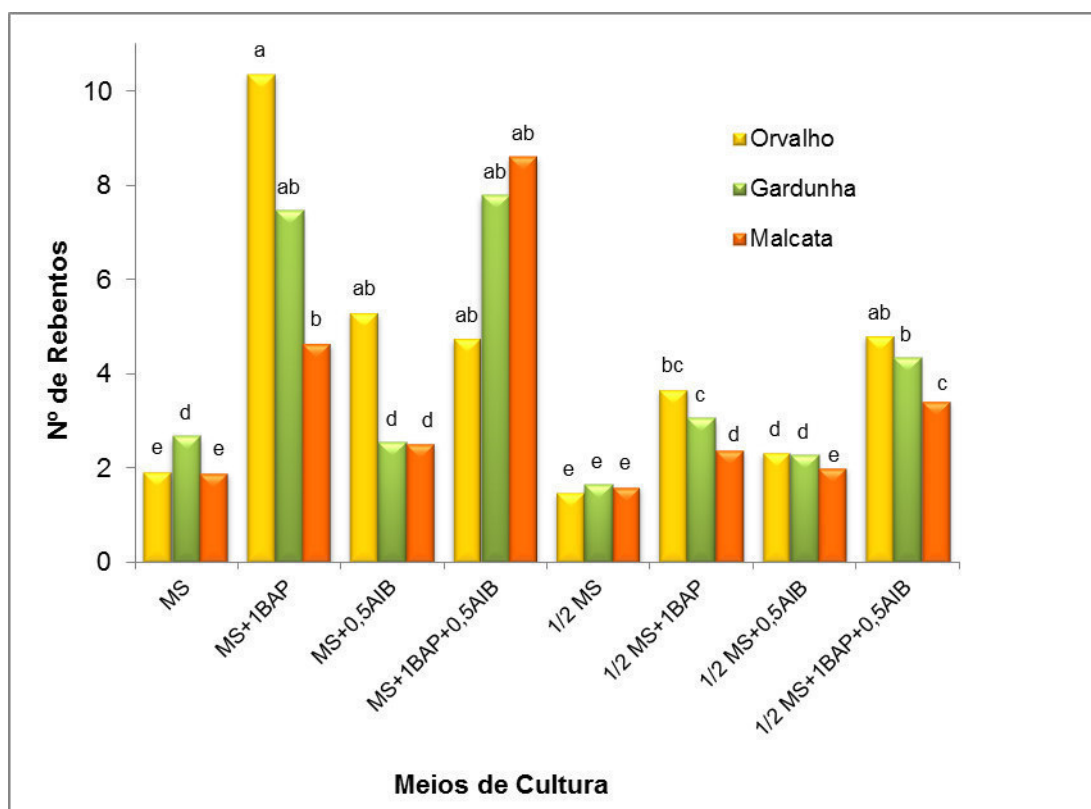
Quanto ao efeito dos reguladores de crescimento verifica-se que na sua ausência se obtêm os piores valores para os parâmetros quantificados e que é altamente significativo o efeito da BAP na promoção e desenvolvimento das culturas. Se verificarmos os resultados obtidos na formulação de MS, a presença de BAP, com ou sem AIB, obteve os valores mais elevados para todos os parâmetros com especial destaque para o número de rebentos e taxa de multiplicação (para o número de rebentos valores de 7,5 e 7,1 com BAP contra 2,2 e 3,5 sem BAP e para a taxa de multiplicação valores 23,2 e 19,4 com BAP contra 3,4 e 7,4 sem BAP). Também para os parâmetros do comprimento do maior e do menor rebento formado se pode observar um padrão de comportamento semelhante.

Da análise estatística da interação entre estes dois fatores (local de origem do material vegetal e combinações de meios de cultura) obtiveram-se valores significativos daí que fosse considerado pertinente apresentar os resultados dessa interação por forma a se ver mais em detalhe o efeito de cada uma das formulações em cada um dos materiais vegetais de acordo com o seu local de origem.

No geral, para o local Orvalho verificou-se que o meio de cultura MS suplementado com 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP promoveu resultados significativamente diferentes nos parâmetros: número de rebentos (Fig. 4.14), comprimento médio do maior rebento (Fig. 4.15) comprimento médio do menor rebento (Fig. 4.16) e taxa de multiplicação (Fig. 4.17). Verifica-se assim, a importância desta citocinina na promoção da divisão celular como também no processo fisiológico de crescimento e diferenciação de células vegetais, sendo que em *P. tridentatum* (L.) Willk. este regulador é um requisito essencial para a indução de

múltiplos rebentos. Neste estudo, a BAP ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) foi de facto muito efetiva no número de rebentos e número de segmentos para o caso da localização Orvalho.

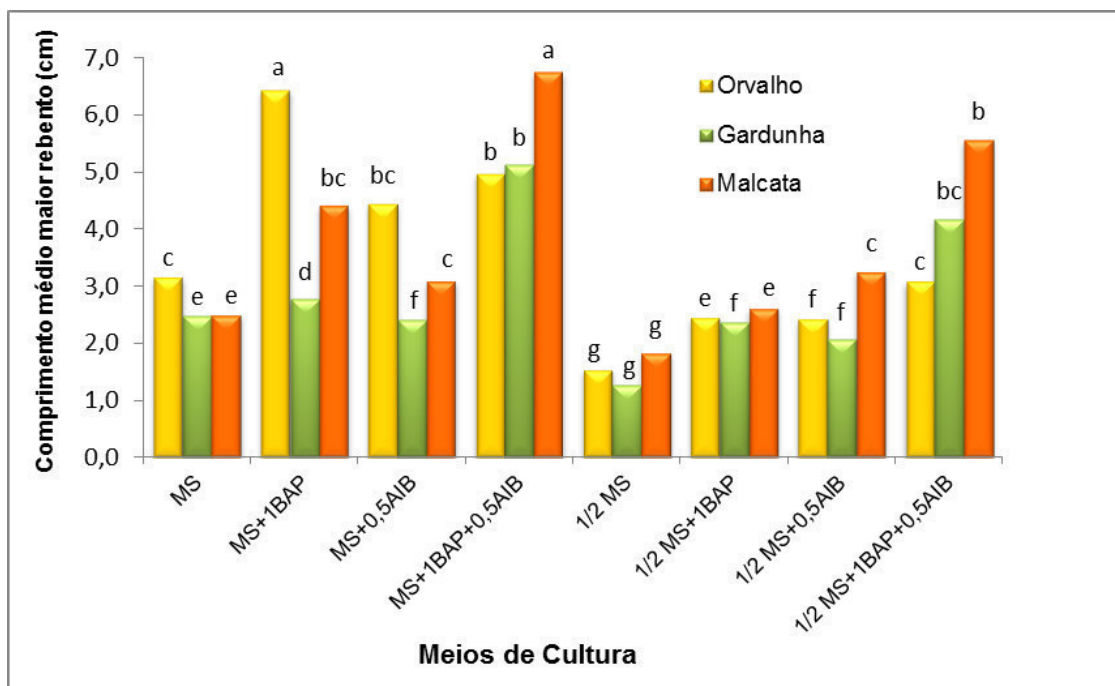
Para o comprimento do maior rebento e número de segmentos passíveis de serem utilizados em subseqüentes repicagens, verificou-se que nos locais Malcata e Gardunha, a composição do meio de cultura que obteve resultados significativamente superiores foi o meio de cultura MS suplementado com a combinação de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB. O uso simultâneo da auxina com citocinina aumentou não só o número de rebentos (Fig. 4.14) como também o seu comprimento (Fig. 4.15 e 4.16) e o número de segmentos que se podem utilizar em subcultivo (Fig. 4.17), pelo que se conclui ser o meio que melhor promoveu crescimento e a excelente proliferação da parte aérea ou seja, é o meio com maior eficácia em fase de multiplicação.



**Figura 4.14.** Número de rebentos formados em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.

Legenda: MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); MS( $1/2\text{NO}_3$ ) - Meio de Murashige e Skoog (1962) com redução de nitratos a metade; BAP - 6-Benzilaminopurina; AIB - Ácido indol-3-butírico.

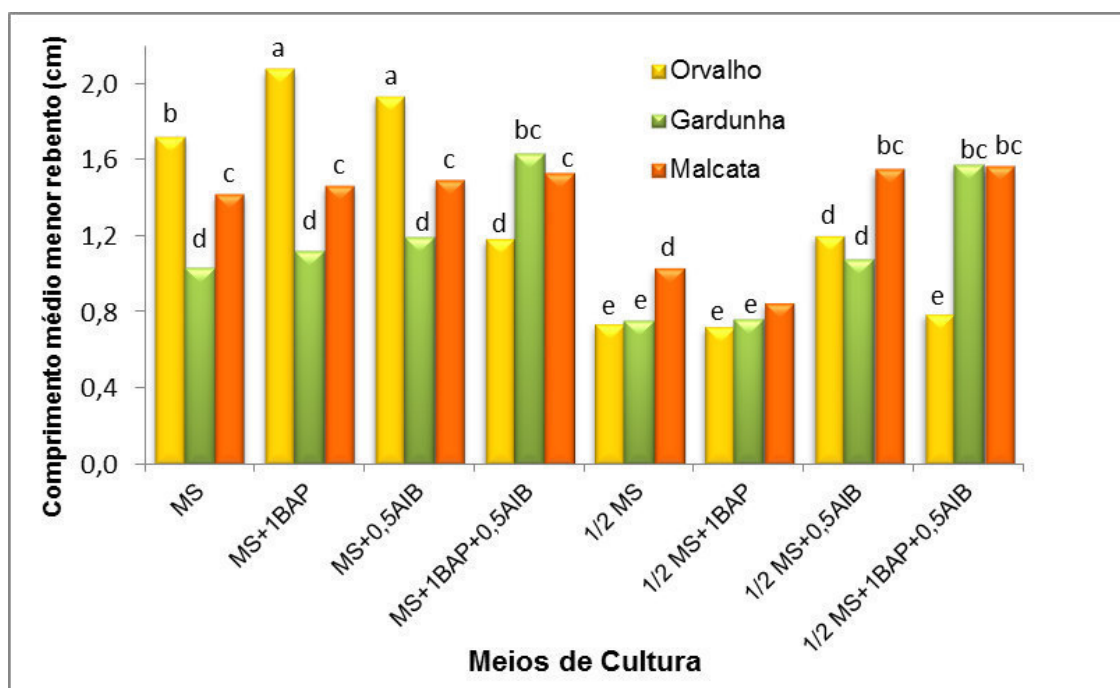
Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.15.** Comprimento médio do maior rebento em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.

Legenda: MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); MS(1/2NO<sub>3</sub>) - Meio de Murashige e Skoog (1962) com redução de nitratos a metade; BAP - 6-Benzilaminopurina; AIB - Ácido indol-3-butírico.

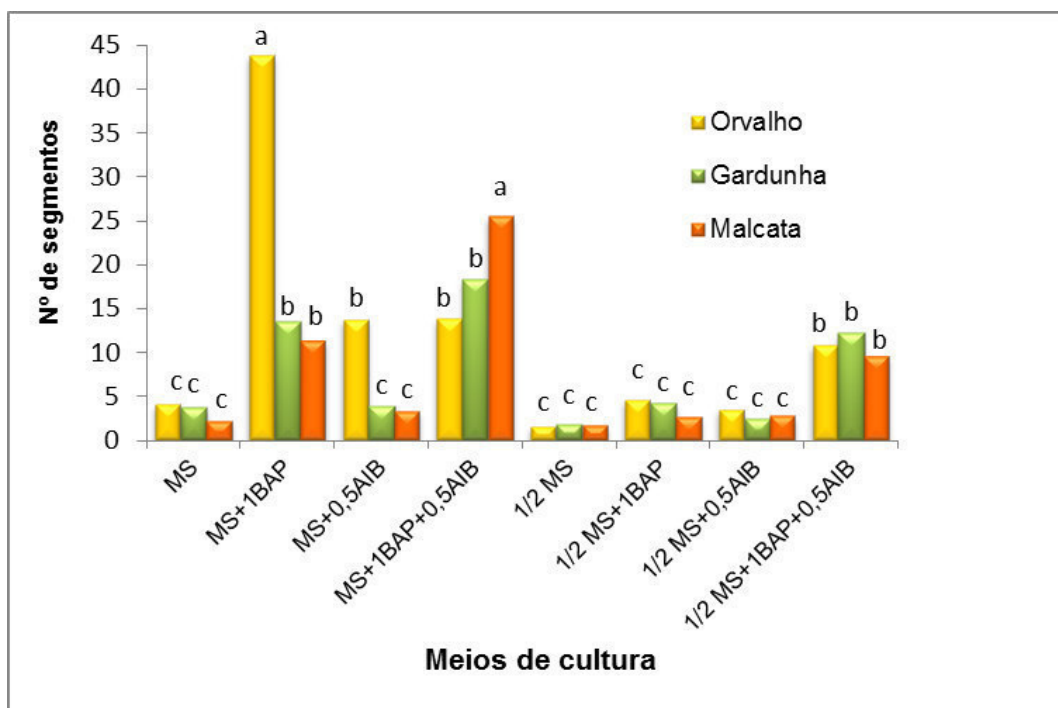
Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes (p<0,05).



**Figura 4.16.** Comprimento médio do menor rebento em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.

Legenda: MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); MS(1/2NO<sub>3</sub>) - Meio de Murashige e Skoog (1962) com redução de nitratos a metade; BAP - 6-Benzilaminopurina; AIB - Ácido indol-3-butírico.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes (p<0,05).



**Figura 4.17.** Número de segmentos em cada meio de cultura para os locais Orvalho, Gardunha e Malcata.

Legenda: MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); MS(1/2NO<sub>3</sub>) - Meio de Murashige e Skoog (1962) com redução de nitratos a metade; BAP - 6-Benzilaminopurina; AIB - Ácido indol-3-butírico.

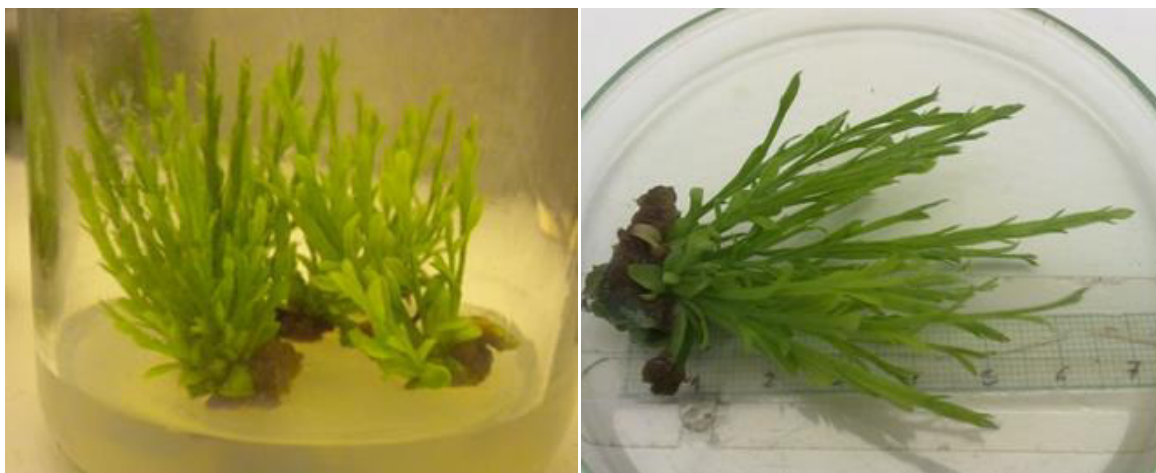
Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 4.18 pode-se verificar o aspeto dos rebentos que estiveram no meio de cultura MS suplementado com 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP em fase de multiplicação para o Orvalho, para a Gardunha (Fig. 4.19) e Malcata (Fig. 4.20) no meio de cultura MS suplementado com 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB.



**Figura 4.18.** Rebentos de *P. tridentatum* do local de recolha Orvalho no final da fase de multiplicação, que estiveram no meio de cultura MS suplementado com 1 mgL<sup>-1</sup> de BAP.





**Figura 4.19.** Rebentos de *P. tridentatum* do local de recolha Gardunha no final da fase de multiplicação, que estiveram no meio de cultura MS suplementado com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB.



**Figura 4.20.** Rebentos de *P. tridentatum* do local de recolha Malcata no final da fase de multiplicação, que estiveram no meio de cultura MS suplementado com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB.

A importância de uma citocinina e, dentro delas, a BAP na multiplicação de rebentos e organogénese tem sido largamente referenciada por diversos autores (Rout *et al.*, 2008; Vengadesan & Pijut, 2009; Aggarwal *et al.*, 2010), uma vez que as citocininas, em geral, são conhecidas por estimular processos de divisão celular e inibir a dominância apical e daí estimularem a diferenciação e multiplicação de rebentos.

Zhai *et al.* (2011) em *Caragana fruticosa* (Pall.) Besser obtiveram uma proliferação e alongamento dos rebentos significativamente superior utilizando meio MS completo ou com redução dos nitratos e suplementado com  $0,44 \text{ } \mu\text{M}$  de BAP, relativamente a outros meios. Para além disto, os rebentos colocados em meio MS apresentaram folhas sempre verdes e

rebentos alongados enquanto que nos restantes meios de cultura os rebentos apresentaram-se muito pouco alongados para serem utilizados como explantes em multiplicações sucessivas e as folhas exibiram algumas cloroses.

Aggarwal *et al.* (2012) em *Eucalyptus tereticornis* Sm. testou citocininas em combinação com a auxina ANA na multiplicação de rebentos e seu alongamento. Das citocininas testadas a BAP mostrou ser mais efetiva do que a cinetina ou o tidiazurão. Neste mesmo trabalho, a utilização de concentrações elevadas de BAP ( $\geq 2,5 \mu\text{M}$ ) promoveram a multiplicação de rebentos e concentrações inferiores ( $\leq 1,0 \mu\text{M}$ ) promoveram o alongamento dos rebentos.

Bisht *et al.* (2012) em *Polygonatum verticillatum* (L.) All. obtiveram a melhor resposta em termos de maior número de rebentos (8,6) com um comprimento médio do rebento de 4,7 cm em meio de cultura MS suplementado com  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA.

Coelho *et al.* (2012) em *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales obtiveram os melhores resultados em termos de número de rebentos e comprimento do maior rebento utilizando a formulação de MS completa, embora a utilização do meio de cultura MS com redução para metade dos macronutrientes não apresentasse diferenças significativas relativamente ao MS completo no que respeita ao número médio de rebentos. Neste estudo, o meio de cultura MS suplementado com benziladenina em diferentes concentrações apresentou o maior número de rebentos, embora a percentagem de rebentos com hiperhidricidade fosse elevada e os rebentos apresentassem alongamento significativamente inferior relativamente aos meios sem adição de citocininas. A hiperhidricidade caracteriza-se por um distúrbio morfológico e fisiológico que ocorre em plantas propagadas *in vitro* cujos caules e folhas apresentam-se espessos, rígidos e facilmente quebráveis. Alguns fatores podem contribuir para estas alterações fisiológicas, como a disponibilidade de água, teor de micronutrientes e desequilíbrio hormonal no meio de cultura. Neste trabalho, a adição de auxinas ao meio de cultura MS com  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de benziladenina aumentou significativamente o número de rebentos; contudo, o comprimento dos rebentos foi superior nos meios de cultura suplementados com  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  de zeatina ou apenas com  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de benziladenina.

Fatima & Anis (2012) em *Withania somnifera* L. mostraram que concentrações de BAP superiores a  $2,5 \mu\text{M}$  diminuem o número de rebentos e o comprimento do mesmo. Para estes autores, a redução do potencial de regeneração pode ser devido ao efeito prejudicial da alta concentração sobre as células predeterminadas para formar gomos vegetativos. Neste mesmo estudo, foi feita uma comparação da relativa eficácia de diferentes citocininas na formação de novos rebentos revelando-se a benziladenina superior à cinetina (Ki) e à 2-iP. Para esta espécie, mostrou-se eficaz a combinação de uma concentração baixa de auxina com uma elevada concentração de citocinina na indução e multiplicação de rebentos.



A adição de ANA aumentou marcadamente a percentagem de regeneração, número de rebentos e comprimento do mesmo, enquanto que o AIB não melhorou significativamente os parâmetros avaliados.

Mahesh & Jeyachandran (2013) desenvolveram um eficiente protocolo de micropropagação em *Trichodesma indicum* (Linn) R. Br. com explantes apicais, colocados em meio de cultura MS suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,69  $\mu\text{M}$  de ANA, registando neste meio o maior número de rebentos (9,9) e o máximo comprimento médio do rebento (5,6 cm). Estes autores referem ainda que a utilização do meio de cultura MS suplementado apenas com 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP foi também efetivo na indução de múltiplos rebentos, apresentando em média 6,8 rebentos por explante com um comprimento médio de 3,5 cm. No entanto, a combinação de BAP com ANA incrementou significativamente a resposta do explante apical o que para os referidos autores evidencia um sinergismo entre os dois reguladores de crescimento, em especial quando utilizam 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP juntamente com 2,69  $\mu\text{M}$  de ANA, já a utilização conjunta de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP com diferentes concentrações de AIA não incrementou significativamente os parâmetros avaliados.

Também nos trabalhos de Phulwaria *et al.* (2013) em *Ceropegia bulbosa* Roxb. foi obtida regeneração de rebentos a partir de *callus* utilizando meio de cultura MS suplementado com BAP ou com BAP em combinação com AIA ou ANA. Neste trabalho o máximo número de rebentos regenerados (25,5) foi obtido em meio de cultura MS contendo 1,0  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP juntamente com 0,1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA.

Patel *et al.* (2014) em *Leptadenia reticulata* (Jeewanti) obtiveram diferenciação de rebentos a partir de *callus* em meio de cultura MS suplementado com BAP ou com BAP em combinação com AIA ou ANA. O máximo número de rebentos (30,7) com comprimento médio de 8,6 cm foi produzido em meio de cultura MS suplementado com 0,5  $\text{mgL}^{-1}$  de BAP em combinação com 0,1  $\text{mgL}^{-1}$  de ANA, considerando haver sinergismo entre estes dois reguladores de crescimento.

#### **4.3.3. Fases de enraizamento e aclimatização**

Os ensaios de enraizamento foram realizados utilizando a indução radicular dos rebentos apenas em condições não asséticas, através do método de imersão basal dos rebentos em solução auxínica com elevada concentração, e colocados diretamente em substrato natural (Fig. 4.21) de acordo com o descrito em materiais e métodos.



**Figura 4.21.** Aspeto dos rebentos de *P. tridentatum* de origem Malcata no final da fase de enraizamento.

Esta metodologia, para o material estudado, mostrou ser altamente eficaz na indução de rizogénese. De facto, para os tempos de exposição e concentrações utilizadas as percentagens de enraizamento garantiram sempre valores acima dos 96% de enraizamento (Tab. 4.5). Pela análise dos restantes parâmetros, número de raízes (NRaízes), comprimento da maior (CMRaiz) e da menor raiz (CmRaiz) e alongamento do rebento (CReb), verifica-se também que as condições em que decorreu o processo de expressão e crescimento radicular foram ajustadas para estas microplantas, mas com registo de algumas diferenças significativas para as modalidades testadas (Tab. 4.5).

**Tabela 4.5.** Parâmetros da fase de enraizamento para as diferentes concentrações de AIB e tempos de exposição para indução radicular de *P. tridentatum*.

Modalidade		% Enr	NRaízes	CMRaiz	CmRaiz	CReb
[AIB] gL <sup>-1</sup>	Tempo (seg)			(cm)	(cm)	(cm)
0,5	30	96,7	2,4 b	5,8 b	3,5 a	6,1 a
	60	96,7	2,5 b	5,0 b	2,6 a	6,0 ab
1	30	100,0	2,6 b	5,5 b	2,9 a	6,5 a
	60	96,7	2,5 b	5,5 b	2,8 a	5,4 b
2	30	96,7	3,4 a	6,8 a	3,2 a	6,0 ab
	60	100,0	2,6 b	6,7 a	3,5 a	6,0 ab

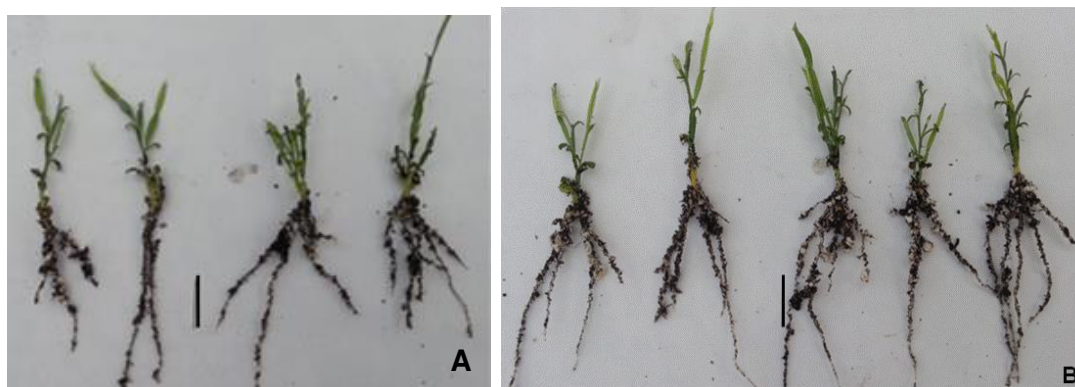
Legenda: AIB - Ácido indol-3-butírico; % Enr - % de enraizamento; NRaízes - número de raízes; CMRaiz - comprimento da maior raiz; CmRaiz - comprimento da menor raiz; CReb - comprimento do rebento.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

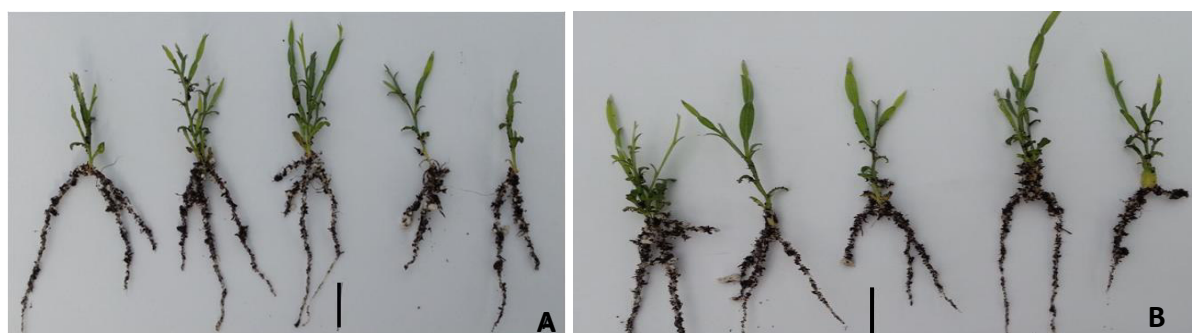
No que diz respeito ao número de raízes, o melhor resultado (3,4) foi obtido na combinação 2 gL<sup>-1</sup> AIB/30 segundos, com diferenças significativas para todas as restantes

modalidades (Tab. 4.5). Para o alongamento radicular verificamos que a concentração mais elevada de auxina ( $2 \text{ gL}^{-1}$ ), independentemente do tempo de exposição, foi a que favoreceu mais este processo (Fig. 4.22) apresentando raízes com 6,7 e 6,8 cm. Não se registou qualquer diferença significativa entre as restantes modalidades. Finalmente, no que diz respeito ao aspeto aéreo do rebento, verificámos que o mesmo se manteve saudável durante todo o processo de enraizamento, eventualmente com algum ligeiro crescimento pois, como se referiu em material e métodos, o comprimento médio dos rebentos utilizados para rizogénese foi de  $5 \pm 1 \text{ cm}$  e o comprimento final registado no final do enraizamento foi de  $6 \pm 1 \text{ cm}$ .

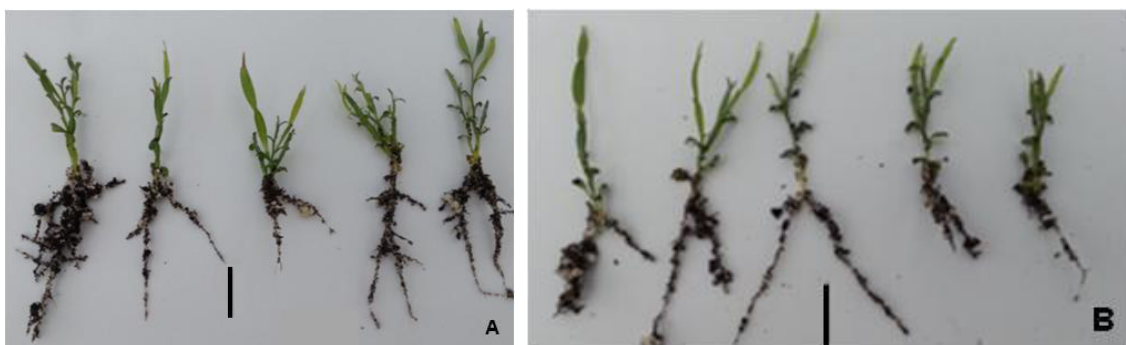
Outro dado importante deste processo teve a ver com a morfologia das raízes formadas. Da sua observação pode-se constatar que se trata de raízes finas, com abundantes ramificações secundárias que são determinantes para a formação de raízes funcionais. Nas Figuras 4.22, 4.23 e 4.24 pode-se verificar o aspeto dos rebentos de *P. tridentatum* (L.) Willk. no final da fase de enraizamento após indução em AIB  $2 \text{ gL}^{-1}$  durante 60 e 30 segundos, em AIB  $1 \text{ gL}^{-1}$  durante 60 e 30 segundos e em AIB  $0,5 \text{ gL}^{-1}$  durante 60 e 30 segundos, respetivamente.



**Figura 4.22.** Aspeto de rebentos de *P. tridentatum* no final da fase de enraizamento após indução em AIB  $2 \text{ gL}^{-1}$  durante 60 (A) e 30 seg (B). (O traço na vertical representa 2 cm).



**Figura 4.23.** Aspeto de rebentos de *P. tridentatum* no final da fase de enraizamento após indução em AIB  $1 \text{ gL}^{-1}$  durante 60 (A) e 30 seg (B). (O traço na vertical representa 2 cm).



**Fig. 4.24.** Aspeto de rebentos de *P. tridentatum* no final da fase de enraizamento após indução em AIB 0,5 gL<sup>-1</sup> durante 60 (A) e 30 seg (B). (O traço na vertical representa 2 cm).

Na Figura 4.25 pode-se observar o pormenor do sistema radicular desenvolvido em condições *ex vitro* de rebentos de *P. tridentatum* (L.) Willk. após indução em AIB 2 gL<sup>-1</sup> durante 60 segundos, sendo visíveis as abundantes ramificações radiculares.



**Fig. 4.25.** Pormenor do sistema radicular desenvolvido em condições *ex vitro* de rebentos de *P. tridentatum* após indução em AIB 2 gL<sup>-1</sup> durante 60 segundos. (O traço na vertical representa 2 cm).

O processo de rizogénese continua a ser uma das fases mais críticas do processo de micropropagação pois torna-se necessário não só desenvolver um sistema radicular mas também que ele se apresente funcional e capaz de absorver os nutrientes necessários para



as atividades globais da microplanta quando colocada em condições autotróficas (McClelland *et al.*, 1990; Gonçalves *et al.*, 1998).

Um outro passo importante mas muito crítico é a transferência das plantas enraizadas para condições de aclimatização. As plântulas desenvolvidas em condições *in vitro* precisam de algum tempo para se aclimatizarem às novas condições *ex vitro* e para corrigirem algumas anomalias/defeitos em termos morfológicos, anatômicos e fisiológicos que possam ter sido induzidas durante aquele período.

Neste estudo, a fase de aclimatização permitiu a manutenção das plântulas enraizadas com elevadas percentagens de sobrevivência (superiores a 80%) (Fig. 4.26). Durante a aclimatização houve formação de novos caules e folhas e aparentemente não apresentaram variação morfológica relativamente às plantas silvestres.



**Figura 4.26.** Aspeto de rebentos de *P. tridentatum* durante a fase de aclimatização.

Segundo Pospíšilová *et al.* (2007) as mudanças mais importantes para a sobrevivência das plantas incluem o desenvolvimento de cutículas, ceras e uma regulação estomática eficaz para redução da transpiração, pelo que a redução gradual da humidade é um fator de enorme importância. A radiação e a concentração de CO<sub>2</sub> durante o crescimento *in vitro* bem como durante a aclimatização são também fatores a ter em conta na promoção de alguns parâmetros fotossintéticos (como o teor de clorofila, a ultraestrutura do cloroplasto, a eficiência do fotossistema II e a taxa líquida fotossintética) para que seja assegurado o crescimento da planta de forma completamente autotrófica (Coelho, 1999; Pospíšilová *et al.*, 2007).

No enraizamento, a auxina é o regulador de crescimento envolvido na formação de raízes laterais, manutenção da dominância apical e formação de raízes adventícias,

requerendo correto transporte e sinalização (Hodge *et al.*, 2009). Dubrovsky *et al.* (2008) demonstraram em estudos com o gênero *Arabidopsis* que a auxina e o seu local de acumulação nas células do periciclo da raiz são um sinal suficiente e necessário para que estas células se convertam em células iniciadoras de raízes laterais.

Na fase inicial de aclimatização, as plantas são colocadas a baixa intensidade luminosa e para além do controlo da humidade relativa (elevada humidade relativa no início da aclimatização e baixa humidade relativa, entre 50 e 55%, no final da aclimatização) é também importante a utilização de um substrato que forneça os nutrientes adequados à espécie, mantenha o arejamento e proporcione um ambiente favorável ao desenvolvimento das plântulas (Thambirai & Paulsamy, 2012) a fim de se obterem elevadas taxas de sobrevivência.

Aggarwal *et al.* (2012) avaliaram o efeito de diferentes auxinas (ANA, AIB e AIA) no enraizamento de um clone de *Eucalyptus tereticornis* Sm. em meio de cultura MS, ½ MS ou ¼ MS concluindo que os rebentos colocados em ¼ MS com 5,0 µM de AIB apresentaram a melhor eficiência de enraizamento (80,7%) embora o máximo de 4,3 raízes por rebento com comprimento médio de raiz de 2,9 cm tivesse sido obtido no meio MS completo suplementado também com 5,0 µM de AIB.

Nos trabalhos de Coelho *et al.* (2012) também foi avaliada a influência de algumas auxinas (AIA, ANA e AIB) no enraizamento de *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales utilizando meio de cultura MS. Para esta espécie, os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura MS sem auxinas (92,0% de enraizamento; 6,5 raízes por rebento e 1,6 cm de comprimento médio da raiz) ou em meio de cultura MS suplementado com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIA (98% de enraizamento, 11,1 raízes por rebento e 2,4 cm de comprimento médio da raiz). A utilização de ¼ MS suplementado com AIA aumentou, embora não significativamente, a frequência de enraizamento bem como o número de raízes e o comprimento das mesmas relativamente à utilização de AIB ou ANA. O método por imersão basal também foi utilizado neste trabalho mas comparativamente com o meio de MS sem auxina ou o meio de MS com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIA não apresentou resultados superiores em termos de taxa de enraizamento. No entanto, o enraizamento *ex vitro* tem algumas vantagens como permitir a redução do tempo de enraizamento, a eliminação de fases em condições assépticas, a simplificação do protocolo e a redução de custos.

As plantas enraizadas por Coelho *et al.* (2012) em ¼ MS com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIA foram transferidas para condições *ex vitro* e aclimatizadas com sucesso obtendo 93,3% e 73,3% de taxas de sobrevivência, respetivamente. Coelho *et al.* (2012) referem ainda que *Thymus mastichina* L. enraíza melhor quando são aplicadas as duas auxinas AIB e ANA e *Thymus vulgaris* L. enraíza mais facilmente em meio com AIB.

Nos trabalhos de Bisht *et al.* (2012) em *Polygonatum verticillatum* (L.) All. foram utilizadas as auxinas AIB, AIA e ANA para indução radicular mas os resultados revelaram que apenas o AIB e o ANA podem induzir raízes em meio de cultura com ½ MS para esta espécie. As plantas enraizadas e transferidas para o solo terão de permanecer durante um longo período em condições controladas, com irrigação regular e mantendo as plantas à sombra para obtenção de elevada taxa de sobrevivência.

Fatima & Anis (2012) em *Withania somnifera* L., obtiveram 100% de enraizamento em meio de cultura ½ MS suplementado com 0,5 µM de ANA, considerando este regulador de crescimento superior ao AIB no que respeita à formação de raízes adventícias. As plantas enraizadas foram colocadas em aclimatização com substrato de jardim tendo obtido 95% de sobrevivência.

Em *Trichodesma indicum* (Linn) R. Br. (Mahesh & Jeyachandran, 2013) os rebentos foram colocados em indução radicular *in vitro* em meio de cultura MS com várias concentrações de AIB e ANA ou sem regulador de crescimento. Na ausência de regulador de crescimento poucas raízes foram induzidas enquanto que os meios suplementados com AIB se mostraram mais efetivos na indução radicular do que os meios com ANA. O meio em que foi adicionado 2,46 µM de AIB foi considerado o meio ideal para indução radicular apresentando ao fim de 30 dias 92,8% de enraizamento com um número médio de 5,6 raízes por rebento e um comprimento médio de 4,3 cm. Neste estudo verificou-se que o aumento da concentração de AIB diminui a eficiência de enraizamento, número de raízes e comprimento das mesmas. Contudo, a aplicação de AIB já foi considerada a auxina mais efetiva na indução radicular noutras espécies (Saritha & Naidu, 2008; Irvani *et al.* 2010).

Phulwaria *et al.* (2013) em *Ceropegia bulbosa* Roxb., induziram o seu enraizamento em condições *ex vitro* aplicando AIB e ANA durante 3 minutos, verificando que a maior percentagem de enraizamento (100%) foi obtida utilizando 100 mgL<sup>-1</sup> de AIB e que comparando com a auxina ANA, o AIB foi mais efetivo na indução radicular. As plantas enraizadas foram aclimatizadas com sucesso em estufa.

Nos trabalhos de Patel *et al.* (2014) em *Leptadenia reticulata* (Jeewanti) a indução radicular foi efetuada *in vitro* e *ex vitro*. Dos diferentes meios utilizados para indução, o meio de cultura contendo ¼ MS com 2% de sacarose e suplementado com 1,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB e 100 mgL<sup>-1</sup> de carvão ativo produziu o número máximo de raízes (11,2) com um comprimento médio de 8,7 cm. Neste estudo, o AIB apresentou melhores resultados em termos de percentagem de enraizamento e número de raízes/comprimento comparativamente a outras auxinas como o AIA e ANA. Outros autores referem esta superioridade do AIB relativamente a outras auxinas em espécies como *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. (Phulwaria & Shekhawat, 2013) e *Eulophia nuda* Lindl. (Panwar *et al.*, 2012). Na mesma espécie a indução radicular realizada *ex vitro* foi otimizada por imersão em AIB (200 mgL<sup>-1</sup>) durante 3

minutos. Após quatro semanas, 85% dos rebentos apresentaram um número médio de raízes de 7,6 com um comprimento médio de 4,0 cm. Para as auxinas AIA e ANA embora tenham produzido raízes, os valores do número de raízes e comprimento das mesmas foram sempre inferiores aos obtidos com AIB, o que revela o papel benéfico da aplicação do AIB em enraizamento *ex vitro*. Os rebentos enraizados pelas duas metodologias (*in vitro* e *ex vitro*) foram aclimatizados com sucesso em estufa com uma elevada percentagem de sobrevivência (95%).

Pela diversidade de resultados compreende-se que o enraizamento adventício é um processo muito complexo dependente de vários fatores, como por exemplo o genótipo, podendo ser regulado por fatores ambientais e endógenos (Sorin *et al.*, 2005). As diferenças em termos de enraizamento adventício podem estar relacionadas com múltiplos fatores, nomeadamente o rácio endógeno citocinina/auxina, a influência do meio de multiplicação dos rebentos, a sensibilidade dos tecidos em absorver ou utilizar a auxina exógena ou depender do tipo de explante inicial.

#### **4.4. Considerações intercalares**

Os resultados mostram que esta metodologia de propagação *in vitro* é simples, rápida e eficaz na multiplicação desta espécie, com a vantagem de manter o material vegetal saudável e utilizando um espaço relativamente pequeno. Este protocolo permite anular uma possível fase adicional de alongamento uma vez que os rebentos apresentaram um porte considerável para serem enraizados. Com a elevada proliferação desta espécie em condições *in vitro*, este protocolo poderá ser aplicado para a sua propagação clonal em larga escala já que os gomos axilares são tidos como os mais seguros na manutenção da integridade genética. Por outro lado, pode-se evitar a exploração indiscriminada dos recursos naturais para necessidades comerciais e este trabalho pode ser uma ferramenta útil no fornecimento de material com princípios ativos importantes para a indústria farmacêutica.



## 4.5. Referências bibliográficas

- Aggarwal, D., Kumar, A. & Reddy, M.S. (2010). Shoot organogenesis from elite plants of *Eucalyptus tereticornis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 102, 45-52.
- Aggarwal, D., Kumar, A., Sharma, J. & Reddy, M.S. (2012). Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48, 521-529.
- Agrawal, V. & Sardar, P.R. (2006). *In vitro* propagation of *Cassia angustifolia* through leaflet and cotyledon derived calli. *Biologia Plantarum*, 50, 118-122.
- Ahkami, A.H., Lischewski, S., Haensch, K.T., Porfirova, S., Hofmann, J. & Rolletschek, H. (2009). Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*, 181, 613-625.
- Anis, M., Varshney, A. & Siddique, I. (2010). *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *Agroforestry Systems*, 78, 151-158.
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M.J., Capote, I., Pina, D. & González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(1), 89-94.
- Arencibia, A.D., Bernal, A., Yang, L., Cortegaza, L., Carmona, E.R., Pérez, A., Hu, C.-J., Li, Y.R., Zayas, C.M. & Santana, I. (2008). New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors (TIBs). *Plant Science*, 175, 487-496.
- Balaraju, K., Agastian, P., Ignacimuthu, S. & Park, K. (2011). A rapid *in vitro* propagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using shoot tip explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2501-2510.
- Blakesley, D. (1994). *Auxin metabolism and adventitious root initiation*. In *Biology of Adventitious Root Formation*. Davis, T.D. & Haissig, B.E. (Eds.). Plenum Press. New York. p. 143-154.
- Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K. (1996). *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier. Amsterdam. 767 p.
- Bisht, S., Bisht, N.S. & Bhandari, S. (2012). *In vitro* micropropagation in *Polygonatum verticillatum* (L.) All. an important threatened medicinal herb of Northern India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(1), 89-93.
- Canhoto, C. (1994). A decomposição e utilização das folhas de *Eucalyptus globulus* como fonte alimentar por detritívoros aquáticos. Universidade de Coimbra. Tese de Mestrado. 94 p.
- Chand, S. & Singh, A.K. (2004). *In vitro* shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose leguminous tree, *Pterocarpus marsupium* Roxb. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, 464-466.
- Coelho, M.T. (1999). Influência da concentração de CO<sub>2</sub> durante a aclimação de plantas de castanheiro (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) regeneradas *in vitro*. Universidade de Évora. Tese de Mestrado. 152 p.
- Coelho, N., Gonçalves, S., González-Benito, M.E. & Romano, A. (2012). Establishment of an *in vitro* propagation protocol for *Thymus lotocephalus*, a rare aromatic species of the Algarve (Portugal). *Plant Growth Regulation*, 66(1), 69-74.
- Costa, C.T., Almeida, M.R., Ruedell, C.M., Schwambach, J., Maraschin, F.S. & Fett-Neto, A.G. (2013). When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-19.
- Debnath, S.C. (2009). A scale-up system for lowbush blueberry micropropagation using a bioreactor. *HortScience*, 44(7), 1962-1966.

- Debnath, S.C. (2010). A scaled-up system for in vitro multiplication of thidiazuron-induced red raspberry shoots using a bioreactor. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(2), 94-100.
- Driver, J.A. & Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of paradox walnut rootstocks. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 18, 506-509.
- Dubuc, J-F. & Desjardins, Y. (2007). Effects of autotrophic and mixotrophic tissue culture conditions on the expression of primary metabolism genes of tomato plantlets. *Acta Horticulturae* (ISHS), 748, 165-171.
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S. & Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (25), 8790-8794.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C. & Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39, 651-656.
- Faisal, M., Siddiqui, I. & Anis, M. (2006). An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L (DC) using cotyledonary node explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42, 59-64.
- Fatima, N. & Anis, M. (2012). Role of growth regulators on *in vitro* regeneration and histological analysis in Indian ginseng (*Withania somnifera* L.) Dunal. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18, 59-67.
- Gaspar, T. & Coumans, M. (1987). *Root formation*. In Cell and tissue culture in forestry. Bonga, J.M. & Durzan, D.J. (Eds.). Martins Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 202-217.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.-J. (Eds.) (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3<sup>rd</sup> Edition. p. 1-28.
- Gonçalves, J.C., Diogo, M.G. & Amâncio, S. (1998). Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): effects of rooting methods on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during root formation. *Scientia Horticulturae*, 72, 265-275.
- Gonçalves, J.C., Diogo, G., Coelho, M.T., Vidal, N. & Amâncio, S. (2008). Quantitation of endogenous levels of IAA, IAAsp and IBA in micro-propagated shoots of hybrid chestnut pre-treated with IBA. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(5), 412-418.
- Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux *in vitro*. *Annales des Sciences Naturelles Botanique et Biologie Vegetale*, 14, 1-223.
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F. & Crespi, M. (2009). Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil*, 321, 153-187.
- Holobiuc, I., Blindu, R. & Cristea, V. (2009). Researches concerning *in vitro* conservation of the rare plant species *Dianthus Nardiformis* Janka. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 221-224.
- Irvani, N., Solouki, M., Omid, M., Zare, A.R. & Shahnazi, S. (2010). *Callus* induction and plant regeneration in *Dorema ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 293-299.
- Jin, M.Y., Piao, X.C., Xiu, J.R., Park, S.Y. & Lian, M.L. (2013). Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock '5BB'. *Scientia Horticulturae*, 164, 35-40.
- Kende, H. & Zeevaart, J. (1997). The five "classical" plant hormones. *Plant Cell*, 9, 1197-1210.

- Loberant, B. & Altman, A. (2010). *Micropropagation of plants*. In Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. Flickinger, M. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. p. 1-17.
- Mahesh, A. & Jeyachandran, R. (2013). Influence of plant growth regulators on micropropagation and *in vitro* flowering of *Trichodesma indicum* (Linn) R. Br. *Plant Biosystems*, 147(2), 493-499.
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Hauserová, E., Greplová, J., Strnad, M. & Doležal, K. (2009). Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 341-348.
- McClelland, M.T., Smith, M.A.L. & Carothers, Z.B. (1990). The effects on *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23, 115-123.
- McCown, B.H. & Lloyd, D.G. (1981). Woody plant medium (WPM). A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. *Horticultural Science*, 16, 453.
- Moutia, M. & Dookun, A. (1999). Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane. *Experimental agriculture*, 35(3), 265-274.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plant*, 15, 473-497.
- Paek, K.Y., Chakrabarty, D. & Hahn, E.J., (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 287-300.
- Panwar, D., Ram, K. & Shekhawat, H.N.S. (2012). *In vitro* propagation of *Eulophia nuda* Lindl., an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 139, 46-52.
- Parkinson, M., Prendergast, M. & Sayegh, A.J. (1996). Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. *Plant Growth Regulation*, 20(1), 61-66.
- Patel, A.K., Agarwal, T., Phulwaria, M., Kataria, V. & Shekhawat, N.S. (2014). An efficient *in vitro* plant regeneration system from leaf of mature plant of *Leptadenia reticulata* (Jeewanti): A life giving endangered woody climber. *Industrial Crops and Products*, 52, 499-505.
- Parveen, S., Shahzad, A. & Saema, S. (2010). *In vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance. *Agroforestry Systems*, 80, 109-116.
- Perveen, S., Varshney, A., Anis, M. & Aref, I.M. (2011). Influence of cytokinins, basal media and pH on adventitious shoot regeneration from excised root cultures of *Albizia lebbeck*. *Journal of Forestry Research*, 22, 47-52.
- Phulwaria, M., Shekhawat, N.S., Rathore, J.S. & Singh, R.P. (2013). An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb. - A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. *Industrial Crops and Products*, 42, 25-29.
- Pop, T.I., Pamfil, D. & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39, 307-316.
- Pospíšilová, J., Synková, H., Haisel, D. & Semorádová, Š. (2007). Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid (a Review). *Acta Horticulturae*, 748, 29-38.
- Prakash, E., Khan, P.S., Rao, T.J. & Meru, E.S. (2006). Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. *Journal of Forest Research*, 11, 329-335.

- Puhan, P. & Rath, S.P. (2012). *In vitro* micropropagation of *Desmodium gangeticum* (L.) DC (Fam-Fabaceae): A medicinal legume through axillary bud multiplication. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15, 477-483.
- Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
- Rodrigues, A.S. & Almeida, D. (1996). Tratamento osmótico de sementes de *Origanum majorana* e *Hipericum androsaemum*. In: *Actas do 1º Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais*. Vilamoura. p. 145-148.
- Rout, G.R., Mahato, A. & Senapati, S.K. (2008). *In vitro* clonal propagation of *Nyctanthes arbortristis*. *Biologia Plantarum*, 52, 521-524.
- Saritha, K.V. & Naidu, C.V. (2008). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Spilanthes acmella*. *Biologia Plantarum*, 52(2), 334-338.
- Schwambach, J., Ruedell, C.M., De Almeida, M.R., Penchel, R.M., Araújo, E.F. & Fett-Neto, A.G. (2008). Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidenni* mini-cuttings derived from mini-stumps grow in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. *New Forests*, 36, 261-271.
- Shahzad, A., Faisal, M. & Anis, M. (2007). Micropropagation through excised root culture of *Clitoria ternatea* and comparison between *in vitro* regenerated plants and seedlings. *Annals of Applied Biology*, 150, 341-349.
- Singh, A.K., Sharma, R., Varshney, R., Agarwal, S.S. & Bansal, K.C. (2006). Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* schum and thonn, a medicinally important plant species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(2), 109-113.
- Singh, J. & Tiwari, K.N. (2010). High-frequency *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. A valuable medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 32, 534-538.
- Sorin, C., Bussell, J., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G. & Bellini, C. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant Cell*, 17, 1343-1359.
- Taiz, L. & Zeiger, L. (2002). Mineral Nutrition. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. 2<sup>nd</sup> ed.
- Tekdal, D. & Cetiner, S. (2014). *In vitro* plant regeneration derived from leaf and stem explants of endemic *Thermopsis turcica*. *Biologia*, 69, 863-869.
- Thambiraj, J. & Paulsamy, S. (2012). Rapid *in vitro* multiplication of the ethnomedicinal shrub, *Acacia caesia* (L.) Willd. (Mimosaceae) from leaf explants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, S618-S622.
- Thorpe, T.A. (1994). Morphogenesis and regeneration. In *Plant Cell and Tissue Culture*. Vasil, I.K. & Thorpe, T. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 17-36.
- Veiga-Junior, V.F. & Mello, J.C. (2008). As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), 464-71.
- Vengadesan, G. & Pijut, P.M. (2009). *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45, 474-482.
- Zhai, X., Yang, L. & Shen, H. (2011). Shoot multiplication and plant regeneration in *Caragana fruticosa* (Pall.) Besser. *Journal of Forestry Research*, 22, 561-567.

***Obtenção e caracterização de extratos  
aquosos de carqueja***

---



## 5. Obtenção e caracterização de extratos aquosos de carqueja

---

### Objetivo

As descrições do uso das plantas resultam, em grande parte, de conhecimento empírico recolhido numa perspetiva etnobotânica e etnofarmacológica, e ao longo dos tempos foi-lhes sendo atribuído um potencial fitoquímico, fitofarmacológico e nutricional que interessa avaliar. Assim sendo, neste trabalho, pretende-se caracterizar os extratos aquosos ao longo do ciclo vegetativo de *P. tridentatum* (L.)Willk. silvestre e do material vegetal micropropagado, avaliando o rendimento de extração, teor de fenóis totais e perfil fenólico, componente glucídica, componente mineral, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

### 5.1. Extração de compostos bioativos

Após a colheita da planta ou de parte desta, se não for utilizada de imediato há que a manter em condições de modo a que não se alterem os seus constituintes. Estas alterações após a colheita, propiciadas pelo elevado teor de água, enzimas (hidrolases e oxidases), temperatura e luz, poderão influenciar a composição final da planta e respetivos extratos. Por estes motivos se compreende os cuidados colocados durante o transporte e secagem, o processo mais corrente de preservação destes materiais, principalmente para folhas e sumidades floridas.

Outro aspeto a ter em conta no período que decorre da colheita à utilização diz respeito ao desenvolvimento de microrganismos, sobretudo bolores e leveduras, já que estes contaminantes existem à superfície das plantas. Com inapropriadas manipulações podem ainda ocorrer contaminações com microrganismos patogénicos (salmonelas, coliformes, etc.). De um modo geral, as plantas são desidratadas, sendo que a secagem pode ser efetuada por vários processos, podendo diferir com a parte da planta utilizada, já que, por exemplo, as raízes, os estolhos, as cascas, pelo menor teor de água que apresentam não necessitam de processos de secagem tão intensos como, por exemplo, as folhas. De um modo geral, os métodos de secagem podem ser agrupados: ao ar livre e sob influência do calor solar; em lugar bem ventilado à sombra; em túneis de secagem com ar quente; por liofilização; por micro-ondas e por radiação infravermelha (menos usado).

Dado o carácter por vezes lenhoso, a baixa concentração dos compostos ativos e a sazonalidade das plantas, é usual recorrer-se à utilização de extratos.

Os extratos de plantas já são amplamente utilizados na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. O método extrativo a utilizar irá depender do carácter hidrofílico ou lipofílico dos compostos a extrair e deverá estar ainda relacionado com outras propriedades físico-químicas dos compostos bioativos, tais como sensibilidade à temperatura e estabilidade à luz e à presença de oxigénio.

A extração é um passo muito importante na separação, identificação e utilização de compostos bioativos. A extração de compostos naturais a partir de material vegetal é efetuada regularmente por hidrodestilação ou através de solventes orgânicos. No entanto, a extração com solventes orgânicos poderá ter alguns inconvenientes, no que respeita à toxicidade de alguns solventes utilizados que podem inviabilizar a sua utilização no domínio alimentar. O consumidor atual, tendo acesso facilitado à informação está cada vez mais alertado para os perigos de contaminação dos alimentos e a legislação que restringe a utilização de solventes orgânicos na indústria alimentar controla cada vez mais o processo.

A escolha do solvente exige que se tenham em consideração todos os processos envolvidos na obtenção do extrato, desde a extração à separação e recuperação do solvente, para além de avaliar os custos energéticos na eliminação do solvente e os riscos na perda de compostos voláteis de interesse (Bernardo-Gil *et al.*, 2002).

A água é o solvente mais usual para a extração de compostos polares, no entanto, quando se pretende extrair compostos apolares é necessário recorrer a solventes apolares. Para fins alimentares, além da água, são muitas vezes utilizadas soluções hidroalcoólicas.

Entre os solventes de baixa e média polaridade mais utilizados podem citar-se os alcanos ou misturas de alcanos (por exemplo, *n*-pentano, *n*-hexano e éter de petróleo), haloalcanos (por exemplo, diclorometano, clorofórmio e tetraclorometano) e cetonas (por exemplo, éter dietílico e dimetilcetona).

Independentemente dos solventes selecionados podem utilizar-se diversos processos de extração que exploram o contacto dos solventes com as matrizes vegetais. A extração por solventes mais simples é a maceração, operação extrativa na qual a matriz vegetal permanece, em repouso, em contacto com o solvente, à temperatura ambiente. Noutro tipo de metodologias mais elaboradas, como por exemplo, a lixiviação ou percolação, o material vegetal é colocado na câmara do lixiviador para ser extraído pela passagem contínua do solvente que se desloca por gravidade ou por aplicação de pressão. No caso de solventes de baixo ponto de ebulição procede-se a extração contínua à escala laboratorial (extrator de Soxhlet). Os compostos extraídos são posteriormente concentrados por evaporação controlada do solvente de extração, por exemplo, por destilação a pressão reduzida em evaporador rotativo (Couto & Cavaleiro, 2013).



No caso de compostos apolares termosensíveis, os processos de extração são efetuados por solventes lipídicos, de elevado ponto de ebulição, o que viabiliza a utilização de matérias gordas de maior consistência para os extrair das matrizes vegetais. São usados processos de extração à temperatura ambiente ou sob aquecimento. Estas metodologias são usadas, por exemplo, para a extração de aromas florais termolábeis de pétalas. Normalmente, o material vegetal é renovado até ser atingida a saturação do solvente nos compostos a extrair ou a concentração pretendida (Couto & Cavaleiro, 2013).

Para além da extração por solventes, a destilação é o processo mais usual da extração de compostos naturais. A destilação é uma das operações unitárias mais antigas e muito utilizada na indústria alimentar e química. As técnicas de destilação recorrem à água e ao vapor de água para facilitar a libertação dos produtos voláteis acumulados nas estruturas vegetais, sendo muito utilizada para extrair aromas de origem vegetal.

A presença de água e do seu vapor limita e estabiliza a temperatura de destilação e facilita a transferência de calor sem necessidade de recorrer a temperaturas muito elevadas. Normalmente, o material é sujeito a uma temperatura próxima dos 100°C. A água e os compostos voláteis transitam para a fase gasosa obedecendo ao equilíbrio líquido-vapor. A mistura gasosa, após condensação por arrefecimento forçado, origina duas fases líquidas imiscíveis, uma aquosa e outra, em geral menos densa, o óleo essencial (Couto & Cavaleiro, 2013).

De acordo como a água e o vapor são utilizados, distinguem-se dois tipos de técnicas de destilação: a destilação em água ou hidrodestilação e a destilação em água por arrastamento de vapor. A hidrodestilação e a destilação por arrastamento de vapor são as metodologias mais simples realizadas em destiladores de caldeira única, sendo o equipamento simples, versátil e de baixo custo, o que justifica a sua utilização em algumas indústrias de menor dimensão. Em termos práticos, estas duas técnicas distinguem-se pela forma como o material vegetal e a água de destilação são colocadas na caldeira. Enquanto que na hidrodestilação, o material vegetal é colocado em contacto direto com a água, na destilação por arrastamento de vapor, o material vegetal é colocado numa coluna separada da água de destilação. O vapor de água ao atravessar a amostra arrasta consigo os compostos voláteis que são posteriormente condensados e decantados. No caso da hidrodestilação além do óleo essencial é também obtida uma fase aquosa que contém os compostos hidrossolúveis não voláteis.

A nível laboratorial a hidrodestilação é efetuada em aparelho de Clevenger modificado ou não, normalmente utilizado para isolamento de óleos essenciais. A destilação é mantida sob refluxo pelo tempo necessário para conseguir o esgotamento da matéria volátil o que é medido pelo nível do óleo essencial no tubo de recolha. Este método apresenta alguns inconvenientes, sendo a principal crítica apontada ao facto de, devido à

coação, poder provocar hidrólises e outras degradações térmicas dos compostos. Tal facto poderá possibilitar a ocorrência de alterações químicas, originando artefactos, ou seja, produtos que se formam *de novo* pelas alterações químicas que ocorrem no processo de extração. O contacto do material vegetal com a água da destilação poderá levar à extração de algumas substâncias que catalisam fenómenos químicos como oxidações, hidrólises e polimerizações e que podem alterar os constituintes voláteis, em particular os mais lábeis e os mais hidrossolúveis (Couto & Cavaleiro, 2013). Assim, este método poderá apresentar alguma modificação do aroma original e alteração de cor.

Na destilação por arrastamento de vapor, o material vegetal é apenas sujeito à ação de uma corrente de vapor de água, produzido num gerador de vapor independente e injetado, a pressão controlada, na coluna de destilação onde se coloca o material vegetal. Assim sendo, as degradações dos constituintes são minimizadas já que as consequências hidrolíticas e oxidativas ficam limitadas.

No sentido de reduzir o tempo de extração, aumentar o rendimento, incrementar a qualidade dos extratos e reduzir custos de operação, novos métodos têm surgido como a extração assistida por micro-ondas ou ultrassons e extração por fluidos supercríticos (Wang & Weller, 2006).

A hidrodestilação assistida por micro-ondas acopla o sistema de extração a um forno de microondas e a energia destas proporciona a volatilização dos compostos voláteis muito mais rapidamente do que a hidrodestilação tradicional (Golmakani & Rezaei, 2008).

Segundo Chemat e Cravotto (2012) na hidrodestilação assistida por microondas e sob vácuo, valores de pressão entre 100 a 200 mbar, permitem uma evaporação mais rápida dos voláteis. Com esta metodologia podem-se realizar extrações de mais de 100 Kg de material vegetal por hora. Com a utilização de micro-ondas pode ainda proceder-se à volatilização dos compostos, sem se verificar a imersão do material vegetal em água ou qualquer outro solvente. A empresa Gattefossé ([www.gattefosse.com](http://www.gattefosse.com)) em França, comercializa uma variedade de produtos chamados “extratos originais”, obtidos por destilação assistida por micro-ondas sem adicionar água ou solvente. Estes extratos são usados em cosmética, perfumaria e indústria farmacêutica.

O uso da extração assistida por micro-ondas reduz o tempo de extração e o consumo de energia, possui alta reprodutibilidade e rendimento, reduz o consumo de solvente, o que simplifica a manipulação, dando maior pureza ao produto final, relativamente a processos de extração convencionais. Várias classes de compostos, tais como óleos essenciais, antioxidantes, pigmentos, lípidos, glúcidos e outros compostos bioativos podem ser extraídos de forma eficiente por esta metodologia a partir de uma variedade de matrizes (Chemat & Cravotto, 2012). Não obstante as vantagens referidas, poderá ocorrer a

deterioração de compostos durante a exposição à radiação de micro-ondas (Golmakani & Rezaei, 2008).

Outra metodologia de extração de compostos bioativos é a extração por fluidos supercríticos. O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado já que se trata de um recurso disponível, não é tóxico nas quantidades utilizadas, não é inflamável, é de baixo custo, é praticamente inerte do ponto de vista químico e é gasoso à pressão atmosférica e temperatura ambiente (Couto & Cavaleiro, 2013). O CO<sub>2</sub>, dadas as baixas temperatura e pressão críticas ( $T_c = 300\text{ K}$  e  $P_c = 7,38\text{ MPa}$ ) é particularmente recomendado para extração de compostos termolábeis. A extração com fluidos supercríticos pode ser uma alternativa, ambientalmente benéfica, para a extração com solventes orgânicos convencionais, de compostos biológicos já que se trata de um método rápido, automatizável, seletivo e evita o uso de solventes tóxicos. Além disso, a ausência da luz e do ar, durante a extração reduz os processos de degradação que podem ocorrer durante as técnicas de extração tradicionais (Bleve *et al.*, 2008).

Como principal inconveniente da extração com CO<sub>2</sub> em condições supercríticas, aponta-se a fraca seletividade que determina a obtenção de extratos com compostos indesejáveis (lípidos, pigmentos, etc.). Este inconveniente pode ser minimizado pelo recurso a co-solventes modificadores de polaridade (por exemplo, o metanol adicionado em pequenas proporções ao CO<sub>2</sub> supercrítico) (Couto & Cavaleiro, 2013). Pode ainda proceder-se a uma recolha fraccionada, com variação de pressão e temperatura controlada. O CO<sub>2</sub> apresenta no entanto como desvantagens a complexidade de equilíbrio de fases entre o solvente supercrítico e o soluto; o facto de ser não polar pelo que dissolve muito bem apenas os solutos não polares; para altas pressões implica custos de equipamento elevados, sendo por isso preferencialmente utilizado na extração de produtos de alto valor acrescentado (Bernardo-Gil *et al.*, 2002).

Mesmo com alguns inconvenientes, a extração com fluidos supercríticos parece ser uma boa técnica para a produção de aromas e fragrâncias já que o extrato mantém as características organoléticas do material de partida, a degradação por hidrólise térmica é praticamente ausente e os possíveis resíduos não causam risco para a saúde humana (Marongiu *et al.*, 2007). No entanto, Costa *et al.* (2012a) comparando a extração de óleos essenciais de *Lavandula viridis* L'Hér. por hidrodestilação e por CO<sub>2</sub> supercrítico concluíram que foram identificados mais compostos no óleo essencial obtido por hidrodestilação do que no extrato obtido por CO<sub>2</sub> supercrítico. Nos últimos anos, tem vindo a ser utilizada a água em condições subcríticas.

Compostos hidrossolúveis como é o caso dos compostos fenólicos podem ser extraídos de frutos e legumes por imersão do material vegetal inteiro ou moído, em água à temperatura ambiente ou sob aquecimento. A eficiência deste processo, à semelhança do

verificado na extração de compostos voláteis, é melhorada com a introdução de ultrassons ou altas pressões hidrostáticas (Wang & Weller, 2006). A extração a temperatura de ebulição pode implicar a perda de polifenóis devido a ionização, hidrólise e oxidação durante a extração (Hui *et al.*, 2005). As soluções de extração obtidas são normalmente desidratadas por liofilização ou por secagem por atomização.

As propriedades biológicas dos polifenóis e os seus benefícios para a saúde intensificaram os esforços de pesquisa para descobrir e utilizar métodos para a extração, separação e identificação destes compostos a partir de fontes naturais (Ignat *et al.*, 2011). É frequente encontrar maior atividade em frações de composição complexa ou em extratos totais do que em substâncias isoladas, podendo a atividade ser devida a sinergias entre diferentes substâncias do mesmo grupo químico ou até de diferentes grupos de metabolitos secundários.

## **5.2. Caracterização dos extratos**

A caracterização dos extratos de PAMs, frutos ou outras estruturas vegetais deve incluir parâmetros de composição, de propriedades físicas e de atividade biológica. No caso dos extratos aquosos a componente fenólica assume especial importância. No que respeita à bioatividade, e tendo em atenção a utilização destes materiais para fim alimentar, salienta-se a atividade antioxidante, pelas implicações tecnológicas e pelo efeito na saúde e bem-estar do consumidor. A atividade antimicrobiana é igualmente um parâmetro importante em resposta à procura de conservantes naturais.

### **5.2.1. Quantificação do teor de fenóis totais e perfil fenólico**

A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por diferentes métodos. O teor de fenóis totais pode ser quantificado por método espectrofotométrico (método Ribéreau-Gayon, 1970) medindo a absorvância das soluções a 280 nm. Este método é muito utilizado em vinhos e também já foi utilizado em aguardente (Mira, 2009) entre outros. Trata-se de um método expedito que à partida pode ser aplicado a líquidos límpidos. Para materiais mais complexos é usual recorrer ao método que utiliza a capacidade de redução do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) (Dimitrios, 2006). O RFC consiste numa mistura de ácidos, na qual o molibdénio se encontra no estado de oxidação 4 (cor amarela no complexo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se complexos molibdénio-tungsténio azuis, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das

substâncias redutoras. Os compostos fenólicos reagem com o RFC apenas sob condições alcalinas (ajustado com uma solução de carbonato de sódio até pH~10) (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). Os complexos formados podem ser monitorizados por espectrofotometria a 750-765 nm (Magalhães *et al.*, 2008).

O reagente Folin-Ciocalteu não é específico para os compostos fenólicos já que pode ser reduzido por outros compostos não fenólicos, como por exemplo, aminas aromáticas, ácido ascórbico, cobre, ferro, etc., e por essa razão pode não ser o mais adequado para a determinação de “teor de fenóis totais” (Prior *et al.*, 2005). Assim, o RFC mede a capacidade de redução mas há sempre a discordância sobre o que está a ser detetado na capacidade antioxidante total, se são apenas fenóis ou se são fenóis juntamente com os agentes redutores ou possivelmente agentes quelantes de metais (Karadag *et al.*, 2009).

Em pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (2009) foi verificado que a adição de ácido ascórbico, um dos interferentes a ácido gálico em diferentes proporções provocou aumento de absorvância. Esta interferência é uma importante observação a ser considerada, principalmente se o estudo estiver a ser realizado em frutas com alto teor de vitamina C.

Para minimizar a variabilidade e eliminar resultados inconsistentes terão de se utilizar adequadas proporções entre agentes alcalinos e o RFC; otimizar o tempo de reação e temperatura para desenvolvimento da cor; monitorizar a absorvância a 765 nm que permite minimizar interferências da matriz da amostra que é frequentemente colorida e usar padrões de referência como é o caso do ácido gálico (Prior *et al.*, 2005).

O método de Folin-Ciocalteu tem as vantagens de ser operacionalmente simples, reprodutível e de procedimento bastante padronizado (Huang *et al.*, 2005). No entanto, é demorado e exige estudos de adaptação específicos o que torna a implementação para análise de rotina nem sempre fácil. Além disso, é realizado em fase aquosa, por isso não é aplicável para matrizes lipofílicas.

Apesar das limitações apontadas, a metodologia de Folin-Ciocalteu, vem sendo utilizada para a quantificação de compostos fenólicos. De entre os inúmeros trabalhos refira-se: Odriozola-Serrano *et al.* (2008) para tomate em fresco; Pichichero *et al.* (2009) para mel de diferentes origens botânicas; Ebrahimabadi *et al.* (2010) na espécie *Salvia eremophila* Boiss; Wannes *et al.* (2010) na espécie *Myrtus communis* L.; Martins *et al.* (2011) para espargos selvagens; Gil *et al.* (2011) para chá verde e ervas comerciais para infusões; Bursal & Gülçin (2011) para frutos de *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson; Wu *et al.* (2011) em espécies do género *Ligustrum*; Ćavar & Maksimović (2012) na espécie *Pelargonium graveolens* L'Her; Costa *et al.* (2012b) na espécie *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales; Gonçalves *et al.* (2013) para infusões de 10 plantas

medicinais mediterrânicas, incluindo *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. e Yosr *et al.* (2013) na espécie *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt.

A seleção de uma metodologia analítica adequada para o estudo dos compostos fenólicos em produtos de origem vegetal depende da natureza da amostra bem como da finalidade do estudo. Tão ou mais importante do que a quantificação dos compostos fenólicos totais é a separação e identificação do perfil fenólico.

Há um crescente interesse em pesquisar um método analítico altamente sensível e seletivo para a referida determinação (Liu *et al.*, 2008). As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas na separação, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No entanto, estes métodos também apresentam algumas desvantagens no que respeita ao limite de deteção e sensibilidade, especialmente em matrizes complexas, tais como extratos de plantas e amostras ambientais. Por vezes é necessário uma pré-concentração e purificação inicial dos extratos de polifenóis antes da análise por HPLC para simplificação dos cromatogramas obtidos. A etapa de purificação é uma parte crítica do método já que a remoção dos componentes potencialmente interferentes varia de acordo com a matriz vegetal a analisar (Ignat *et al.*, 2011). Várias combinações de colunas e fases móveis têm sido utilizadas para analisar compostos fenólicos. Grande parte dos trabalhos utiliza uma coluna de fase reversa C18 com sistemas de solventes binários, um eluente aquoso acidificado e um eluente polar, usualmente acetonitrilo ou metanol. Nestas condições os compostos mais polares do extrato eluem em primeiro lugar, seguidos de compostos de polaridade inferior.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de matriz de díodos acoplada à espectrometria de massa (HPLC-DAD-MS), é hoje a melhor abordagem analítica para estudar os polifenóis a partir de diferentes recursos biológicos (Bureau *et al.*, 2009).

A cromatografia supercrítica (SFC) é uma técnica cromatográfica relativamente recente utilizada na separação e identificação de compostos fenólicos. O que diferencia a SFC de outras técnicas cromatográficas, cromatografia gasosa (GC) e HPLC é a utilização de um fluido supercrítico como fase móvel. A cromatografia supercrítica é mais versátil do que a cromatografia líquida de alta resolução, mais eficiente em termos de custo, de fácil utilização, com tempo de resolução e análise mais rápidos. A instrumentação necessária para a cromatografia supercrítica é versátil devido à sua compatibilidade com múltiplos detetores (Ignat *et al.*, 2011).

A cromatografia gasosa é uma outra técnica que tem sido utilizada para a separação e identificação de compostos fenólicos e a deteção por espectrometria de massa (GC/MS). No entanto, a preparação de amostras para GC é complexa, incluindo a remoção de lípidos a partir do extrato, a libertação de ésteres fenólicos e derivatização de polifenóis de baixa volatilidade (Liu *et al.*, 2008).

### 5.2.2. Determinação da capacidade antioxidante

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante baseiam-se em fundamentos diversos e podem estar sujeitas a interferências. Desta forma, tendo em conta os pontos fortes, pontos fracos e aplicabilidade de cada tipo de estudo, atualmente preconiza-se a utilização de dois ou mais métodos para determinar a atividade antioxidante já que esta ocorre por diferentes mecanismos, o que significa que a utilização de um método de acordo com um mecanismo pode não refletir a verdadeira capacidade antioxidante da matriz (Karadag *et al.*, 2009).

Foram desenvolvidos vários métodos com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante de diferentes tipos de matrizes (Böhm & Schlesier, 2004). Estes métodos diferem entre si relativamente aos mecanismos de reação, agentes oxidantes e espécies alvo/marcadores, condições de reação assim como na expressão dos resultados (Karadag *et al.*, 2009).

Com base no mecanismo de inativação envolvido, os principais métodos têm sido geralmente divididos em duas categorias: transferência de átomos de hidrogénio (TAH) e transferência de eletrões (TE). Estes dois mecanismos de ação podem ocorrer em simultâneo o que pode dificultar a sua diferenciação e classificação (Karadag *et al.*, 2009).

Os métodos que têm por base a transferência de átomos de hidrogénio são geralmente constituídos por um gerador de radical livre sintético, um marcador oxidável e um antioxidante. São métodos que avaliam a capacidade de um antioxidante eliminar os radicais livres pela cedência de hidrogénio.

Os métodos com base na transferência de eletrões avaliam a capacidade de um antioxidante para reduzir um oxidante, que muda de cor quando reduzido.

Huang *et al.* (2005), MacDonald-Wicks *et al.* (2006) e Karadag *et al.* (2009) agrupam as metodologias do seguinte modo: metodologias TAH incluem métodos como o ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), TRAP (*ferric reducing antioxidant power*) e o método TBARS (*thiobarbituric acid-reactive-substances*); metodologias de TE incluem métodos como o o FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), CUPRAC (*cupric ion reducing antioxidant capacity*) e o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). Huang *et al.* (2005) e MacDonald-Wicks *et al.* (2006) utilizando DPPH consideraram-no um método que utiliza o mecanismo de TE, enquanto que Prior *et al.* (2005) o classifica como mecanismo que utiliza quer o mecanismo de TE quer o mecanismo de TAH devido à dificuldade na interpretação do mecanismo de inibição destes radicais.

A diversidade de metodologias é grande e a escolha terá de ser adequada para cada caso, mas alguns dos métodos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro* são o DPPH, FRAP, ABTS e ORAC.

A capacidade antioxidante pode pois ser expressa por meio de vários parâmetros:

- Capacidade de remoção de radical orgânico ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina)-6-ácido sulfónico) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo);
- Capacidade de redução de metal FRAP (*ferric reducing antioxidant power*), ou seja, poder antioxidante por redução do ião férrico e CUPRAC (*cupric ion reducing antioxidant capacity*), capacidade antioxidante por redução do ião cúprico;
- Remoção de um radical peroxil ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) ou seja, capacidade de absorção do radical oxigénio e TRAP (*total reactive antioxidant potential*), potencial antioxidante de radicais totais;
- Quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lípidos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

## DPPH

O método do DPPH tem sido muito utilizado pela comunidade científica para a determinação da atividade antioxidante por se tratar de um método de fácil controlo, simples e rápido e o DPPH ser um dos poucos radicais orgânicos estáveis disponíveis no comércio (Niederlander *et al.*, 2009; Scherer & Godoy, 2009).

Na presença de dadores de eletrões ou de átomos de hidrogénio, como é o caso dos compostos fenólicos, o radical DPPH (que apresenta um máximo de absorvância a 517 nm) é reduzido, isto é, dá-se o emparelhamento de eletrões e é originado DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazilo).

Com a formação de DPPH-H, uma hidrazina incolor, ocorre um decréscimo de absorvância pelo que o grau de descoloração de uma solução de DPPH, de cor violeta forte (Karadag *et al.*, 2009) para amarelo, após a adição de um antioxidante R-H, constitui uma medida do poder redutor deste composto e, consequentemente, uma forma de avaliar a sua atividade antioxidante. Assim sendo, este método consiste em avaliar a reação dos compostos antioxidantes presentes no extrato com o radical 2,2-difenilpicril-hidrazilo, sendo a mesma monitorizada pela variação da absorvância a 517 nm até valores constantes (Barreira, 2010; Barroso *et al.*, 2011). Na maioria dos casos o método de DPPH é utilizado para medir a captação de radicais após 30 minutos depois de iniciada a reação. A percentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para



decrecer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50, e maior a sua atividade antioxidante (Sousa *et al.*, 2007). A atividade de captura de radicais pelo método de DPPH também se expressa em valor TEAC (capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox) (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2008).

O método de DPPH para determinação da atividade antioxidante foi utilizado em diferentes trabalhos, tais como: Odriozola-Serrano *et al.* (2008) para tomate em fresco; Pichichero *et al.* (2009) para mel de diferentes origens botânicas; Wannes *et al.* (2010) na espécie *Myrtus communis* var. *italica* L.; Ebrahimabadi *et al.* (2010) na espécie *Salvia eremophila* Boiss; Albano & Miguel (2011) para extratos de *Foeniculum vulgare* Miller, *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter, *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L., *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Thymus camphoratus* Hoffmanns & Link, *Thymus carnosus* Boiss e *Thymus mastichina* (L.) L.; Bursal & Gülçin (2011) para frutos de *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson; Martins *et al.* (2011) para espargos selvagens; Wu *et al.* (2011) em espécies do género *Ligustrum*; Ćavar & Maksimović (2012) na espécie *Pelargonium graveolens* L'Her.; Du *et al.* (2013) para frutos do género *Chaenomeles*; Gallego *et al.* (2013) para três ervas aromáticas (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Lavandula angustifolia* Mill.; Gonçalves *et al.* (2013) para infusões de 10 plantas medicinais mediterrânicas, incluindo *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. e Yosr *et al.* (2013) na espécie *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt.

## ABTS

Outro método de avaliação da atividade antioxidante utiliza o radical catiónico ABTS que é produzido a partir de um precursor o 2,2-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina)-6-ácido sulfónico. O radical ABTS é um composto cromóforo quimicamente estável e apresenta alta solubilidade em água.

O método ABTS está baseado na capacidade dos antioxidantes em capturar o radical ABTS. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância a 658 nm (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2008).

A atividade de captura de radicais pelo método de ABTS expressa-se, normalmente, em valor TEAC (capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox) (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2008). Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (Lima, 2008). Tem sido utilizado em vários tipos de frutos como acerola, goiaba, açaí, maracujá, pitanga, entre outros (Sucupira *et al.*, 2012).

Quanto à limitação deste método, considera-se que o valor de TEAC caracteriza mais a capacidade da amostra para reagir com o radical ABTS do que para inibir o processo de oxidação. A reação em produtos naturais com muitos compostos fenólicos pode levar muito tempo para chegar ao fim. Conforme estudado por Perez-Jimenez & Saura-Calixto (2008), a comparação entre a capacidade antioxidante obtida num determinado tempo fixo e a cinética das amostras, quando tanto a concentração como o tempo necessário para esgotar o radical são considerados, mostra algumas diferenças. Uma outra desvantagem deste método é o facto do radical ABTS não ser encontrado em sistemas biológicos (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Este método foi utilizado nos trabalhos de Bursal & Gülçin (2011) para frutos de *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson; Contreras-Calderón *et al.* (2011) para polpa, casca e semente de vinte e quatro frutos exóticos da Colômbia; Gil *et al.* (2011) para chá verde e ervas comerciais para infusões; Costa *et al.* (2012b) na espécie *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales; Ferreira *et al.* (2012) para a espécie *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.; Costa *et al.* (2013) para a espécie *Lavandula viridis* L'Hér. e Gallego *et al.* (2013) para três ervas aromáticas (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Lavandula angustifolia* Mill.).

## FRAP

O método FRAP baseia-se na capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -(TPTZ)<sub>2</sub><sup>3+</sup> (complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina) de cor amarela, ao complexo azul  $\text{Fe}^{2+}$ -(TPTZ)<sub>2</sub><sup>2+</sup> medida espectrofotometricamente, com uma absorvância máxima a 595 nm (Karadag *et al.*, 2009) e relacionando-a com uma solução padrão de iões ferrosos ou de uma solução padrão de antioxidante (como por exemplo, ácido ascórbico). O desenvolvimento de cor significa que um redutor (antioxidante) está presente.

Nem todos os redutores capazes de reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  são antioxidantes, quaisquer substâncias que sejam dadoras de eletrões, mesmo sem propriedades antioxidantes podem contribuir para o valor de FRAP e sobrestimar os resultados (Magalhães *et al.*, 2008). São referidas como vantagens deste método o facto de ser um método simples, rápido, de baixo custo e robusto (Karadag *et al.*, 2009).

O método FRAP para determinação da atividade antioxidante foi utilizado em diferentes trabalhos, tais como: Pichichero *et al.* (2009) para mel de diferentes origens botânicas; Bursal & Gülçin (2011) para frutos de *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson; Contreras-Calderón *et al.* (2011) para polpa, casca e semente de vinte e quatro frutos exóticos da Colômbia; Wu *et al.* (2011) em espécies do género *Ligustrum*; Gallego *et al.* (2013) para três ervas aromáticas (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris*

L. e *Lavandula angustifolia* Mill.); Martins *et al.* (2013) para 6 amostras de chás de ervas adquiridas no comércio (chá de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire., *Cymbopogon citratos* (DC) Stapf., *Matricaria recutita* L., chá verde, chá branco e chá preto de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze e Yosr *et al.* (2013) na espécie *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt.

## ORAC

O método ORAC mede a capacidade antioxidante em amostras biológicas *in vitro*. O método consiste em medir a diminuição da fluorescência de uma proteína, como resultado da perda da sua conformação quando sofre danos oxidativos causados por uma fonte de radicais peróxido. Assim, o método mede a capacidade dos antioxidantes da amostra para proteger a proteína da degradação oxidativa (Zulueta *et al.*, 2009). O antioxidante adicionado reage rapidamente com os radicais, doando átomos de hidrogênio, inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Esta inibição é proporcional à atividade antioxidante.

O método ORAC possui uma vantagem em relação aos outros métodos de determinação da capacidade antioxidante, que é o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, pois assim ocorre menor interferência dos compostos corados presentes nas amostras. Isto é um fator a ter em conta quando se analisam matrizes que possuem cor. Outra vantagem é o uso de radicais peróxido ou hidroxilo como pró-oxidantes, conferindo maior significado biológico em relação aos métodos que usam oxidantes não necessariamente, pró-oxidantes fisiológicos (Sucupira *et al.*, 2012).

O método ORAC foi utilizado em trabalhos de Costa *et al.* (2012b) na espécie *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales; Costa *et al.* (2013) para a espécie *Lavandula viridis* L'Hér. e Gallego *et al.* (2013) para três ervas aromáticas (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Lavandula angustifolia* Mill.).

Um método relativamente recente de medição direta da capacidade total de antioxidantes em alimentos é o Quencher (QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible), ou seja, um método rápido, fácil, barato e reprodutível, segundo Gökmen *et al.* (2009). Este método exclui os anteriores métodos de extração com solventes que inevitavelmente alteram a avaliação. O Quencher também é um método de captação de radicais utilizando as matrizes diretamente através da utilização de radicais como o DPPH e o ABTS.

### 5.2.3. Atividade antimicrobiana

Os metabolitos secundários apresentam um papel importante na adaptação das plantas aos seus habitats, aumentando a probabilidade de sobrevivência da espécie, já que

são responsáveis por diversas atividades biológicas com essa finalidade como por exemplo, poderem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteção da planta ou apresentar atividade tóxica para outras plantas e animais (Li *et al.*, 1993).

Um problema acrescido em conservação pós-colheita de cereja são as contaminações microbiológicas, em especial por fungos do género *Monilia*, *Penicillium* e *Botrytis* (Chand-Goyal & Spotts, 1996; Romanazzi, 2010). Para além destes microrganismos, outras contaminações por leveduras e bactérias podem surgir durante o período de armazenamento, causando não só a deterioração do fruto como também podem ser causadores de doenças ao consumidor, quer pela ingestão do alimento contaminado com o microrganismo quer pela possibilidade da presença de toxinas indesejáveis produzidas pelos mesmos.

A temperatura a que os alimentos são sujeitos, quer durante o armazenamento quer na sua confeção, pode minimizar a atividade patogénica dos microrganismos, mas os frutos consumidos em fresco e armazenados em casa dos consumidores sem controlo da mesma, pode levar à deterioração dos mesmos e ao aumento da atividade microbiana.

O *Bacillus subtilis* embora não seja patogénico pode ser encontrado tanto no solo como na água tolerando condições ambientais atípicas e, por isso, podem estar presentes em alimentos deteriorados conferindo uma aparência desagradável ao alimento.

Praticamente todos os alimentos, quer de origem vegetal quer de origem animal que não tenham sido objeto de processamento, podem veicular *E. coli*, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos a contaminação fecal.

A *Listeria monocytogenes* é de grande importância em termos de saúde pública, sendo causadora de importantes toxinfecções quer nos humanos quer noutros animais. Sobrevive no homem podendo este ser contaminado através do solo, estrume, frutas, legumes, água, aves domésticas, peixes e muitos outros alimentos.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria que raramente causa doenças num sistema imunológico saudável mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infeção, sendo resistente a um grande número de antibióticos e antissépticos.

A presença de *Staphylococcus aureus* nos alimentos pode provir dos próprios manipuladores de alimentos que alojam frequentemente estas bactérias na pele ou nas fossas nasais, podendo provocar doenças que vão de uma simples infeção até infeções mais graves.

Os bolores e leveduras são considerados como agentes de deterioração em frutos. Os bolores podem ser responsáveis por doenças alimentares devido à possibilidade de produzirem toxinas (micotoxinas) à superfície do alimento, em especial quando as condições de conservação e armazenamento não são ideais.

O género *Monilinia* é conhecido como um dos causadores de deterioração e contaminação em cereja.

Uma das atividades biológicas que se atribui tanto às plantas aromáticas e medicinais como aos respetivos extratos e óleos essenciais é a atividade antimicrobiana, em particular a antibacteriana e a antifúngica. As propriedades antimicrobianas e antioxidantes de óleos essenciais têm sido extensivamente analisadas e parecem estar relacionados com a sua natureza hidrofóbica. Alguns óleos essenciais como os de tomilho (*Thymus* sp.), de cravinho (*Syzygium aromaticum*), de alfavaca (*Lavandula* sp.) ou de segurelha (*Satureja* sp.) são exemplos clássicos que têm sido usados em medicina humana pela sua atividade antimicrobiana, quer por aplicação direta, quer por incorporação em medicamentos antissépticos e desinfetantes para uso externo. Em geral, a atividade está associada à presença de compostos oxigenados com reduzido tamanho molecular, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio e com hidrossolubilidade razoável, como são exemplos, o timol, o carvacrol, o eugenol, o linalol, o geraniol, o aldeído cinâmico, o neral ou o geranial. Estes compostos atuam por modificação da permeabilidade da membrana externa dos microrganismos e por inibição de enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o balanço energético da célula (Cunha *et al.*, 2009).

Atualmente existem diferentes métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas. Os métodos normalmente usados são os de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no agar, diluição em agar e diluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) (Nostro *et al.*, 2004).

No método de difusão em disco, na maioria dos estudos os halos de inibição são comparados aos dos antibióticos, no entanto é importante levar em consideração: particularidade dos óleos, o meio de cultura utilizado e o microrganismo teste (Nostro *et al.*, 2004).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), anteriormente denominado de NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Os meios de cultura utilizados e o pH devem proporcionar o crescimento adequado dos organismos em teste. Entre os meios de cultura utilizados para o teste de suscetibilidade de bactérias, o Müller-Hinton é o mais citado. No entanto, Adongo *et al.* (2012), usaram caldo nutritivo ao determinar o valor de MIC de extratos de plantas face a cinco bactérias *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* e uma levedura, *C. albicans*.

## 5.3. Materiais e métodos

### 5.3.1. Obtenção de extratos aquosos

Os extratos aquosos de *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk.) foram obtidos por ebulição sob refluxo (aparelho de Clevenger modificado) (Fig. 5.1) misturando 250 mL de água destilada com 50 g de material vegetal fresco (caules, folhas e flores) proveniente dos três locais de colheita (1º ano: Orvalho, Malcata e Gardunha; 2º e 3º ano: Malcata e Gardunha) em três momentos do ciclo vegetativo: início do repouso vegetativo (final de outubro), em repouso vegetativo (fevereiro) e à floração (maio).



**Figura 5.1.** Aparelho de Clevenger utilizado nas extrações aquosas.

Os extratos aquosos das plantas de campo e do material vegetal micropropagado foram liofilizados, sendo o sólido recolhido e conservado em condição de baixa umidade relativa para posterior análise.

Para cada local de colheita e ao longo dos três momentos do ciclo vegetativo em estudo, bem como para o material vegetal micropropagado, foram avaliados os seguintes parâmetros: rendimento de extração, teor de fenóis totais, perfil fenólico, caracterização da componente glucídica, componente mineral, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

As siglas utilizadas para identificar os extratos em cada um dos parâmetros encontram-se na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.** Siglas utilizadas na identificação dos extratos.

Sigla	Identificação do extrato (Material vegetal, origem e época de recolha)
OMic	Material vegetal micropropagado proveniente do local de recolha Orvalho
MMic	Material vegetal micropropagado proveniente do local de recolha Malcata
GMic	Material vegetal micropropagado proveniente do local de recolha Gardunha
OR	Plantas silvestres provenientes do local de recolha Orvalho; repouso vegetativo
MR	Plantas silvestres provenientes do local de recolha Malcata; repouso vegetativo
GR	Plantas silvestres provenientes do local de recolha Gardunha; repouso vegetativo
OIR	Plantas silvestres provenientes do local de recolha Orvalho; início do repouso
MIR	Plantas silvestres provenientes do local de recolha Malcata; início do repouso
GIR	Plantas silvestres provenientes do local de recolha Gardunha; início do repouso
OCF	Caules/folhas de plantas silvestres provenientes do local de recolha Orvalho; floração
MCF	Caules/folhas de plantas silvestres provenientes do local de recolha Malcata; floração
GCF	Caules/folhas de plantas silvestres provenientes do local de recolha Gardunha; floração
OF	Flores de plantas silvestres provenientes do local de recolha Orvalho
MF	Flores de plantas silvestres provenientes do local de recolha Malcata
GF	Flores de plantas silvestres provenientes do local de recolha Gardunha

### 5.3.2. Rendimento de extração

Tendo por objetivo estudar previamente o rendimento de extração em função do tempo foram testados diversos tempos em ebulição sob refluxo: 15, 30, 60, 90 e 120, 150 e 180 minutos. Dado que a massa de extrato recuperada aos 120 minutos foi em média superior a 75%, optou-se por este tempo de extração.

O rendimento de extração para os locais estudados ao longo do ciclo vegetativo foi determinado por gravimetria e expresso em termos de massa de extrato liofilizado por 100 g de material original seco.

As determinações foram efetuadas em triplicado.

### 5.3.3. Teor de fenóis totais e perfil fenólico

#### • Teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais dos extratos foi quantificado por método espectrofotométrico (método Ribéreau-Gayon, 1970) medindo a absorvância a 280 nm, em células de quartzo de 1 cm de percurso ótico. Na preparação da amostra foram pesados 3,5 mg de extrato seco para um balão volumétrico de 100 mL, perfazendo o volume com água destilada. Após agitação procedeu-se à leitura da absorvância (UNICAM UV/Vis Spectrometer UV4). Os

resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca, com base numa curva de calibração (Anexo 4, Fig. 1), determinada por regressão linear simples, estabelecida a partir de concentrações de 0 a 30 mg/L ácido gálico.

As determinações foram efetuadas em triplicado.

- **Determinação do perfil fenólico**

A identificação dos fenóis presentes nos extratos de carqueja de diferentes origens e em diferentes fases do ciclo vegetativo foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência com Detetores de Díodos, Electroquímico e de Massa (HPLC-DAD-ED e HPLC-DAD-MS)).

As análises HPLC-DAD-ED dos extratos foram realizadas no ITQB (Oeiras, Portugal). Foi utilizado um equipamento Thermo Finnigan (Modelo Surveyor) equipado com um amostrador automático, detetor de díodos (DAD), detetor electroquímico (ED) e um espectrómetro triplo quadrupolo (TQ) (Micromass® Quattro microTM, Waters) com uma fonte ESI em modo negativo. O capilar foi colocado a 2.5KV e o cone a 35V. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Lichrocart RP-18 column (250 x 4 mm, tamanho de partículas 5 µm, Merck) num forno a 35 °C. Utilizou-se um fluxo de 0,700 mL/min e registou-se os perfis cromatográficos a 280, 320 e 360 nm. Os eluentes usados foram: Eluente A – Ácido fosfórico p.a em água Milli-Q (0,1% v/v) e Eluente B – Acetonitrilo HPLC gradient grade (0 % v/v) em ácido fosfórico p.a (0,1 % v/v) e água Milli-Q (9,9 % v/v). A aquisição e tratamento dos dados realizou-se com recurso ao *software* Chromquest®.

### **5.3.4. Caracterização da componente glucídica**

#### **5.3.4.1. Determinação do peso molecular médio**

O peso molecular médio em número ( $M_n$ ) e peso ( $M_w$ ) bem como o índice de polidispersão ( $M_w/M_n$ ) foram obtidos por cromatografia de exclusão molecular (*Size Exclusion Chromatography – SEC*) a baixa temperatura num equipamento da Waters Co, equipado com uma coluna Waters Ultrahydrogel Linear e um detetor diferencial de índice de refração (Waters 2410). Foi usado como eluente uma solução 0,1 M de NaCl a 30°C, e a concentração de polímero foi menor do que 0,1% em peso, assegurando assim o bombeamento de polissacáridos essencialmente não-agregados com uma conformação em hélice pelo sistema Waters 510 Solvent Delivery. Os valores de  $M_n$  e  $M_w$  foram calculados usando uma curva de calibração preparada com padrões de pululano monodispersos



(Shodex, Showa Denko, Japão). Esta análise foi realizada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

#### **5.3.4.2. Composição química**

Os açúcares neutros individuais foram determinados após hidrólise ácida, derivatização de acetato de alditol e análise por GC-FID, como descrito por Passos e Coimbra (2013). Os derivados de acetato de alditol foram separados com diclorometano e analisados por GC (Perkin Elmer-Clarus® 400) com um detector FID equipado com uma coluna DB-225 (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA), com diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 mm e 0,15 µm respetivamente. O programa de temperatura utilizado foi: temperatura inicial de 200°C, seguido de uma rampa linear de 40°C/min até 220°C, mantendo esta temperatura durante 7 minutos, seguida de uma taxa de 20°C/min até 230°C, temperatura mantida durante 1 min. As temperaturas do injetor e do detetor foram respetivamente, 220 e 230°C. O caudal do gás de arraste (H<sub>2</sub>) foi fixado em 1,7 mL/min (Nunes & Coimbra, 2001).

Para a análise dos açúcares neutros foi inicialmente efetuada uma hidrólise, seguida de redução e acetilação (Anexo 5). O procedimento para determinação dos ácidos urónicos encontra-se descrito no Anexo 6.

As determinações foram realizadas em duplicado. Esta componente analítica foi realizada na Universidade de Aveiro.

#### **5.3.5. Caracterização da humidade e da componente mineral**

Os extratos liofilizados dos rebentos micropropagados e das plantas silvestres foram avaliadas em termos de:

- Humidade
- Fósforo total
- Potássio, cálcio e magnésio totais
- Ferro, cobre, sódio, zinco, manganês, crómio, cádmio, níquel e chumbo

A humidade foi determinada por secagem, a 105 °C realizando pesagens até à obtenção de massa constante. O fósforo total foi quantificado por espectrofotometria de absorção molecular – colorimetria. O potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, sódio, zinco,

manganês, crômio, cádmio, níquel e chumbo foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica.

### 5.3.6. Atividade antioxidante

#### 5.3.6.1. Método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). A solução-mãe de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila, marca Sigma-Aldrich) foi preparada dissolvendo 24 mg de DPPH em 100 mL de metanol (Fisher Chemical, UK) sendo armazenada no frio até utilização (no máximo até 5 dias).

A solução de trabalho (solução diária) foi obtida misturando 9 mL da solução-mãe em 36 mL de metanol (absorvância a 517 nm inferior a 1,1).

Na preparação da amostra, 2 mg de extrato desidratado foram diluídos em 1 mL de água destilada. Após homogeneização, adicionaram-se 4 mL de solução diária de DPPH, incubando a mistura no escuro durante 40 minutos, correspondente ao tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio da reação, ou seja, o equilíbrio entre as espécies oxidadas (antioxidantes) e reduzida (DPPH•) na solução, à temperatura ambiente. Procedeu-se em seguida à leitura da absorvância a 517 nm, utilizando metanol como branco num espectrofotômetro UV-VIS, marca JASCO, Modelo 7800.

Foi efetuada uma curva de calibração (Anexo 4, Fig. 2) com um antioxidante de referência, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico, marca Acros Organics, EUA). Para obter a curva de calibração foram preparadas diferentes concentrações de Trolox (de 75 µM a 1200 µM).

A atividade bloqueadora de radicais (RSA, *radical scavenging activity*) foi calculada como percentagem da descoloração da solução de DPPH, usando a equação 1.

$$\text{RSA (\%)} = [(A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}})/A_{\text{inicial}}] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

em que A é a absorvância.

Os resultados são expressos em TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) definido como a concentração do antioxidante que fornece a mesma percentagem de inibição do Trolox (Re *et al.*, 1999), calculado em mM Trolox/100g m.s.

As determinações da atividade antioxidante foram efetuadas em triplicado.

#### 5.3.6.2. Método FRAP

A atividade antioxidante dos extratos foi também avaliada através de outra metodologia, o método FRAP.

- **Curva-Padrão do Sulfato Ferroso**

Para estabelecer uma curva padrão a partir da solução de sulfato ferroso 2000  $\mu\text{M}$  (marca Sigma-Aldrich, Índia) prepararam-se soluções variando a concentração de 500  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$ . Em ambiente escuro, colocaram-se 25  $\mu\text{L}$  de cada concentração de sulfato ferroso (500  $\mu\text{M}$ , 1.000  $\mu\text{M}$ , 1.500  $\mu\text{M}$  e 2.000  $\mu\text{M}$ ) a 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP homogeneizando e mantendo em banho-maria a 37 °C.

O reagente FRAP foi preparado adicionando solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina, marca Sigma-Aldrich, Reino Unido) 10 mM a 25 mL de tampão acetato 0,3 M, pH 3,6 e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto de ferro hexahidratado 20 mM (Panreac, USA).

A solução TPTZ foi preparada dissolvendo 3,12 g de TPTZ em aproximadamente 5 mL de HCl 40 mM (Merck) e completando o volume para 1 L num balão volumétrico com HCl 40 mM.

A solução tampão acetato 0,3 M, pH 3,6 foi preparada adicionando 3,1 g de acetato de sódio (marca Riedel-deHaen, Alemanha) a 16 mL de ácido acético glacial (marca Panreac, Espanha), completando o volume para 1000 mL com água destilada.

Após 30 minutos, foi feita a leitura da absorvância a 595 nm, utilizando o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro. A curva-padrão encontra-se no Anexo 4 (Fig. 3).

- **Preparação da amostra**

Amostras de 0,5 mg de extrato liofilizado foram dissolvidas em 1 mL de água destilada. 25  $\mu\text{L}$  da solução de extrato foram adicionados a 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro de UV/VIS a 595 nm, utilizando o reagente FRAP com água destilada como branco.

As determinações da atividade antioxidante foram efetuadas em triplicado.

### 5.3.7. Atividade antimicrobiana

Foram efetuados estudos para avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de carqueja com os seguintes microrganismos:

- Bolores e leveduras: *Monilinia fructigena*, referência CBS 101499; *Monilinia laxa*, referência CBS 101503; *Pichia fermentans* e *Candida albicans*.
- Bactérias: *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Os extratos liofilizados foram hidratados com água destilada esterilizada mas, atendendo a que nos primeiros resultados se observaram contaminações na zona da gota do extrato, para minimizar possíveis contaminações, procedeu-se à sua esterilização. Numa primeira fase procedeu-se à filtração (com filtro de 45 µm) que seria o mais conveniente a fim de não provocar alterações nos extratos. Verificou-se a impossibilidade desta metodologia dada a colmatação dos filtros e optou-se pela autoclavagem dos extratos a 121 °C durante 15 minutos. Testou-se, em paralelo, a ação dos extratos hidratados com água destilada esterilizada e extratos esterilizados.

Numa primeira abordagem foram testadas concentrações de extrato de carqueja de 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 10000; 15000; 30000 e 50000 ppm.

Face aos resultados dos ensaios preliminares, foram também estudadas concentrações superiores: 1000; 3000; 5000; 7500; 20000; 40000; 60000; 75000; 80000; 90000 e 100000 ppm.

As culturas de bolores foram adquiridas no Instituto Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre do Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, na Holanda.

As culturas de bactérias e leveduras encontravam-se crioconservadas a -80 °C num meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) com glicerol adicionado numa proporção de 1:1, tendo sido previamente repicadas para meio de cultura adequado ao seu crescimento, conforme Tabela 5.2, para obtenção de culturas puras e jovens, com um período de incubação de 24 horas a 37 °C para as bactérias, 48 horas a 30 °C para as leveduras e a 25 °C durante 3 a 5 dias para os bolores.

**Tabela 5.2.** Meios de cultura utilizados para o crescimento dos microrganismos.

<i>Monilinia fructigena</i>	PDA (Potato Dextrose Agar), extrato de malte
<i>Monilinia laxa</i>	PDA (Potato Dextrose Agar) e V8
<i>Bacillus subtilis</i>	Agar nutritivo
<i>Escherichia coli</i>	Agar nutritivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar nutritivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar nutritivo
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSYEA (Tryptic Soy Agar + Yeast extract)
<i>Cândida albicans</i>	SDA (Sabouraud Dextrose Agar)
<i>Pichia fermentans</i>	SDA (Sabouraud Dextrose Agar)

Os meios de cultura, preparados de acordo com indicações do fabricante, foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e, após esterilização, distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em condições de assepsia.

No anexo 7 apresentam-se as metodologias utilizadas para obtenção de esporos de *Monilinia fructigena* e *Monilinia laxa*; preparação do inóculo bacteriano; quantificação do inóculo; preparação do inóculo de leveduras; preparação da suspensão de esporos de bolores e quantificação da suspensão de esporos.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelos seguintes métodos:

- Método 1: No meio de cultura apropriado ao crescimento do microrganismo foi incorporado o extrato da planta nas concentrações pretendidas. Nesse meio dispensou-se 10 µl de cada microrganismo. As placas foram incubadas à temperatura adequada para cada microrganismo e, após o período de incubação, na zona onde foi colocada a gota, verificou-se a existência ou não de crescimento do microrganismo.
- Método 2: Cada microrganismo em estudo foi semeado por espalhamento no meio de cultura adequado ao seu crescimento, com o auxílio de uma zaragatoa de algodão estéril e assegurando uma distribuição uniforme do inóculo.  
Após o espalhamento do microrganismo, foi colocada uma gota de 10 µl de cada extrato de carqueja nas diferentes concentrações estudadas, sobre a superfície do meio.
- Método 3: Por difusão em disco.  
Do mesmo modo que para o método anterior, cada microrganismo em estudo foi semeado por espalhamento no meio de cultura adequado ao seu crescimento.

Foram colocados discos brancos esterilizados de 6 mm de diâmetro (marca Oxoid) sobre a superfície do meio inoculado, assegurando uma boa adesão com a superfície do meio de cultura.

A superfície de cada disco foi inundada com 10 µl de cada extrato da planta nas diferentes concentrações estudadas. As placas foram invertidas e colocadas em condições apropriadas ao crescimento de cada microrganismo.

Nas três metodologias utilizadas, após o período de incubação adequado a cada microrganismo, verificou-se a existência ou não de halos de inibição. Os halos de inibição são zonas onde não se verifica crescimento dos microrganismos por sensibilidade aos extratos de carqueja utilizados nas diferentes concentrações.

A verificação da existência ou não de halos de inibição foi efetuada de acordo com o microrganismo em estudo. No caso das bactérias o período de incubação pode ir de 24 a 48 horas; no caso das leveduras pode ir de 48 a 72h de incubação e no caso dos bolores esse período é alargado para um período aproximado de 5 dias.

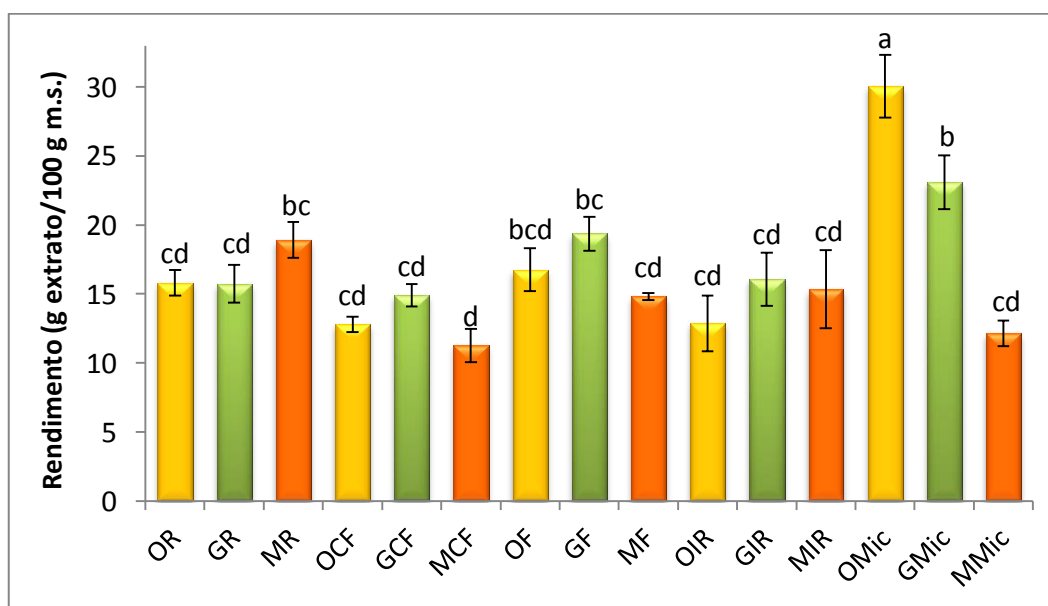
#### **5.3.8. Análise estatística dos resultados**

Os resultados deste capítulo foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi efetuada pelo teste de Scheffé, com um nível de significância  $p < 0,05$ , através do programa Statistica, Versão 7.

## 5.4. Resultados e discussão

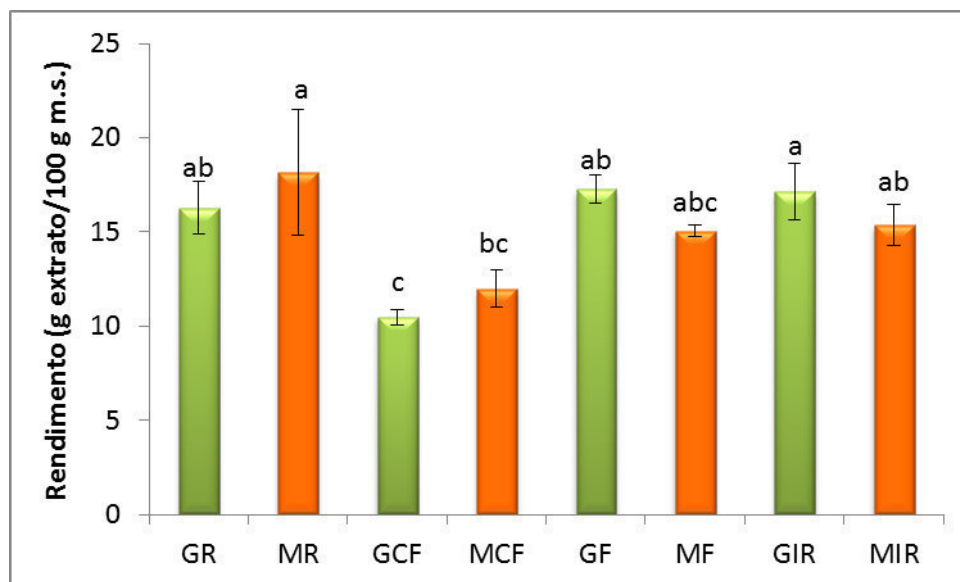
### 5.4.1. Rendimento de extração

Os resultados do rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para os diferentes locais de colheita das plantas silvestres, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano de avaliação bem como para o material vegetal micropropagado são apresentados na Figura 5.2. Como se pode verificar o rendimento de extração é sempre relativamente elevado, superior a 11%. No que respeita às plantas silvestres não se observaram diferenças significativas entre locais ou épocas de colheita. No material vegetal produzido *in vitro*, o rendimento de extração foi superior, sendo esta diferença significativa no caso do material vegetal obtido a partir de plantas do Orvalho (30,1%) e da Gardunha (23,1%). Não obstante as diferenças não serem significativas, os caules em floração possuem sempre menor rendimento de extração relativamente às flores, em cada local, o que leva a supor que os compostos podem ser canalizados para a parte floral.



**Figura 5.2.** Rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado. Legenda: OR - Orvalho, repouso vegetativo; GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; OCF - Orvalho, caules à floração; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; OF - Orvalho, flores; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; OIR - Orvalho, início do repouso; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso; OMic - Orvalho, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado. Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

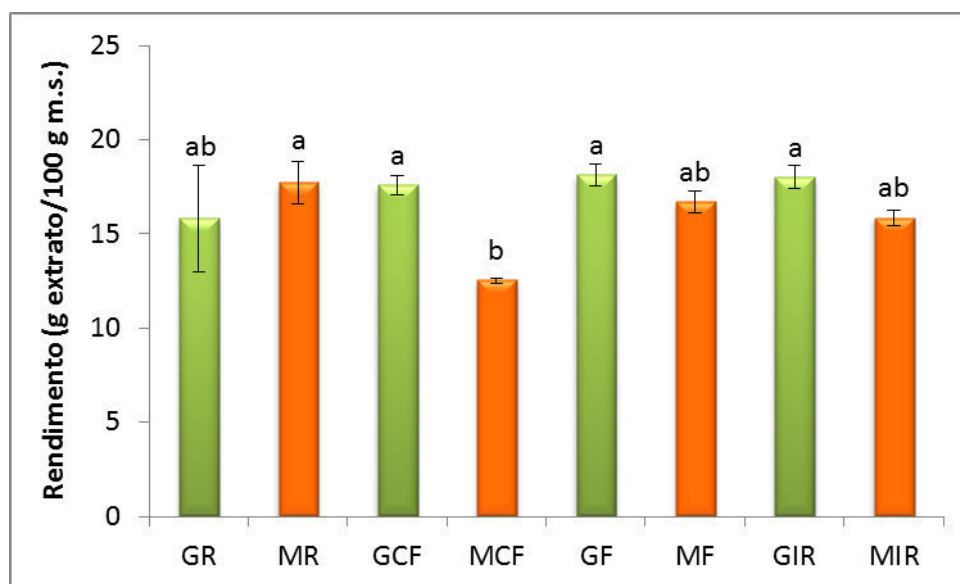
Relativamente aos rendimentos de extração obtidos no 2º e 3º ano verificaram-se novamente os valores elevados obtidos no 1º ano. Confirmam-se no segundo ano (Fig. 5.3) os maiores rendimentos de extração no repouso vegetativo (18,1%) para o local de recolha Malcata e flores de origem da Gardunha (17,3%) e no terceiro ano (Fig. 5.4) nas flores (18,1%) para o local de recolha Gardunha. De salientar que esta diferença se anularia se na época de floração não se procedesse à separação das flores da restante parte aérea.



**Figura 5.3.** Rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º ano de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.4.** Rendimento de extração (g extrato/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação. Letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso. Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Face ao exposto é possível concluir que o local de recolha bem como a fase do ciclo vegetativo não afetam de forma significativa o rendimento de extração. O extrato de material vegetal micropropagado, em especial de origem no Orvalho e Gardunha, apresentaram valores significativamente superiores aos das plantas silvestres provenientes de todas as origens independentemente da fase do ciclo vegetativo.

Luís *et al.* (2009) referem a carqueja silvestre como uma planta com elevados rendimentos de extração relativamente a outras espécies, embora o rendimento seja superior em extratos etanólicos (28,6%) comparativamente a extratos aquosos (12,0%).

O rendimento de extração em carqueja utilizando extratos metanólicos de plantas silvestres situou-se entre 26% para caules e folhas e 25% para flores (Luís *et al.*, 2011).

Por outro lado, Martínez *et al.* (2012) num estudo com 35 plantas endémicas e sub-endémicas da Galícia, entre as quais a *Pterospartum tridentatum* subsp. *tridentatum* obtiveram rendimentos de extração em etanol e água (1:1) de 30% para folhas e caules e 24% nas flores.

Em *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales (Costa *et al.*, 2012b) os valores mais elevados de rendimento de extração foram obtidos utilizando água como solvente comparativamente à utilização de água e etanol. Com a mesma espécie utilizando a planta selvagem e em cultura *in vitro* foram atingidos rendimentos de hidroextração de 21% e 23,6%, respetivamente, confirmando o maior rendimento de extração em condições *in vitro*.

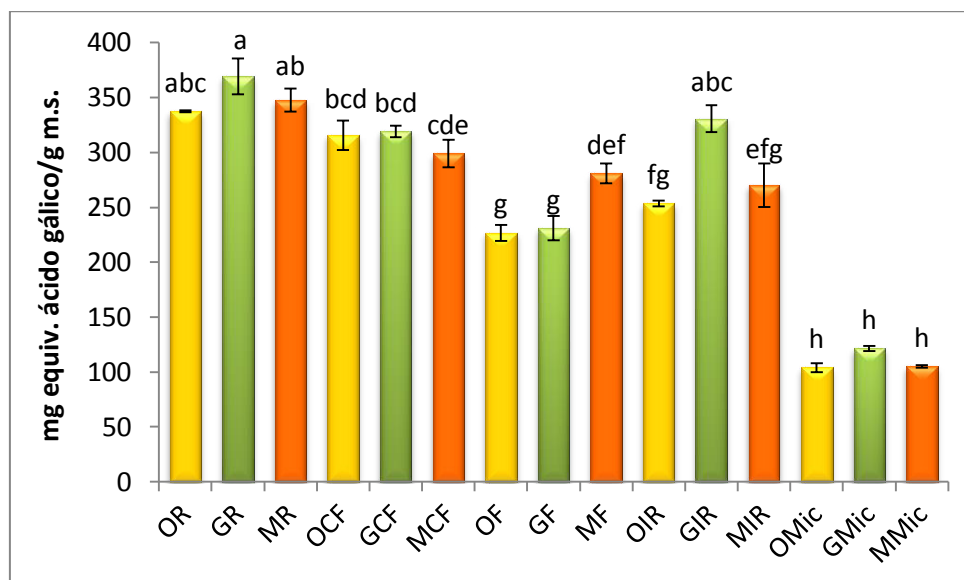
Variadas técnicas estão a ser desenvolvidas para uma eficiente extração, a fim de encurtar o tempo de extração, diminuir o consumo de solvente, melhorar a qualidade dos extratos e evitar custos de funcionamento e problemas ambientais bem como melhorar o rendimento de extração e reprodutibilidade.

#### 5.4.2. Teor de fenóis totais e perfil fenólico

Nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 apresentam-se os teores de fenóis totais para cada um dos três anos em estudo podendo observar-se que os extratos das plantas silvestres apresentam teores de fenóis totais relativamente elevados.

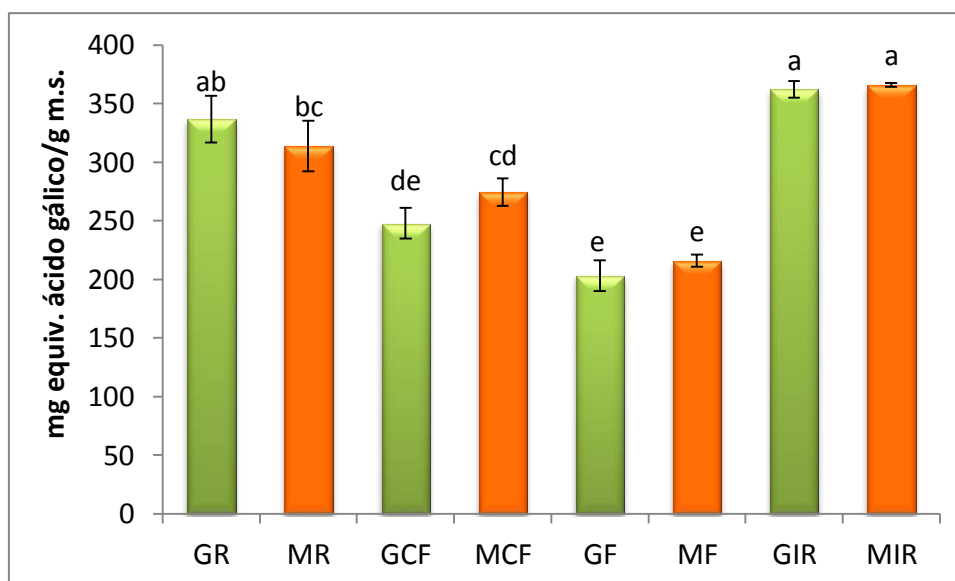
O teor de fenóis totais varia significativamente com a fase do ciclo vegetativo verificando-se para todos os locais de recolha das plantas silvestres os valores mais elevados na época de repouso vegetativo, sendo o extrato da Gardunha aquele que apresenta valor significativamente mais elevado (369,2 mg equiv. ácido gálico/g m.s.). Nos

extratos dos rebentos micropropagados (Fig. 5.5), verificaram-se teores significativamente mais baixos (entre 104 a 121 mg equiv. ácido gálico/g m.s.) relativamente aos extratos das plantas silvestres independentemente da origem ou do período vegetativo.



**Figura 5.5.** Teor de fenóis totais (mg equiv. ácido gálico/g m.s.) para o material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado. Legenda: OR - Orvalho, repouso vegetativo; GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; OCF - Orvalho, caules à floração; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; OF - Orvalho, flores; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; OIR - Orvalho, início do repouso; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso; OMic - Orvalho, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado. Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

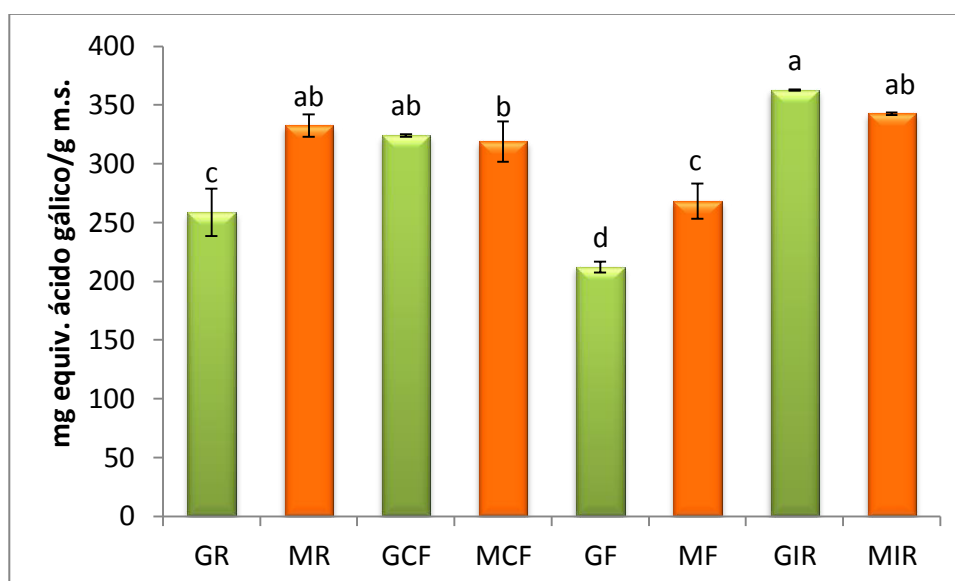
Na avaliação dos teores de fenóis totais no 2º ano (Fig. 5.6) verifica-se que a época do repouso e início de repouso para ambos os locais de recolha das plantas silvestres apresentam os valores significativamente mais elevados. No 3º ano (Fig. 5.7) verificam-se também os valores superiores nos extratos do início do repouso e repouso, à exceção do extrato proveniente da Gardunha na época do repouso vegetativo. Verifica-se ainda que os extratos de flores apresentam teores de fenóis totais significativamente inferiores aos restantes extratos das plantas silvestres.



**Figura 5.6.** Teor de fenóis totais (mg equiv. ácido gálico/g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º ano de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.7.** Teor de fenóis totais (mg equiv. ácido gálico/g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Luís *et al.* (2009) realizaram um estudo em três espécies portuguesas, entre as quais a *P. tridentatum* (L.) Willk., *Erica* spp. e *Cytisus scoparius* (L.) Link, comparando extratos aquosos e etanólicos relativamente ao teor de fenóis totais e atividade antioxidante. O teor

de fenóis foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu's. O teor de fenóis totais de carqueja ( $196,6 \pm 3.9$  mg equiv. ácido gálico/g m.s.) em extrato etanólico foi superior ao de *Erica* spp. ( $141,5 \pm 1.2$  mg equiv. ácido gálico/g m.s.) bem como em extrato aquoso ( $222,7 \pm 5,1$  para carqueja e  $212,7 \pm 1.5$  mg equiv. ácido gálico/g m.s. para *Erica* spp.). Relativamente ao teor de fenóis totais da espécie *Cytisus scoparius* (L.) Link em extrato etanólico ( $225,3 \pm 4.1$  mg equiv. ácido gálico/g m.s.) foi superior ao de carqueja mas em extrato aquoso a carqueja possui um teor de fenóis totais muito superior ( $134,7 \pm 0.1$  mg equiv. ácido gálico/g m.s.) a esta mesma espécie.

Luís *et al.* (2011) avaliaram o teor de fenóis totais em extratos metanólicos de dez espécies portuguesas, entre as quais a *P. tridentatum* (L.) Willk. e, utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, verificaram que as folhas e caules de carqueja apresentam um teor de fenóis mais baixo ( $113,6 \pm 1.5$  ácido gálico equivalente/g m.s.) do que as suas flores ( $171,4 \pm 0.7$  ácido gálico equivalente/g m.s.). Os mesmos autores referem que *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., *Erica arborea* L., *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet e *Rubus ulmifolius* Schott são espécies que apresentam elevada concentração de flavonóides.

Utilizando o método Folin-Ciocalteu, Gallego *et al.* (2013) avaliaram três espécies aromáticas, *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Lavandula angustifolia* Mill. relativamente ao teor de fenóis totais. Os extratos aquosos (com solvente constituído por 50% de água e 50% etanol) de folhas e caules de *Rosmarinus officinalis* L., caules de *Thymus vulgaris* L. e caules e flores de *Lavandula angustifolia* Mill. apresentaram teores de fenóis totais inferiores (variando entre 52 e 219 mg ácido gálico/g extrato liofilizado) aos obtidos neste estudo de carqueja.

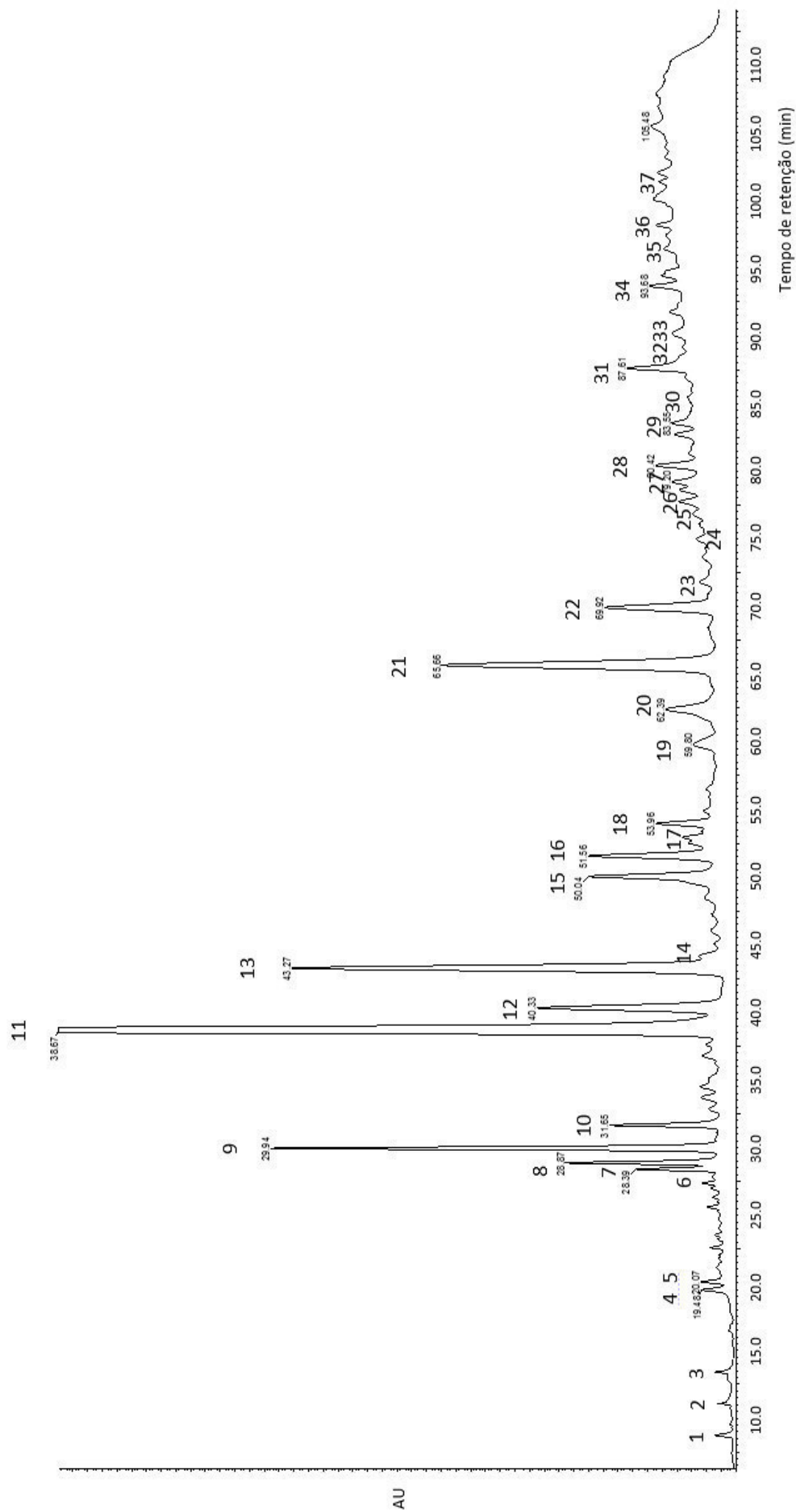
Martínez *et al.* (2012) em estudo com 35 plantas silvestres da Galícia, entre as quais a *Pterospartum tridentatum* subsp. *tridentatum*, reportaram teores de fenóis totais entre 282 e 292 mg equiv. ácido gálico/g m.s. para as flores e folhas respetivamente. Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos neste estudo para a parte aérea na época da floração em que se obteve, em média dos 3 anos, 297 mg equiv. ácido gálico/g m.s. quer para as plantas silvestres de origem Malcata quer de origem Gardunha.

A análise de outros estudos realizados com PAMs confirma o elevado teor de fenóis destas plantas. Utilizando o método Folin-Ciocalteu, Gallego *et al.* (2013) avaliaram três espécies aromáticas, relativamente ao teor de fenóis totais. Os extratos liofilizados de folha e caule de *Rosmarinus officinalis* L., de caule de *Thymus vulgaris* L. e de caule e flor de *Lavandula angustifolia* Mill. apresentaram teor de fenóis totais inferiores (variando entre 52 e 219 mg ácido gálico/g extrato liofilizado) aos obtidos neste estudo de carqueja.

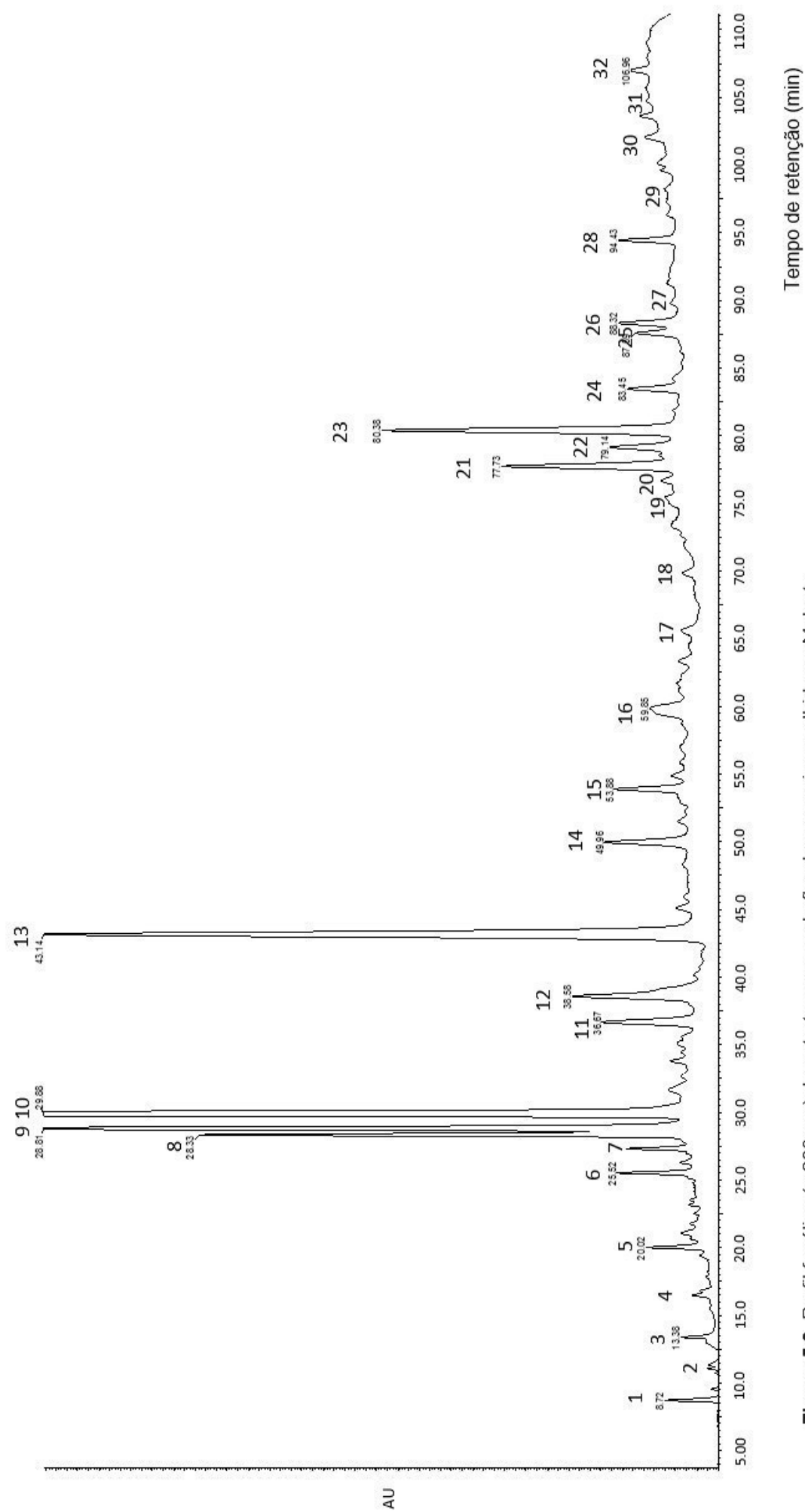
Nas Figuras 5.8 e 5.9 apresentam-se os cromatogramas exemplificativos do perfil fenólico dos extratos de caule de carqueja recolhida na serra da Gardunha na época de

floração e de flor recolhida na Malcata respetivamente. A análise das figuras evidencia ligeiras diferenças entre os dois perfis.

A identificação dos diferentes compostos foi efetuada por MS/MS. Foram identificados alguns dos compostos presentes nos extratos. No Anexo 8 apresentam-se, a título exemplificativo, compostos detetados nos caules recolhidos na serra da Gardunha na época da floração e das flores de plantas da serra da Malcata respetivamente.



**Figura 5.8.** Perfil fenólico (a 280 nm) do extrato aquoso de caules de carqueja recolhidos na serra da Gardunha na época de floração.



**Figura 5.9.** Perfil fenólico (a 280 nm) do extrato aquoso de flor de carqueja recolhida na Malcata.

Nas Tabelas 5.3 e 5.4 são apresentados os compostos identificados nos caules recolhidos na serra da Gardunha na época da floração e das flores de plantas da serra da Malcata respetivamente.

**Tabela 5.3.** Identificação de compostos no extrato de caules e folhas na época de floração da planta silvestre de origem Gardunha.

Pico	Tr (min)	[M <sup>-1</sup> ]	MS/MS (25eV)	MS/MS (40eV)	Identificação
2	11,55	191	111(90%);87(100%); 85(52%)	-	Ácido quinínico
3	13,30	191	111(100%);87(57%); 85(41%)	-	Ácido cítrico
9	29,94	465	345(100%);327(68%); 317(54%);167(85%)		Taxifolina-6-C-glucósido
13	43,27	479	359(100%);479(43%)	359(12%);166(100%);167(4%);194(45%);125(50)	Miricetina-6-C-glucósido
21	65,66	431/499	311(100%); 431(46%) /283(100%)	311(75%);283(100%)	Genisteína-8-C-glucósido
22	69,92	461	341(100%);326(32%); 298(49%)	298(100%)	5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido
25	77,09	609	300(100%);301(73%)	-	Rutina
26	77,37	463	300(100%);301(4%)	300(58%);271(100%);255(58%)	Quercetina- 3-O-glucósido (Isoquercetina)
27	79,57	463	300(100%);301(45%)	300(39%);271(100%);255(30%)	Quercetina 3-O-galactósido
28	80,42	431	268(100%);269(43%)	-	Genistina 1
31	87,61	431	268(100%);431(18%)	268(100%);267(39%); 239(17%)	Genistina 2
35	96,45	283	268(100%);283(98%); 240(66%)	-	Prunetina
37	100,84	299	281(100%)	-	7-O-metilrobol

**Tabela 5.4.** Identificação de compostos no extrato da flor da planta silvestre de origem Malcata.

Pico	Tr (min)	[M <sup>-1</sup> ]	MS/MS	Identificação
2	11,07	191	-	Ácido quinínico
3	13,38	191	-	Ácido cítrico
10	29,88	465	345(100%);327(66%);317(40%);167(91%)	Taxifolina-6-C-glucósido
13	43,14	479	359(100%);479(44%)	Miricetina-6-C-glucósido
17	66,27	431	311(100%);283	Genisteína-8-C-glucósido
18	70,33	461	341(100%);461(96%)	5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido
20	76,91	609	300(100%)/301	Rutina
21	77,73	463	300(100%);301(43%);463(11%)	Quercetina 3-O-glucoside (Isoquercetina)
22	79,14	463	300(100%);301(69%)	Quercetina 3-O-galactósido
23	80,38	431	268(80%);269(100%)	Genistina 1
25	87,80	431	268(100%)	Genistina 2
30	100,84	299	284(100%);283(49%);255(47%);281(21%)	7-O-metilrobol
31	105,00	445	283(100%)	Sissotrina

Os compostos identificados que apresentam áreas cromatográficas maiores quer para a flor de origem Malcata quer para a parte aérea das plantas silvestres provenientes da Gardunha na época de floração, correspondem aos compostos Taxifolina-6-C-glucósido e Miricetina-6-C-glucósido. Os restantes compostos identificados na flor de origem Malcata e



na parte aérea de plantas silvestres recolhidas à floração de origem Gardunha foram idênticos tendo diferido em dois compostos: a prunetina e a sissotrina.

No sentido de perceber eventuais diferenças entre extratos de diferentes origens e fases do ciclo vegetativo, bem como se os rebentos micropropagados apresentam o mesmo perfil fenólico, procedeu-se a uma análise comparativa dos respetivos perfis cromatográficos (Fig. 5.10). Com base nos perfis cromatográficos e atendendo apenas à presença ou ausência do composto, construiu-se a Tabela 5.5.

Numa primeira análise pode observar-se uma maior influência da época do ciclo vegetativo do que do local de colheita. Extratos da época de floração, quer dos caules quer das flores, apresentam um perfil fenólico mais complexo do que na época de repouso vegetativo.

**Tabela 5.5.** Compostos fenólicos identificados nos extratos das plantas silvestres e micropropagadas das origens Gardunha e Malcata.

Composto identificado	Amostras							
	GMic	MMic	GR	MR	GCF	MCF	GF	MF
Ácido quinínico	x	x	x	x	x	x	x	x
Ácido cítrico	x	x	x	-	x	x	x	x
Taxifolina-6-C-glucósido	-	-	x	x	x	x	x	x
Miricetina-6-C-glucósido	x	x	x	x	x	x	x	x
Genisteína-8-C-glucósido	x	x	x	x	x	x	x	x
5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido	x	x	x	x	x	x	x	x
Rutina	-	-	x	x	x	x	x	x
Quercetina 3-O-glucósido (Isoquercetina)	-	-	-	-	x	x	x	x
Quercetina 3-O-galactósido	x	x	-	x	x	-	-	x
Genistina 1	-	x	-	x	x	-	x	x
Genistina 2	x	x	x	x	x	x	-	x
Prunetina	-	-	-	-	x	-	-	-
7-O-metilrobol	-	x	x	-	x	-	-	x
Sissotrina	-	-	x	-	-	-	x	x

Legenda: GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado; GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores.

De realçar que a isoquercetina só surge na época da floração. O perfil fenólico identificado no presente trabalho está em concordância com os poucos estudos existentes para as plantas silvestres (Vitor *et al.*, 2004; Paulo *et al.*, 2008; Luís *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012), não havendo referência ao perfil fenólico de rebentos micropropagados. Recentemente Roriz *et al.* (2014) identificaram vinte e um flavonoides em *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., dos quais oito são comuns a este presente trabalho nomeadamente, Miricetina-6-C-glucósido; Quercetina 3-O-glucósido (Isoquercetina); Genistina; Genisteína-8-

C-glucósido; 5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-*O*-glucósido; Sissotrina (Biochanina A 7-*O*-glucósido ou 5-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona-7-*O*- $\beta$ -glucósido); Prunetina (7-*O*-metilgenisteína) e 7-*O*-metilnorobol.

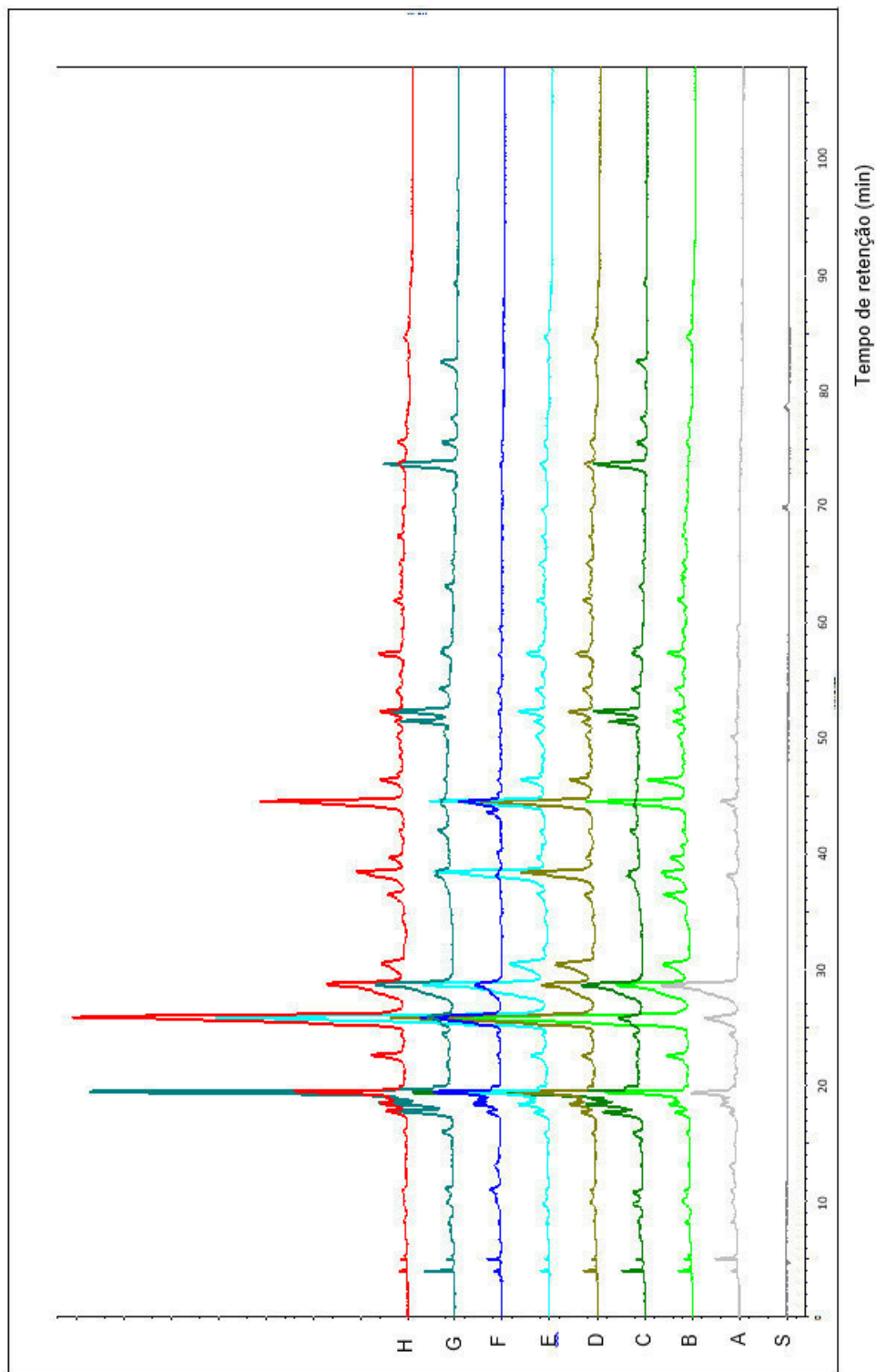


Figura 5.10. Comparação de perfis cromatográficos (a 280 nm) dos extratos de plantas silvestres das duas origens em estudo nos diferentes estádios vegetativos e das plantas micropropagadas.  
Legenda: A – GMic; B – GCF; C – GF; D – GR; E – MR; F – Mmic; G – MF; H – MCF; S – Solvente (EtOH:H<sub>2</sub>O).

A pouca implicação do local de recolha no perfil fenólico é corroborada quando comparando os resultados do presente estudo com os de Paulo *et al.* (2008). De salientar que os referidos autores estudaram plantas da zona de Cinfães, região mais a norte de Portugal do que a zona de recolha para o presente trabalho, logo com condições edafo-climáticas diferentes relativamente às condições em que se desenvolveram as plantas deste estudo (referidas no capítulo 3).

Os perfis fenólicos do material micropopagado são muito semelhantes aos extratos das plantas silvestres na época de repouso independentemente da origem. No entanto, a Taxifolina-6-C-glucósido, um dos mais representativos nas plantas silvestres, bem como a rutina e a isoquercetina, não estão presentes nos extratos dos rebentos micropopagados.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem permitir alterações no perfil químico das plantas através da manipulação do ambiente físico e químico, ou seja, por alteração das condições de cultivo *in vitro*. Por exemplo, no caso da espécie *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales, Costa *et al.* (2012b) concluíram que as condições *in vitro* utilizadas foram favoráveis à acumulação de elevados teores de ácido rosmarínico, sugerindo que esta espécie micropopagada poderia ser usada como uma fonte de compostos antioxidantes naturais, ajudando deste modo a preservar as populações naturais.

### **5.4.3. Caracterização da componente glucídica**

#### **5.4.3.1. Peso molecular médio**

A análise da componente glucídica de extratos de amostras provenientes das serras da Gardunha e da Malcata nas épocas do repouso vegetativo e na floração permitiu observar que todas as amostras apresentam duas frações de pesos moleculares bastante distintos. Na Tabela 5.6 apresentam-se os pesos moleculares médios em peso ( $M_w$ ) e o índice de polidispersão (PD).

**Tabela 5.6.** Peso molecular médio em peso ( $M_w$ ) e polidispersão ( $PD = M_w/M_n$ ) das folhas e caules na época de repouso e na época de floração para as plantas silvestres de origem Gardunha e Malcata.

Amostra	$M_w$	PD
GR	$1,0 \times 10^6$	1,6
	$1,7 \times 10^4$	
GCF	$1,2 \times 10^6$	1,5
	$0,3 \times 10^4$	
MR	$0,5 \times 10^6$	1,3
	$1,5 \times 10^4$	
MCF	$0,6 \times 10^6$	2,0
	$0,7 \times 10^4$	

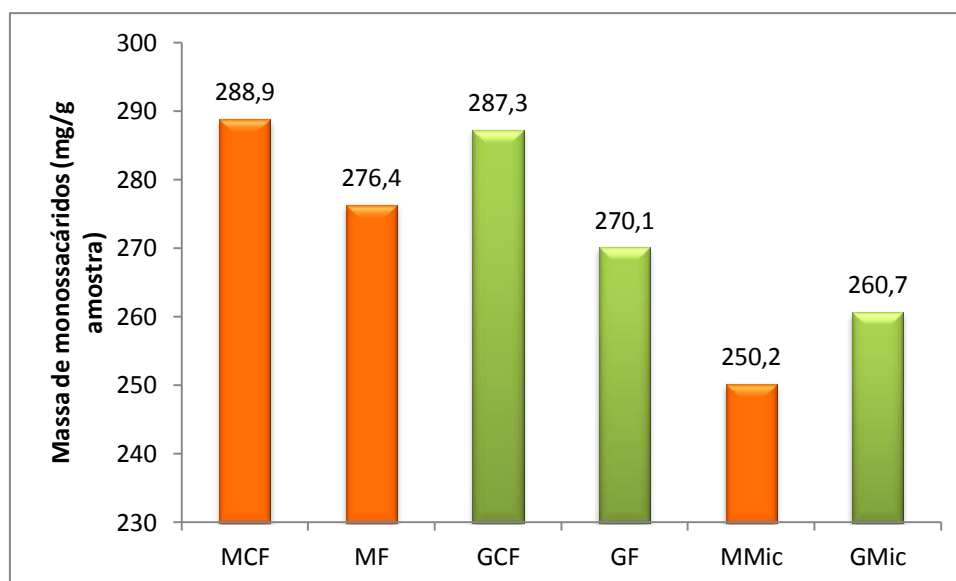
Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MR - Malcata, repouso vegetativo; MCF - Malcata, caules à floração.

Para cada local de recolha, os caules na época da floração apresentam pesos moleculares superiores, mas esta diferença não é relevante dado o erro associado à metodologia (10%).

De igual modo ao que foi observado para o teor de fenóis, também no que respeita ao peso molecular médio da componente glucídica o efeito do local de recolha e fase do ciclo vegetativo não é evidente.

#### 5.4.3.2. Composição em monossacáridos

Na Figura 5.11 apresenta-se a massa total de monossacáridos dos extratos de plantas silvestres da Malcata e da Gardunha em diferentes fases do ciclo vegetativo bem como de plantas micropropagadas. Como se pode observar o teor total de monossacáridos dos extratos de plantas silvestres é mais dependente da parte da planta do que do local de recolha. Verificam-se teores ligeiramente mais elevados nos extractos dos caules à floração (entre 287 e 290 mg/g) relativamente aos da flor (entre 270 e 276 mg/g). O material vegetal micropropagado apresenta valores inferiores o que poderá ser explicado pela baixa taxa fotossintética dos rebentos.



**Figura 5.11.** Massa total de monossacáridos de extratos de plantas silvestres da Malcata e da Gardunha em diferentes fases do ciclo vegetativo bem como de plantas micropropagadas. Legenda: MCF - Malcata, caules à floração; MF - Malcata, flores; GCF - Gardunha, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado.

Na Tabela 5.7 estão representadas as massas de monossacáridos ramnose (Ram), fucose (Fuc), arabinose (Ara), xilose (Xil), manose (Man), galactose (Gal), glucose (Glc) e ácidos urônicos, em mg/g de amostra e na Tabela 5.8. estão apresentadas as respectivas percentagens molares. Como se pode observar nos extratos de carqueja a glucose e os ácidos urônicos são os componentes maioritários. Esses componentes são também aqueles cujos teores são mais diferentes entre as plantas silvestres e as micropropagadas. Enquanto que nas plantas silvestres a glucose é o açúcar predominante, independentemente do local e época de recolha, nas micropropagadas é precisamente o contrário e os ácidos urônicos são os principais componentes.

**Tabela 5.7.** Massa de monossacarídeos em mg/g de amostra (média de duas réplicas).

Fração	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Ácidos Urónicos
MCF	2,8	0,0	7,0	1,9	6,0	6,9	213,2	51,1
MF	1,9	0,0	6,1	3,1	15,9	16,2	172,0	61,1
MR	4,8	0,0	5,6	1,1	1,5	9,5	192,6	61,8
GCF	3,5	0,0	8,2	1,9	4,7	7,5	208,0	53,6
GF	1,8	0,0	5,8	2,7	17,1	10,9	162,0	69,8
MMic	10,8	0,0	5,4	1,9	1,6	15,8	79,3	135,4
GMic	7,5	0,0	6,7	1,8	5,0	16,6	92,2	131,0

Legenda: MCF - Malcata, caules à floração; MF - Malcata, flores; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado.

**Tabela 5.8.** Percentagens molares dos monossacarídeos (média de duas réplicas).

Fração	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc	Ácid. Urón.
MCF	1,1	0,0	2,9	0,8	2,1	2,4	74,1	16,6
MF	0,8	0,0	2,7	1,4	5,8	5,9	62,8	20,7
MR	1,9	0,0	2,4	0,5	0,6	3,5	70,2	21,0
GCF	1,3	0,0	3,4	0,8	1,7	2,6	72,7	17,4
GF	0,7	0,0	2,6	1,2	6,4	4,1	60,7	24,3
MMic	4,9	0,0	2,7	0,9	0,7	6,5	32,8	51,5
GMic	3,2	0,0	3,2	0,8	2,0	6,5	36,4	47,9

Legenda: MCF - Malcata, caules à floração; MF - Malcata, flores; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado.

Pode ainda verificar-se que o material vegetal micropropagado, quer de origem Gardunha quer proveniente da Malcata, apresenta percentagens molares de ramnose e ácidos urónicos superiores às plantas silvestres. Assim, a análise glucídica evidencia que o material vegetal micropropagado apresenta uma composição que pode suscitar mais interesse do que a das plantas silvestres. Segundo Kumar & Mody (2009) a fucose, a ramnose e os ácidos urónicos são considerados açúcares raros que apresentam propriedades interessantes, tais como atividades anti-inflamatória, antioxidante ou antiviral, com aplicação na indústria farmacêutica e cosmética, por exemplo. Alguns deles podem ser produzidos por enzimas especializadas ou reações utilizando a glicose como precursor principal (Granstrom *et al.*, 2004 Beerens *et al.*, 2012), mas são processos bastante dispendiosos. A sua escassez torna estes açúcares altamente valiosos. Consequentemente, a presença destes compostos em plantas micropropagadas consiste num fator adicional que justifica o investimento na sua produção.

No que respeita à componente glucídica da espécie em estudo, na bibliografia consultada foi possível encontrar dois trabalhos, Pinela *et al.* (2011) e Roriz (2014). No trabalho de Roriz (2014) com três espécies vegetais, a carqueja apresentou os níveis mais elevados de açúcares totais (133,70 mg/g) relativamente às espécies *Gomphrena globosa* L. e *Cymbopogon citratos* (DC) Stapf. Os teores de açúcares totais obtidos no estudo de Pinela *et al.* (2011) foram inferiores ao estudo de Roriz e ao presente estudo, já que o teor obtido foi de 52,7 e 49,6 mg/g m.s. para a carqueja liofilizada e seca à sombra, respetivamente. No que respeita aos teores de glucose, no presente trabalho, quer para as plantas silvestres quer para rebentos micropropagados, os valores são sempre superiores aos obtidos por Roriz (2014) (26,70 mg/g m.s.) e Pinela *et al.* (2011) (11,9 mg/g m.s. para material vegetal liofilizado e 8,4 mg/g m.s. para secagem à sombra).

Estas diferenças podem ser devidas a diferentes condições de desenvolvimento das plantas, como por exemplo a diferentes condições edafo-climáticas. No trabalho de Pinela *et al.* (2011) as plantas silvestres foram obtidas em Trás-os-Montes e no trabalho de Roriz as

plantas foram provenientes da serra de Montemuro. As diferenças de valores também podem ser devidas ao processo de secagem utilizado em cada um dos trabalhos. Pinela *et al.* (2011) procedeu a liofilização após colheita das plantas e também realizou o processo tradicional de secagem à sombra, em local seco e à temperatura ambiente numa sala durante 30 dias e Roriz (2014) procedeu à secagem das plantas apenas durante cinco dias, à sombra, controlando a temperatura ambiente, humidade relativa bem como a taxa de fluxo de ar.

#### 5.4.4. Caracterização da componente mineral

Na Tabela 5.9 apresenta-se a caracterização da componente mineral de extratos liofilizados quer das plantas silvestres quer do material vegetal micropropagado. Os teores de fósforo, potássio, cálcio e magnésio são expressos em percentagem mássica. O ferro, cobre, sódio, zinco, manganésio, crómio, cádmio, níquel e chumbo são expressos em mg/Kg.

Pela tabela 5.9 pode-se verificar que o extrato do material micropropagado apresenta teores superiores de fósforo, potássio, ferro, cobre, sódio e zinco do que o extrato das plantas silvestres. Enquanto este apresenta teores superiores de cálcio, magnésio e manganês, sendo que o cobre é inferior ao limite de quantificação. Os teores de crómio, cádmio, níquel e chumbo nos extratos de material micropropagado são inferiores ao limite de quantificação pelo que se pode afirmar que os extratos não apresentam contaminação destes elementos. Os extratos de plantas silvestres embora em teores relativamente baixos, apresentam níveis quantificáveis de níquel e chumbo.

**Tabela 5.9.** Composição mineral de extratos de carqueja micropropagada e silvestre.

<b>Extratos</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Na</b>	<b>Zn</b>	<b>Mn</b>	<b>Cr</b>	<b>Cd</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>
EMic	0,8	7,3	0,4	0,1	38,4	0,1	2146,0	113,0	349,0	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
EPS	0,1	2,5	0,5	0,3	28,6	< LQ	308,0	20,9	441,0	< LQ	< LQ	1,9	2,4

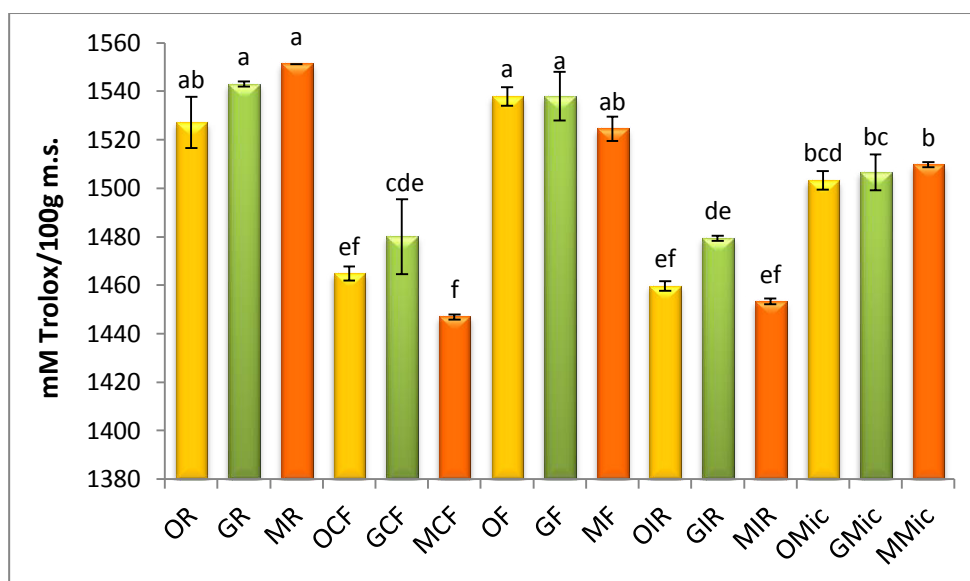
Legenda: EMic - extratos liofilizados de carqueja em micropropagação; EPS - extratos liofilizados de plantas silvestres; LQ – limite de quantificação.

Uma análise comparativa com os resultados obtidos no capítulo 3 (c.f. 3.3) permite observar que os extratos apresentam maiores concentrações em minerais como o potássio, o sódio e o manganês relativamente ao material vegetal que lhes deu origem. Este resultado pode ser explicado pela solubilidade em água destes elementos. Contrariamente o ferro, elemento menos solúvel, diminuiu em ambos os extratos.

## 5.4.5. Atividade antioxidante

### 5.4.5.1. Método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos aquosos para os diferentes locais, em diferentes fases do ciclo vegetativo são apresentados nas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 (1º, 2º e 3º ano respectivamente). Todos os extratos aquosos independentemente do local de recolha e fase do ciclo vegetativo da planta apresentam atividade antioxidante. Os valores significativamente mais elevados de atividade antioxidante nas plantas silvestres foram observados no repouso vegetativo e na época de floração (parte floral) para os três locais em estudo. No caso do material vegetal micropropagado não existem diferenças significativas, no que respeita o local de origem, evidenciando uma atividade antioxidante elevada, semelhante aos extratos das plantas silvestres no repouso. De referir que este resultado não está em concordância com o teor de fenóis totais (conforme 5.4.2), indicando que a atividade antioxidante não estará relacionada exclusivamente com o teor de compostos fenólicos.



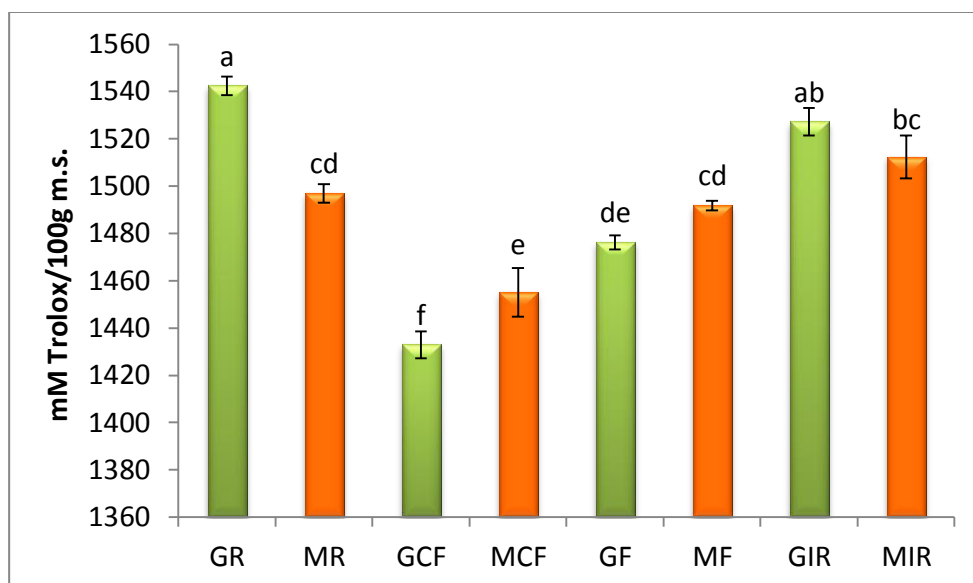
**Figura 5.12.** Atividade antioxidante pelo método DPPH (mM Trolox/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado.

Legenda: OR - Orvalho, repouso vegetativo; GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; OCF - Orvalho, caules à floração; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; OF - Orvalho, flores; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; OIR - Orvalho, início do repouso; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso; OMic - Orvalho, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



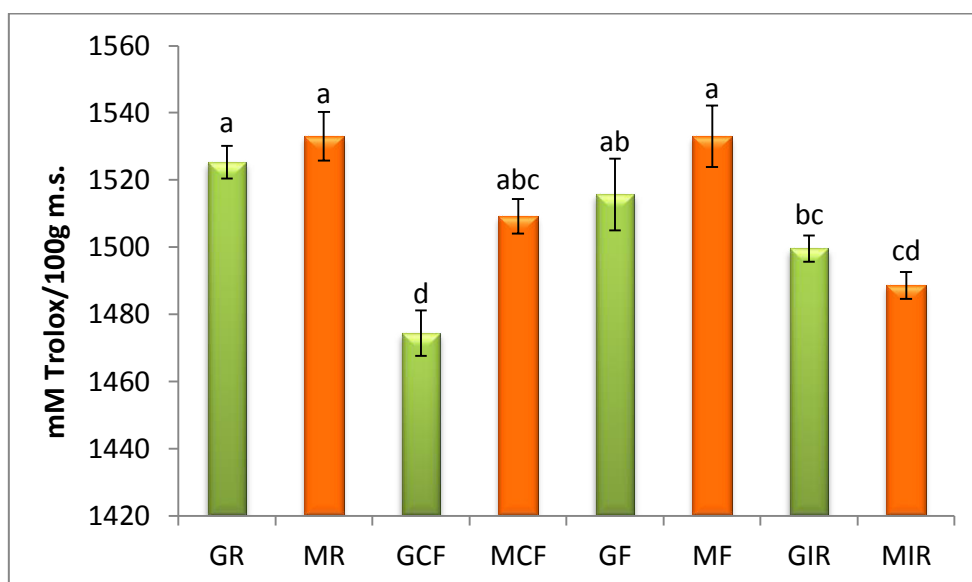
No 2º e 3º ano de estudo (Fig. 5.13 e 5.14, respetivamente) confirmam-se os valores superiores de atividade antioxidante na época do repouso e nas flores.



**Figura 5.13.** Atividade antioxidante pelo método DPPH (mM Trolox/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º ano de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.14.** Atividade antioxidante pelo método DPPH (mM Trolox/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Segundo Vítor *et al.* (2004) a atividade antioxidante da carqueja é devida ao elevado teor de flavonoides desta espécie.

Os resultados do presente estudo confirmam o descrito por outros autores (Luís *et al.*, 2009 e Luís *et al.*, 2011). Luís *et al.* (2009) em estudos com três espécies, *P. tridentatum* (L.) Willk., *Cytisus scoparius* (L.) Link e três espécies do género *Erica* concluíram que a atividade antioxidante da *P. tridentatum* (L.) Willk. é superior em extratos aquosos do que em extratos etanólicos. Luís *et al.* (2011) estudaram a atividade antioxidante em extratos metanólicos de alguns arbustos provenientes da Serra da Estrela (*Echinopartum ibericum* Rivas Mart., Sánchez-Mata & Sancho, *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., *Juniperus communis* L., *Ruscus aculeatus* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Hakea sericea* Schrader, *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet, *Crataegus monogyna* Jacq., *Erica arborea* L. e *Ipomoea acuminata* (Vahl) Roemer & Schultes) e utilizando o método DPPH verificaram que a carqueja possui atividade antioxidante moderada nas folhas e caules e uma intensa atividade antioxidante nas flores.

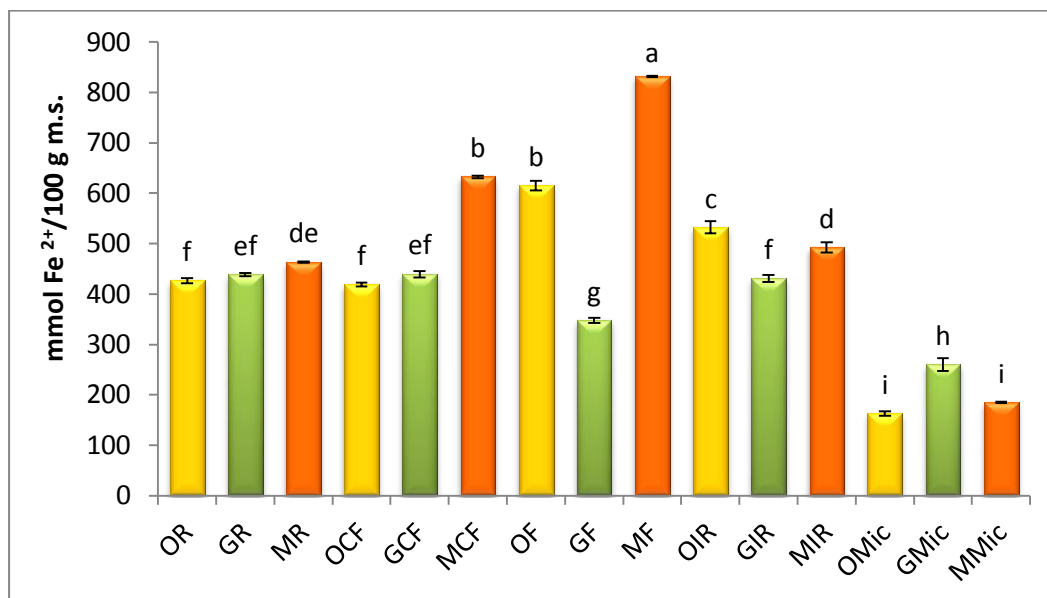
A elevada atividade antioxidante de extratos de carqueja foi também reportada por Ferreira *et al.* (2012). De salientar que os referidos autores concluíram que a atividade antioxidante de carqueja é superior à de *Rosmarinus officinalis* L., considerada uma planta aromática e medicinal com elevada atividade antioxidante (Cheung *et al.*, 2007).

Gallego *et al.* (2013) no estudo com três espécies aromáticas, *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Lavandula angustifolia* Mill. avaliaram a atividade antioxidante pelo método de DPPH (mM Trolox/g extrato liofilizado) e os valores obtidos são muito inferiores (entre 20 e 160 mM Trolox/100 g de extrato liofilizado) aos valores obtidos neste estudo de carqueja.

#### 5.4.5.2. Método FRAP

Um dos problemas na avaliação da atividade antioxidante é que esta atividade pode ser variável e depender do método utilizado. Sabe-se que o mecanismo antioxidante em matrizes biológicas é complexo e vários fatores podem intervir no processo (Çam *et al.*, 2009). Dada essa complexidade, apenas um método para determinar a atividade antioxidante de extratos pode não ser suficiente para retirar conclusões. Com base em estudos em que foi demonstrado que a atividade antioxidante de plantas está estreitamente associada ao seu poder redutor (Wu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009), foi também avaliado neste trabalho o poder redutor de extratos de carqueja silvestre e micropropagadas, pelo método FRAP. Este método é simples e rápido e mede a capacidade de redução dos antioxidantes e da manutenção do estado redox em células (Huang *et al.*, 2005).

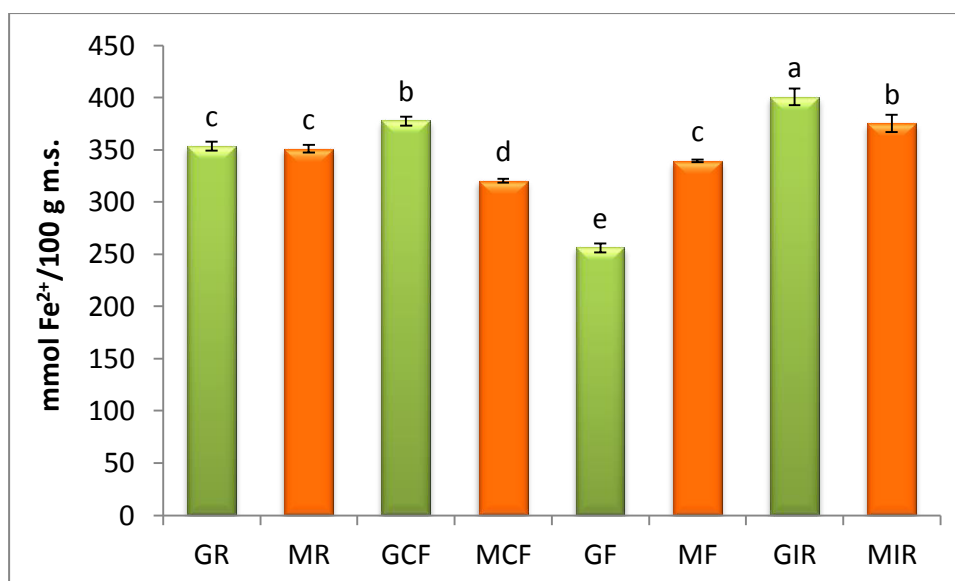
Os valores apresentados em mmol Fe<sup>2+</sup>/100g m.s., referentes ao método FRAP para os diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, encontram-se nas Figuras 5.15 (para o 1º ano de avaliação), 5.16 (para o 2º ano) e 5.17 para o 3º ano).



**Figura 5.15.** Atividade antioxidante pelo método FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup>/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos diferentes locais, ao longo do ciclo vegetativo, no 1º ano avaliado e material vegetal micropropagado.

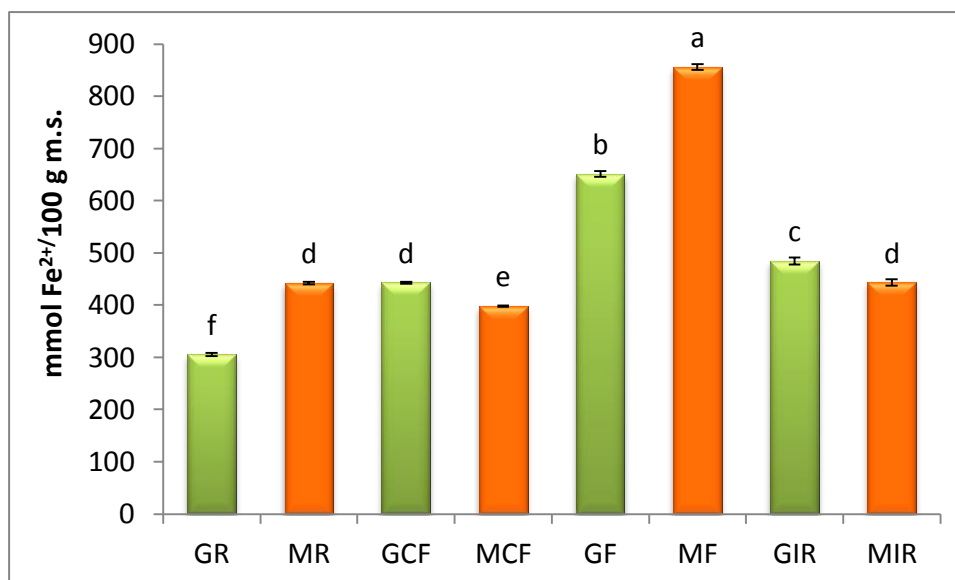
Legenda: OR - Orvalho, repouso vegetativo; GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; OCF - Orvalho, caules à floração; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; OF - Orvalho, flores; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; OIR - Orvalho, início do repouso; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso; OMic - Orvalho, material vegetal micropropagado; GMic - Gardunha, material vegetal micropropagado; MMic - Malcata, material vegetal micropropagado.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes (p<0,05).



**Figura 5.16.** Atividade antioxidante pelo método FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup>/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 2º de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.  
 Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.17.** Atividade antioxidante pelo método FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup>/100g m.s.) para o material vegetal recolhido nos dois locais, ao longo do ciclo vegetativo no 3º ano de avaliação.

Legenda: GR - Gardunha, repouso vegetativo; MR - Malcata, repouso vegetativo; GCF - Gardunha, caules à floração; MCF - Malcata, caules à floração; GF - Gardunha, flores; MF - Malcata, flores; GIR - Gardunha, início do repouso; MIR - Malcata, início do repouso.

Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Analisando os resultados obtidos pelo método FRAP, em qualquer ano de avaliação, podemos verificar que independentemente do local de colheita e da época do ciclo vegetativo, quer nas plantas silvestres quer nas micropropagadas, todos os extratos apresentam capacidade redutora. Esta capacidade redutora foi mais evidente na flor para o local de colheita Malcata quer no 1º ano quer no 3º ano de avaliação. Relativamente ao material vegetal micropropagado verifica-se que apesar de apresentarem atividade redutora os valores obtidos são significativamente inferiores às plantas silvestres.

Os resultados mostram ainda que a capacidade redutora não é consistente com a capacidade de captação de radicais observada pelo método de DPPH, já que a atividade antioxidante mais elevada pelo método DPPH é obtida na época do repouso e pelo método FRAP a atividade antioxidante é mais elevada na flor para plantas de origem Malcata, 832,0 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g m.s. (1ºano) e 855,8 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g m.s. (3º ano) e no início do repouso para as plantas de origem Gardunha, 400,6 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g m.s. (para o 2º ano).

No trabalho de Martínez *et al.* (2012) em *Pterospartum tridentatum* subsp. *tridentatum* e *Armeria transmontana* (Samp.) G.H.M. Lawrence também não obtiveram correlação entre as duas metodologias utilizadas, obtendo valores elevados no método

FRAP e relativamente baixos pelo método DPPH. O modo de ação dos antioxidantes é complexo e pode estar dependente de muitas variáveis (Craft *et al.*, 2012). Porém, os trabalhos de Clarke *et al.* (2013) demonstram uma correlação elevada e significativa entre os dois métodos (FRAP e DPPH), indicando um elevado grau de redundância se utilizados em paralelo. Estes autores são de opinião que se trata de um desperdício de extratos de plantas potencialmente valiosos sem fornecimento de informação adicional, acrescentando ainda que o método FRAP pode apresentar fragilidades relativas à interferência de cor e taxas variáveis de ponto de reação, sendo o teste DPPH preferido na seleção preliminar dos extratos de plantas, no caso deste trabalho. No entanto, muitos autores utilizam tanto o DPPH como o FRAP na sua atividade, no pressuposto de que a combinação dos dados fornece uma melhor descrição da atividade antioxidante do que o obtido a partir de um único teste.

Analisando os 3 anos em estudo verifica-se que o material vegetal micropropagado apresenta menor capacidade redutora relativamente às plantas silvestres, independentemente da época do ciclo vegetativo e do local de recolha das mesmas. Também foi testada a atividade antioxidante de extratos de plantas silvestres e de culturas *in vitro* de *Thymus lotocephalus* G. López & R. Morales, concluindo-se que os extratos de plantas silvestres são mais ativos do que os de cultura *in vitro*, no que se refere à capacidade quelante do  $Fe^{2+}$  (Costa *et al.*, 2012b).

A maior atividade antioxidante dos extratos de plantas silvestres, relativamente a extratos de culturas *in vitro*, pode prender-se com o facto de os metabolitos secundários, responsáveis por este tipo de atividade, serem sintetizados preferencialmente em condições de stress. Por este motivo, se o objetivo for a obtenção de compostos com atividade antioxidante, as condições *in vitro* deverão ser otimizadas de acordo com a espécie em causa. Em geral, a cultura *in vitro* é realizada em pequenos contentores, mais ou menos estanques, onde a atmosfera é caracterizada por elevada humidade relativa, concentração elevada de etileno e concentração de  $CO_2$  variável. Por outro lado, o material vegetal é mantido a uma temperatura de crescimento praticamente constante durante o período de dia e de noite, sujeito a baixa irradiância e fotoperíodo específico. Estas condições podem ou não ser de stress, dependendo da espécie em causa e das taxas de biossíntese pretendidas.

As plantas que produzem compostos bioativos são por vezes obtidas por colheita indiscriminada no seu ambiente natural e a quantidade de princípios ativos de interesse pode ser limitada e ocorrer apenas em alguns órgãos ou células específicas e em determinadas épocas do ano. Assim, a produção de metabolitos secundários recorrendo à cultura *in vitro* tem vindo a ser estudada de forma a ser vantajosa tanto do ponto de vista económico como ecológico.

Segundo a bibliografia consultada existem estudos insuficientes sob a segurança destes antioxidantes naturais. No caso da carqueja, Ferreira *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade de extratos aquosos da sua flor e concluíram que estas podem ser empregues quer para fins alimentares quer na medicina tradicional, sendo usadas no tratamento de doenças associadas ao stress oxidativo, tendo considerado esta prática como segura e inofensiva (pelo menos para terapias de curta duração). No entanto, no referido trabalho não foi excluída a toxicidade crónica com a utilização de longo prazo que deverá ser acautelada.

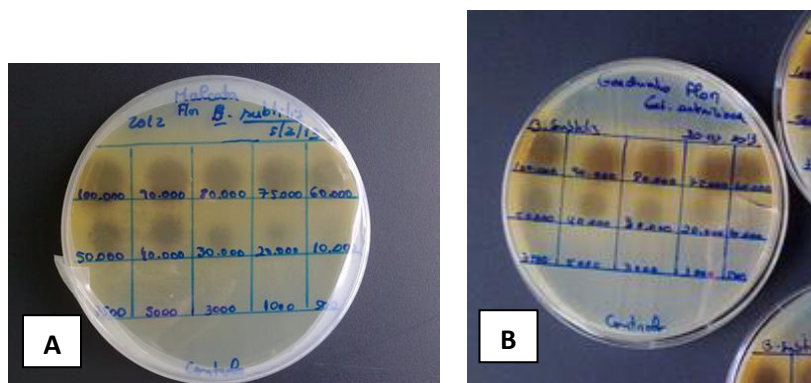
O facto de se tratar de produtos naturais não implica que não possam exercer efeitos adversos. Concentrações elevadas de antioxidantes, naturais ou sintéticos podem ser ineficientes e até mesmo indesejáveis já que os radicais livres podem não ser completamente eliminados e apenas a sua concentração pode ser reduzida. A toxicidade destes antioxidantes naturais deve ser acautelada já que em grandes quantidades os fenóis reagem com as proteínas e a sua atividade antioxidante diminui (Rohn & Rawel, 2004).

#### **5.4.6. Atividade antimicrobiana**

Como referido anteriormente (conforme 5.3.7) a atividade antimicrobiana foi testada por três métodos. O método 1 (meio de cultura adequado ao crescimento do microrganismo com extrato de carqueja incorporado, em diferentes concentrações, dispensado nesse meio 10 µL de cada microrganismo a testar) foi o que se revelou mais eficiente.

A Figura 5.18 ilustra o facto de a esterilização do extrato não afetar a capacidade do mesmo inibir o desenvolvimento do microrganismo, já que na Figura 5.18 (A) o extrato foi apenas hidratado com água destilada esterilizada e na Figura 5.18 (B) o extrato foi esterilizado, e em ambos houve inibição do crescimento do microrganismo quando aplicada uma concentração de extrato acima de 30000 ppm. Os halos de inibição apresentam um diâmetro médio de 90 a 100 mm.

A Tabela 5.10 apresenta as concentrações do extrato em que se verificou inibição do microrganismo em estudo, para cada local de recolha e parte da planta utilizada. Esta inibição foi verificada com o método 1, em que foi realizado meio de cultura adequado ao crescimento do microrganismo com extrato de carqueja incorporado, em diferentes concentrações, sendo dispensado nesse meio 10 µL de cada microrganismo a testar.



**Figura 5.18.** Halos de inibição obtidos para *Bacillus subtilis* na presença do extrato de flor da Malcata (A) e Gardunha (B).

A análise dos resultados permite observar que os extratos de carqueja apresentam atividade antimicrobiana. No caso do *Bacillus subtilis* a referida atividade foi independente do local e época de recolha da planta. A concentração mínima inibitória variou de 20 000 a 60 000 ppm.

**Tabela 5.10.** Concentrações do extrato de carqueja, das origens Malcata e Gardunha em que se verifica inibição do microrganismo utilizando o método 1.

Microrganismo	Concentração do extrato (ppm) ( $\times 10^3$ )	Local de recolha	Parte da planta
<i>Bacillus subtilis</i>	40 a 100	Malcata	Flor
	30 a 100	Gardunha	Flor
	40 a 100	Malcata	Repouso
	20 a 100	Gardunha	Repouso
	60 a 100	Malcata	Início Repouso
	40 a 100	Gardunha	Início Repouso
	40 a 100	Malcata	Caules à floração
	30 a 100	Gardunha	Caules à floração
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 a 100	Malcata	Flor
<i>Staphylococcus aureus</i>	60 a 100	Malcata	Flor

Já no que respeita aos outros microrganismos estudados, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, só os extratos da flor de origem Malcata revelaram atividade antimicrobiana. Este facto poderá estar relacionado com a diferente composição fenólica na época da floração, nomeadamente com a presença de isoquercetina.

A baixa atividade de extratos de plantas relativamente a *Staphylococcus aureus*, concentração mínima inibitória de 60 000 ppm, foi referida por outros autores. Estudos com extratos metanólicos e óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. mostraram baixa atividade relativamente a *Staphylococcus aureus* (Celik et al., 2007). Já Falleh et al. (2008) obtiveram inibição de *Staphylococcus aureus* com extratos de folha de *Cynara cardunculus* L.. Vale & Orlanda (2011) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos etanólicos a 0.09 mg/mL da parte aérea de *Euphorbia tirucalli* L., fresco e seco e verificaram

que os extratos da planta seca não possuíam atividade antibacteriana mas os extratos da planta fresca possuíam atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Citrobacter freundii* enquanto que a *Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa* eram menos susceptíveis.

Com extratos de carqueja no presente estudo, não se verificou inibição de crescimento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Cândida albicans*, *Pichia fermentans*, *Monilinia fructigena* e *Monilinia laxa* pelos três métodos utilizados. A atividade antimicrobiana relativamente a estes microrganismos poderá estar relacionada com compostos mais voláteis, mais relacionados com o aroma e não presentes em extratos aquosos.

## 5.5. Considerações intercalares

O local de recolha e a fase do ciclo vegetativo não influenciam o rendimento de extração, verificando-se que o material vegetal micropropagado apresenta rendimento de extração superior.

A glucose é o açúcar predominante nas silvestres enquanto que a ramnose e os ácidos urónicos, considerados açúcares raros, são os principais açúcares das micropropagadas.

Os extratos das plantas silvestres e do material vegetal micropropagado apresentam elevada atividade antioxidante. Os extratos do material vegetal micropropagado possuem um teor de fenólicos inferior ao das plantas silvestres mas o perfil fenólico é semelhante ao das plantas silvestres no repouso vegetativo.

Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Perante o objetivo da obtenção de extratos ricos em compostos com atividade antioxidante e/ou antimicrobiana, minerais e açúcares raros a carqueja pode constituir uma boa matéria-prima.

A micropropagação permite obter extratos, semelhantes aos das plantas silvestres, com a vantagem de não delapidar os patrimónios naturais.



## 5.6. Referências bibliográficas

- Adongo, J.O., Omolo, J.O., Njue, A.W. & Matofari, J.W. (2012). Antimicrobial activity of the root extracts of *Tylosema fassoglensis* Schweinf. Torre & Hillc (Caesalpiniaceae), *Science Journal of Microbiology*, 2012, 1-3.
- Albano, S.M. & Miguel, M.G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33, 338-343.
- Alizadeh-Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R. & Safaie, N. (2010). Essential oils inhibit mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*. *European Journal of Horticultural Science*, 75, 278-282.
- Barreira, J.C. (2010). *Caracterização biológica, química e nutricional de Castanea sativa* Miller e *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb. Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia. Tese de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas - Nutrição e Química dos Alimentos. 225 p.
- Barroso, M.F., Noronha, J.P., Delerue-Matos, C. & Oliveira, M.B. (2011). Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5062-5072.
- Beerens, K., Desmet, T. & Soetaert, W. (2012). Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 823-834.
- Bernardo-Gil, M.G., Ribeiro, M.A. & Esquível, M.M. (2002). Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*, 14-21.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Schettino, L. & Vasapollo, G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 64, 192-197.
- Böhm, V. & Schlesier, K. (2004). *Methods to evaluate the antioxidant activity*. In Production Practices and Quality Assessment of Food Crops. Dris, R. & Mohan Jain, S. (Eds). Springer. Netherlands. p. 55-71.
- Bureau, S., Renard, C.M.G., Reich, M., Ginies, C. & Audergon, J.M. (2009). Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *Food Science and Technology*, 42, 372-377.
- Bursal, E. & Gülçin, İ. (2011). Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44, 1482-1489.
- Çam M, Hışıl Y, Durmaz G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112, 721-726.
- Ćavar, S. & Maksimović, M. (2012). Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food Control*, 23, 263-267.
- Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T. & Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 553-559.
- Chand-Goyal, T., & Spotts, R.A. (1996). Postharvest biological control of blue mould of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control*, 6, 253-259.
- Chemat, F. & Cravotto, G. (2012). *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. Springer. 250 p. ISBN 978-1-4614-4830-3 (e-Book).
- Cheung, C.K., Wyman, J.F. & Halcon, L.L. (2007). Use of complementary and alternative therapies in community-dwelling older adults. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13, 997-1006.
- Clarke, G., Ting, K., Wiart, C. & Fry, J. (2013). High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates

- redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*, 2(1), 1-10.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44, 2047-2053.
- Costa, P., Grosso, C., Gonçalves, S., Andrade, P., Valentão, P., Bernardo-Gil, M. & Romano, A. (2012a). Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chemistry*, 135, 112-121.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P.B., Coelho, N. & Romano, A. (2012b). *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135, 1253-1260.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P.B. & Romano, A. (2013). Accumulation of phenolic compounds in *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 69-74.
- Couto, L. & Cavaleiro, C. (2013). 4ª Edição do *Curso de Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais – Da Origem ao Processamento, da Qualidade às Aplicações em Saúde*. Módulo: Tecnologia de Preparação de Plantas Aromáticas e Óleos essenciais. Tema: Extratos Aromáticos. Universidade de Coimbra, Ensino à distância.
- Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R. & Pegg, R.B. (2012). Phenolbased antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 148-173.
- Cunha, A.P., Cavaleiro, C. & Salgueiro, L. (2009). *Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais In Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian (Ed.) Lisboa. p. 339-401.
- Dimitrios, B. (2006). Review: Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*. Cambridge, 17(9), 505-512.
- Du, H., Wu, J., Li, H., Zhong, P.-X., Xu, Y.-J., Li, C.-H., Ji, K.-X. & Wang, L.-S. (2013). Polyphenols and triterpenes from *Chaenomeles* fruits: chemical analysis and antioxidant activities assessment. *Food Chemistry*, 141, 4260-4268.
- Duarte-Almeida, J.M., José, R., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 26(2), 446-452.
- Ebrahimabadi, A.H., Mazoochi, A., Kashi, F.J., Djafari-Bidgoli, Z. & Batooli, H. (2010). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1371-1376.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- Ferreira, F.M., Dinis, L.T., Azedo, P., Galhano, C.I.C., Simões, A., Cardoso, S.M., Domingues, M.R., Pereira, O.R., Palmeira, C.M. & Peixoto, F. (2012). Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts. *CyTA – Journal of Food*, 10(2), 92-102.
- Gallego, M.G., Gordon, M.H., Segovia, F.J., Skowrya, M. & Almajano, M.P. (2013). Antioxidant properties of three aromatic Hhrbs (Rosemary, Thyme and Lavender) in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90, 1559-1568.
- Gil, D.M.A., Falé, P.L.V., Serralheiro, M.L.M. & Rebelo, M.J.F. (2011). Herbal infusions bioelectrochemical polyphenolic index: Green tea - The gallic acid interference. *Food Chemistry*, 129, 1537-1543.
- Gökmen, V., Serpen, A. & Fogliano, V. (2009). Direct measurement of total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in food Science & Technology*, 20, 278-288.

- Golmakani, M-T. & Rezaei, K. (2008). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 448-454.
- Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P. & Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43, 465-471.
- Granström, T.B., Takata, G., Tokuda, M. & Izumori, K. (2004). Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(2), 89-94.
- Huang D., Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hui, L., Bo., C. & Shouzhuo, Y. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 295-300.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.
- Kumar, A.S. & Mody, K. (2009). *Microbial exopolysaccharides: variety and potential applications*. In *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Rehm, B.H.M. (Ed.). Caister Academic Press. Norfolk. p. 229-254.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. & Last, R.L. (1993). Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell*, 5, 171-179.
- Lima, A. 2008. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado em Bromatologia. 335 p.
- Liu, Q., Cai, W. & Shao, X. (2008). Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*, 77, 679-683.
- Luís, Â., Domingues, F., Gil, C. & Duarte, A.P. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 886-893.
- Luís, A., Domingues, F. & Duarte, A.P. (2011). Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some portuguese shrub species extracts. *Natural Product Communications*, 6, 1863-1872.
- MacDonald-Wicks, L., Wood, L. & Garg, M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
- Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S. & Lima, J. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Sanjust, E., Meli, M., Sollai, F., Zucca, P. & Rescigno, A. (2007). Supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10022-10027.
- Martínez, A., Estévez, J.C. & Silva-Pando, F.J. (2012). Antioxidant activity, total phenolic content and skin care properties of 35 selected plants from Galicia (NW Spain). *Frontiers in Life Science*, 6 (3-4), 77-86.
- Martins, D., Barros, L., Carvalho, A.M. & Ferreira, I.C.F. (2011). Nutritional and *in vitro* antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. *Food Chemistry*, 125, 488-494.
- Martins, A.C., Bukman, L., Vargas, A.M.M., Barizão, É.O., Moraes, J.C.G., Visentainer, J.V. & Almeida, V.C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to

- the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 138, 574-580.
- Mira, R. (2009). *Actividade antioxidante de aguardentes vínicas envelhecidas portuguesas e francesas*. Instituto Politécnico de Beja. Tese de Mestrado. 96 p.
- NF EN ISO 7218:2007. V08-002. Versão 1.
- Niederlander G., Van Beek, A., Bartasiute A. & Koleva I. (2009). Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1210, 121-134.
- Norma CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) – M27-A2. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 22, nº15.
- Norma CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) - M2-A9. January 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 9<sup>th</sup> ed. Vol. 26, nº1.
- Norma CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) - M38-A2. April 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 28, nº16.
- Norma FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 2006-05. Sierotzki, H., Frey, R. & Crop, S. Versão 1.
- Norma FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 2009-01. Stammler, G. Versão 1.
- Norma ISO 7218:2007. Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A, Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S. & Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230, 191-195.
- Nunes, F.M. & Coimbra, M.A. (2001). Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1773–1782.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. (2008). Effect of minimal processing on bioactive compounds and color attributes of fresh-cut tomatoes. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 217-226.
- Oliveira, A., Valentim, I., Goulart, M., Silva, C., Bechara, E. & Trevisan, M. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689-702.
- Passos, C.P. & Coimbra, M.A. (2013). Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 626-633.
- Paulo, A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A.I., Costa, M.C., Teixeira, A. & Mota-Filipe, H. (2008). The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on oral glucose tolerance in rats. *Phytotherapy Research*, 22, 539-543.
- Perez-Jimenez, J. & Saura-Calixto, F. (2008). Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 185-191.
- Pichichero, E., Canuti, L. & Canini, A. (2009). Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 609-616.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983-2989.
- Prior, R., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

- Ribéreaux-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, 52, 627-631.
- Rohn, S., Rawel, H.M. & Kroll, J. (2004). Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4725-4729.
- Romanazzi G., 2010. Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. *Fresh Produce*, 4, 111-115.
- Roriz, C. (2014). *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, *Gomphrena globosa* L. e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: fitoquímica e bioatividade das espécies individuais e sinergismos resultantes do uso combinado. Instituto Politécnico de Bragança e Universidade de Salamanca. Tese de Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais. 154 p.
- Scherer R. & Godoy H. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654-658.
- Sousa, C., Silva, H., Vieira-Jr., G., Ayres, M., Costa, C., Araújo, D., Cavalcante, L., Barros, E., Araújo, P., Brandão, M. & Chaves, M. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355.
- Sucupira, N., Silva, A., Pereira, G. & Costa, J. (2012). Methods for measuring antioxidant activity of fruits. *Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 14, 263-269.
- Vale, V.V. & Orlanda, J.F.F. (2011). Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). *Scientia Plena*, 7, 044601.
- Vitor, R.F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A.I., Teixeira, A. & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 363-370.
- Wang, L. & Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-312.
- Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Ben Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. & Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1362-1370.
- Wu, C., Huang, M., Lin, Y., Ju, H. & Ching, H. (2007). Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*, 104, 1464-1471.
- Wu, C.-R., Lin, W.-H., Hseu, Y.-C., Lien, J.-C., Lin, Y.-T., Kuo, T.-P. & Ching, H. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum* species leaves from Taiwan flora *in vitro*. *Food Chemistry*, 127, 564-71.
- Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T. & Mohamed, B. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 43, 412-419.
- Zhu, F., Cai, Y.Z., Sun, M., Ke, J., Lu, D. & Corke, H. (2009). Comparison of major phenolic constituents and *in vitro* antioxidant activity of diverse Kudingcha genotypes from *Ilex kudingcha*, *Ilex cornuta*, and *Ligustrum robustum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6082-6089.
- Zulueta, A., Esteve, M.J. & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.



***Revestimentos comestíveis bioativos  
na conservação pós-colheita de cereja***

---





## 6. Revestimentos comestíveis bioativos na conservação pós-colheita de cereja

---

### Objetivo

Sendo a cereja (*Prunus avium* L.) por natureza, um fruto suscetível a deterioração pós-colheita, pretendeu-se avaliar, durante a conservação, a influência da aplicação de revestimentos comestíveis bioativos na sua qualidade, avaliando alguns parâmetros físico-químicos, o desenvolvimento de bolores e leveduras e a aceitabilidade por parte do consumidor.

A formulação base dos dos revestimentos comestíveis utilizados foi constituída por quitosano, um plastificante (glicerol) e um surfatante (Tween 80). A esta formulação base adicionou-se um componente lipídico (cera de abelha), bem como extrato aquoso de carqueja de forma a obter revestimentos bioativos.

### 6.1. A cereja

#### 6.1.1. Caracterização botânica

A cereja é um dos frutos mais populares de clima temperado, sendo normalmente colhida a partir de junho até meados de julho, coincidindo o seu pico de maturação com o máximo dos atributos sensoriais de gosto e aparência (Vursavus *et al.*, 2006). O seu cultivo abrange grande parte da Europa (mediterrânica e central), Norte de África, Próximo e Extremo Oriente, Sul da Austrália, Nova Zelândia e zonas temperadas do continente americano (EUA e Canadá, Argentina e Chile) (Silva & Alarcão, 1999).

A cerejeira pertence à família *Rosaceae*, subfamília *Prunoideae*, género *Prunus* e espécie cultivada *Prunus avium* L. Existem algumas variedades regionais, nomeadamente Saco e Morangão, que são cultivares tradicionais portuguesas, e sete cerejeiras exóticas muito disseminadas (Summit, Maring, Van, Early Van Compact, Lapin, Ulster e Garnet) (Serra *et al.*, 2011). O seu fruto é uma drupa de forma arredondada, que pode atingir 2 a 3 centímetros de diâmetro. O epicarpo dos frutos pode variar de amarelo a vermelho escuro ou negro e o mesocarpo tem uma cor pálida (que pode variar de amarelado a vermelho, mais ou menos acentuado). A sua polpa é firme, sumarenta e de sabor doce (Silva & Alarcão, 1999).

Devido ao considerável teor de compostos fenólicos e antocianinas, as cerejas são caracterizadas por uma elevada atividade antioxidante (Vursavus *et al.*, 2006; Usenik *et al.*, 2008).

### 6.1.2. Produção nacional

Devido às condições edafo-climáticas únicas, o elevado número de horas de frio, a Primavera amena, a proteção elevada aos ventos, a origem granítica dos solos de encosta, profundos e bem drenados e localização geográfica na Europa, Portugal (em especial a região da Cova da Beira) dispõe de um enorme potencial para colocar no mercado, frutos frescos, e mais concretamente a cereja, em épocas em que a produção em muitos países europeus não consegue satisfazer a procura existente.

A cultura da cerejeira regista forte implantação na região centro de Portugal, representando mais de 60% da produção nacional. Na região da Beira Interior, a cereja "Cova da Beira" tem indicação geográfica protegida (IGP), de acordo com os regulamentos da UE. Esta cereja é produzida nos municípios de Fundão, Covilhã e Belmonte, em ambas as variedades regionais e não-regionais (Serra *et al.*, 2011). Tradicionalmente possui uma grande importância cultural e social com utilização de mão-de-obra local sendo fonte de rendimento de empresas familiares com ou sem dedicação exclusiva.

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (Estatísticas Agrícolas, 2013) (Tab. 6.1) para o ano de 2012, o norte e centro do país produziram praticamente toda a cereja de Portugal, sendo a zona centro a superfície mais cultivada.

**Tabela 6.1.** Produção de cereja em Portugal Continental (por NUTS II).

NUTS II	Produção (t)	Superfície (ha)
Continente	5680	10180
Norte	3195	3636
Centro	2406	6393
Lisboa	8	29
Alentejo	66	14
Algarve	5	8

Segundo a mesma fonte, a intermitência da precipitação de abril e princípios de maio, no ano de 2012, conjugada com as oscilações térmicas, teve um efeito negativo nas variedades precoces de cereja, que se encontravam em plena fase de maturação, provocando o fendilhamento de alguns frutos, com consequências quer na produção quer na capacidade de conservação e comercialização. Apesar de em Trás-os-Montes e no Entre

Douro e Minho estas diminuições terem sido compensadas pelas produções obtidas pelas variedades mais tardias, tal não sucedeu na principal região produtora, a Beira Interior, o que acabou por determinar uma redução global na produção de 22,0%, face à campanha anterior.

Cerca de 90% da cereja produzida em Portugal destina-se ao consumo em fresco, sendo os restantes 10% destinados a transformação e outras utilizações agroalimentares, tais como: chás utilizando os pedúnculos de cereja, o óleo proveniente da prensagem dos seus caroços, fabrico de doces, geleias, marmeladas e conservas.

### 6.1.3. Conservação pós-colheita

A cereja é um fruto não climatérico pelo que não apresenta elevação na taxa respiratória próximo ao final do período de maturação. Os frutos não climatéricos não devem ser colhidos antes da sua maturação já que após a sua colheita entram geralmente em processo de senescência. A maturação dos frutos é uma fase do desenvolvimento em que podem ocorrer diversas mudanças físico-químicas, tais como alterações na coloração, no sabor, na textura, na permeabilidade dos tecidos, na formação de ceras na epiderme, alterações no teor de açúcares, de ácidos orgânicos, nas proteínas, nos compostos fenólicos, nas pectinas, na produção de substâncias voláteis, entre outras.

O intervalo de tempo que decorre entre a colheita e o consumo dos frutos pode diminuir drasticamente a qualidade dos mesmos, em especial quando os frutos se destinam à exportação ou a mercados distantes da zona de produção. A deterioração pela desidratação, a perda de *flavour*, a diminuição do valor nutricional bem como a aparência do fruto podem ocorrer em apenas algumas horas (Pavlath & Orts, 2009) o que induz ao decréscimo do seu valor comercial.

A forma mais simples de aumentar o tempo de prateleira é refrigerar os frutos o mais rapidamente possível após a sua colheita, sendo a temperatura próxima dos 0 °C e a humidade relativa de 90-95%, as condições que devem ser mantidas durante o tempo de armazenamento (Lim *et al.*, 2011). A baixa temperatura durante o armazenamento tem consequências importantes na qualidade devido ao impacto das mesmas nas reações metabólicas. A temperatura além de diminuir a taxa de respiração e a permeabilidade de gases (Jacxsens *et al.*, 2000) é também um fator importante na sobrevivência e crescimento de microrganismos em produtos frescos. Após a refrigeração, os frutos são colocados normalmente numa prateleira à temperatura ambiente, a cerca de 20 °C, para comercialização, o que limita a um tempo de prateleira não superior a 3 ou 4 dias (Romanazzi, 2010).

A cereja é, por natureza, um produto altamente perecível e a perda de qualidade pós-colheita é principalmente devida a lesões no epicarpo, alterações no equilíbrio ácido-açúcar, desidratação e escurecimento do pedúnculo (Alique *et al.*, 2005). Outro problema acrescido na deterioração da cereja são as contaminações microbiológicas em especial por fungos do género *Monilia*, *Penicillium* e *Botrytis*, em particular no período de armazenamento (Chand-Goyal & Spotts, 1996; Romanazzi, 2010). Assim sendo, a exploração de novas tecnologias para a preservação da qualidade dos produtos frescos, que sejam considerados seguros para o consumidor e amigos do ambiente, são muito desejáveis (Rico *et al.*, 2007).

A embalagem tem uma elevada importância na conservação dos alimentos. Atualmente os materiais de embalagem mais utilizados são polímeros sintéticos e não-biodegradáveis, o que conduz a impactos ambientais muito negativos. Com a finalidade de minimizar estes problemas vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de utilizar materiais alternativos. Um dos exemplos são as películas que têm por base polímeros biodegradáveis (p.e. celulose, amido, pectinas, galactomananos, alginato, gelatina, quitosano, proteínas do soro de leite) que permitem aproveitar subprodutos da indústria alimentar (Vargas *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2012; Cinelli *et al.*, 2014; Elsabee *et al.*, 2014; Espitia *et al.*, 2014; Oun *et al.*, 2015), bem como biopolímeros microbianos produzidos em biorreactor usando resíduos agroindustriais como fonte de carbono (poliésteres como os polihidroxialcanoatos, ou polissacáridos como o gelano, FucoPol e pululano) (Zhu *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2015).

Em alguns países não é permitida a utilização de fungicidas sintéticos durante o armazenamento dos produtos, ou possuem uma lista muito restrita de ingredientes que podem ser utilizados. Este facto, conjugado com a crescente preferência dos consumidores por produtos naturais, estimulou o interesse no desenvolvimento de métodos que permitissem controlar o apodrecimento pós-colheita (Romanazzi, 2010). Para esse controlo de doenças pós-colheita já foram estudadas alternativas aos fungicidas sintéticos e aplicadas no caso específico da cereja, como por exemplo a aplicação de tratamentos hiperbáricos que reduziram significativamente a presença de *Alternaria* e *Rhizopus* nesses frutos (Romanazzi *et al.*, 2008).

A utilização de embalagens de atmosfera modificada (MAP) também foi já estudada, tendo sido eficaz no retardamento das alterações físico-químicas relacionadas com a perda de qualidade, utilizando diferentes concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em diferentes cultivares de cereja (Tian *et al.*, 2004). No entanto, este método de conservação apresenta algumas desvantagens já que há necessidade de controlar e manter a temperatura a fim de evitar condensações na embalagem e o seu custo é elevado (Pavlath & Orts, 2009). A atmosfera modificada também pode desencadear a produção de toxinas pela bactéria *C. Botulinum* em

frutos com o pH superior a 4,8 (Olivas & Barbosa-Cánovas 2005). A combinação de embalagem de atmosfera modificada passiva com vários óleos essenciais demonstrou possuir efeitos benéficos na qualidade de cerejas (Serrano *et al.*, 2005).

## 6.2. Revestimentos comestíveis

A aplicação de revestimentos comestíveis tem sido uma estratégia muito estudada na conservação pós-colheita de frutos e vegetais frescos e minimamente processados (Dhall, 2013). Os revestimentos comestíveis consistem em barreiras adicionais que são aplicadas à superfície do produto alimentar, com vista à sua proteção e consequente prolongamento do seu tempo de vida útil, e que pode ser ingerido em conjunto com o mesmo. Geralmente a sua espessura é inferior a 0,3 mm e pode encontrar-se, não só à superfície, mas também em finas camadas entre diferentes componentes do alimento (Pavlath & Orts, 2009; Vargas, *et al.*, 2009).

Os componentes usados na produção deste tipo de revestimentos são edíveis, e devem estar em conformidade com os regulamentos que se aplicam ao produto alimentar que está a revestir. São normalmente constituídos por um polímero ou mistura de polímeros (geralmente polissacáridos e proteínas), para formar uma barreira densa; agentes plastificantes para melhorar as propriedades mecânicas evitando a formação de estruturas poliméricas quebradiças; agentes reticulantes para promover ligações cruzadas e desenhar as propriedades das matrizes poliméricas; e agentes tensioativos, com a finalidade de melhorar a aderência do revestimento à superfície do produto. A formulação dos revestimentos deve ser realizada tendo em conta o tipo de produto onde vai ser aplicado, escolhendo os componentes mais adequados de entre as classes referidas.

De entre os biopolímeros, o quitosano tem sido muito aplicado, na medida em que está disponível no mercado em grandes quantidades, apresenta a capacidade de formação de películas, é biocompatível, não é tóxico, proporciona geralmente uma boa adesividade a superfícies biológicas dada a sua carga positiva e apresenta por si só atividade antimicrobiana (Dutta *et al.*, 2009; Moradi *et al.*, 2012; Elsabee *et al.*, 2014).

Atendendo a que os materiais edíveis mais disponíveis são de natureza hidrofílica, estes dão origem a revestimentos com uma fraca resistência a água líquida e com baixa barreira ao vapor de água. De modo a aumentar a sua barreira à água, têm sido desenvolvidos revestimentos compósitos, constituídos por uma fase polimérica contínua hidrofílica com uma fase dispersa lipofílica (óleos vegetais ou ceras). Em alternativa, também têm sido desenvolvidas barreiras multicamada, alternando camadas de biopolímero com camadas de cera.

Para além da ação de barreira passiva, os revestimentos comestíveis podem ainda servir de veículo de substâncias bioativas (p.e. óleos essenciais de plantas) (Sánchez-González *et al.*, 2011), tornando-se em barreiras de proteção ativas, prevenindo reações de oxidação e o desenvolvimento de microrganismos (Rižnar *et al.*, 2006; Khadri *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2012; Siripatrawan & Noipha, 2012).

Segundo Lim *et al.* (2011) foram realizados muitos estudos abordando a importância do período pós-colheita na conservação de cerejas já que abastecem mercados longínquos a nível mundial, mas refere a existência de poucos estudos publicados sobre a utilização de revestimentos comestíveis para estes frutos.

Como exemplos, pode indicar-se o trabalho de Martínez-Romero *et al.* (2006), em que estudaram o efeito de um revestimento comestível com base em gel de *Aloe vera*. Adicionalmente, Aday & Caner (2010) utilizaram em cereja um revestimento à base de quitosano (3%) em ácido acético (1%) e 0,25 mL de glicerol/g de quitosano e conseguiram demonstrar alguma melhoria nas propriedades de barreira aos gases e vapor de água. No mesmo trabalho, referiram ainda uma diminuição nas alterações de pH, condutividade elétrica, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, teor de ácido ascórbico e firmeza dos frutos.

Os revestimentos apresentam potencial para serem aplicados neste fruto, sendo necessário mais estudos no sentido de desenhar formulações de revestimentos que vão de encontro às necessidades de conservação das várias cultivares da cereja. Esta otimização passará em grande parte pela seleção dos componentes de barreira (biopolímeros e compostos lipídicos) e dos compostos bioativos (presentes em óleos essenciais ou extratos aquosos de plantas), sendo que os óleos essenciais apresentam a desvantagem de alterarem muitas vezes de forma negativa a qualidade sensorial dos produtos devido ao seu forte aroma.

Neste capítulo pretende-se avaliar pela primeira vez a utilização de revestimentos comestíveis bioativos à base de quitosano com incorporação de extrato aquoso de carqueja, que é inodoro e não confere sabor, na conservação pós-colheita de cereja.

## 6.3. Materiais e métodos

Numa primeira fase caracterizaram-se os revestimentos comestíveis sob a forma de película, no que diz respeito às suas propriedades óticas e morfologia. Posteriormente, as soluções de revestimento comestíveis foram aplicadas em cereja. Escolheu-se cereja da variedade regional Saco muito difundida na região da Cova da Beira.

### 6.3.1. Preparação das soluções de revestimento

- Solução base de quitosano, glicerol e Tween 80

O quitosano é um biopolímero natural insolúvel em água pelo que deverá ser dissolvido numa solução ácida, o que também pode permitir o ativar das suas propriedades antimicrobianas (Romanazzi *et al.*, 2009). Neste trabalho foi utilizado como solvente do quitosano o ácido acético (Panreac, Espanha) a 1%; pH=2,57 que também já foi utilizado por outros autores nesta concentração (Romanazzi *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2009; Martínez-Camacho *et al.*, 2010). O quitosano utilizado como matriz principal possui grau de desacetilação > 85% (GoldenShell Chemical, China).

Dissolveu-se o quitosano (2% em peso) na solução de ácido acético à temperatura ambiente e sob agitação, com um agitador de pás, durante cerca de 12 horas. De seguida adicionou-se o glicerol (Labsolve, Portugal), a um teor de 50% relativamente à massa de polímero e o Tween 80 (Sigma-Aldrich, Reino Unido) a uma concentração de 1,5% em relação à massa total. A mistura resultante foi homogeneizada por agitação durante alguns minutos.

- Solução base com cera de abelha

A formulação base foi aquecida à temperatura de 70 °C, sob agitação, usando uma placa de agitação magnética com controlo de temperatura (Velp Scientifica, Itália). Posteriormente adicionou-se a cera de abelha (adquirida no apiário do Instituto Superior de Agronomia), no estado sólido, a uma concentração de 20% relativamente à massa de quitosano. Após a fusão da cera de abelha (temperatura de fusão de cerca de 63 °C), esta foi emulsionada na formulação base sob agitação mecânica vigorosa.

- Solução base com cera de abelha e extrato aquoso de carqueja

À solução base com cera de abelha foi posteriormente adicionado extrato aquoso de carqueja liofilizado na concentração de 1% (com base na massa total).

## **6.3.2. Caracterização dos revestimentos sob a forma de película**

### **6.3.2.1. Preparação das películas**

As películas foram preparadas pelo método de “casting” e evaporação do solvente. Transferiram-se 20 g de solução filmogénica para placas de petri com 60 mm de diâmetro e colocaram-se numa estufa (WTB-Binder, Alemanha) à temperatura de 40 °C durante cerca de 48h, período necessário para a formação das películas.

### **6.3.2.2. Propriedades óticas**

Os parâmetros da cor foram determinados usando um colorímetro Minolta CR-300 (USA), previamente calibrado com um padrão de referência branco ( $L^* = 97,10$ ;  $a^* = 0,19$ ;  $b^* = 1,95$ ) no sistema CIELab (iluminante C) que define três coordenadas tridimensionais:  $L^*$  (que diz respeito à luminosidade, variando entre 0 e 100; 0 corresponde ao preto e 100 ao branco),  $a^*$  e  $b^*$  (dizem respeito ao croma, variando entre -60 e +60; o  $a^*$  indica o valor associado ao vermelho/verde e o  $b^*$  ao amarelo/azul).

Inicialmente foram determinados os parâmetros da cor de três folhas de cartolina de diferentes cores (amarelo, verde e vermelho) e em seguida, das mesmas folhas cobertas pelas amostras de película. Foi calculada a variação total da cor pela equação 1:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 1})$$

Quando esta variação de cor apresenta valores inferiores a 6 considera-se que a diferença entre as cores é pouco significativa, embora valores superiores a 3 já sejam perceptíveis pelo olho humano.



### 6.3.2.3. Morfologia

O estudo da morfologia superficial e interna foi realizado por microscopia eletrônica de varrimento, uma vez que esta técnica permite a obtenção de imagens de alta resolução, sendo possível recolher informação detalhada sobre a superfície de uma amostra. Foi utilizado um microscópio Jeol JSM-7001F, *Field Emission Scanning Electron Microscope*, que permite a observação e caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos heterogêneos numa escala manométrica (nm) e micrométrica ( $\mu\text{m}$ ). Este equipamento, para além das imagens da superfície das amostras permite ainda obter uma visualização da secção de corte dos filmes, através da inclinação das amostras num ângulo aproximado de 45°. As amostras foram fraturadas após imersão em azoto líquido para que não ocorresse deformação na zona de corte. Aplicou-se uma fina camada de ouro na superfície das películas e durante a análise foi utilizado um feixe de 5 kV.

### 6.3.3. Aplicação de revestimentos em cereja

Foram preparados quatro lotes para revestimento comestível em cereja de acordo com a Tabela 6.2.

**Tabela 6.2.** Soluções de revestimento aplicadas em cereja.

Formulações	Quitosano (m/m solução)	Ácido Acético (m/m solução)	Glicerol (m/m Q)	Tween 80 (m/m solução)	Cera de Abelha (m/m Q)	Carqueja (m/m solução)
<b>C</b>	-	-	-	-	-	-
<b>R</b>	2%	1%	50%	1,5%	-	-
<b>RC</b>	2%	1%	50%	1,5%	20%	-
<b>RCE</b>	2%	1%	50%	1,5%	20%	1%

Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja. Q - quitosano.

O número de frutos revestidos para cada lote foi o seguinte:

- Frutos sem revestimento (matéria-prima inicial) (**C**) - 250
- Frutos com revestimento de quitosano (**R**) - 207
- Frutos com revestimento composto de quitosano e cera de abelha (**RC**) - 223
- Frutos com revestimento composto de quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja (**RCE**) - 224

Os revestimentos foram aplicados por imersão dos frutos nas soluções filmogénicas tendo o cuidado do revestimento se apresentar homogéneo na superfície do mesmo e sem escorrimento.

As cerejas revestidas foram secas ao ar e conservadas numa câmara de refrigeração (Friarco, Portugal) a 4 °C durante 12 dias, no escuro. Os frutos foram colocados em cima de uma rede suportada numa bancada de aço inoxidável. Durante o armazenamento foi efetuado o controlo analítico aos frutos acompanhado de análise sensorial.

#### **6.3.4. Estudo de conservação**

##### **6.3.4.1. Controlo analítico dos frutos**

Para todos os parâmetros, no controlo e nos revestimentos, as cerejas foram avaliadas ao fim do 1º, 4º, 7º, 11º e 13º dia (último dia de ensaio) de armazenamento no frio (4 °C).

O controlo analítico compreendeu os seguintes parâmetros: perda de massa, textura, cor, teor de sólidos solúveis, pH, infeções por bolores e atividade antioxidante das cerejas.

- ***Perda de massa***

No parâmetro perda de massa, as cerejas foram pesadas no início do ensaio e nas diferentes datas de amostragem. A perda de massa foi expressa em percentagem relativamente à massa inicial (massa média de 166 gramas por amostra) utilizando balança analítica Precisa Instruments BJ-11000.

- ***Textura***

A textura foi avaliada num texturómetro, Marca Stable Micro Systems, UK, Modelo Texture Analyser TA.XT Plus. Foi realizado um teste de compressão utilizando uma sonda plana com 60 mm de diâmetro. A amostra de cereja foi fixa na plataforma e pressionada na zona central a uma velocidade constante de 1 mm/s. Pelo teste efetuado obtém-se a força exercida (N) em função da distância e do tempo exercido para pressionar o fruto. A percentagem de compressão foi escolhida de modo a minimizar a influência do caroço. Foram utilizados 10 frutos de cada lote em cada dia de análise.

- **Cor**

Os parâmetros da cor foram avaliados através do colorímetro Minolta CR-300 (USA), do mesmo modo já descrito no ponto 6.3.2.2. Foram igualmente medidos os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  bem calculada a diferença total de cor ( $\Delta E$ ) através da equação 1. Sendo a diferença total de cor um parâmetro que indica a diferença de cor entre uma dada amostra ( $L^*a^*b^*$ ) e uma amostra de referência ( $L_0^*a_0^*b_0^*$ ), foi considerada amostra de referência a amostra no dia 0. Adicionalmente foram calculados os parâmetros  $C^*$  (saturação da cor) e  $h^\circ$  (tonalidade da cor) pelas equações 2, 3, 4 e 5.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Equação 2})$$

$$h^\circ = \frac{\left( \arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360 \quad \text{se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (\text{Equação 3})$$

$$h^\circ = 180 + \frac{\left( \arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360 \quad \text{se } a^* < 0 \quad (\text{Equação 4})$$

$$h^\circ = 360 + \frac{\left( \arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360 \quad \text{se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (\text{Equação 5})$$

A medição foi realizada em 10 frutos de cada um dos lotes: controlo e cerejas com os diferentes revestimentos.

- **Teor de sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis foi determinado com um refratómetro digital (Atago PAL-1) com uma precisão de  $\pm 0,2\%$  para um espectro de grau Brix entre 0% a 53%, a 25 °C. As amostras (10 frutos de cada lote) foram previamente trituradas, sendo a polpa filtrada num tecido de algodão e desse sumo foi retirada uma gota para colocar na superfície de leitura do refratómetro. Foram efetuadas três leituras por amostra, nos dias de avaliação durante o ensaio de conservação, sendo os resultados expressos como médias  $\pm$  desvio padrão em °Brix (NP EN 12143:1999).

- *pH*

A determinação do pH das amostras foi efetuada em triplicado, em cada uma das datas de amostragem num potenciômetro marca Crison, modelo Basic 20 (Estados Unidos). O aparelho foi previamente calibrado com solução tampão de pH=4,01 e pH=6,86 a 20 °C.

- *Avaliação visual de frutos e contagem de bolores e leveduras*

Para avaliar o efeito dos revestimentos na conservação das cerejas, em cada uma das datas de avaliação das amostras foi contabilizado o número de cerejas que apresentavam bolores visíveis sendo também realizada uma análise microbiológica para contagem de bolores e leveduras em cerejas de cada lote ao 7º e ao 22º dias de conservação pela técnica de sementeira. Para esta análise microbiológica pesaram-se 10 g de cereja por cada lote que foram adicionadas a 90 mL de uma solução de triptona sal. Esta mistura foi homogeneizada em aparelho Stomacher durante um minuto e meio. Realizaram-se três diluições da amostra ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) e adicionaram-se 100 ml de solução a placas contendo meio de cultura apropriado (meio de Cooke Rose Bengal) preparado previamente. As placas foram incubadas numa estufa durante 5 dias a 25 °C. Após esse período procedeu-se à contagem das colónias formadas e ao cálculo do número provável de unidades formadoras de colónia por grama de produto (UFC/g). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Norma Portuguesa NP 3277-1.

- *Atividade antioxidante das cerejas*

Na avaliação da atividade antioxidante das cerejas foi utilizado o método de captação de radicais de DPPH, como descrito na secção 5.3.6.1.

Na preparação da amostra, as cerejas foram trituradas e pesadas, aproximadamente 50 g do triturado, o qual foi diluído com água destilada (50:50). A suspensão diluída resultante foi novamente triturada durante aproximadamente 1 minuto até ficar bem homogeneizada. Pesou-se uma massa de 50 mg dessa suspensão, à qual se adicionou 10 mL de solução diária de DPPH, incubando a mistura no escuro durante 40 minutos, correspondente ao tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio da reação, à temperatura ambiente. Procedeu-se em seguida à leitura da absorvância a 517 nm contra o branco correspondente (metanol) num espectrofotómetro UV-VIS, marca UNICAM, Modelo Spectrometer UV4. O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados, expressos em mM Trolox/100g m.s.

#### **6.3.4.2. Avaliação sensorial**

A avaliação sensorial foi realizada por um painel de 10 provadores semi-treinados, com idades compreendidas entre os 26 e os 69 anos (8 femininos e 2 masculinos). As sessões de análise sensorial tiveram lugar numa sala de provas do Edifício Ferreira Lapa do Instituto Superior de Agronomia.

As provas sensoriais foram realizadas nos mesmos dias das determinações analíticas aos frutos, de modo a possibilitar uma correta avaliação sensorial ao longo do tempo.

Foram realizados testes descritivos (a ficha de prova encontra-se no Anexo 9) tendo sido utilizada uma escala de 1 a 6 (escala de intensidade) para os atributos:

- Aparência (cor característica, brilho e rugosidade)
- Aroma (característico, estranho)
- Gosto (característico, estranho)
- Textura (Firmeza da cutícula, firmeza da polpa)

Foram ainda utilizados dois parâmetros hedónicos:

- Apreciação global por parte do provador
- Intenção de compra

Os resultados dos parâmetros avaliados neste capítulo foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi efetuada pelo teste de Scheffé, com um nível de significância  $p < 0,05$ , através do programa Statistica, Versão 7.

## 6.4. Resultados e discussão

### 6.4.1. Caracterização dos revestimentos sob a forma de película

#### 6.4.1.1. Propriedades óticas das películas obtidas

- Cor

A Tabela 6.3 apresenta os valores da diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre as cartolinas coloridas e as amostras das películas sobre essas cartolinas. Uma vez que os valores de  $\Delta E$  são superiores a 6, em todas as cores testadas, podemos concluir que as películas obtidas provocam alterações de cor que são detetáveis pelo olho humano ( $\Delta E > 3$ ). Pode-se então concluir que as películas alteram a cor das cartolinas utilizadas. Porém, é de referir que esta alteração de cor também depende da espessura das películas, que neste trabalho variou entre 85  $\mu\text{m}$  e 125  $\mu\text{m}$ . Aquando da aplicação das soluções filmogénicas sobre produtos alimentares, designadamente sobre as cerejas, espera-se a formação de um revestimento com uma espessura bastante inferior ( $< 10 \mu\text{m}$ ). Deste modo, espera-se que a alteração da cor das cerejas provocada pelo revestimento seja menor.

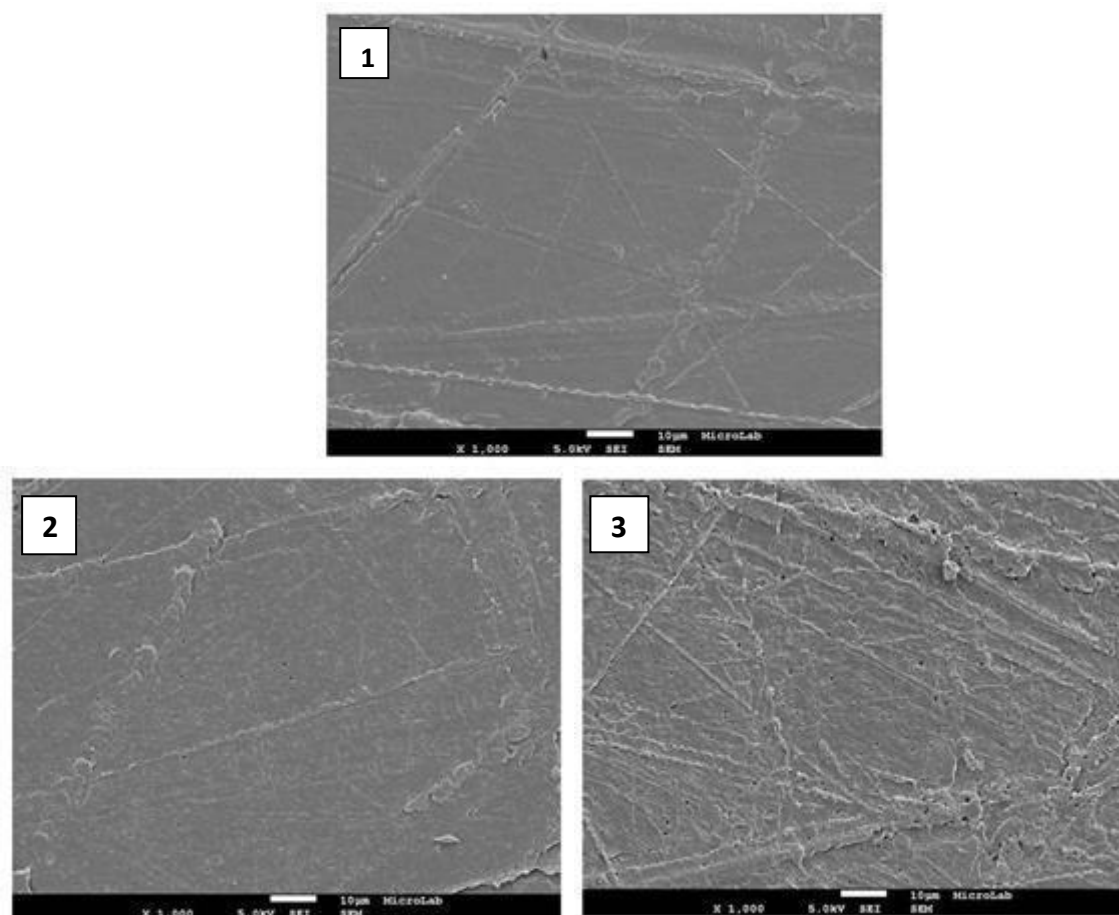
**Tabela 6.3.** Diferença de cor ( $\Delta E$ ) entre as cartolinas de cor e as películas sobre as cartolinas.

	$\Delta E$		
	Amarelo	Verde	Vermelho
<b>R</b>	14	10	13
<b>RC</b>	12	7	12
<b>RCE</b>	13	9	7

Legenda: R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

#### 6.4.1.2. Morfologia

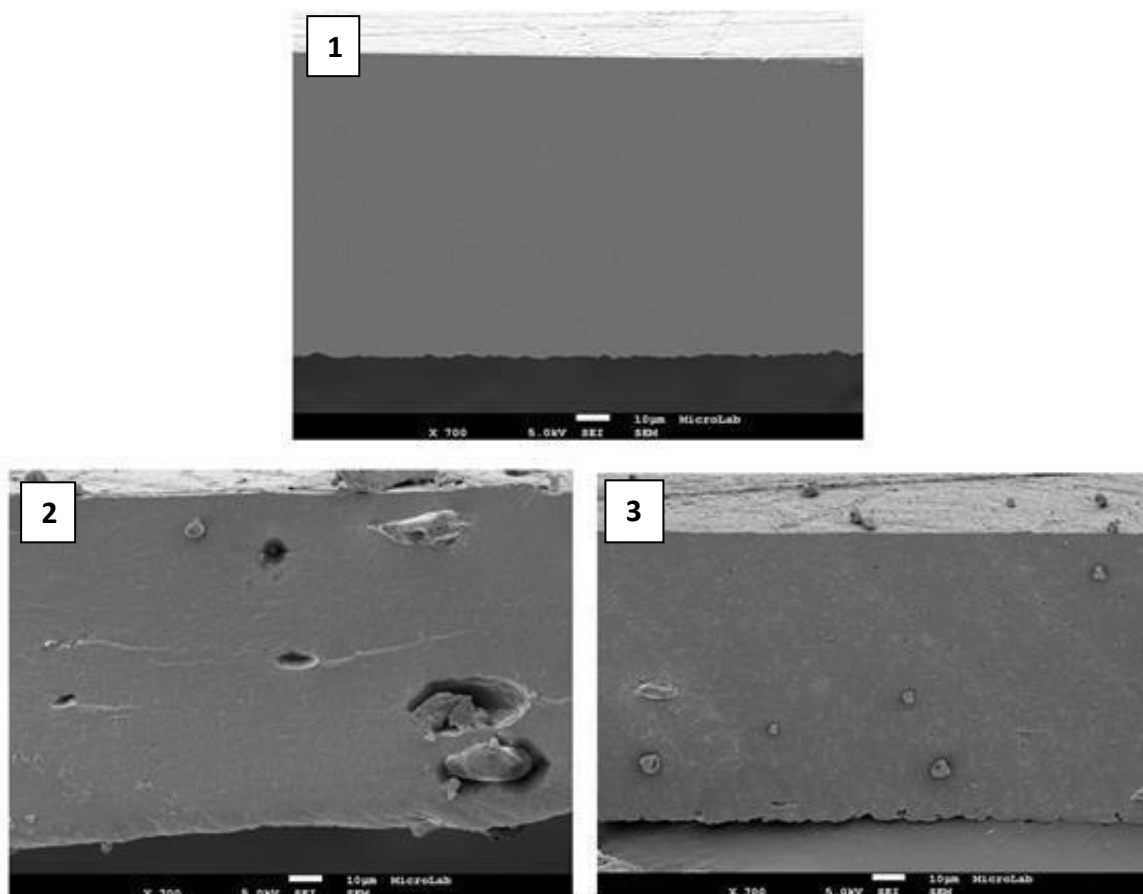
Na Figura 6.1 apresentam-se as imagens da superfície e da secção de corte das películas obtidas por microscopia eletrónica de varrimento.



**Figura 6.1.** Imagens da superfície das películas obtidas por microscopia eletrônica de varrimento, com uma ampliação de 1000x (1: R, 2: RC; 3: RCE).  
 Legenda: R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

É possível verificar que a superfície é semelhante em todas as amostras. As linhas que se observam na superfície dos filmes correspondem a sulcos já existentes nas placas de Petri que foram utilizadas para a sua secagem.

Na Figura 6.2 apresentam-se as imagens da secção de corte observando-se uma morfologia distinta entre as amostras. A imagem 1 representa a amostra sem cera, na qual se verifica uma estrutura bastante densa e homogênea, característica das películas de polissacáridos. As restantes imagens mostram uma estrutura irregular, com partículas dispersas na matriz contínua de quitosano. Estas partículas são de cera, cuja origem pode estar na homogeneização incompleta durante a preparação da solução filmogénica, e/ou na coalescência de gotas de cera após a homogeneização, que depois do arrefecimento dá origem a partículas sólidas de grande dimensão.



**Figura 6.2.** Imagens da secção dos cortes das películas obtidas por microscopia eletrônica de varrimento, com uma ampliação de 700x (1: R, 2: RC; 3: RCE).

Legenda: R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

A presença de extrato de carqueja não é visível (amostras 3), o que leva a concluir que esteja completamente dissolvido.

#### 6.4.2 Estudo de conservação

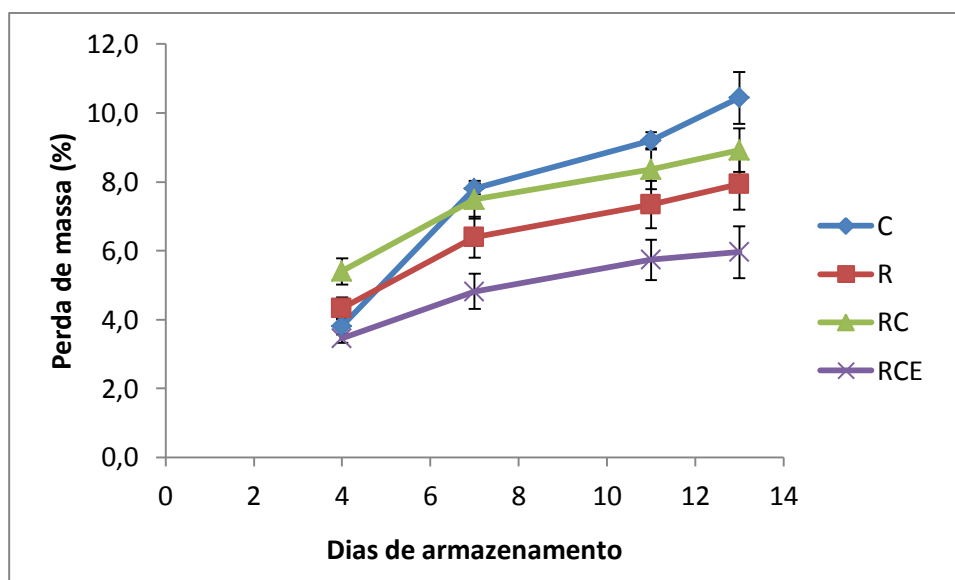
O estudo de conservação consistiu no armazenamento em condições refrigeradas de quatro lotes de frutos, efetuando-se o controlo da qualidade dos mesmos ao longo de 13 dias. Na identificação das amostras utilizou-se uma nomenclatura constituída pela designação do lote (C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja) seguida do dia da análise (número de 1 a 13).



#### 6.4.2.1. Controlo físico-químico dos frutos

- *Perda de massa*

Os valores da perda de massa (%) obtida no controlo (C) e nas cerejas com revestimento (R; RC; RCE) encontram-se no gráfico da Figura 6.3.



**Figura 6.3.** Perda de massa (%) das amostras de cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

Verifica-se que todos os lotes apresentam uma perda de massa ao longo do tempo. Pode-se considerar que a perda de massa corresponde quase exclusivamente à perda de água, uma vez que outros componentes que podem ser perdidos, tais como aromas e gases da respiração são praticamente indetetáveis em termos de massa (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005).

Porém, observa-se uma perda de massa inferior nos lotes de cerejas em que foi aplicado o revestimento comestível, indicando que revestimentos à base de quitosano têm um efeito positivo na prevenção da desidratação dos frutos. A menor perda de massa e manutenção da firmeza em frutos, como manga e banana, durante o armazenamento e em condições de mercado, relativamente a amostras sem revestimentos tem sido reportada por outros autores (Falguera *et al.*, 2011). Este facto poderá ser explicado pelas propriedades hidrofílicas do quitosano, sendo possível verificar-se uma adsorção de água pelo revestimento em ambiente refrigerado, diminuindo a força motriz para a transferência de água do interior do fruto para o exterior.

As cerejas revestidas com quitosano e cera perderam um teor de água superior relativamente às cerejas revestidas apenas com quitosano, o que não era espectável já que a incorporação de cera de abelha nos revestimentos exerceria uma barreira à perda de água e permitiria prevenir a desidratação. Possivelmente a percentagem de cera utilizada não foi suficiente para esse fim, mas uma percentagem superior não parece favorecer a aparência visual dos frutos.

De entre os revestimentos aplicados, o revestimento de quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja (RCE) foram os que provocaram uma menor perda de massa ao longo do período de armazenamento. Este facto pode ser devido a um sinergismo entre o quitosano e o extrato da planta. A sinergia em revestimentos comestíveis constituídos por mais de um componente tem sido referida na literatura, designadamente em revestimentos de quitosano e goma arábica aplicados em bananas armazenadas durante 33 dias, em que foi mantida a qualidade sensorial e os parâmetros microbiológicos sem efeitos fitotóxicos (Falguera *et al.*, 2011).

- **Textura (firmeza) dos frutos**

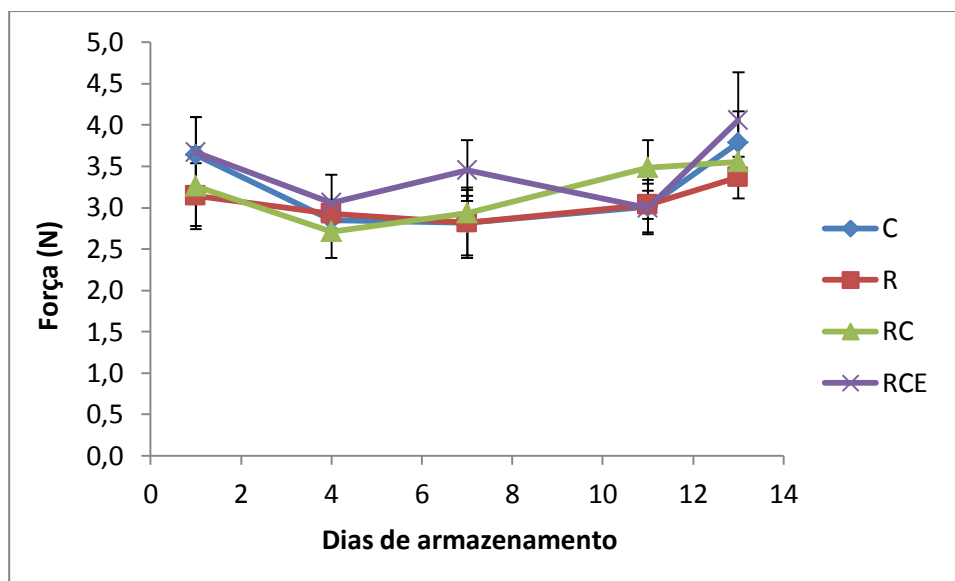
De acordo com Bourne (2002) as propriedades texturais dos alimentos são “um conjunto de características físicas que decorrem dos elementos estruturais, são sentidas pela sensação de toque, estão relacionadas com a deformação, desintegração e fluxo do alimento sob uma força e são medidos objetivamente por funções de massa, tempo e distância”.

Os frutos e vegetais contêm um significativo teor em água delimitado por uma membrana semipermeável e parede celular. A textura dos frutos e vegetais é consequência da sua pressão de turgescência, da composição das paredes celulares e da lamela média que mantém as células individuais unidas. As paredes celulares são compostas por celulose, hemicelulose, substâncias pécicas, proteínas e no caso dos vegetais, lenhina (Barrett *et al.*, 2010).

Pelo teste de compressão pode-se avaliar a força (em N) exercida pela sonda do texturómetro necessária para deformar a amostra, permitindo inferir sobre os parâmetros de textura, designadamente a firmeza. Os resultados estão apresentados na Figura 6.4. A firmeza dos frutos de cada lote não variou significativamente durante os 13 dias de armazenamento, não se observando também diferenças entre os frutos dos vários lotes. Estes resultados vão de encontro aos obtidos para a perda de massa dado que, apesar de para este parâmetro se observarem diferenças entre os lotes, a perda de massa ao longo do

ensaio foi sempre baixa (< 10,5%). Pelo que, a perda de água que se verificou, não terá sido suficiente para provocar uma alteração substancial na textura dos frutos.

Por outro lado, durante o armazenamento a atividade das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase presentes nas cerejas pode aumentar 2 a 2,5 vezes mais num período de armazenamento de 5 dias, o que pode levar à degradação da parede celular e da textura das cerejas (Remón *et al.*, 2003). Porém, no presente trabalho este efeito não foi observado.

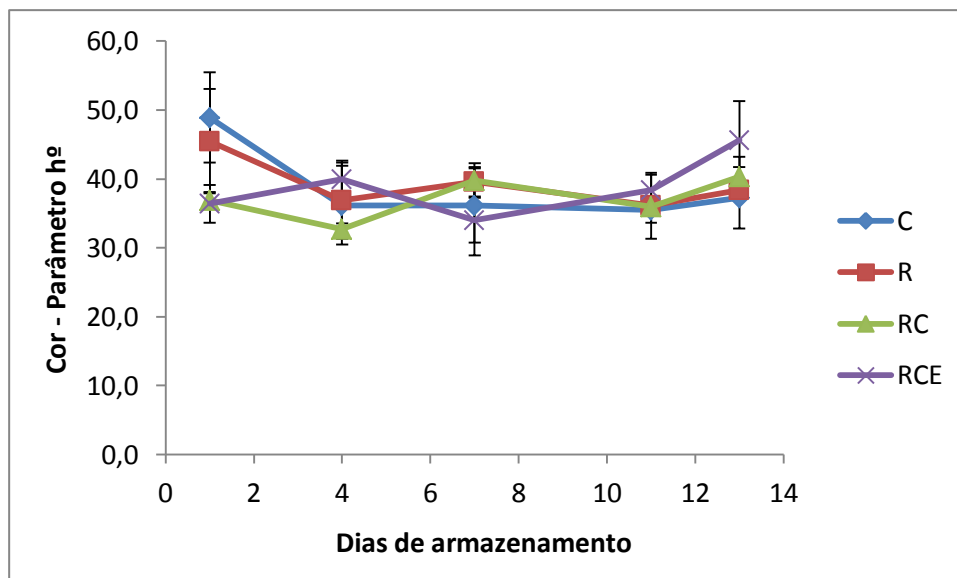


**Figura 6.4.** Firmeza (N) dos frutos com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

#### • Cor

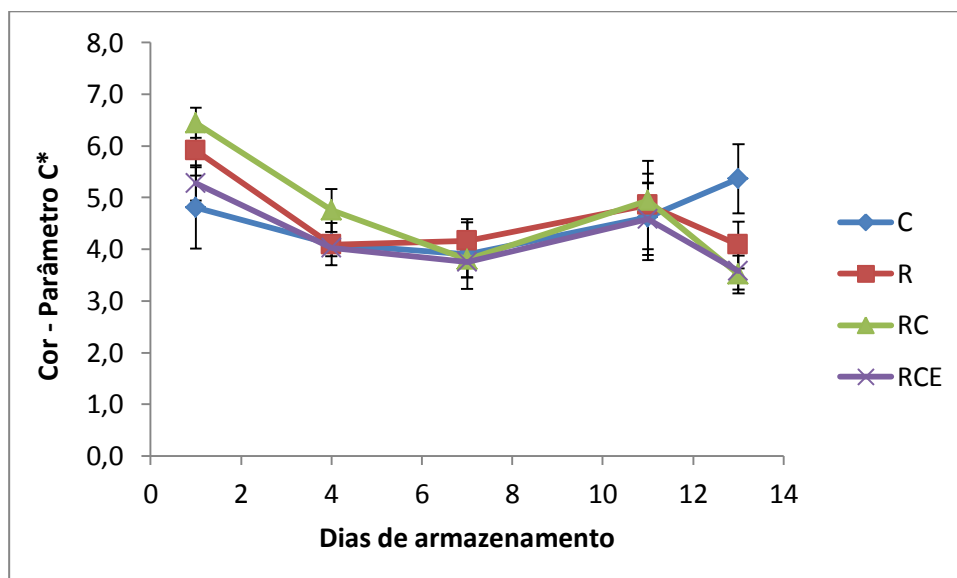
Em relação à matiz da cor ( $h^0$ ) (Figura 6.5), no dia 1 verifica-se que os valores obtidos para os frutos com revestimento apenas de quitosano não diferem substancialmente em relação ao controlo e afastam-se ligeiramente dos valores obtidos para os frutos com revestimentos RC e RCE. Este facto indica que a aplicação de revestimentos com cera induz uma maior alteração da matiz do produto. Porém, durante o período de armazenamento a matiz dos frutos dos diferentes lotes tende para um valor idêntico.



**Figura 6.5.** Cor dos frutos: parâmetro  $h^{\circ}$  da cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

Legenda: C - controle, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

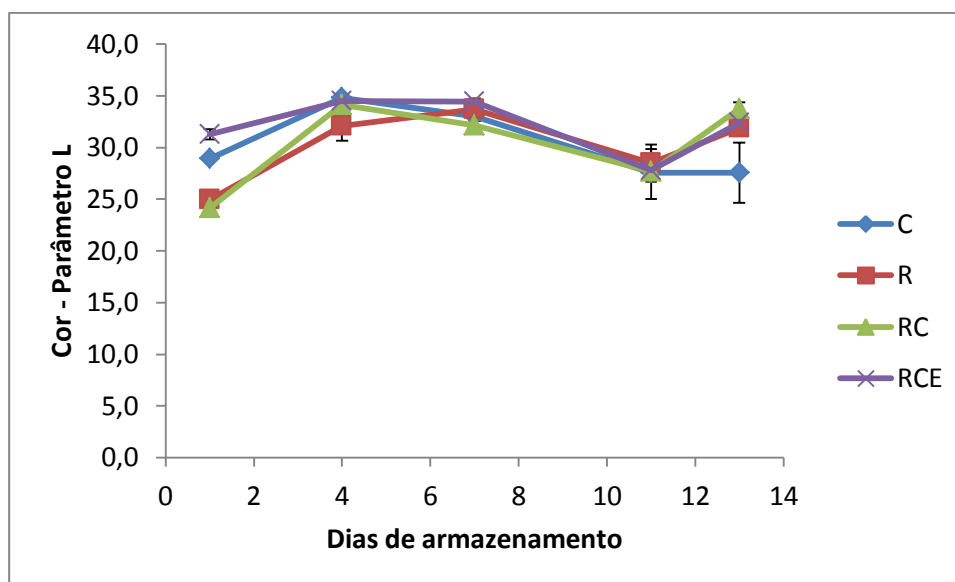
Na Figura 6.6 apresentam-se os valores do parâmetro  $C^*$  podendo-se verificar que os frutos dos vários lotes apresentam valores bastante idênticos, havendo uma tendência para um ligeiro decréscimo da saturação da cor ao longo do tempo, que é mais notório para os frutos revestidos.



**Figura 6.6.** Cor: parâmetro  $C^*$  da cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

Legenda: C - controle, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

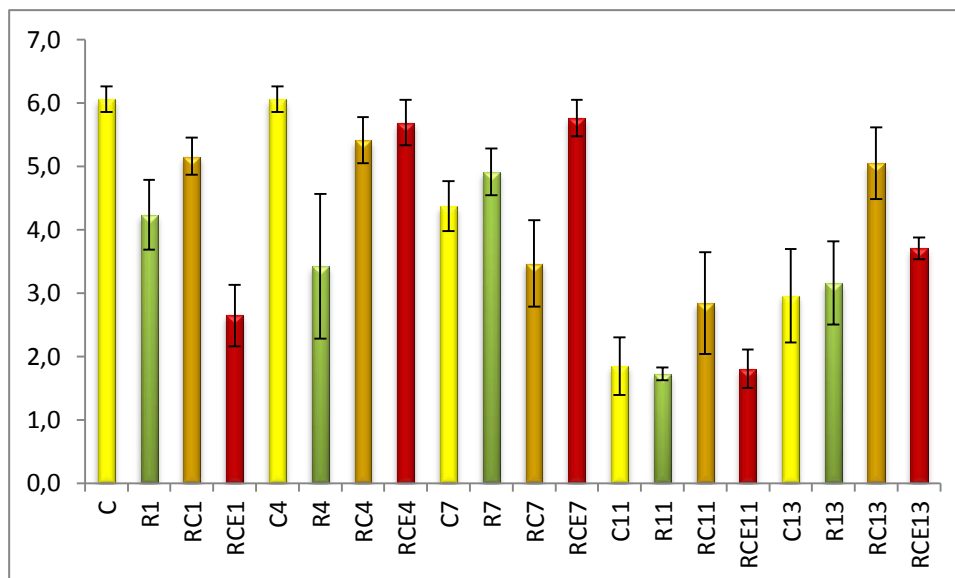
Relativamente à luminosidade ( $L^*$ ), verificou-se que todas as amostras apresentam maior luminosidade ao 4º dia de conservação (Fig. 6.7). No geral, todas as amostras diminuem a luminosidade do 7º para o 11º dia e ao 13º dia todas as cerejas onde foram aplicados os revestimentos apresentam valores de luminosidade superiores e o controlo mantém o seu valor.



**Figura 6.7.** Cor: parâmetro  $L^*$  da cereja com e sem revestimento comestível ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

No que diz respeito à diferença total de cor em relação à cor inicial dos frutos (Fig. 6.8), pode-se verificar que os valores estão entre 2 e 6 ao longo do tempo de armazenamento, o que se considera uma diferença de cor pouco pronunciada, embora valores superiores a 3 já sejam perceptíveis pelo olho humano.



**Figura 6.8.** Diferença total de cor da cereja com e sem revestimento comestível, ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

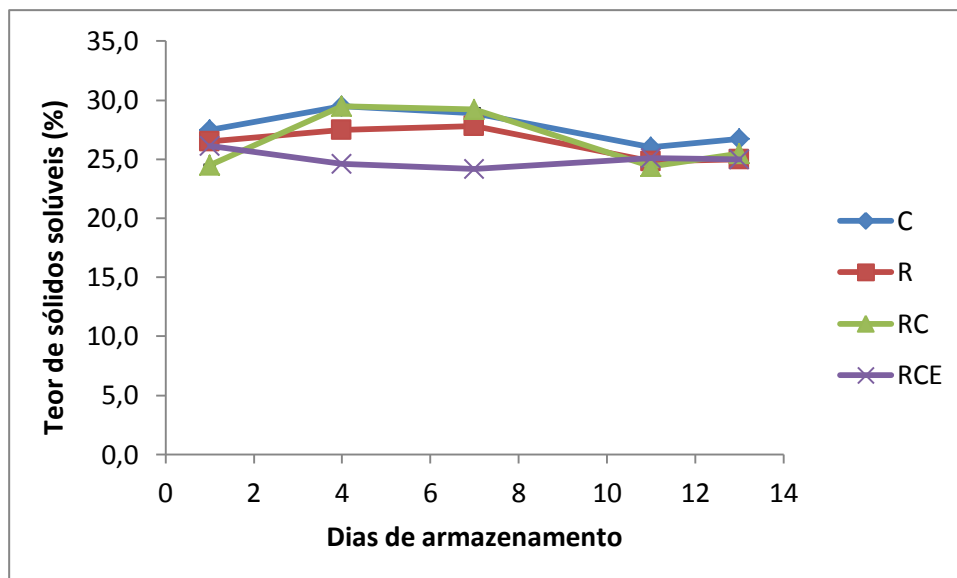
Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja. Os números 1, 4, 7, 11 e 13 a seguir às letras indicam os dias do ensaio de conservação a 4 °C.

As cerejas após a colheita tendem a perder a sua cor vermelha brilhante podendo este facto ser causado pela degradação das antocianinas (Gonçalves *et al.*, 2007), fatores fisiológicos, processos bioquímicos ou por outros (Esti *et al.*, 2002). No presente trabalho, a variação total da cor não apresenta uma correlação visível com o tipo de revestimento aplicado nem com o tempo de armazenamento, podendo estar mais relacionada com a variabilidade da matéria-prima original.

#### • Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis de cereja depende da cultivar, e pode variar entre 11 e 25 °Brix. Deve-se principalmente à presença de glucose e frutose e menos devido à presença de sacarose e sorbitol (Martínez-Romero *et al.*, 2006). A presença de glucose e frutose são os principais responsáveis pelo sabor doce das cerejas.

Neste trabalho, o teor de sólidos solúveis não apresenta uma variação substancial ao longo do tempo de armazenamento e é idêntico para os frutos de todos os lotes (Fig. 6.9). Conte *et al.* (2009) considera que em condições de armazenamento no frio, o teor de sólidos solúveis de cereja diminui ligeiramente ou mantém-se constante, o que está de acordo com os resultados obtidos. A manutenção ou pouca variação do teor de sólidos solúveis no período pós-colheita em frutos não climatéricos, como é o caso da cereja, é normal.

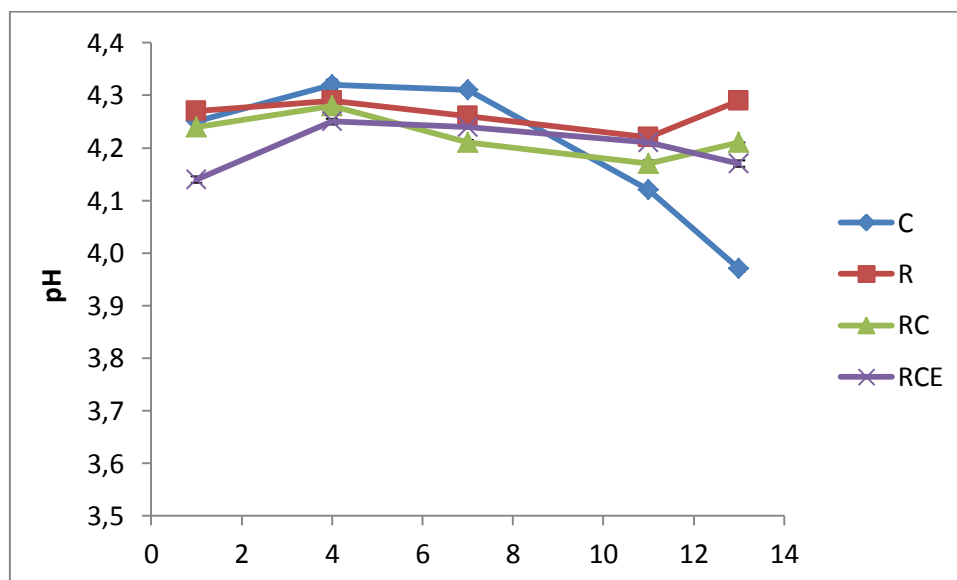


**Figura 6.9.** Teor de sólidos solúveis (Grau Brix) da cereja com e sem revestimento comestível, ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

#### • pH

Em relação ao pH, o seu valor oscilou entre cerca de 4,0 e 4,3 ao longo do ensaio para todos os lotes de frutos (Fig. 6.10).



**Figura 6.10.** pH da cereja com e sem revestimento comestível, ao longo do ensaio de conservação a 4 °C.

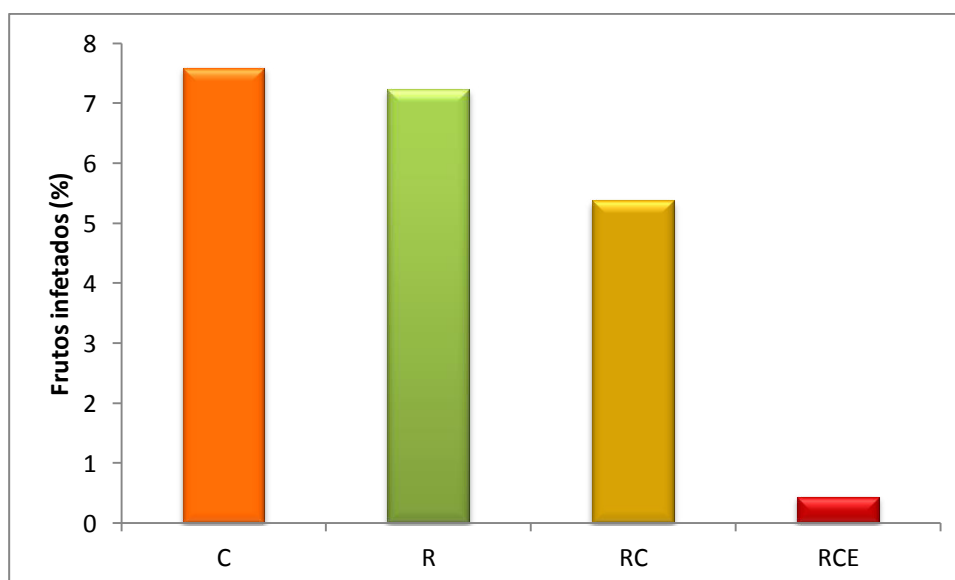
Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

Verifica-se que a aplicação dos revestimentos selecionados não provoca grandes oscilações de pH, o que também foi referido por Moraes *et al.* (2012).

- **Controlo microbiológico**

O controlo microbiológico foi efetuado pela contagem de bolores e leveduras e pela observação macroscópica dos frutos.

O gráfico da Figura 6.11 apresenta a percentagem de cerejas com bolores visíveis ao final 7 dias de conservação. A análise da figura permite observar o efeito antifúngico do revestimento de quitosano com extrato aquoso de carqueja. Embora o quitosano possua propriedades antifúngicas, anteriormente documentadas, as amostras revestidas apenas com quitosano, com ou sem cera de abelha (R e RC) apresentaram entre 5 e 7% de frutos infetados. As cerejas com revestimento com extrato incorporado (RCE) mantiveram-se praticamente sem fungos visíveis. De realçar que os extratos aquosos de carqueja não apresentaram atividade contra os géneros *Monilia* (c.f. 5.4.6), principais fungos responsáveis por perdas pós colheita de cerejas. Face ao exposto, os dados observados neste estudo de conservação podem evidenciar a existência de um certo sinergismo entre o quitosano e o extrato aquoso de carqueja.



**Figura 6.11.** Frutos infetados com bolores visíveis ao fim de 7 dias de conservação a 4°C. Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.



Face aos resultados obtidos visualmente, decidiu-se manter os frutos em câmara por um período mais prolongado e proceder à contagem objetiva das unidades formadoras de colónias.

A Tabela 6.4 apresenta os valores relativos à contagem de unidades formadoras de colónias por grama de produto obtidos ao 7º e 22º dia de armazenamento.

**Tabela 6.4.** Unidades formadoras de colónias por grama de produto (UFC/g) obtidas ao 7º e 22º dia do ensaio de conservação a 4 °C.

Amostra	dia 7	dia 22
R	$4,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$
RC	<100	<100
RCE	<100	$2,0 \times 10^2$

Legenda: R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja.

Os dados confirmam a atividade antifúngica dos filmes RC e RCE observada visualmente ao 7º dia de conservação e verifica-se que este efeito se mantém durante pelo menos 22 dias.

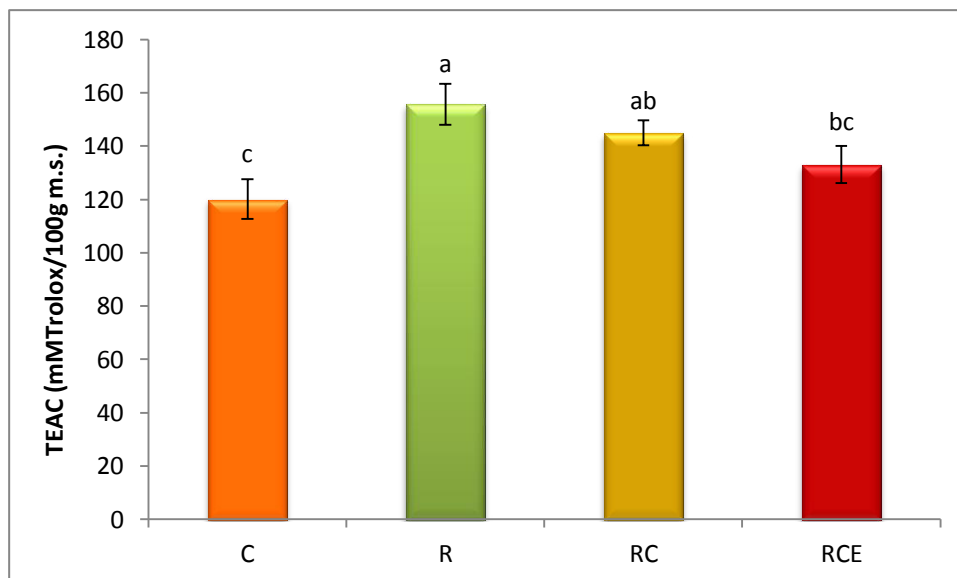
- **Atividade antioxidante das cerejas**

No final do ensaio de conservação compararam-se as cerejas do controlo com os frutos com revestimento no que respeita à atividade antioxidante.

A atividade antioxidante foi expressa em TEAC (mMTrolox/100g m.s.) (Fig. 6.12). Todas as amostras, controlo e revestidas, apresentaram atividade antioxidante.

As propriedades antioxidantes do quitosano e seus derivados já foram estudadas e muitos alimentos podem beneficiar destas características quando o quitosano é usado sob a forma de película (Moradi *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante do revestimento RCE, embora superior ao controlo, não difere significativamente das cerejas sem revestimento, variedade regional Saco. Apesar dos extratos aquosos de carqueja apresentarem elevada atividade antioxidante, a sua aplicação como revestimento não aumentou significativamente a atividade antioxidante dos frutos. Porém, este estudo indica que poderá ser possível aumentar a atividade antioxidante dos frutos com a aplicação de revestimentos comestíveis bioativos com base de quitosano.



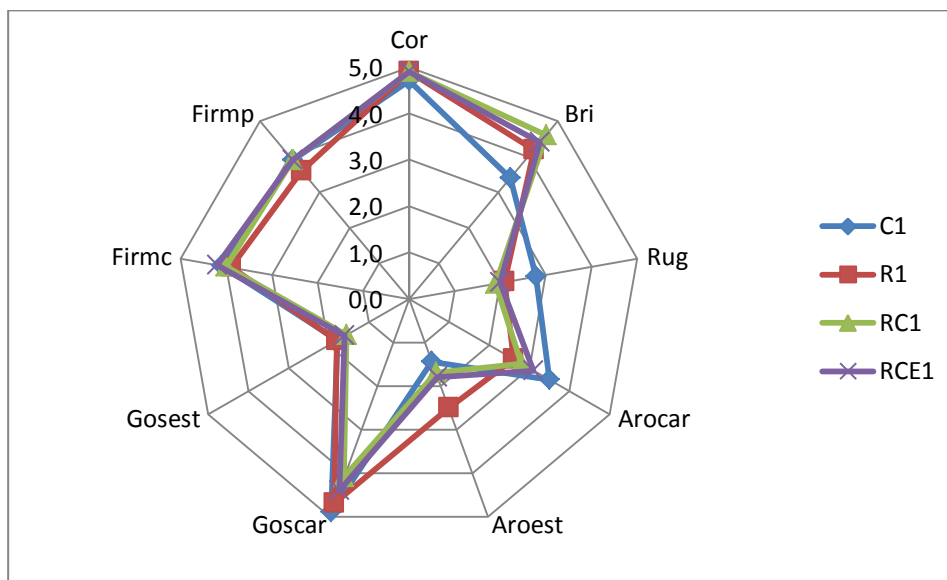
**Figura 6.12.** Atividade antioxidante das cerejas no final do período de armazenamento a 4 °C. Legenda: C - controlo, frutos sem revestimento (cerejas da variedade regional Saco); R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja. Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Usenik *et al.* (2008) no seu trabalho com 13 diferentes cultivares de cereja concluíram que a atividade antioxidante em diferentes cultivares pode apresentar variabilidade e, se para algumas cultivares depende dos compostos fenólicos presentes, para outras depende das antocianinas e também de outros compostos. No caso da cultivar Ferrador obtiveram elevada atividade antioxidante mas as cerejas apresentaram valores baixos de compostos fenólicos e antocianinas, o que leva a sugerir que a atividade antioxidante depende de diferentes atributos químicos e é específica para cada cultivar.

#### 6.4.2.2. Avaliação sensorial

A avaliação sensorial ao 1º dia (Fig. 6.13), 4º dia (Fig. 6.14), 7º dia (Fig. 6.15), 11º dia (Fig. 6.16) e ao 13º dia de ensaio (Fig. 6.17) para os atributos: aparência, aroma, gosto e textura permitem verificar, no geral, a existência de alguma homogeneidade nas classificações.

Relativamente à homogeneidade da cor, os provadores, na escala de 1 a 6, atribuíram o valor mais baixo (4,0) ao controlo no dia 13 e o valor mais elevado (4,9) a todos os frutos revestidos no dia 1. De referir que neste atributo, os provadores atribuíram pontuação de forma semelhante a todas as amostras já que as médias não apresentaram diferenças significativas.

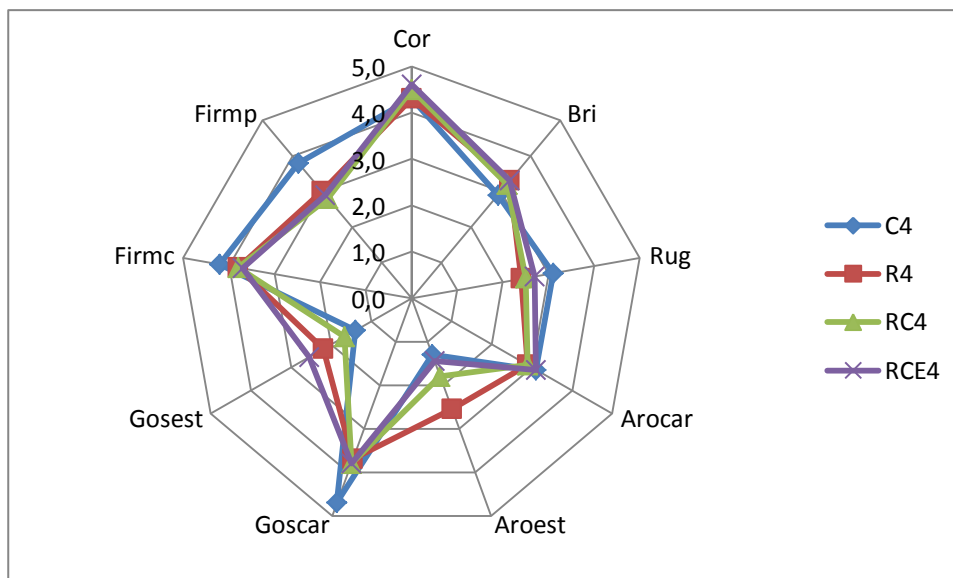


**Figura 6.13.** Avaliação sensorial das cerejas ao 1º dia de armazenamento a 4 °C.

Legenda: C1 - controlo, frutos sem revestimento no 1º dia do ensaio de conservação; R1 - frutos com revestimento de quitosano no 1º dia do ensaio de conservação; RC1 - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha no 1º dia do ensaio de conservação; RCE1 - frutos com revestimento de quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja no 1º dia do ensaio de conservação.

Bri - brilho; Rug - rugosidade; Arocar - aroma característico; Aroest - aroma estranho; Goscar - gosto característico; Gosest - gosto estranho; Firmc - firmeza da cutícula; Firmp - firmeza da polpa.

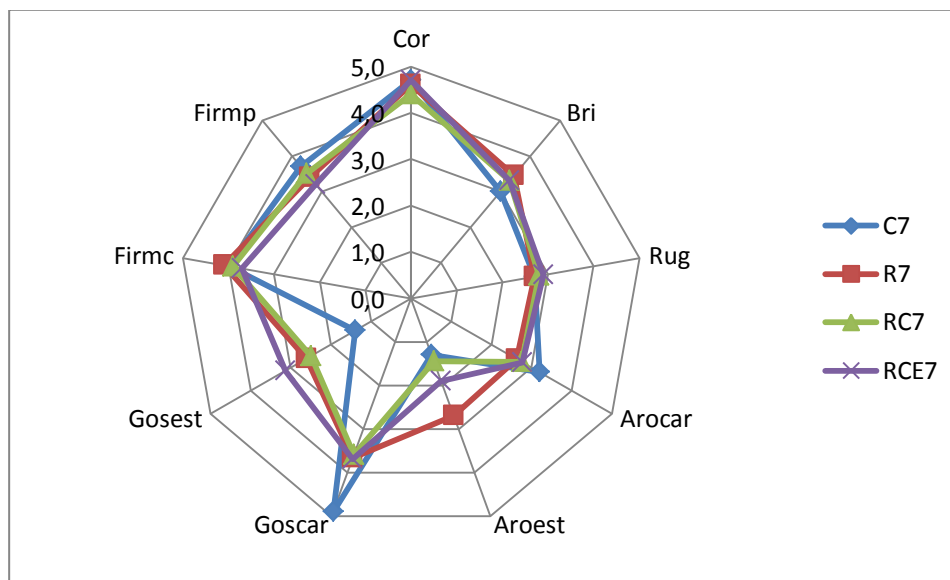
No caso do brilho os valores oscilaram entre 2,5 atribuído ao controlo no último dia de ensaio e o valor 4,6 atribuído ao RC no primeiro dia. Os valores atribuídos a partir do 1º dia não foram significativamente diferentes. Apenas no 1º dia o brilho de RC foi considerado superior e significativamente diferente do controlo. Em média pode-se afirmar que as amostras com revestimento apresentaram classificações superiores ao controlo.



**Figura 6.14.** Avaliação sensorial das cerejas ao 4º dia de armazenamento a 4 °C.

Legenda: C4 - controlo, frutos sem revestimento no 4º dia do ensaio de conservação; R4 - frutos com revestimento de quitosano no 4º dia do ensaio de conservação; RC4 - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha no 4º dia do ensaio de conservação; RCE4 - frutos com revestimento de quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja no 4º dia do ensaio de conservação.

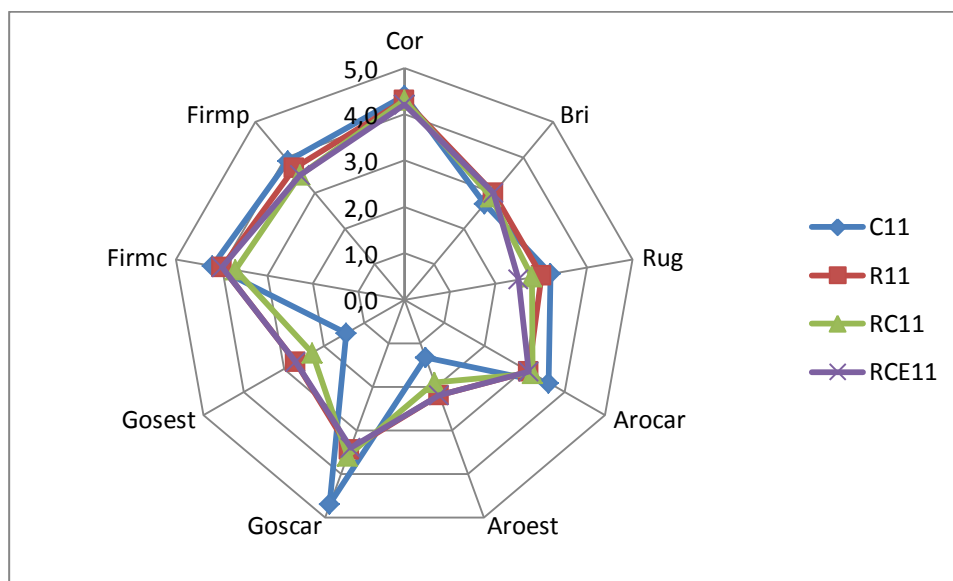
Bri - brilho; Rug - rugosidade; Arocar - aroma característico; Aroest - aroma estranho; Goscar - gosto característico; Gosest - gosto estranho; Firmc - firmeza da cutícula; Firmp - firmeza da polpa.



**Figura 6.15.** Avaliação sensorial das cerejas ao 7º dia de armazenamento a 4 °C.

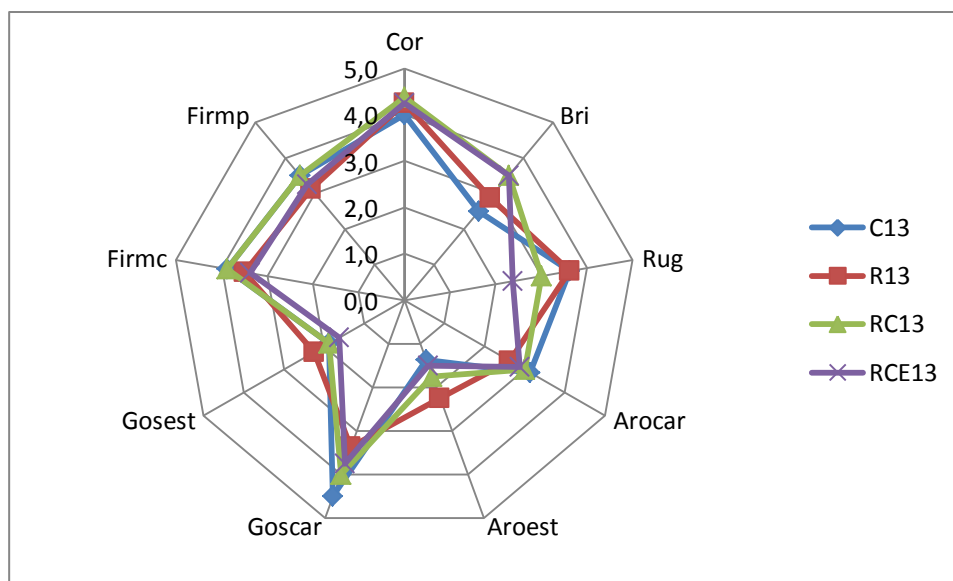
Legenda: C7 - controlo, frutos sem revestimento no 7º dia do ensaio de conservação; R7 - frutos com revestimento de quitosano no 7º dia do ensaio de conservação; RC7 - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha no 7º dia do ensaio de conservação; RCE7 - frutos com revestimento de quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja no 7º dia do ensaio de conservação.

Bri - brilho; Rug - rugosidade; Arocar - aroma característico; Aroest - aroma estranho; Goscar - gosto característico; Gosest - gosto estranho; Firmc - firmeza da cutícula; Firmp - firmeza da polpa.



**Figura 6.16.** Avaliação sensorial das cerejas ao 11º dia de armazenamento a 4 °C.

Legenda: C11 - controlo, frutos sem revestimento no 11º dia do ensaio de conservação; R11 - frutos com revestimento de quitosano no 11º dia do ensaio de conservação; RC11 - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha no 11º dia do ensaio de conservação; RCE11 - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja no 11º dia do ensaio de conservação. Bri - brilho; Rug - rugosidade; Arocar - aroma característico; Aroest - aroma estranho; Goscar – gosto característico; Gosest - gosto estranho; Firmc - firmeza da cutícula; Firmp - firmeza da polpa.



**Figura 6.17.** Avaliação sensorial das cerejas ao 13º dia de armazenamento a 4 °C.

Legenda: C13 - controlo, frutos sem revestimento no 13º dia do ensaio de conservação; R13 - frutos com revestimento de quitosano no 13º dia do ensaio de conservação; RC13 - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha no 13º dia do ensaio de conservação; RCE13 - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja no 13º dia do ensaio de conservação. Bri - brilho; Rug - rugosidade; Arocar - aroma característico; Aroest - aroma estranho; Goscar – gosto característico; Gosest - gosto estranho; Firmc - firmeza da cutícula; Firmp - firmeza da polpa.

Para a rugosidade o valor mais baixo foi atribuído às amostras RC no 1º dia (1,9) e o valor mais elevado ao controlo e amostras com revestimento de quitosano no dia 13 (3,6). No entanto, comparando o controlo e as amostras com os diferentes revestimentos em cada dia de avaliação, pode-se afirmar que os valores não apresentam diferenças significativas. Em média as classificações mais baixas de rugosidade foram obtidas nas cerejas com revestimento.

No parâmetro aroma característico foi atribuído o valor mais baixo (2,6) aos frutos com revestimento de quitosano no 1º, 7º e 13º dia e o valor mais elevado (3,6) ao controlo no dia 11. Tal como no atributo rugosidade, avaliando em cada dia os valores não diferem significativamente.

Para a característica aroma estranho o controlo no dia 4, 7 e 11º obteve a classificação mais baixa de 1,3 e os frutos com revestimento de quitosano ao 7º dia obtiveram 2,7. No 1º, 11º e 13º dia não houve diferenças significativas entre os valores, mas comparando no 4º e 7º dia, o controlo e restantes revestimentos, verifica-se que os provadores classificaram o controlo e os frutos com revestimento com quitosano com valores significativamente diferentes, ou seja, o revestimento à base de quitosano imprimiu algum aroma.

Quanto ao gosto característico para R11, R13 e RCE ao 11º dia foi atribuída a classificação mais baixa de 3,4 e a pontuação mais elevada (4,9) foi atribuída ao controlo no 1º e 7º dia de avaliação. Ao longo das avaliações os valores não diferem significativamente, exceto no dia 11 em que o controlo difere significativamente do RCE, ou seja possui gosto característico mais acentuado.

A pontuação mais baixa para a característica gosto estranho foi atribuída ao controlo nos dias 4, 7 e 11 e a pontuação mais alta ao RCE no 7º dia. Para cada dia de avaliação comparando o controlo e restantes revestimentos os valores não diferem significativamente.

A firmeza da cutícula oscilou entre os valores de 3,4 para RCE ao 13º dia e 4,2 para o controlo no dia 4 e 11 e também para RCE no 1º dia.

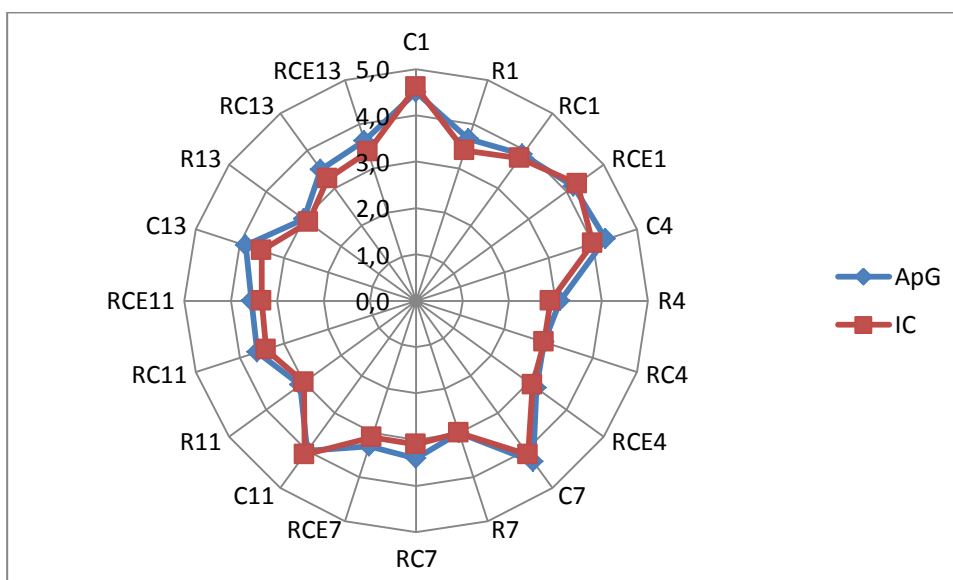
Relativamente à firmeza da polpa o valor mais baixo (2,8) foi para RC ao 4º dia e o valor mais alto (3,9) foi distribuído entre o controlo no 1º e 11º dia, RC e RCE também no 1º dia de ensaio.

Quer para a firmeza da cutícula quer na firmeza da polpa, em cada dia de avaliação comparando o controlo e os diferentes revestimentos os valores não diferem significativamente.

A apreciação global obteve a classificação mais baixa para o RC no 4º dia (2,9) e a apreciação global mais favorável, como seria espectável, foi atribuída ao controlo no 1º dia (4,5) (Fig. 6.18). Nesta apreciação não houve diferenças significativas exceto no dia 7 em

que o controle apresentou uma apreciação global significativamente diferente dos valores dos revestimentos.

A intenção de compra obteve a pontuação mínima (2,9) nos revestimentos R e RC ao 4º dia e a pontuação máxima (4,6) para o controle no 1º dia de ensaio (Fig. 6.18). Para cada dia de avaliação, a comparação entre o controle e os revestimentos aplicados não apresentou diferenças significativas.



**Figura 6.18.** Apreciação global e intenção de compra em cada uma das datas de avaliação.

Legenda: ApG – apreciação global; IC – intenção de compra. C - controle, frutos sem revestimento; R - frutos com revestimento de quitosano; RC - frutos com revestimento de quitosano e cera de abelha; RCE - frutos com revestimento quitosano, cera de abelha e extrato de carqueja. Os números 1, 4, 7, 11 e 13 a seguir às letras indicam os dias do ensaio de conservação a 4 °C.

A apreciação conjunta de todos os dados da avaliação sensorial realizada neste trabalho permite concluir que os revestimentos aplicados não têm impacto negativo nos atributos estudados, ou seja, os revestimentos, no geral, não alteram significativamente os parâmetros sensoriais.

## 6.5. Considerações intercalares

A aplicação de revestimentos comestíveis bioativos à base de quitosano, cera de abelha e extrato aquoso de carqueja proporcionou melhorias na qualidade dos frutos armazenados em condições refrigeradas. Os revestimentos promoveram uma menor perda de massa e um menor desenvolvimento de bolores e leveduras, não afetando a aceitabilidade sensorial por parte dos consumidores.

## 6.6. Referências bibliográficas

- Aday, M.S. & Caner, C. (2010). Understanding the effects of various coatings in the storability of fresh cherry. *Packaging Technology and Science*, 23, 441-456.
- Alique, R., Zamorano, J.P., Martínez, M.A. & Alonso, J. (2005). Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelf-life of sweet cherry, type picota cv "Ambrunés". *Postharvest Biology and Technology*, 35, 153-165.
- Barrett, D.M., Beaulieu, J.C. & Shewfelt, R. (2010). Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 369-89.
- Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. San Diego.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N. & Flores, S.K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 849-875.
- Chand-Goyal, T. & Spotts, R.A. (1996). Postharvest biological control of blue mould of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control*, 6, 253-259.
- Cinelli, P., Schmid, M., Bugnicourt, E., Wildner, J., Bazzichi, A., Anguillesi, I. & Lazzeri, A. (2014). Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 151-157.
- Conte, A., Scrocco, C., Lecce, L., Mastromatteo, M. & Del Nobile, M.A. (2009). Ready-to-eat cherries: Study on different packaging systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 564-571.
- Cunha, M., Fernandes, B., Covas, J.A., Vicente, A.A. & Hilliou, L. (2015). Film blowing of PHBV blends and PHBV-based multilayers for the production of biodegradable packages. *Journal of Applied Polymer Science*, 42165.
- Dhall, R.K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435-450.
- Dutta, P., Tripathi, S., Mehrotra, G. & Dutta, J. (2009). Review: perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Elsabee, M.Z. & Abdou, E.S. (2014). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.
- Espitia, P.J., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R.J., Soares, N.F. & McHugh, T.H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287-296.
- Esti, M., Cinquanta, L., Sinesio, F., Moneta, E. & Di Matteo, M. (2002). Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry*, 76, 399-405.
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A. & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 292-303.
- Ferreira, A.R.V., Torres, C.A.V., Freitas, F., Reis, M.A.M., Alves, V.D. & Coelho, I.M. (2014). Biodegradable films produced from the bacterial polysaccharide FucoPol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 111-116.
- Gonçalves, B., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E. & Meyer, A.S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 103, 976-984.
- Instituto Nacional de Estatística, I.P. (2013). *Estatísticas Agrícolas 2012*.



- Jacxsens, L., Devlieghere, F., De Rudder, T. & Debevere, J. (2000). Designing equilibrium modified atmosphere packages for fresh-cut vegetables subjected to changes in temperature. *Food Science and Technology*, 33, 178-187.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P. & Chiralt, A. (2012). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2058–2076.
- Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Falé, P., Lino, A.R.L., Serralheiro, M.L.M. & Araújo, M.E.M. (2010). Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 331–336.
- Li, T., Hu, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J. & Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenols and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control*, 25(1), 101–106.
- Lim, R., Stathopoulos, C.E. & Golding, J.B. (2011). Effect of edible coatings on some quality characteristics of sweet cherries. *International Food Research Journal*, 18(4), 1237-1241.
- Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerro-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., Yépiz-Gómez, M.S. & Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315.
- Martínez-Romero, D., Alburquerque, N., Valverde, J.M., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D. & Serrano, M. (2006). Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by *Aloe vera* treatment: A new edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 93-100.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J. & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 477-484.
- Moraes, K.S., Fagundes, C., Melo, M.C., Andreani, P. & Monteiro, A.R., 2012. Conservation of Williams pear using edible coating with alginate and carrageenan. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32, 679-684.
- NP 3277-1 (1987) – Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 37° C.
- NP EN 12143 (1999) - Norma portuguesa: Sumos de frutos e de produtos hortícolas: Determinação do teor de sólidos solúveis: Método refratométrico. IPQ, 2000. Monte da Caparica. 12p.
- Olivas, G.I. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 657-670.
- Oun, A.A. & Rhim, J.-W. (2015). Preparation and characterization of sodium carboxymethyl cellulose/cotton linter cellulose nanofibril composite films. *Carbohydrate Polymers*, 127, 101-109.
- Pavlat, A.E. & Orts, W. (2009). *Edible Films and Coatings: Why, What and How?* In Edible Films and Coatings for Food Applications. Huber, K.C. & M.E. Embuscado (Eds.). Springer. New York. 1-23.
- Remón, S., Venturini, M.E., Lopez-Buesa, P. & Oria, R. (2003). Burlat cherry quality after long range transport: Optimisation of packaging conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4, 425-434.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M. & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 373-386.
- Rižnar, K., Čelan, Š., Knez, Ž., Škerget, M., Bauman, D. & Glaser, R. (2006). Antioxidant and antimicrobial activity of Rosemary extract in chicken frankfurters. *Journal of Food Science*, 71, C425–C429.
- Romanazzi, G., Nigro, F. & Ippolito, A. (2008). Effectiveness of a short hyperbaric treatment to control postharvest decay of sweet cherries and table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 440-442.

- Romanazzi, G., Gabler, F.M., Margosan, D., Mackey, B.E. & Smilanick, J.L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99(9), 1028-36.
- Romanazzi G., 2010. *Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries*. In Fresh Produce - Special Issues: New trends in postharvest management of fresh produce. Sivakumar, D. (Ed.). Vol. 4. p. 111-115.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. & Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16.
- Serra, A.T., Duarte, R.O., Bronze, M.R. & Duarte, C.M.M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125(2), 318-325.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F. & Valero, D. (2005). The use of antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 115-123.
- Silva, M.L. & Alarcão, A. (1999). Características físico-químicas e utilizações agro-alimentares da cereja e da ginja. *Revista de Ciências Agrárias*, 21(3), 127-152.
- Siripatrawan, U. & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27, 102–108.
- Tian, S.P., Jiang, A.L., Xu, Y. & Wang, Y.S. (2004). Responses of physiology and quality of sweet cherry fruit to different atmosphere in storage. *Food Chemistry*, 87, 43-49.
- Usenik, V., Fabcic, J. & Stampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107, 185-192.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536-547.
- Vursavus, K., Kelebek, H. & Selli, S. (2006). A study on some chemical and physicomechanic properties of three sweet cherry varieties (*Prunus avium* L.) in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 74, 568-575.
- Zhu, G., Sheng, L., Li, J. & Tong, Q. (2013). Preparation and characterization of gellan/pullulan composite blend films. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 2683–2687.

***Conclusões gerais  
e perspectivas futuras***

---



## 7. Conclusões gerais e perspetivas futuras

---

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização e valorização de uma espécie muito disseminada na região da Beira Interior, a *Pterospartum tridentatum*, de nome vulgar carqueja.

Realizou-se o **estudo etnobotânico** que permitiu documentar e confirmar o valor que a carqueja ainda possui nos locais em estudo. A carqueja continua a ser utilizada quer para fins culinários quer como planta medicinal, em especial para problemas digestivos, sendo preparada como tisana.

A *Pterospartum tridentatum* não é cultivada, sendo a colheita realizada em populações naturais, justificando a necessidade de avaliar o impacto desta atividade de forma a manter a sustentabilidade destes recursos. Deste modo, estudou-se, pela primeira vez, a propagação desta espécie em condições *ex situ*, por **micropropagação**, na tentativa de multiplicar o material vegetal e, em simultâneo, estudar o seu potencial fitoquímico comparativamente ao das plantas silvestres.

Foi possível estabelecer o material vegetal em condições *in vitro* e os resultados obtidos mostram que esta metodologia de propagação foi otimizada, quer em fase de multiplicação quer em fase de enraizamento, com a vantagem de manter o material vegetal saudável e utilizando um espaço relativamente pequeno. A metodologia utilizada permitiu uma elevada proliferação em condições *in vitro*, podendo este protocolo ser aplicado para a sua propagação clonal em larga escala já que os gomos axilares são tidos como os mais seguros na manutenção da integridade genética. A metodologia de enraizamento *ex vitro* utilizada mostrou ser altamente eficaz na indução de rizogénese. Para os tempos de exposição e concentrações utilizadas as percentagens de enraizamento garantiram sempre valores de enraizamento superiores a 96%, apresentando raízes alongadas, morfológicamente finas e com abundantes ramificações secundárias, determinantes para a formação de raízes funcionais.

Dado o carácter predominantemente lenhoso da carqueja, bem como a necessidade de dispor dos constituintes bioativos numa forma mais concentrada e de utilização controlada, procedeu-se à obtenção e caracterização dos respetivos **extratos aquosos**, sendo possível concluir:

- O local de colheita, bem como a fase do ciclo vegetativo não influenciam significativamente o rendimento de extração pelo que a colheita pode ser efetuada em qualquer dos locais em estudo, serras da Malcata ou Gardunha e em qualquer época do ano o que constitui uma vantagem sob o ponto de vista industrial;

- Na época de floração, a utilização da planta inteira poderá ser vantajosa permitindo uma poupança em termos de mão-de-obra;
- O material vegetal micropropagado, em especial de origem Gardunha, apresentou rendimentos de extração significativamente superiores aos das plantas silvestres independentemente da origem e fase do ciclo vegetativo à colheita;
- A glucose e os ácidos urónicos são os monossacáridos maioritários dos extratos, sendo que nas plantas silvestres a glucose é o açúcar predominante, independentemente do local e época de colheita e nos extratos do material micropropagado a ramnose e os ácidos urónicos são os principais componentes. Estes dois açúcares são considerados raros, o que pode tornar as plantas que os sintetizam, uma fonte interessante para o seu isolamento e produção.
- Os extratos das plantas silvestres, independentemente do local e época de recolha, bem como do material vegetal micropropagado, apresentaram elevada atividade antioxidante.
  - A atividade antioxidante evidenciada é devida ao elevado teor fenólico: entre 200 e 370 mg equiv. ácido gálico/g m.s. no caso dos extratos das plantas silvestres e entre 104 a 121 mg equiv. ácido gálico/g m.s. no caso dos extratos de material vegetal micropropagado;
  - As diferenças observadas nos teores fenólicos não se refletem de forma linear na atividade antioxidante: os extratos do material vegetal micropropagado evidenciam uma atividade antioxidante elevada, semelhante aos extratos das plantas silvestres no repouso, apresentando um menor teor de fenólicos. Este facto prende-se com diferenças no perfil fenólico dos extratos. Os perfis fenólicos dos extratos do material micropropagado apresentam uma maior semelhança com os das plantas silvestres na época de repouso independentemente da origem.
- Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana relativamente a:
  - *Bacillus subtilis* independentemente do extrato. A concentração mínima inibitória variou de 20 000 a 60 000 ppm;
  - *Pseudomonas aeruginosa* (>10000 ppm) e *Staphylococcus aureus* (>60000 ppm) - só os extratos da flor de origem Malcata revelaram atividade. Este facto poderá estar relacionado com a diferente composição fenólica na época da floração, nomeadamente com a presença de isoquercetina, apenas presente nesta fase.

A incorporação de extratos aquosos de carqueja em **revestimentos comestíveis** à base de quitosano e cera de abelha, reforçou as funções destes na melhoria da conservação pós-colheita de cereja. Estes revestimentos bioativos promoveram uma menor

perda de massa e um menor desenvolvimento de bolores e leveduras, não afetando a qualidade sensorial dos frutos.

Este estudo contribuiu para a compilação de conhecimento sobre a *Pterospartum tridentatum*, para a preservação da biodiversidade e para a manutenção da identidade local e do património cultural.

A valorização dos extratos de carqueja micropropagada como fonte de antioxidantes naturais e açúcares raros para a indústria alimentar e/ou farmacêutica apresenta um elevado potencial, podendo contribuir para o desenvolvimento rural sustentável.

Dado que os resultados obtidos se afiguram no geral promissores, seria de todo o interesse prosseguir esta linha de investigação nomeadamente:

- Relativamente à **micropropagação** com o objetivo de aumentar as taxas de multiplicação, seria de grande importância o estudo do comportamento desta espécie em sistemas de propagação em biorreatores de imersão temporária aumentando, assim, a disponibilidade de material vegetal possível de utilizar para a extração dos compostos bioativos.
- No que respeita a **extração** impõe-se testar outras condições menos degradativas e energeticamente menos dispendiosas, com tempos mais curtos e temperaturas mais baixas. Testar a utilização de ultrassons e fontes térmicas alternativas como micro-ondas.
- Proceder à identificação de todo o perfil fenólico.
- Testar outras aplicações dos extratos, incorporados em **revestimentos bioativos** ou noutras formas.
- Testar estes revestimentos em frutos/hortícolas suscetíveis à oxidação.

Pensando numa utilização industrial seria imprescindível proceder ao estudo económico da produção de material vegetal e da extração.





---

***ANEXOS***

---



---

## ***ANEXO 1***

### ***Inquérito de etnobotânica***

---



## INQUÉRITO DE ETNOBOTÂNICA

Inquérito n.º \_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Identificação do Inquirido

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ Sexo: M ☐ F ☐

Localidade: \_\_\_\_\_ Freguesia: \_\_\_\_\_ Distrito: \_\_\_\_\_

#### Habilitações académicas

Não sabe ler nem escrever ☐ Primário ☐ Preparatório ☐

Secundário ☐ Superior ☐ Outros ☐ Área \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

### Informação Sobre o Conhecimento da Planta

Nome (s) Vulgar, para além de Carqueja: \_\_\_\_\_

Conhece: Sim ☐ Não ☐

#### Como Conheceu?

TV ☐ Através de Familiares ☐ Livros ☐ Revistas ☐

Através de pessoas da comunidade ☐ Outros ☐ Quais? \_\_\_\_\_

Utiliza: Sim ☐ Não ☐

Raramente utiliza ☐ Utiliza Moderadamente ☐ Utiliza Frequentemente ☐

## *Usos da Planta*

### Partes da Planta que utiliza?

Raiz ☐ Caule ☐ Folha ☐ Flor ☐ Fruto ☐ Toda a Planta ☐

Onde apanha a planta? \_\_\_\_\_

Em que época do ano apanha a planta? \_\_\_\_\_

Como conserva a Planta? \_\_\_\_\_

### Para que fins apanha a Planta?

Medicinal ☐ Aromática ☐ Culinária ☐

Ornamental ☐ Cosmética ☐ Outras ☐

Quais? \_\_\_\_\_

### Preparação:

Chá/Tisana ☐ Vapores/Gotas ☐ Banhos/ Lavagens ☐ Xaropes ☐ Outros ☐

Quais? \_\_\_\_\_

Usa com outras Plantas? Sim ☐ Não ☐

Quais? \_\_\_\_\_

### Modo de Preparação / Receitas:

---

---

---

### Conhece algum provérbio, lenda, música ou reza relacionada com esta Planta?

Não ☐ Sim ☐ Quais? \_\_\_\_\_

Finalidade: Uso Doméstico ☐ Comércio ☐

Obrigada pela sua colaboração 😊

---

## ***ANEXO 2***

### ***Guião do inquérito de etnobotânica***

---





## **Guião do Inquérito/entrevista**

### **Lista de conteúdos para abordar e registar informação**

#### **1. Identificação do informante**

- Nome
- Idade
- Sexo
- Localidade, freguesia, distrito
- Habilitações académicas (não sabe ler nem escrever; ensino primário; ensino preparatório; ensino secundário; ensino superior; outro tipo de formação; área de formação).

#### **2. Conhecimento da planta silvestre e seus usos**

- Nome vulgar (outro nome vulgar pelo qual é conhecida a planta).
- Conhece a planta (se é o próprio informante que a conhece ou porque contacta com ela lá em casa e são os familiares diretos que a utilizam).
- Como a conheceu (pela televisão, através dos familiares, pelos livros, revistas, através de pessoas da comunidade, todos estes ou outros. No caso de escolher “outros”, referir quais).
- Saber se o informante a utiliza e com que frequência (raramente, ou seja menos de uma vez por semana; moderadamente, ou seja, pelo menos uma vez por semana; frequentemente, ou seja, duas a três vezes por semana).
- Qual a parte da planta que utiliza (raiz, caule, folha, flor, fruto ou toda a planta).
- Local onde colhe a planta (no quintal, perto de casa, no campo... Tentar perceber se é autóctone, se se lembra dela desde que era criança, ou se os avós já a colhiam...).
- Época do ano em que faz a colheita
- Conservação da planta (saber se a utiliza em verde ou se a seca. Tentar saber como faz a secagem e como a armazena posteriormente).
- Quais os fins a que se destina a colheita (medicinal, aromática, utilização em pratos de culinária, ornamental, cosmética ou outras utilizações).  
No caso do uso medicinal tentar saber qual a indicação terapêutica:
  - Aparelho digestivo: espasmos, flatulência, diarreia, prisão de ventre, parasitas, purgantes, para vômitos, hemorroidas, estômago, digestivo, outras;
  - Aparelho circulatório: circulação, hipertensão, colesterol, coração, hemorragias, outras;
  - Aparelho respiratório: gripe, constipação, tosse, catarro, dor de garganta, pneumonia, asma, outras;

- Aparelho excretor: diurético, doenças dos rins e bexiga;
- Aparelho reprodutor: para doenças ginecológicas femininas e masculinas, abortivo, outras;
- Reumatismo, dores musculares, articulações;
- Picadas de insetos, mordedura de animais, doenças de pele, acne, feridas, desinfetante, cicatrizante;
- Diabetes, febre, avitaminoses;
- Depressão, dor de cabeça, calmante;
- Outras.

Para cosmética (perceber se é utilizado para cremes, perfumes ou outros fins).

Para culinária (quais os pratos em que se utiliza, se serve para aromatizar bebidas, condimentar o quê, que outras utilizações).

Tentar saber outros fins a que se destina o seu uso.

- Como a utiliza.  
Em chá/tisana; vapores/gotas; banhos/lavagens; xaropes; outros.
- Quando utiliza a planta mistura ou não com outras. Se misturar tentar saber quais.
- Tentar conhecer outros modos de preparação e/ou receitas onde seja utilizada.
- Estimular o informante a lembrar-se de algum provérbio, lenda, música, reza ou outros, relacionados com esta planta silvestre.
- Saber se comercializa a planta ou se é apenas para uso doméstico.
- Por último, sugerir ao inquirido, que caso se lembre de algo importante pode sempre complementar a informação.

---

## ***ANEXO 3***

### ***Composição do meio de cultura MS***

---



## Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)

### Macronutrientes

mg L<sup>-1</sup>

KNO <sub>3</sub>	1900,000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,000
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	170,000
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	1650,000

### Micronutrientes

SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O	27,850
Na <sub>2</sub> EDTA	37,250

Mn SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250

### Vitaminas

Tiamina HCl	0,1
Ác. nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2,0
mio-inositol	100,0



---

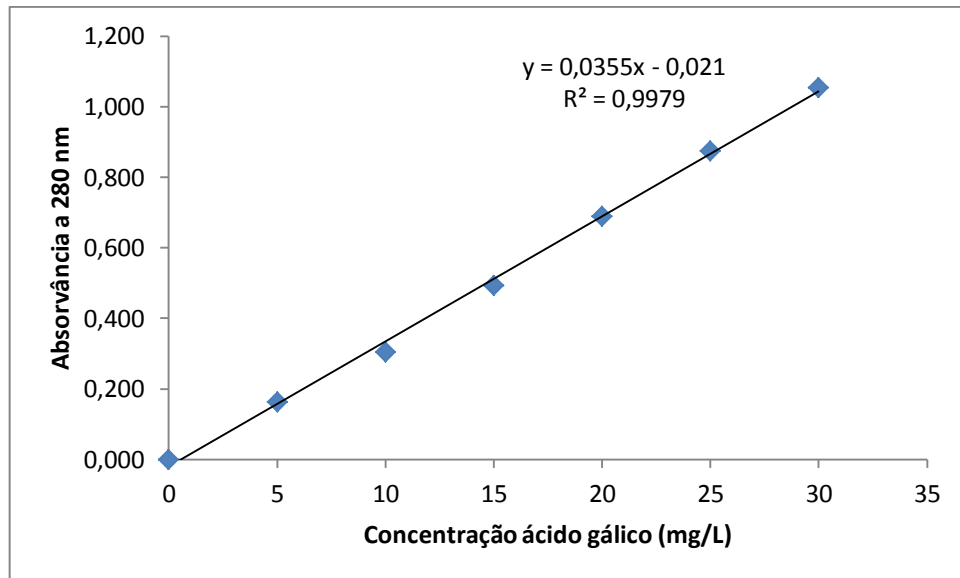
## ***ANEXO 4***

### ***Curvas de calibração***

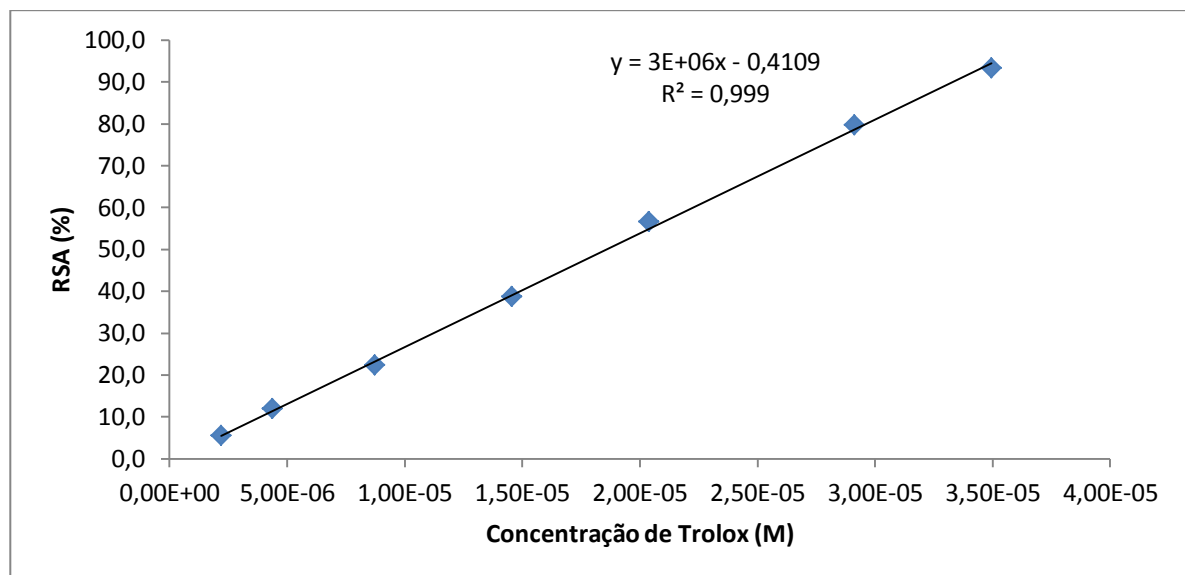
---



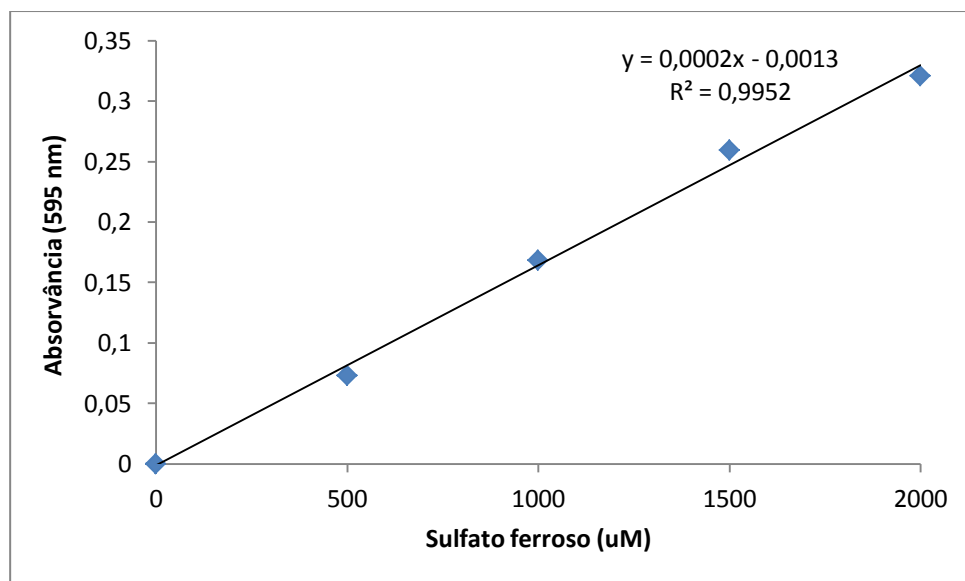




**Figura 1.** Curva de calibração de ácido gálico.



**Figura 2.** Curva de calibração de Trolox.



**Figura 3.** Curva de calibração de sulfato ferroso.

---

## ***ANEXO 5***

### ***Metodologia de análise de açúcares neutros***

---



## • **Análise de Açúcares Neutros**

### **Hidrólise**

- Foram pesados 2-3mg de amostra para um tubo soviril.
- Adicionaram-se 200µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%.
- Foi deixado a reagir durante 3h à temperatura ambiente com agitação ocasional.
- Adicionaram-se 2,2 mL de água destilada, mexendo.
- Incubou-se durante 2,5h a 100°C. Após 1h de reação retirou-se 0.5mL de hidrolisado para os ácidos urónicos e diluiu-se com 3.0 mL de água destilada.
- Foi arrefecido em gelo. Adicionaram-se 200 µL de padrão interno (2-desoxiglucose).

### **Redução**

A 1 mL de hidrolisado foi adicionado:

- 0,2 mL de NH<sub>3</sub> a 25% (Neutralização do ácido)
- 0,1 mL de NH<sub>3</sub> a 3M contendo 150 mg/mL de NaBH<sub>4</sub> (solução preparada na hora). (Redução dos monossacarídeos aos correspondentes alditóis)
- Incubou-se durante 1h a 30°C.
- Foi arrefecido gelo. Adicionou-se 2x 50 µL de ácido acético. (Eliminou-se o excesso de NaBH<sub>4</sub>)

### **Acetilação**

- A 0,3 mL de solução, adicionou-se (em banho de gelo):
  - 0.45 mL de 1-metilimidazol (Catalisador)
  - 3 mL de anidrido acético.
- Foi homogeneizado e incubado durante 30 min a 30°C. Após esse tempo foi arrefecido em gelo.
- Adicionou-se 4,5 ml (3,0) de água destilada (Destruir o excesso de anidrido acético) e 3 mL (2,5) de diclorometano (Extração dos acetatos de alditol)
- Foi agitado vigorosamente e centrifugado a baixa rotação durante 30 s.
- Foi aspirada a fase aquosa.
- Adicionaram-se 3 ml de água destilada e 2 mL (2,5) de diclorometano.
- Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se. Foi aspirada a fase aquosa.
- Adicionaram-se 3 ml de água destilada. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se. Foi aspirada a fase aquosa (Remoção do excesso de anidrido acético).
- Foi transferida a fase orgânica para um tubo Speed-Vac.

- O diclorometano foi evaporado no Speed-Vac.
- Adicionou-se 1 mL de acetona e repetiu-se o processo de evaporação.
- Foi repetido o passo anterior.
- Dissolveu-se em 50  $\mu$ L de acetona e foi armazenado a -20°C.
- Foi analisado por GC, com injeção de 2  $\mu$ L.

---

## ***ANEXO 6***

### ***Determinação de ácidos urónicos***

---





- **Determinação de ácidos urónicos**

- Foram pesados 2-3 mg de amostra para um tubo soviril.
- Adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 72%.
- Deixou-se reagir durante 3 h à temperatura ambiente com agitação ocasional.
- Adicionaram-se 2,2 mL de água destilada, em agitação.
- Foi incubado durante 1 h a 100°C.
- Retirou-se 0,5 mL de hidrolisado e foi diluído em 3 mL de água destilada.
- Colocaram-se 3 mL de solução 12,5 mM de borato de sódio em ácido sulfúrico concentrado, em tubos de ensaio (3 por amostra) arrefecidos em gelo.
- Em triplicado, adicionou-se 0,5 mL de solução de amostra, fazer o mesmo no caso dos padrões.
- Aqueceram-se os tubos, em água a ferver, durante 10 m e deixou-se arrefecer.
- Foi adicionado a 2 de cada 3 tubos, 100  $\mu\text{L}$  de solução de *m*-fenilfenol (0.15% em NaOH 0.5%).
- Agitou-se fortemente e foi deixado a reagir durante 30m na ausência de luz.
- Foi lida a absorvância a 520 nm, contra o ar.



---

## ***ANEXO 7***

### ***Atividade antimicrobiana (metodologia prévia)***

---



- **Obtenção de esporos de *Monilinia* sp.**

Para obtenção de esporos de *Monilinia* sp. foi utilizado meio PDA mas como se verificou a inexistência de esporulação optou-se pela utilização do extrato de malte para o *Monilinia fructigena* e meio V8 (Norma da FRAC 2006-05) para o *Monilinia laxa*, incubadas a 18 °C, durante 10 a 12 dias com fotoperíodo de 12 horas, segundo a Norma da FRAC 2009-01. Após este período, para confirmar a existência de esporos, retirou-se um quadrado de 0,5 cm de lado que se colocou sobre uma lâmina onde previamente se colocou uma gota de lactofenol. Observou-se ao microscópio com uma ampliação de 400x (Fig. 1).



**Figura 1.** Esporos do bolor de *Monilinia* sp. observados ao microscópio (400 x).

- **Preparação do inóculo bacteriano** (de acordo com a Norma CLSI-M2-A9, 2006)

A partir de colônias isoladas e representativas do microrganismo, presentes em placa de isolamento primário, suspendeu-se em solução salina a 0,85%, de forma a obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) que se utilizou de imediato.

- **Quantificação do inóculo** para confirmação da opacidade da escala de McFarland
- Após preparação da suspensão contabilizou-se o inóculo, diluindo-o e semeando, por incorporação, 1 mL de cada diluição (a partir da suspensão  $10^8$  considerada a suspensão-mãe, foram preparadas uma série de diluições que permitissem contar na placa um número de colônias entre 30 e 300) em placas de Petri com o meio de cultura adequado ao inóculo suspenso;

- Foram adicionados em cada placa, 12 a 15 mL de meio de cultura adequado ao microrganismo em estudo, arrefecido a 44-47 °C e misturado cuidadosamente com o inóculo em movimentos circulares;
- As placas foram incubadas durante o tempo e temperaturas adequados;
- Depois da incubação contaram-se as colónias de cada placa que continham um número inferior a 300. O cálculo do número de unidades formadoras de colónias (UFC) foi efetuado de acordo com a NF EN ISO 7218:2007.
- Para confirmar o inóculo bacteriano (de acordo com a escala 0,5 de MacFarland), calculou-se o número N de microrganismos por mL, sob a forma de média ponderada, a partir de duas diluições sucessivas, segundo a Equação 1:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad (\text{Equação 1})$$

$\sum c$  é a soma das colónias contadas em todas as placas consideradas nas duas diluições sucessivas em que pelo menos uma delas tenha 15 colónias;

V é o volume do inóculo aplicado a cada placa em mililitros;

n1 é o número de placas consideradas da primeira diluição retida para contagem;

n2 é o número de placas consideradas na diluição seguinte;

d é a taxa de diluição correspondente à primeira diluição considerada.

Registou-se como resultado o número de microrganismos por mL.

- **Preparação do inóculo de leveduras** (segundo Norma CLSI - M27-A2, 2002)
- A partir de uma única colónia, foi feita repicagem para novas placas de Petri com meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (DAS), para assegurar a pureza e viabilidade do microrganismo a testar, sendo incubadas a 35 °C, durante 24 horas;
- Preparou-se o inóculo, repicando para um tubo de ensaio com 5 mL de solução salina 0,85%, o número de colónias suficiente de modo a obter uma suspensão com turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (a suspensão comparada ao padrão 0,5 fornece uma suspensão-padrão de leveduras contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL).

## • Preparação da suspensão de esporos de bolores

A preparação da suspensão de esporos a partir de colónias de bolores foi efetuada do seguinte modo:

- As colónias de bolores foram repicadas e incubadas de acordo com as regras referidas na Norma da FRAC 2009-01, para promoção de uma densa esporulação, confirmada com observação microscópica.
- Após esporulação, as colónias de bolores foram cobertas com 1 mL de solução salina a 0,85% e 0,01 mL de Tween 80;
- Removeu-se o bolor da placa de Petri para um novo tubo com 5 mL da mesma solução salina;
- Inicialmente procedeu-se de acordo com a Norma CLSI – M38-A2 (2008), a qual refere aguardar 5 minutos para haver deposição das partículas maiores e retirar a suspensão à superfície para um novo tubo de ensaio esterilizado. Sendo difícil acertar os valores de absorvância optou-se por remover o bolor para frasco com 30 mL de solução salina e procedeu-se à filtração da suspensão (Fig. 2) com 6 camadas de gaze (Alizadeh-Salteh *et al.*, 2010) e confirmou-se, microscopicamente, a presença de esporos (ampliado 400x) (Fig. 3);
- Obtida a suspensão, esta foi ajustada a uma absorvância de 0,15-0,17 num comprimento de onda de 570 nm.



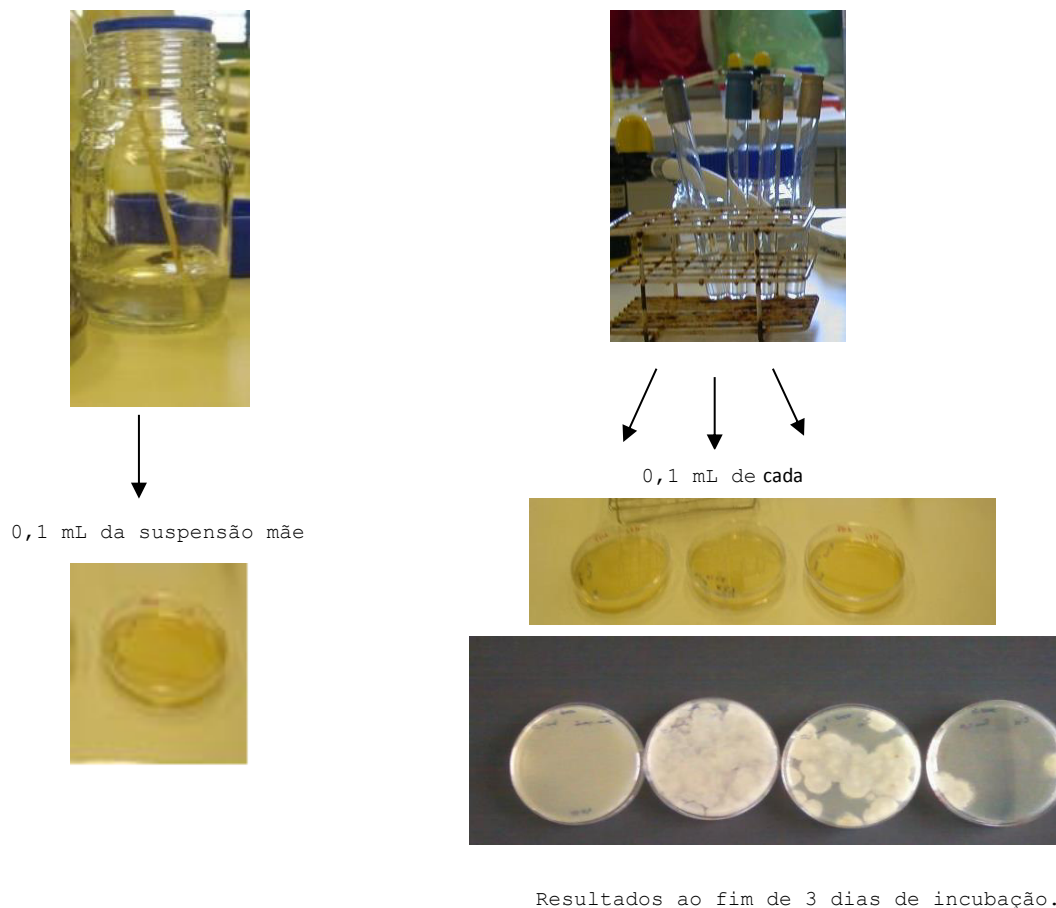
**Figura 2.** Filtração da suspensão de esporos de bolores.



**Figura 3.** Suspensão de esporos após filtração.

- **Quantificação da suspensão de esporos**

A quantificação do inóculo foi confirmada em placa de Petri, retirando 0,1 mL da suspensão mãe e semeando em placa de Petri com meio de cultura PDA. Repetiu-se o mesmo procedimento para as diluições efetuadas (Fig 4). As placas foram incubadas a 25 °C, durante 3 dias, sendo contabilizado o número de colônias para verificar o número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL).



**Figura 4.** Procedimento de quantificação da suspensão de esporos.

Após preparação das placas de Petri com os diferentes meios de cultura: Mueller-Hinton para bactérias; Sabouraud Dextrose Agar para leveduras e PDA para bolores foram riscadas quadrículas, na base, correspondendo cada uma delas, a uma concentração diferente de extrato de carqueja.



---

## ***ANEXO 8***

### ***Identificação de compostos fenólicos***

---



**Tabela 1.** Identificação de compostos no extrato de caules e folhas na época de floração da planta silvestre de origem Gardunha.

Pico	Tr (min)	[M <sup>+</sup> ]	MS/MS (25eV)	MS/MS (40eV)	Identificação
1	8,13	191	191(58%);127(25%);111(20%); 85(100%);59(30%)	-	
		341	179(18%);119(51%);89(100%); 71(16%);59(15%)	-	
		533	191(100%);533(14%)	-	
2	11,55	191	111(90%);87(100%);85(52%)	-	Ácido quinínico
3	13,3	191	111(100%);87(57%);85(41%)	-	Ácido cítrico
4	19,48	359	153(100%);125;359	-	
5	20,07	282	150(100%)	133(100%); 108(92%)	
6	27,00	627	339(59%);627(100%)	-	
7	28,39	465	345(100%);465(18%)	-	
8	28,87	465	345(100%);375(28%);167(17%)	-	
9	29,94	447	152(100%);447(65%)	-	Taxifolina-6-C-glucósido
		465	345(100%);327(68%);317(54%);167 (85%)	-	
10	31,65	579/533	179(100%)/179(100%);119(44%); 89(52%)	90(100%)/89 (100%)	
11	38,67	417	209(100%);307(74%)	-	
12	40,33	593	473(100%);593(56%)	473(100%);282(6 0%);310(51%)	
13	43,27	479	359(100%);479(43%)	359(12%);166(10 0%);167(4%);194 (45%);125(50)	Miricetina-6-C- glucósido
14	43,94	609	-	-	
15	50,04	639	431(100%);639(10%)	431(100%);268 (30%)	
16	51,56	447	327(100%);299(38%);447(7%)	327(24%);299 (100%);149(27%)	
17	52,14	445	280(76%);151(100%)	151(100%)	
		461	461(100%)	295(100%)	
18	53,96	479	359(100%);479(35%)	166(100%);194(5 %);359(29%); 125(47%)	
		463	343(100%)	193(100%); 165(82%)	
20	62,37	415	191(78%);161(69%);149(100%);99 (99%);89(87%);113(56%);119(44%)	99(41%);89(70%; 59(100%)	
21	65,66	431/499	311(100%); 431(46%) /283(100%)	311(75%);283 (100%)	Genisteína-8-C-glucósido
22	69,92	461	341(100%);326(32%);298(49%)	298(100%)	5,5'-di-hidroxi-3'- metoxi-isoflavona-7-O- glucósido
23	72,48	461	341(100%)	-	
24	74,30	445	-	-	
25	77,09	609	300(100%);301(73%)	-	Rutina
26	77,37	463	300(100%);301(4%)	300(58%);271 (100%);255(58%)	Quercetin 3-O- glucoside (Isoquercitrin)
		463	300(100%);301(45%)	300(39%);271 (100%);255(30%)	
27	79,57	463	300(100%);301(45%)	300(39%);271 (100%);255(30%)	Quercetina- 3-O- glucósido (Isoquercetina)
28	80,42	431	268(100%);269(43%)	-	Genistina 1
		269	-	-	
29	83,06	461	-	-	
30	85,08	301	-	-	
31	87,61	431	268(100%);431(18%)	268(100%);267 (39%); 239(17%)	Genistina 2
32	88,83	461	-	-	
33	90,03	461	-	-	
34	93,68	513	393(100%);513(24%)	393(100%);365 (77%);337(73%); 282(80%)	Prunetina
		283	268(100%);283(98%);240(66%)	-	
35	96,45	283	268(100%);283(98%);240(66%)	-	
36	98,56	445	445(100%)	219(100%);175 (60%)	
37	100,84	299	281(100%)	-	7-O-metilorobol

**Tabela 2.** Identificação de compostos no extrato da flor da planta silvestre de origem Malcata.

Pico	Tr (min)	[M <sup>-1</sup> ]	MS/MS	Identificação
1	8,72	191	85(100%);191(53%)	
		341	179(29%);119(45%);89(100%)	
2	11,07	191	-	Ácido quinínico
3	13,38	191	-	Ácido cítrico
4	16,51	366	-	
5	20,02	282	150(87%);133(100%);108(63%)	
6	25,52	465	345;167;125	
7	27,36	627	345(100%)	
8	28,33	465	345(100%);327(58%);167(63%)	
9	28,81	465	345(100%);327(70%);317(72%);167(90%)	
10	29,88	465	345(100%);327(66%);317(40%);167(91%)	Taxifolina-6-C-glucósido
11	36,67	465	375;345;167;125	
12	38,58	269	157	
13	43,14	479	359(100%);479(44%)	Miricetina-6-C-glucósido
14	49,96	639	431(100%)	
15	53,88	479	359(100%);479(34%);167	
16	59,85	463	343(100);463(22%)	
17	66,27	431	311(100%);283	Genisteína-8-C-glucósido
18	70,33	461	341(100%);461(96%)	5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido
19	75,69	609	300(100%)/301	
20	76,91	609	300(100%)/301	Rutina
21	77,73	463	300(100%);301(43%);463(11%)	Quercetina 3-O-glucoside (Isoquercetina)
22	79,14	463	300(100%);301(69%)	Quercetina 3-O-galactósido
23	80,38	431	268(80%);269(100%)	Genistina 1
		269	97(62%);98(100%)	
24	83,45	461	-	
25	87,80	431	268(100%)	Genistina 2
		299	284	
26	88,32	461	-	
27	90,03	461	-	
28	94,43	269	-	
29	98,49	445	-	
30	100,84	299	284(100%);283(49%);255(47%);281(21%)	7-O-metilorobol
31	105	445	283(100%)	Sissotrina
32	106,96	283	-	

---

## ***ANEXO 9***

### ***Ficha de análise sensorial***

---



# Análise Sensorial de Cerejas

Nome: \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Código \_\_\_\_\_

## Aparência

	1	2	3	4	5	6
Cor característica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brilho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Rugosidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Nada intensa				Muito intensa	

## Aroma

	1	2	3	4	5	6
Característico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estranho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Nada intenso				Muito intenso	

## Gosto

	1	2	3	4	5	6
Característico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estranho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Nada intenso				Muito intenso	

## Textura

	1	2	3	4	5	6
Firmeza da cutícula	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Firmeza da polpa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Muito baixa				Muito elevada	

## Apreciação global

	1	2	3	4	5	6
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Não gosto nada				Gosto extremamente	

## Intenção de compra

	1	2	3	4	5	6
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Não compraria				Compraria de certeza	

Comentários:

Muito obrigada pela colaboração