



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sofia Baptista Martins Soares

CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE DE
CYNARA CARDUNCULUS L.
PARA A SUA VALORIZAÇÃO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química – Controlo da Qualidade e Ambiente,
orientada pela Doutora Cláudia Nunes, Universidade de Aveiro,
e pela Professora Doutora Maria João Moreno, Universidade de Coimbra,
e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Junho de 2020

Caracterização das sementes de
Cynara cardunculus L. para a sua valorização

Sofia Baptista Martins Soares



Dissertação no âmbito do Mestrado em Química - Controlo da Qualidade e Ambiente orientado pela Doutora Cláudia Nunes, Universidade de Aveiro e pela Professora Doutora Maria João Moreno, Universidade de Coimbra e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

junho 2020

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Resumo

Cynara cardunculus L., vulgarmente designado de cardo, oriundo da bacia mediterrânica, é utilizado em Portugal na produção de queijo da Serra DOP. O facto de as flores de cardo possuírem uma família de proteases aspárticas – cardosinas, permite a sua utilização como coagulante vegetal. No entanto, desta atividade resultam vários subprodutos (caules, folhas e capítulos com as brácteas, papilhos e sementes). O cardo é reconhecido na medicina popular devido aos seus efeitos hepatoprotetor e coleréticos, assim a sua biomassa, tais como folhas e caules, tem sido alvo de estudo devido à presença de compostos bioativos que podem estar associados às propriedades benéficas para a saúde. No entanto, para as sementes apenas é conhecida a composição do óleo. O objetivo deste trabalho foi a caracterização das sementes do cardo para avaliar o potencial de valorização para aplicação em diferentes indústrias como a alimentar, nutracêutica e cosmética. Neste estudo as sementes foram separadas em duas partes visivelmente diferentes, o miolo (60%) e a casca (40%), que foram sujeitas a extrações sequenciais para a obtenção dos diferentes componentes, nomeadamente compostos lipofílicos, compostos fenólicos e polissacarídeos. Os resultados obtidos demonstram que a casca é constituída por cerca de 21 % em açúcares e 38% em lenhina, já o miolo é rico em gordura (39%) e em proteína (27%). Os óleos obtidos com *n*-hexano (39% miolo e 1% casca) foram analisados quanto o teor em ácidos gordos tendo sido identificado o ácido linoleico como o seu componente maioritário (52-68%), seguido dos ácidos oleico (20-31%), palmítico (10-13%) e esteárico (2-4%). A análise dos derivados silitados também permitiu a identificação de α -tocoferol, estigmasterol e β -sitosterol no óleo do miolo. A caracterização dos polissacarídeos revelou que eram constituídos por (1 \rightarrow 5)-Araf, (1 \rightarrow 3,5)Araf, (1 \rightarrow 2,5)Araf, (1 \rightarrow 4)Glc β , (1 \rightarrow 4,6)Glc β , (1 \rightarrow 2)Xyl β , e (1 \rightarrow 2)Gal β . Estas ligações são características de arabinanas e xiloglucanas. No entanto, a elevada percentagem molar de ramificações como a (1 \rightarrow 3,5)Araf e (1 \rightarrow 2,5)Araf, associada ao teor de compostos fenólicos nestas frações, 9 e 117 mg EAC/g para o EA do miolo e EA da casca, respetivamente, sugerem estruturas sob a forma de complexo entre polissacarídeo-composto fenólico. Este tipo de complexos têm vindo a ser associados pela elevada atividade antioxidante muitas vezes apresentada por polissacarídeos.

Este trabalho demonstrou que as sementes de *Cynara cardunculus* L. são constituídas por compostos com potencial, tais como ácidos gordos, esteróis, compostos fenólicos, proteína e polissacarídeos, que podem ser valorizados para diferentes aplicações devido ao seu potencial biológico, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e ação como preservação cardíaca e neurológica.

Palavras-chave: cardo; subprodutos; compostos lipofílicos; polissacarídeos; compostos fenólicos

Abstract

Cynara cardunculus L., commonly known as cardoon, from the Mediterranean basin, is used in Portugal for the production of “Queijo da Serra DOP”. The fact that the thistle flowers have a family of aspartic proteases - cardosins – allows them to be used as a vegetable coagulant. However, several by-products (stems, leaves, heads (which include bracts, pappus and seeds)) result from this activity. Cardoon is recognized in popular medicine due to its hepatoprotective and choleric effects and its biomass, such as leaves, and stems has been studied due to the presence of bioactive compounds that may be associated with beneficial properties for health. However, for the seeds only the composition of the oil is known.

The aim of this work was to characterize the cardoon seeds in order to evaluate the potential for application in different industries such as food, nutraceuticals and cosmetics. In this study, seeds were separated into two visibly different parts, the kernel (60%) and the shell (40%), which were subjected to sequential extractions to obtain the different components, namely lipophilic, phenolic compounds and polysaccharides.

The results obtained show that the shell consists of about 21% sugars and 38% lignin, while the kernel is rich in fat (39%) and protein (27%). The oils obtained with *n*-hexane (39% kernel and 1% shell) were analyzed for their fatty acid content and linoleic was identified as the major component (52-68%) followed by oleic (20-31%), palmitic (10-13%) and stearic (2-4%) acids. The analysis of silylated derivatives also allowed the identification of α -tocopherol, stigmaterol and β -sitosterol in the kernel oil.

The characterization of polysaccharides revealed that they consisted of (1 \rightarrow 5)-Araf, (1 \rightarrow 3,5)Araf, (1 \rightarrow 2,5)Araf, (1 \rightarrow 4)Glc β , (1 \rightarrow 4,6)Glc β , (1 \rightarrow 2)Xyl β , and (1 \rightarrow 2)Gal β . These bonds are characteristic of arabinans and xyloglucans. However, the high molar percentage of branches such as (1 \rightarrow 3,5)Araf and (1 \rightarrow 2,5)Araf along with the content of phenolic compounds in these fractions, 9 and 117 mg ECA/g for water extract kernel and shell, respectively, suggest structures in the form of polysaccharide-phenolic compound complex. This type of complex has been associated with the high antioxidant activity often presented by polysaccharides.

This work has shown that the seeds of *Cynara cardunculus* L. consist of compounds with potential such as fatty acids, sterols, phenolic compounds, proteins and polysaccharides which can be valorised for different applications due to their biological potential like antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity and action as cardiac and neurological preservation.

Keywords: cardoon; byproducts; lipophilic compounds; polysaccharides; phenolic compounds

Agradecimentos

Quero agradecer, em particular, à Dra. Cláudia Nunes pela sua orientação, disponibilidade, ajuda, apoio e experiência transmitida.

À professora Dra. Maria João Moreno e ao professor Dr. Manuel António Coimbra pela orientação e conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas de laboratório da Universidade de Aveiro, obrigada pelo companheirismo e boa disposição.

À Soraia, à Cátia, à Joana e à Zélia por toda a amizade, incentivo e conhecimento transmitido.

Às minhas amigas Ana Miguel, Carla e Leirião por todo o carinho e estarem sempre presentes.

À minha família, em especial aos meus pais e ao Diogo por todo o suporte, apoio, confiança e amor incondicionais.

A todos o meu sincero obrigada!

Waste2Value – Integração da valorização de subprodutos da atividade agrícola com a produção de alimentos compostos para animais, plásticos biodegradáveis e tratamento de efluentes animais

(PDR2020-101-031828)   

Índice	
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Agradecimentos.....	vii
Índice de Tabelas.....	xi
Índice de Figuras.....	xi
Abreviaturas.....	xiii
Capítulo 1.....	1
Introdução.....	1
1.1 O Cardo.....	1
1.2 Distribuição Geográfica.....	1
1.3 Ciclo de Vida.....	2
1.4 Utilização do cardo.....	3
1.4.1 Usos tradicionais.....	3
1.4.2 Aplicações industriais: fabrico de queijo em Portugal.....	4
1.5 Subprodutos do cardo.....	5
1.5.1 Folhas, Caules e floretos.....	6
1.5.2 Capítulo e Sementes.....	8
1.6 Objetivos.....	11
Capítulo 2.....	13
Procedimento Experimental.....	13
2.1 Ensaio Experimental.....	13
2.2 Reagentes.....	14
2.3 Preparação das amostras.....	15
2.4 Determinação do conteúdo em lenhina, humidade e cinzas.....	15
2.5 Quantificação da proteína.....	16
2.6.1 Análise dos compostos lipofílicos.....	17
2.6.1.1 Análise do perfil de triacilglicerídeos.....	18

2.6.1.2 Análise dos compostos lipofílicos livres.....	18
2.6.2 Análise por espectrofotometria UV-Visível do material extraído com clorofórmio: metanol.....	20
2.7 Extração sequencial dos compostos solúveis em meio aquoso.....	20
2.7.1 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	21
2.7.2 Análise de Polissacarídeos	21
2.7.2.1 Análise dos açúcares neutros.....	21
Capítulo 3.....	27
Resultados e Discussão.....	27
3.1 Composição química das sementes	27
3.2 Caracterização dos compostos lipofílicos	30
3.3 Análise dos carboidratos da semente do cardo	37
Capítulo 4.....	45
Conclusão.....	45
Bibliografia.....	47
Apêndice	55

Índice de Tabelas

Tabela 1- Rendimentos de frações lipofílicas das várias partes morfológicas de <i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> (DC) (Adaptado de (44)).....	6
Tabela 2- Composição em ácidos gordos (%) do óleo de <i>Cynara cardunculus</i> L provenientes de culturas distribuídas pela Europa.....	10
Tabela 3- Composição química das sementes de <i>Cynara cardunculus</i> L. e dos seus componentes, miolo e casca.....	27
Tabela 4- Rendimento obtido, em mg/g, de cada extrato (AIR, SnAIR, EA e REA) obtido para o miolo e casca e a quantificação de proteína, carboidratos e compostos fenólicos (equivalentes de ácido cafeico, EAC).....	29
Tabela 5 - Quantificação dos compostos lipofílicos livres identificados no óleo extraído do miolo da semente do cardo.....	33
Tabela 6- Compostos lipofílicos identificados no extrato de clorofórmio: metanol e SnAIR do miolo da semente de <i>Cynara cardunculus</i> L.....	35
Tabela 7- Concentração total (mg/g) e composição dos açúcares (% molar) do miolo desengordurado e das diferentes frações da precipitação com 85% etanol (AIR e snAIR) e extração com água quente (EA e REA) do miolo da semente do cardo.....	37
Tabela 8 - Concentração total (mg/g) e composição dos açúcares (% molar) da casca desengordurada e das diferentes frações da precipitação com 85% etanol (AIR e snAIR) e extração com água quente (EA e REA) da casca da semente do cardo.....	38
Tabela 9 - Conteúdo total (mg/g) e composição dos açúcares totais (% molar) do material lipofílico extraído com clorofórmio: metanol (2:1 v/v).....	39
Tabela 10- Identificação e quantificação, em % molar, das ligações glicosídicas identificadas na análise dos acetatos de alditol parcialmente metilados por GC-MS (* - não detetados por GC-FID, mas detetado por GC-MS).....	40

Índice de Figuras

Figura 1- Ilustrações das 3 variedades pertencentes à espécie <i>Cynara cardunculus</i> L.: (a) <i>Cynara cardunculus. sylvestris</i> Fiori, (b) <i>Cynara cardunculus scolymus</i> L. Fiori e (c) <i>Cynara cardunculus</i> L. <i>altilis</i> (DC).....	1
Figura 2- Distribuição geográfica das plantações de cardo em Portugal -adaptado de [14]	2


Figura 3 -Fases de crescimento do cardo: (A) formação dos cotilédones; (B) formação das primeiras folhas; (C) aparecimento dos capítulos; (D) desenvolvimento da planta; (E) floração (adaptado de [18])	3
Figura 4 -Ilustração da flor de cardo.....	5
Figura 5 -Estrutura química da cinaropicrina (a) e do acetato de taraxasterilo (b).....	7
Figura 6 -Ilustração do capítulo de uma planta de cardo.....	8
Figura 7 -Ilustração das sementes de cardo: (A) - sementes envolvidas nos papilhos; (B) – sementes após separação.....	9
Figura 8 -Estruturas químicas dos ácidos cafeicos identificados nas sementes: (a) ácido trans-5-O-cafeoilquínico (b) ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	11
Figura 9 -Esquemática das frações obtidas e análises realizadas	14
Figura 10 -Ilustração das sementes do cardo: (A)-sementes inteiras; (B)-Miolo da semente; (C)-Casca da semente	15
Figura 11 -Esquema do sistema de extração do material lipofílico - metodologia de Soxhlet – adaptado de [18]	17
Figura 12 -Estrutura química do agente sililante N, O - bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida.....	19
Figura 13 -Estrutura química do agente cromóforo (a): m-fenilfenol e do padrão (b): ácido galacturónico	23
Figura 14 -Cromatograma obtido por GC- FID com o perfil em ácidos gordos esterificados do óleo extraído do miolo da semente do cardo.....	31
Figura 15 -Composição em ácidos gordos esterificados do óleo do miolo e casca da semente do cardo. (Os resultados apresentados são a média \pm desvio-padrão de ensaios independentes (n=3)).....	32
Figura 16 -Cromatograma dos compostos lipofílicos livres existentes no óleo extraído do miolo da semente com n-hexano.	33
Figura 17 -Cromatograma dos compostos lipofílicos livres existentes no material extraído com a mistura de solventes (clorofórmio: metanol 2:1v/v).....	34
Figura 18 -Espectro de absorção do extrato clorofórmio: metanol (2:1 v/v) do miolo da semente do cardo	36
Figura 19 -Proposta de estrutura da arabinana existente nos EA Legenda: Arabinose:  (96)	42
Figura 20 -Proposta da estrutura da xiloglucana existente no REA do miolo [99]	43
Figura 21 - Proposta da estrutura da xilana existente no REA da casca [99]	43
Figura 22 -Perfil cromatográfico obtido por GC-FID dos acetatos de alditol presentes ambas as partes da semente	58
Figura 23 -Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existentes no resíduo da extração com água quente proveniente do miolo	58

Figura 24 -Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existente no extrato de água proveniente do miolo.....	58
Figura 25 -Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existentes no resíduo da extração com água quente proveniente da casca.....	59
Figura 26 -Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existente no extrato de água proveniente da casca.....	59

Abreviaturas

AIR – Resíduo insolúvel em álcool

DMSO – Dimetilsulfóxido

EAC – Equivalentes em ácido cafeico

EA – Extrato aquoso

GC – FID – Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama

GC – MS – Cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa

PMAAs – Acetatos de alditol parcialmente metilados

REA – Resíduo extração com água quente

SnAIR - sobrenadante da extração em etanol a 85%

TFA – Ácido trifluoroacético

THF - tetraidrofurano

UA – Ácidos urónicos

u.a. – unidades arbitrárias

Capítulo 1

Introdução

1.1 O Cardo

O cardo tem como nome científico *Cynara cardunculus* L. e pertence à família *Asteraceae*, género *Cynara* e espécie *Cynara cardunculus* [1], [2]. *C. cardunculus* está subdividida em três variedades: 1) a *sylvestris* Fiori (cardo selvagem); 2) *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra) e 3) *altilis* DC (cardo cultivado) (Figura 1).



Figura 1-Ilustrações das 3 variedades pertencentes à espécie *Cynara cardunculus* L.: (a) *Cynara cardunculus sylvestris* Fiori, (b) *Cynara cardunculus scolymus* L. Fiori e (c) *Cynara cardunculus* L. *altilis* (DC)

O cardo selvagem apresenta uma roseta característica de folhas grandes, caules ramificados e um capítulo com vários espinhos e tons azul-violeta [2], [3]. Estudos citogénicos indicam que tanto a *scolymus* (L.) Fiori e *altilis* DC provêm de *Sylvestris* Fiori. No entanto possuem diferentes características morfológicas como resultado de critérios de seleção [4]–[7]. Ao contrário de *Sylvestris* Fiori, *Cynacara cardunculus* (L.) *altilis* DC não apresenta espinhos nos caules, folhas e capítulo [3], [4], [8].

1.2 Distribuição Geográfica

O cardo selvagem é oriundo das zonas oeste e centro da Bacia do Mediterrâneo que inclui o sul da Europa (grande parte da Península Ibérica: sul de Portugal e sul de Espanha). Também se encontra espalhado pela Madeira, ilhas Canárias, norte de África, Turquia e Chipre. Este tipo selvagem também é uma espécie colonizadora no México, Argentina e Austrália [2], [3]. Quanto à alcachofra, espécie da mesma família, pode encontrar-se por todo o mundo, mas tem um impacto económico especialmente

em países como Itália, Espanha, Turquia e França [3], [4], [8], [9]. Relativamente ao cardo cultivado encontra-se em Espanha, Itália, França, Grécia e, mais recentemente, no sul de Portugal [3], [10]–[13]. Em Portugal, podemos encontrar o cardo nas zonas do centro, sul e interior (Figura 2).



Figura 2-Distribuição geográfica das plantações de cardo em Portugal -adaptado de [14]

1.3 Ciclo de Vida

Tanto nas variedades selvagens como o cardo cultivado são plantas herbáceas perenes, isto é, são plantas cujos seus caules não são lenhosos, atingindo a altura máxima e produção no espaço de um ano. O tempo de vida é superior a 2 anos e, neste caso específico, podem durar 10 a 15 anos. Estas plantas crescem e vivem sob condições xerotérmicas marcadas pelos verões mediterrânicos (elevadas temperaturas e stress hídrico) devido ao seu robusto sistema radicular (até 5 m de profundidade), estas apresentam um bom desenvolvimento face às condições climáticas adversas [11], [15].

A primeira fase de crescimento do cardo começa com a germinação das sementes no início do outono. Os primeiros dois cotilédones emergem à superfície, seguidos do crescimento das folhas em forma de roseta (novembro) estendendo-se até junho, momento em que o cardo fica em flor (Figura 3). O processo de senescência começa a meados de julho e perdura durante o mês de agosto com a secura dos caules e folhas assim como a abertura e secura das cabeças que proporcionam a dispersão das sementes. É, nesta fase, que as raízes entram num estado de dormência até o começo de um novo ciclo,

com o respetivo brotar precoce da planta no início do outono [11], [15]–[17]. Sabe-se que uma planta de cardo na sua fase adulta pode atingir até 3 m de altura e uma área com 1,5 m de diâmetro[18].

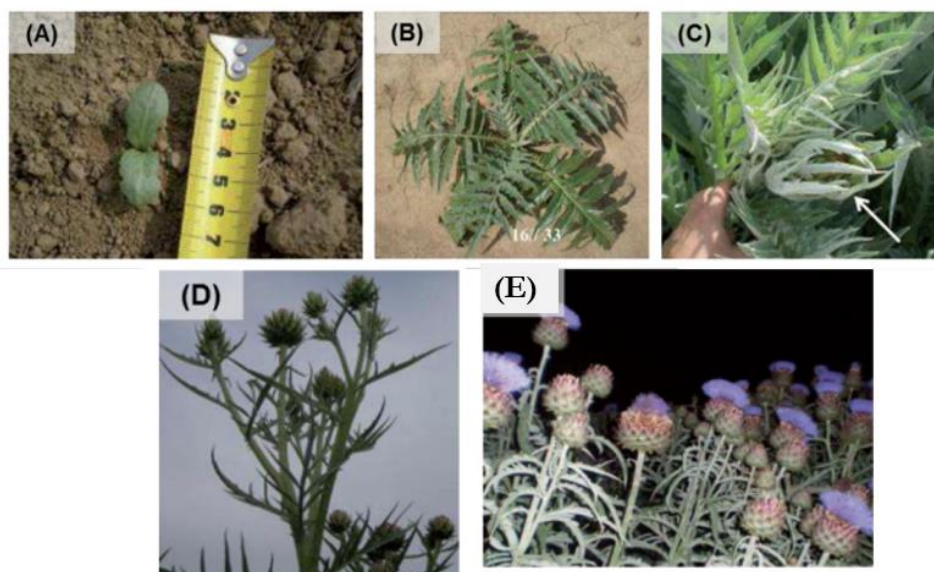


Figura 3-Fases de crescimento do cardo: (A) formação dos cotilédones; (B) formação das primeiras folhas; (C) aparecimento dos capítulos; (D) desenvolvimento da planta; (E) floração (adaptado de [18])

1.4 Utilização do cardo

1.4.1 Usos tradicionais

As plantas da espécie *Cynara cardunculus* são utilizadas desde há vários séculos pelo Homem com vários propósitos. A utilização de infusões das folhas de alcachofra e cardo selvagem são reconhecidas pelos seus efeitos benéficos à saúde, como a proteção do fígado e estimulação do fluxo biliar [19]–[23]. As folhas e sementes de alcachofra também são consumidas para a prevenção da arteriosclerose, hipertensão arterial e hiperuricemia (elevada concentração de ácido úrico no sangue) [2], [24]. Ainda sobre a alcachofra, desde o século 15, que o capítulo faz parte da dieta mediterrânica, sendo consumido como um vegetal em fresco ou enlatado [3], [4], [9].

No cardo selvagem, o capítulo é o nome dado à inflorescência caracterizada por ter as flores inseridas num receptáculo protegido por brácteas onde também estão incluídas as sementes e os papilhos. As flores (pistilos) têm vindo a ser usadas durante séculos na Península Ibérica para a produção de queijos de ovelha como o da “Serra da Estrela”, “Nisa”, “Évora”, “Serpa” e “Azeitão” em Portugal e “La serena” e “Guía” em Espanha. A capacidade de coagulante dos estigmas do cardo selvagem resulta da elevada concentração de proteínas aspárticas denominadas de cardosinas [25]–[27].

1.4.2 Aplicações industriais: fabrico de queijo em Portugal

A alimentação humana é um dos mais importantes setores económicos da Europa, onde o leite e os seus derivados representam alimentos comuns às diferentes dietas. O fabrico de queijo exige a passagem por várias etapas: inicia com a receção do leite cru que sofre um processo de filtração; passagem para as cubas de coagulação onde é aquecido até a temperatura desejada e adicionado o coalho vegetal ou animal, permanecendo em repouso até à ocorrência da coalhada. Após esse tempo faz-se a dessorção da coalhada onde o soro recolhido pode ser aproveitado para a produção de requeijão. Quanto à coalhada é colocada em moldes e devidamente prensados, tirada dos mesmos, salgada e colocada em câmaras de cura onde irá maturar (o processo de prensagem leva algum tempo até que seja extraído mais soro diminuindo o teor em humidade) [28].

A coagulação é uma parte importante na produção do queijo. As proteínas existentes no leite encontram-se sob a forma de uma solução coloidal e, a fração proteica envolvida na coagulação é a fração das caseínas, sendo estas aproximadamente 80% das proteínas do leite. Apenas estas proteínas têm capacidade coagulante, e o rendimento em queijo depende não só da sua percentagem como também do tipo de proteínas presentes [29]. Este processo ocorre por alteração físico-química das caseínas [30] e, pode ocorrer por via enzimática (enzimas proteolíticas), ácida (diminuição do pH do leite) ou mista. A coagulação enzimática consiste em 3 fases: proteólise, agregação e gelificação [31]. As duas primeiras fases consistem na destabilização da ligação da Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da k-caseína que conseqüentemente origina a libertação do segmento 106-169 hidrofílico caseinomacropéptido que fará parte do soro [32]. Quanto ao segmento 1-105 agrega-se originando a coalhada [33].

O coalho animal foi o 1º coalho utilizado no fabrico de queijo, e consistia no extrato enzimático do abomaso de animais jovens. Este extrato é constituído apenas por duas enzimas: a quimosina (E.C. 3.4.23.4) e a pepsina (E.C. 3.4.23.1). Quanto mais jovem é o animal maior o teor de quimosina no coalho [34]. No entanto, com o aumento da produção de queijo e diminuição dos bezerros abatidos (anos 70), levaram a diversas pesquisas em busca de alternativas com potencial uso no fabrico de queijo [35]. Os coalhos de origem vegetal são bastante utilizados a nível artesanal em pequenas explorações leiteiras e agrícolas [9], [36]. Há séculos que extratos de *Cynara cardunculus* são utilizados no fabrico de queijo e mostram afinidade específica para o leite de ovelha. Devido à localização geográfica e condições climáticas favoráveis em Portugal, os pequenos ruminantes, em particular os ovinos, têm um papel importante na exploração animal. O queijo de ovelha é fabricado em Portugal há muitos anos e apreciado devido às suas características únicas de textura e sabor, sendo considerado um produto *gourmet* [37].

Cynara cardunculus é um substituto do coalho animal, apresentando elevada atividade proteolítica [33]. É nas flores desta espécie que é possível isolar as cardosinas (proteases aspárticas que têm o mesmo comportamento na clivagem da k-caseína) [38], [39]. O famoso queijo da Serra da Estrela com

denominação de origem protegida (DOP) é produzido com leite de ovelha Bordaleira Serra da Estrela e/ou Churra Mondegueira cru, sal e flor de cardo. O queijo da Serra da Estrela DOP representa um setor em Portugal, é o resultado de um modo de vida que se adaptou às circunstâncias da natureza local e, dado o volume de produção deste queijo no nosso país está também associada uma necessidade de plantações de cardos. No entanto, a parte útil da planta são apenas os pistilos da sua flor (Figura 4) pois é onde existe maior concentração das proteases aspárticas – as cardosinas, que representa uma percentagem pequena face ao tamanho que um cardo pode atingir. Esta questão remete-nos à situação de desperdícios agrícolas que têm sido alvo de grande atenção nos últimos anos com o intuito de **valorizar os subprodutos agropecuários**. Esta indústria produz anualmente grandes quantidades de resíduos cujo aproveitamento é mínimo ou nulo, sendo que apenas uma pequena parte é utilizada diretamente para alimentação animal ou compostagem [40].

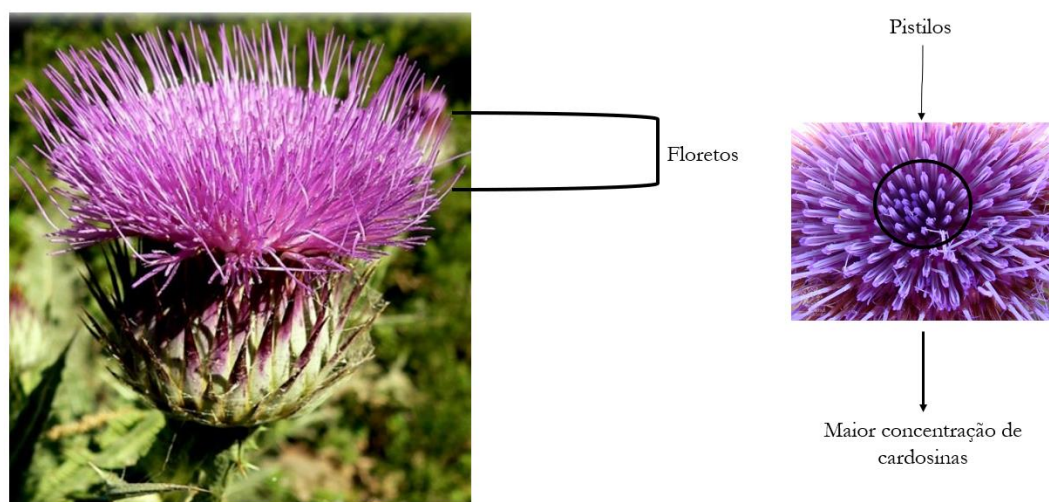


Figura 4-Ilustração da flor de cardo

1.5 Subprodutos do cardo

Com a utilização das flores de cardo no fabrico do queijo da Serra da Estrela DOP, os caules, as folhas e o capítulo, que engloba as brácteas, papilhos e sementes, surgem como um subproduto com pouco, ou nenhum, valor económico.

No entanto se olharmos apenas para a biomassa total gerada, a sua exploração para fins energéticos surge como possibilidade de valorização desta cultura. Esta utilização tem um efeito benéfico ao nível da redução da dependência de importação de produtos energéticos, nomeadamente os combustíveis fósseis, e na poluição associada aos mesmos [41]. Do ponto de vista ecológico, trata-se de uma cultura autossuficiente, pois requer quantidades mínimas de nutrientes, ajuda na preservação da

erosão dos solos e consegue sobreviver apenas com a água das chuvas no inverno, não interferindo na produção de biomassa. Segundo a literatura, na Grécia o rendimento em biomassa de cardo cultivado pode ir até 33,4 ton peso seco/ha após o 2º ano de vida da planta [11]. Em Portugal, mais especificamente no Alentejo, também existem plantações de cardo cultivado, no entanto o rendimento em biomassa é bastante inferior comparativamente às culturas gregas (7,5 ton peso seco /ha) [42]. No entanto, a existência de compostos ativos nas diferentes partes morfológicas do cardo potenciam a sua utilização para outras aplicações. Segundo a literatura, as diferentes partes do cardo têm potencial para enriquecimento de produtos na indústria alimentar e farmacêutica, como uso fitoterapêutico [43].

1.5.1 Folhas, Caules e Floretos

A tabela 1 mostra o rendimento da extração de compostos lipofílicos com diclorometano de cada parte morfológica do cardo. O maior rendimento de extração está associado às folhas (17,5%) seguido do capítulo que varia de 3,3% e 4,5%. Esta informação é útil para entender quais as diferentes partes morfológicas do cardo com um maior rendimento das extrações lipofílicas.

Tabela 1- Rendimentos de frações lipofílicas das várias partes morfológicas de *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC) (Adaptado de [44])

Parte morfológica de <i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> (DC)		Rendimento de extração (% m/m)
Caule	Parte exterior	1,0
	Parte interior	2,0
Capítulo	Recetáculos e brácteas	3,3
	Flor	4,5
Folhas		17,5

A cinaropicrina e o acetato de taraxasterilo (Figura 5) foram descritos como os compostos maioritários dos extratos lipofílicos de *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* [18]. Nos extratos lipofílicos obtidos com diclorometano das diferentes partes do cardo (caules, folhas e capítulo) foram identificados 65 compostos, entre os quais o ácido hicosanóico e cinaropicrina foram pela primeira vez identificados [18]. Nos extratos lipofílicos das folhas, floretos e caules o total de compostos identificados corresponde a 182,5 g/kg, 33,7 g/kg e 3 g/kg, respetivamente. Para os extratos lipofílicos das folhas, as lactonas sesquiterpénicas foram a principal família identificada ($\approx 94,5$ g/kg; cinaropicrina $\approx 87,4$ g/kg) enquanto que nos extratos dos floretos foram os compostos triterpenos pentacíclicos, a principal classe de compostos identificados ($\approx 27,5$ g/kg; acetato de taraxasterilo $\approx 8,9$ g/kg). Os extratos lipofílicos das

folhas e fletos (Figura 4) revelaram possuir efeitos antiproliferativos contra células cancerígenas [45]. Tanto os extratos como os compostos maioritários (cinaropícrina e acetato de taraxasterilo) foram testados, permitindo-os associar a este efeito nas células. Os resultados obtidos mostraram que as células foram mais sensíveis ao extrato lipofílico proveniente das folhas (IC₅₀ 10,39 µg/mL) do que ao extrato lipofílico extraído dos fletos (IC₅₀ 315,22 µg/mL). Comparativamente aos extratos enriquecidos, a cinaropícrina mostrou ser mais efetiva contra o desenvolvimento das células testadas. O valor de IC₅₀ obtido para a cinaropícrina foi de 6,19 µg/mL, o valor mais baixo de todos os testados. Este resultado indica que possivelmente, a cinaropícrina será o componente responsável pelo efeito observado nos extratos lipofílico proveniente das folhas [45].

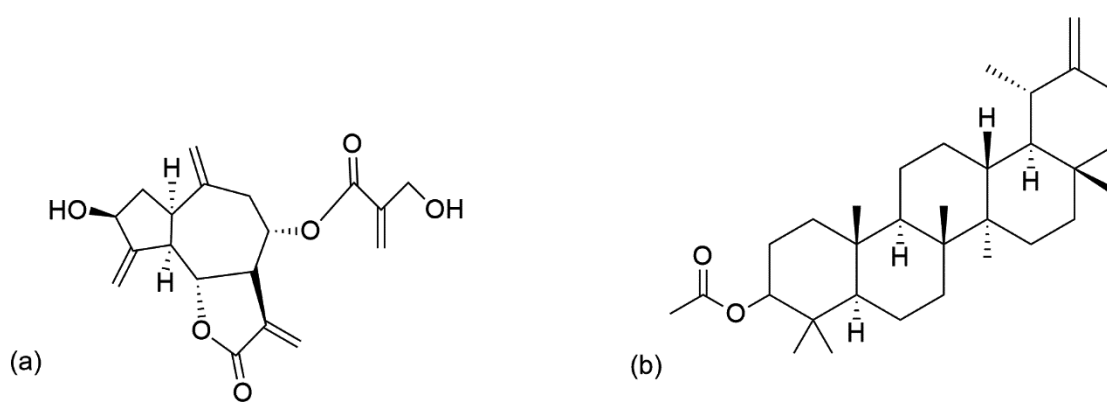


Figura 5-Estrutura química da cinaropícrina (a) e do acetato de taraxasterilo (b)

No cardo (*Cynara cardunculus* L. var. *altilis*) os compostos lipofílicos extraídos das folhas são constituídos principalmente por lactonas sesquiterpénicas e triterpenos pentacíclicos [46]. As lactonas sesquiterpénicas representam um grupo de metabolitos secundários presentes em todo o reino vegetal [47]. Este tipo de compostos é mais comum em algumas famílias, como *Cactaceae*, *Solanaceae*, *Araceae*, *Euphorbiaceae* e *Asteraceae* [48], [49]. Estes compostos são constituídos por 15 átomos de carbono e classificados com base no seu esqueleto (germacronólido, guaianólido, pseudoguaianólido, eudesmanólido, eremofilanolólido, elemanólido, cadinanolólido e xantonólido) sendo que as suas principais diferenças são na formação de anéis (varia no número de membros) e a posição das ligações duplas [50].

A cinaropícrina, composto maioritário, pertence ao grupo das lactonas sesquiterpénicas mais especificamente às do tipo guaianólido [46]. Tanto a cinaropícrina como outras lactonas sesquiterpénicas têm vindo a mostrar atividades biológicas, como citotoxicidade contra algumas células tumorais (indução de apoptose), efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e também como já referido anteriormente, ao nível de agente anti-carcinogénico (inibição da proliferação) [51]–[53]. A cinaropícrina é também o principal composto ativo na ação de relaxamento do músculo liso, o que revela

atividade antiespasmódica justificando assim o uso das infusões desta espécie para combater problemas gastrointestinais [54].

Os diversos compostos bioativos presentes nas folhas do cardo, bem como as suas propriedades e aplicações, tornam a biomassa desta espécie um material de interesse para a sua valorização, em especial para a extração de cinaropicrina, um composto de alto valor comercial (18 €/mg >97,5%) [46].

Como já referido nos usos tradicionais (1.4.1) as infusões das folhas de cardo são reconhecidas pela medicina popular devido às suas ações hepatoprotetoras e coleréticas [20],[23]. Estes efeitos benéficos à saúde estão associados à presença de compostos fenólicos, tais como os ácidos hidroxicinâmicos (ácido 1,5-dicafeoilquínico) e flavonóides (luteolina e luteolina-7-O-glicosídeo) [20],[22]. Flores, folhas, caules e rizomas foram também já descritas como possuem propriedades antimicrobianas, com efeitos mais significantes para a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, entre outras, tendo sido atribuída a responsabilidade aos compostos fenólicos presentes [55], [56].

1.5.2 Capítulo e Sementes

O capítulo engloba as brácteas, papilhos e sementes (Figura 6). As brácteas são das partes do cardo mais ricas em compostos fenólicos [57], principalmente em ácidos hidroxicinâmicos. Esta parte do cardo é também rica em carboidratos, sendo a sacarose o maior constituinte dos açúcares livres. O seu óleo é constituído principalmente por ácidos gordos saturados, tais como o ácido palmítico, docosanoico, linoleico, esteárico, caproico, tendo também sido identificados os ácidos linoleico e oleico [43].

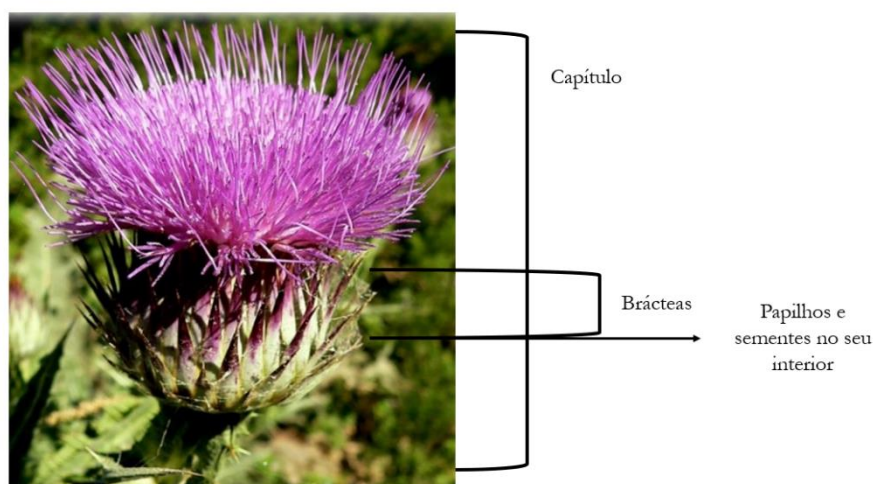


Figura 6-Ilustração do capítulo de uma planta de cardo

As sementes fazem parte do capítulo onde estão envolvidas nos papilhos e brácteas (Figura 7). Neste caso, o cardo trata-se de uma planta angiospérmica, isto é, uma planta espermatófita onde a sua

semente está protegida pelo fruto gerado, neste caso a flor de cardo, podendo no futuro germinar e originar uma nova planta.



Figura 7-Ilustração das sementes de cardo: (A) - sementes envolvidas nos papilhos; (B) – sementes após separação

As sementes são constituídas por uma grande quantidade de óleo (ácidos gordos, esteróis e tocoferóis). Ainda que as sementes de *Cynara cardunculus* L. correspondam a uma pequena percentagem da biomassa total, estudos demonstraram que estas são importantes devido às suas propriedades bioativas como a eliminação de radicais livres devido ao seu alto teor em compostos fenólicos [56]. O óleo das sementes pode variar entre 24 a 26 (% m/m) [43],[58]. No entanto, a quantidade em óleo está associada à irrigação da planta, isto é, menor irrigação menor quantidade de óleo. [59]. Contrariamente ao óleo do capítulo, o óleo das sementes é essencialmente constituído por ácidos gordos insaturados como o ácido linoleico e oleico. Na tabela 2 é possível verificar a composição em ácidos gordos do óleo extraído das sementes provenientes de culturas de diferentes locais da Europa onde foram avaliados vários genótipos. No entanto, os ácidos maioritários são os mesmo nas diferentes culturas: ácido linoleico (59-65%), oleico (21-25%), palmítico (9,4-11%) e esteárico (2,8-3,7%) e em percentagem inferior a 1% foram identificados os ácidos caproico, mirístico, palmitoleico, araquidónico, entre outros [17], [43], [60].

O perfil de ácidos gordos é importante pois destaca o valor nutricional de um produto alimentar. O óleo extraído das sementes poderá ser adicionado a alimentos ou até ser usado ao nível industrial, em substituição de outros óleos alimentares [43],[56]. Noutra perspetiva o óleo de cardo também já foi estudado no sentido de ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel, tendo demonstrado características semelhantes às de culturas atualmente usadas para a produção de biodiesel [61].

Tabela 2-Composição em ácidos gordos (%) do óleo de *Cynara cardunculus* L provenientes de culturas distribuídas pela Europa.

Composição em ácidos gordos (%)	Distribuição Geográfica			
	Grécia [43]	Espanha [17]	Portugal[60]	
			Beja	Sesimbra
C _{6:0}	0,01			
C _{14:0}	0,09	0,11	0,10	0,10
C _{14:1}		0,01		
C _{15:0}	0,02			
C _{16:0}	9,4	11	11	11
C _{16:1}	0,11	0,16	0,2	0,20
C _{17:0}	0,07	0,05	0,1	0,10
C _{17:1}		0,01		
C _{18:0}	2,8	3,7	3,5	3,4
C _{18:1}	21	25	25	21
C _{18:2}	65	60	59	64
C _{18:3}	0,11		0,08	0,08
C _{20:0}	0,28	0,36	0,3	0,3
C _{20:1}	0,11	0,13	0,1	0,1
C _{22:0}	0,46	0,03	0,1	0,1
C _{22:1}	0,01			
C _{23:0}	0,02			
C _{24:0}	0,12		0,1	0,1

Os esteróis e tocoferóis foram também identificados no óleo extraído das sementes [58]. Foram identificados 12 esteróis como o colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, clerosterol, estigmastanol, entre outros, sendo o β -sitosterol o composto maioritário (30,9-31,5%) [60]. Na classe dos tocoferóis apenas o α -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol foram identificados no óleo [59].

As sementes de cardo mostraram possuir propriedades bioativas como antimicrobianas e antioxidantes [56]. A existência destas propriedades bioativas realça o interesse para o possível uso das sementes em áreas como a indústria alimentar e/ou farmacêutica como, por exemplo, fonte de conservantes naturais. As propriedades bioativas demonstradas pelos extratos de sementes de cardo estão muitas vezes associadas à presença de compostos fenólicos [56]. Compostos fenólicos como ácido cis-3-O-cafeoilquínico, ácido trans-3-O-cafeoilquínico, ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico, ácido cis-3,5-di-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-ferulolilínico, luteolin-7-O-glucuronida, hexosídeo de ácido cafeico,

hexosídeo de ácido *p*-cumárico, ácido trans-5-O-cafeoilquínico e ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, entre outros foram identificados nas diferentes partes morfológicas do cardo, no entanto, nas sementes apenas foram identificados ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente o ácido trans-5-O-cafeoilquínico e ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (Figura 8) [43]. De acordo com a literatura, extratos metanólicos da semente mostraram efeitos antimicrobianos, também associados aos compostos fenólicos, uma vez que em outras espécies vegetais, este tipo de compostos (ácidos cafeoilquínicos) está associado a estes efeitos inibitórios [56].

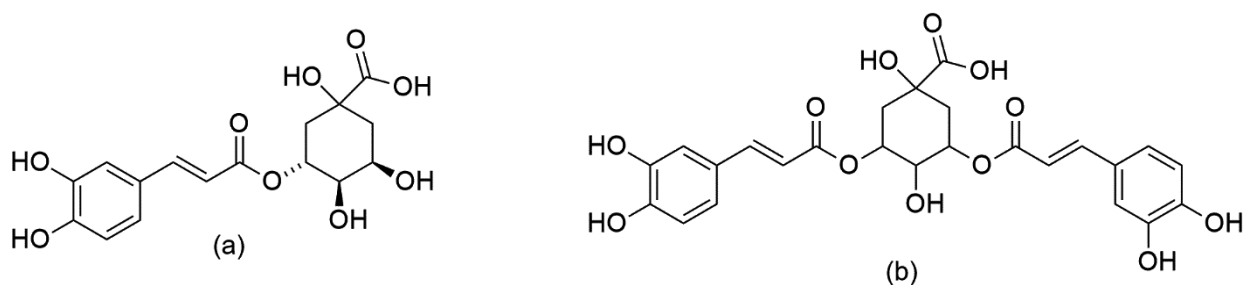


Figura 8-Estruturas químicas dos ácidos cafeicos identificados nas sementes: (a) ácido trans-5-O-cafeoilquínico (b) ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico

As sementes de *Cynara cardunculus scolyms L. Fiori* (alcachofra) como as de *L. altilis* (cardo) foram previamente identificadas como um produto de importante valor nutricional devido ao elevado teor em proteína (26-30 g/100 de massa seca) e fibras (celulose e lenhina) [56], [62]. Relativamente ao teor em minerais as sementes são constituídas por potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, manganês e zinco, correspondendo no total a aproximadamente 2400 mg/ 100g de amostra seca [43], [56].

1.6 Objetivos

A valorização de subprodutos induz a recuperação de substância bioativas presentes nos resíduos gerados pelas inúmeras indústrias, levando a uma questão de sustentabilidade: natural e financeira. Ao nível da sustentabilidade natural, está relacionada com a recuperação de compostos com valor acrescentado existentes no material vegetal descartado, como compostos fenólicos, pigmentos, fibras, vitaminas e sais minerais. Por vezes os subprodutos podem ser reaplicados noutras indústrias, como a alimentar, nutracêutica e cosmética [40],[46]. Ao nível da sustentabilidade financeira o conceito de valorização reflete sobre um “consumo verde” e economia circular [63]. Todavia, um fator importante é garantir a existência de potenciais utilizadores do que é recuperado.

O sector agroindustrial em conjunto com a comunidade científica tem realizado estudos com o objetivo de desenvolver um maior potencial dos alimentos funcionais, de forma a garantir a promoção

da saúde e bem-estar do cidadão através de propostas alternativas às dietas onde são incluídos produtos de valor acrescentado, criando novos nichos de mercado [40].

O consumo de sementes tem vindo a aumentar pois este tipo de alimentos estão associados a efeitos benéficos à saúde devido à presença de compostos, como os ácidos gordos dos quais podemos salientar o ómega 3 que está associado à redução do nível de colesterol na corrente sanguínea [67]. Assim, as sementes do cardo podem também ser valorizadas devido ao seu valor nutricional, tal como os ácidos gordos insaturados e compostos fenólicos. No entanto, a sua composição ainda não está completamente elucidada.

O objetivo deste trabalho foi a caracterização da semente de cardo com vista à identificação do seu potencial de valorização como fonte de compostos com elevado valor acrescentado, visto ser um subproduto subvalorizado. O estudo focou-se especificamente na caracterização dos polissacarídeos, devido à falta de informação sobre estes compostos na literatura. Realizaram-se diferentes extrações com o intuito de determinar compostos solúveis e/ou insolúveis em solventes diferentes e posterior caracterização.

Capítulo 2

Procedimento Experimental

2.1 Ensaio Experimental

Na época de floração do cardo, é realizado o corte dos estigmas (parte onde está a maior concentração de cardosinas) para a utilização na produção de queijo. Esta ação gera alguns subprodutos: caules, folhas e capítulos (brácteas, papilhos e sementes). Neste trabalho foram estudadas as sementes de cardo, que foram separadas em duas partes: miolo e casca. A ambas as partes foram realizadas extrações sequenciais para separar os diferentes componentes, nomeadamente extração dos compostos lipofílicos, pelo método de Soxhlet com diferentes solventes (*n*-hexano e mistura clorofórmio: metanol), extração com etanol, para a obtenção dos compostos fenólicos, e extração dos polissacarídeos solúveis em água. Os extratos obtidos foram analisados para quantificar e caracterizar os diferentes componentes.

Na figura 9 está representado um esquema com a ordem de obtenção de frações e análises realizadas.

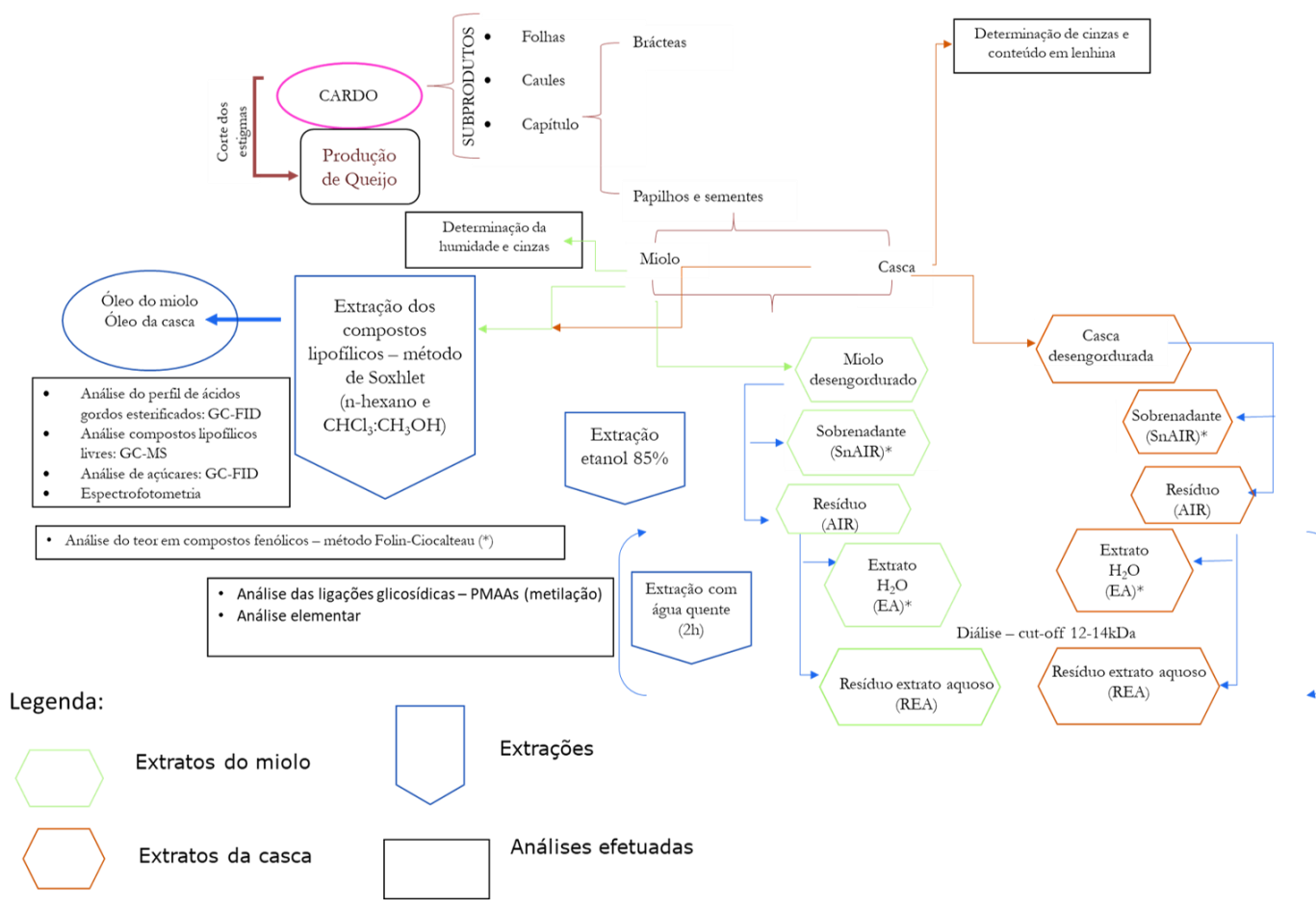


Figura 9-Esquemática das frações obtidas e análises realizadas

2.2 Reagentes

Ácido sulfúrico, diclorometano e tetracosano foram adquiridos à Honeywell- Fluka; boro-hidreto de sódio deuterado (NaBD₄), 2-desoxiglucose, peneiros moleculares de 3 Å, 3-fenilfenol, heptadecanoato de metilo e ácido cafeico foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ácido acético glacial, metanol, ácido bórico foram obtidos da Fisher Chemicals; Anidrido acético, n-hexano, piridina, tetraidrofurano e etanol foram adquiridos à Carlo Erba Reagents. Quanto ao reagente de Folin-Ciocalteu, iodeto de metilo e ácido galacturónico eram da Merck; 1-metilimidazol e membranas de diálise foram adquiridos às empresas Alfa Aesar e Medicell Membranes Ltd, respetivamente.

2.3 Preparação das amostras

As amostras de sementes de cardo foram colhidas no ano de 2019 na Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV), que cultiva esta espécie de plantas para estudos que visam esclarecer diferenças ao nível genético dentro da espécie que possam influenciar variações na produção de Queijo da Serra com Denominação de Origem Protegida (DOP).

No campo onde se encontra a plantação de cardos, estão também presentes todas as espécies existentes na região demarcada do Queijo da Serra da Estrela com o objetivo de recriar a zona na sua essência. Tais espécies podem ser divididas em 3 grupos: vegetação basal, intermédia e superior nas quais podemos salientar sobreiro (*Quercus suber*) para o andar basal; carvalho-negral (*Quercus pyrenaica*), bosques de bétulas (*Betula alba*) e teixos (*Taxus baccata*) para os andares intermédio; e zimbro (*Juniperus communis*) e piorno (*Cytisus oromediterraneus*) para o superior.

Para uma melhor análise deste subproduto, separou-se a parte interior (miolo) da semente da sua casca, obtendo assim duas partes distintas (figura 10). Ambas as partes foram analisadas a nível físico-químico.



Figura 10-Ilustração das sementes do cardo: (A)-sementes inteiras; (B)-Miolo da semente; (C)-Casca da semente

2.4 Determinação do conteúdo em lenhina, humidade e cinzas

A determinação do conteúdo em lenhina foi apenas efetuada às cascas da semente do cardo que foram previamente secas numa estufa a 105 °C durante uma noite, etapa na qual se determinou a percentagem de humidade. Neste passo também se determinou a humidade relativamente ao interior da semente. Colocou-se aproximadamente 500 mg de amostra numa caixa de petri numa estufa a 105 °C onde permaneceram durante 8 h. A percentagem de humidade foi determinada de forma gravimétrica pela diferença de massa obtida após o tempo que as amostras estiveram na estufa.

A metodologia usada para a determinação do conteúdo em lenhina foi adaptada da literatura [64], [65]. Foi pesada aproximadamente 1 g de amostra, em triplicado e colocada num Erlenmeyer juntamente com 15 mL de H₂SO₄ a 72% (m/v) e incubou-se a 30 °C durante 1 h sob agitação. Após a pré-hidrólise, foram adicionados 345 mL de água destilada obtendo assim uma solução com 3 % (m/v) de H₂SO₄ e colocou-se em refluxo durante 4 h a 100 °C. Posteriormente as amostras foram filtradas, utilizando filtros de placa porosa. O filtrado foi usado para determinação da lenhina solúvel em ácido e o resíduo foi lavado com água quente até à obtenção de pH neutro do filtrado resultante das lavagens. Este resíduo foi seco durante a noite numa estufa a 105 °C e, posteriormente, pesado.

Ao filtrado foi medida a absorvância ao comprimento de onda de 205 nm num leitor de microplacas (BioTek) para a determinação da lenhina solúvel em ácido. É necessário garantir que o filtrado absorve no intervalo de 0,4 a 0,7 u.a. Foi utilizada uma microplaca de quartzo para as medições e, realizaram-se várias diluições (F.D = 4, 10 e 20).

O teor em lenhina resulta da soma da lenhina solúvel e da insolúvel em ácido. A lenhina solúvel, é determinada de acordo com a equação 1 (A – absorvância, D – fator de diluição, Vt – volume total, a – coeficiente de extinção da lenhina (110 g/L), b – largura da célula (cm) e M – massa inicial da amostra):

$$(1) \text{ ASL} = \frac{A D Vt}{a b M} \times 1000 \left(\frac{mg}{g} \right)$$

A lenhina insolúvel em ácido é determinada gravimetricamente pela diferença entre o resíduo obtido após a hidrólise e a subtração da massa de cinzas. A percentagem de cinzas foi determinada no resíduo insolúvel em ácido e no interior da semente. Neste ensaio, utilizaram-se cadinhos de porcelana onde foi colocada a amostra, cada uma em triplicado. A amostra foi incinerada e, em seguida, os cadinhos foram colocados numa mufla durante 7 h a 700 °C . Depois de arrefecer num exsiccador, os cadinhos com as cinzas foram pesados de forma a obter a massa das cinzas [66].

2.5 Quantificação da proteína

A análise elementar foi realizada para determinação da percentagem de carbono, oxigénio, hidrogénio e nitrogénio, nos extratos de água e seus respetivos resíduos de ambas as partes da semente. A análise elementar foi realizada num equipamento de análise elementar da marca Leco TruSpec 630-200-200 com um detetor TCD (detetor de condutividade térmica). A temperatura de operação do forno de combustão foi de 1075 °C e a temperatura do pós-queimador foi de 850 °C. A condutividade térmica foi usada para detetar o nitrogénio.

De acordo com FAO (1973) [67] foi utilizado um fator de conversão adequado para sementes de 5,3, para a determinação do conteúdo proteico a partir da quantidade de nitrogénio elementar.

2.6 Extração dos compostos lipofílicos

O método de Soxhlet é um sistema fechado que utiliza refluxo de solvente, num processo de extração intermitente. O extrator de Soxhlet contém uma câmara central onde está retida a amostra, dentro de um cartucho de fibra de vidro, que se enche à medida que ocorre condensação do solvente (Figura 11). Quando atinge o sifão, o solvente em contacto com a amostra é descartado para o balão de fundo redondo onde está o solvente em excesso, arrastando os compostos lipofílicos extraídos. Este método é utilizado para a extração de metabolitos secundários de origem vegetal como, por exemplo, ácidos gordos, fitoesteróis e terpenóides [18].

A parte interior da semente e a sua casca foram congeladas com azoto líquido e moídas com um pilão e sujeitas a uma extração dos compostos lipofílicos. Relativamente à metodologia, foi utilizado um banho térmico a 80°C, o solvente utilizado foi *n*-hexano (ponto de ebulição de 69°C) e, realizaram-se 3 réplicas para cada amostra, sendo que cada réplica continha aproximadamente 5 a 6 g de amostra. De modo a garantir a eficácia da extração dos lípidos existentes, foi contabilizado o tempo que demorava a realizar um ciclo e, assim, conduziu-se a extração até se realizarem, pelo menos, 50 ciclos.

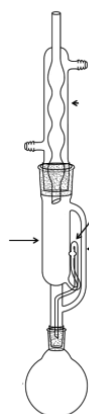


Figura 11-Esquema do sistema de extração do material lipofílico - metodologia de Soxhlet – adaptado de [18]

Ao interior da semente foi ainda realizada uma segunda extração com clorofórmio: metanol (2:1 v/v) de forma a potenciar a extração de compostos com polaridade intermédia. Neste caso a única alteração feita foi em relação à temperatura do banho térmico, que foi ajustada a 69 °C [56].

2.6.1 Análise dos compostos lipofílicos

Os compostos lipofílicos presentes no óleo extraído do interior e da casca da semente foram analisados por duas metodologias: a determinação do perfil de triacilglicerídeos (FAME – fatty acid methyl esters) por cromatografia em fase gasosa e os compostos lipofílicos livres como derivados sililados por cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa.

2.6.1.1 Análise do perfil de ácidos gordos esterificados

O perfil de ácidos gordos esterificados existente no óleo extraído de ambas as partes da semente foi determinado por transesterificação. A principal vantagem da utilização deste método, para além da rapidez, é o facto de se realizar à temperatura ambiente o que reduz significativamente o risco de oxidação dos ácidos gordos.

Pesaram-se aproximadamente 3 mg de amostra para um tubo Sovirel, ao qual se adicionou 100 µL de solução de padrão interno, o heptadecanoato de metilo (C17:0), em metanol numa concentração de 7 mg mL⁻¹, seguido de 1 mL de *n*-hexano e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio 2 M em metanol. Agitou-se, vigorosamente, no vortex durante 30 s. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de uma solução saturada de hidróxido de sódio e, centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 min de modo a separar a fase orgânica da aquosa. No final, foi retirada uma alíquota de 1 mL da fase orgânica. Os ácidos gordos foram identificados e quantificados pela análise por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama. O cromatógrafo utilizado foi um Perkin Elmer Clarus 400 equipado com uma coluna de sílica fundida DB-FFAP com 0,32 mm de diâmetro, 30 m de comprimento e 0,25 µm de espessura de filme. Esta coluna é ideal para a análise de ácidos gordos voláteis e fenóis, devido à sua elevada polaridade. As temperaturas do injetor e detetor estavam programadas para 245 e 250 °C, respetivamente. O forno foi programado para três rampas de aumento de temperatura: desde 75 a 155 °C com um aumento de 15 °C/min, de 155 até 180 °C a 3 °C/min e, por último de 180 até 220 °C a 20 °C/min à qual se manteve por 3 min, perfazendo um tempo total de corrida de 17,7 min. O gás de arraste foi o hidrogénio a uma pressão à cabeça da coluna de 17 psi. Os ácidos gordos metilesterificados foram identificados de acordo com o tempo de retenção de uma mistura comercial de ácidos gordos metilesterificados (C8-C24) [68]. A quantificação foi realizada com base na razão das áreas entre o analito e o padrão interno utilizado. Todas as amostras analisadas foram realizadas em triplicado (n=3).

2.6.1.2 Análise dos compostos lipofílicos livres

Nesta análise foi realizada uma reação de derivatização – sililação – as reações de derivatização servem para transformar o analito num derivado volátil que permita a sua eluição sem decomposição térmica. No caso da sililação, é dos métodos de derivatização mais utilizados e, consiste na substituição

dos hidrogénios dos grupos hidroxilo que estão disponíveis para realizar ligações por pontes de hidrogénio por um grupo trimetilsilil ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) diminuindo a polaridade do analito e as ligações por pontes de hidrogénio. Normalmente o agente sililante mais utilizado é o N, O – bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida, figura 12 [18].

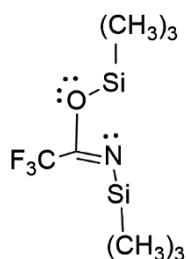


Figura 12-Estrutura química do agente sililante N, O - bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida

A metodologia para a realização deste ensaio foi adaptada de Vilela et al [67]. Previamente preparou-se uma solução padrão de tetracosano em piridina ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Pesaram-se cerca de 20 mg de cada amostra, em triplicado, para um tubo de Sovirel ao qual foram adicionados 250 μL da solução de padrão interno, 250 μL N, O – bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida e 50 μL de cloreto de trimetilsililo e, incubou-se durante 30 min a 70 °C num bloco de aquecimento. Posteriormente, foi injetada uma alíquota de 1 μL num cromatógrafo em fase gasosa (Shimadzu CG-MS-QP2010 ULTRA) equipado com uma coluna HT5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,10 μm de espessura de filme), com o injetor a 250 °C e em modo split (razão de 33). O forno foi programado para uma temperatura inicial de 80 °C seguida de um aquecimento de 4 °C/min até 260 °C e, por último um aumento de 2 °C/min até 285 °C à qual permaneceu 10 min, perfazendo um tempo total de corrida de 72,5 min. A velocidade linear do gás de arraste (He) foi definida a 35 cm/s. Os espectros de massa foram adquiridos entre 700 e 33 m/z com uma energia de ionização a 70 eV. Os compostos foram identificados como derivados trimetilsililados (TMS) pela comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa das bibliotecas existentes Wiley e NIST [68], [69]. Para uma quantificação correta dos compostos existentes, foram usados fatores de resposta previamente obtidos em relação ao tetracosano para cada família: ácido palmítico ($r^2=0,905$ $y=0,69x$) para os ácidos gordos, estigmasterol ($r^2=0,972$ $y=0,65x$) para os esteróis e 1-dodecanol ($r^2=0,963$ $y=0,94x$) para álcoois alifáticos de cadeia longa. Foram analisados por este método os compostos lipofílicos extraídos com *n*-hexano, o SnAIR do miolo e com a mistura de solventes clorofórmio: metanol (2:1 v/v). No entanto, para o material extraído com a mistura de solventes e SnAIR, o forno foi programado de outro modo, atingindo temperaturas mais altas. O forno foi preparado para uma temperatura inicial de 160 °C, seguido de um aquecimento a 4 °C/min até 260 °C e, por último a 5 °C/min até 350 °C à qual permaneceu durante 5 min perfazendo um tempo total de corrida de 48 min. Todas as amostras analisadas foram realizadas em triplicado ($n=3$).

2.6.2 Análise por espectrofotometria UV-Visível do material extraído com clorofórmio: metanol

A espectrofotometria UV- Visível é uma espectroscopia de absorção e uma técnica de análise quantitativa. A absorvância (A) exprime a energia luminosa que é absorvida por uma espessura de um material, isto é, a capacidade de absorver luz. Sendo possível relacionar com a transmitância (T), isto é, resulta da relação que há entre a intensidade da luz transmitida após a passagem pela amostra (I) e a que incide na amostra (I_0) equações 2 e 3.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2) \qquad A = \log_{10} (T) \quad (3)$$

A análise por espectrofotometria UV- Visível foi realizada para verificar se o material extraído com clorofórmio: metanol contém compostos que absorvam na zona do UV-Vis, como por exemplo os compostos fenólicos, que podem interagir com as membranas. Foram utilizadas diferentes massas desta fração dissolvidas no respetivo solvente e analisadas por espectrofotometria UV-Visível, utilizando um leitor da *BioTek*.

2.7 Extração sequencial dos compostos solúveis em meio aquoso

Ao material desengordurado do interior da semente e da casca foram realizadas duas extrações sequenciais:

- 1) extração em etanol: a amostra foi macerada numa solução com etanol a 85% e levada à fervura durante 10 min com um sistema de refluxo. Após este tempo, procedeu-se a uma filtração sob vácuo, com funis de placa porosa, e o resíduo insolúvel em álcool (AIR) foi seco numa estufa durante noite a 105°C. O sobrenadante (SnAIR) foi concentrado utilizando um evaporador rotativo (BÜCHI Rotavapor R-114), congelado e liofilizado.
- 2) extração em água quente: o AIR foi macerado em água destilada, numa razão massa – volume utilizada de 0,03 g/mL, de acordo com Martins et al. [70], e levado ao ponto de fervura durante 2 h. Ao fim desse tempo, os extratos foram filtrados sob vácuo, com funis de placa porosa. O resíduo foi congelado e liofilizado e extrato aquoso foi dialisado, usando mangas de diálise com *cut-off* de 12-14 kDa. Inicialmente realizaram-se duas mudas diárias da água da diálise e, posteriormente apenas uma até atingir a condutividade idêntica à da água destilada ($\sigma = 1 \mu\text{S cm}^{-1}$). O extrato dialisado foi congelado e, posteriormente liofilizado.

2.7.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada através do método espectrofotométrico de Folin - Ciocalteu utilizando como padrão o ácido cafeico. O método Folin – Ciocalteu, ou método dos fenóis totais, consiste na mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (reagente de Folin) que, em meio alcalino, reage com os compostos fenólicos existentes em solução, ocorrendo consequentemente a dissociação de um próton fenólico, formando o anião fenolato. Por sua vez, o anião gerado tem a capacidade de reduzir o reagente de Folin, formando um complexo azul de molibdênio que absorve intensamente a 750 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração de compostos fenólicos.

A metodologia para a execução deste ensaio foi adaptada de Ferreira et al. [71]. Foi preparada uma solução padrão de ácido cafeico ($0,250 \text{ mg mL}^{-1}$) em etanol, e dessa solução foram retirados 0, 200, 400, 600, 790, 1190 e 1590 μL aos quais se juntou etanol até perfazer um volume total de 2 mL. Elaborou-se uma curva de calibração com soluções padrão de ácido cafeico em etanol ($r^2=0,974$; $y=3,5513 + 0,0745x$), pela qual se quantificou o total de compostos fenólicos existentes. Os volumes utilizados para a realização do ensaio foram adaptados de modo a se utilizar uma microplaca de 96 poços. Assim sendo, adicionou-se a cada poço 60 μL de água destilada, 15 μL de padrão ou amostra e 15 μL de reagente Folin, deixando incubar à temperatura ambiente durante 5 min. Por último, adicionaram-se 150 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3 7% (m/v)) e, deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 1 hora. Ao final do tempo de reação mediu-se a absorvância a 750 nm no leitor de microplacas (*BioTek*). Os extratos testados quanto ao seu teor em compostos fenólicos foram os sobrenadantes da extração em etanol a 85% e extratos de aquosos do miolo e casca. Também o material obtido pela extração pelo método de Soxhlet com a mistura de solventes clorofórmio: metanol foi analisado. Todos os extratos foram pesados entre 0,46 a 2,44 mg e dissolvidos em 1 mL do solvente utilizado (etanol 85%, água destilada ou clorofórmio: metanol, respetivamente). Os resultados obtidos foram expressos como compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido cafeico (mg/g de extrato). Foram analisadas 3 réplicas para cada padrão e amostra.

2.7.2 Análise de Polissacarídeos

2.7.2.1 Análise dos açúcares neutros

Para a análise de açúcares foi realizada uma derivatização – acetilação – sendo assim identificados como acetatos de alditol. As reações de derivatização servem para transformar o analito num derivado volátil que permita a sua eluição sem decomposição térmica. O agente acetilante utilizado foi o anidrido acético - $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$.

Pesaram-se aproximadamente 2 mg de cada fração (amostra desengordura, AIR, SnAIR, EA e REA de ambas as partes) para um tubo de cultura, ao qual foram adicionados 200 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 72% (m/m) para fazer uma pré-hidrólise dos polissacarídeos. Esta mistura esteve à temperatura ambiente durante 3 h com agitação pontual. De seguida, adicionaram-se 2,2 mL de água destilada, obtendo-se uma concentração final de 1 M de H₂SO₄, e colocou-se num bloco de aquecimento a 100 °C durante 2 h e 30 min para a hidrólise, sendo que ao final da primeira hora removeu-se uma alíquota de 0,5 mL para a análise dos ácidos urónicos (secção 2.7.2).

Arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e, adicionaram-se 200 µL de padrão interno, 2-deoxi-glucose (1 mg mL⁻¹) a cada tubo, e transferiu-se 1 mL para novos tubos e neutralizou-se com 200 µL de amoníaco (NH₃) a 25 %. O pH foi verificado, garantindo a eficácia da neutralização da solução. Seguidamente as amostras foram reduzidas com 100 µL de boro-hidreto de sódio (NaBH₄) 15 % (m/v) em NH₃ a 3 M, e colocadas num bloco a 30 °C durante 1 h. Colocaram-se novamente os tubos num banho de gelo e adicionou-se 2 vezes 50 µL de ácido acético glacial, para a destruição do excesso de BH₄⁻. Foram transferidos 300 µL para tubos de Sovirel e mantidos no banho de gelo durante a adição de 450 µL de 1-metilimidazol e de 3 mL de anidrido acético, os quais foram bem agitados e colocados novamente num bloco de aquecimento a 30 °C durante 30 min. Nesta etapa promove-se a acetilação dos monossacarídeos presentes na amostra.

Novamente num banho de gelo, adicionou-se 3 mL de água destilada para a destruição do excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), agitaram-se muito bem manualmente, os tubos com o objetivo de extrair os acetatos de alditol para a fase orgânica. Para essa separação de fases, foram centrifugados durante 30 s a 3000 rpm. A fase aquosa foi aspirada por sucção e o passo anterior foi repetido mais uma vez. De seguida, lavou-se bem a fase orgânica com 3 mL de água destilada, agitou-se e centrifugou-se e, removeu-se a fase aquosa – este passo foi realizado 2 vezes. Por fim, os tubos foram colocados num evaporador rotativo para a evaporação do diclorometano. Ao resíduo seco adicionou-se 1 mL de acetona anidra e colocou-se a evaporar – este passo foi repetido mais uma vez [72]. Todas as análises foram realizadas em triplicado (n=3).

Os acetatos de alditol obtidos após a hidrólise dos polissacarídeos e respetiva derivatização dos monossacarídeos presentes nas diferentes frações obtidas da semente do cardo, foram identificados e quantificados pela análise por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID). Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 20 µL de acetona anidra e injetou-se 2 µL no cromatógrafo em modo *split*. As amostras foram analisadas num cromatógrafo (Perkin Elmer Clarus 400) com uma coluna DB-225 (0,25 mm de diâmetro, 30 m de comprimento e 0,15 µm de espessura de filme). A temperatura do injetor estava programada a 220 °C e o detetor a 250 °C. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 200 °C, seguido de um aumento de 40 °C/min até 220 °C,

permanecendo a essa temperatura durante de 7 minutos, seguido um aumento da temperatura até 230 °C (20 °C/min). Os acetatos de alditol foram identificados de acordo com o tempo de retenção face ao padrão interno utilizado.

2.7.2.2 Análise dos ácidos urônicos

Os ácidos urônicos foram quantificados através de um método espectrofotométrico – método colorimétrico do *m*-fenilfenol (MFF) usando uma curva de calibração de ácido galacturónico (GalA), figura 12. Para a determinação da curva de calibração foi preparada uma solução padrão de ácido galacturónico com uma concentração de 200 ug mL⁻¹ da qual foram retiradas 0, 50, 100, 150, 200 e 250 uL, perfazendo com água destilada um volume total de 500 uL, obtendo assim soluções padrão com diferentes concentrações de ácido galacturónico.

As alíquotas retiradas durante o processo de hidrólise (secção 2.7.1) foram diluídas em 3 mL de água destilada. Para todos os padrões e amostras prepararam-se 3 tubos (1 branco e 2 réplicas), tendo-se adicionado 0,5 mL de amostra diluída. Colocaram-se os tubos num banho de gelo e, de seguida, adicionou-se a cada um 3 mL de borato de sódio (50 mM) preparado em ácido sulfúrico concentrado. Agitaram-se manualmente os tubos e colocaram-se num banho a 100 °C durante 10 min e, novamente arrefecidos num banho de gelo.

Para cada padrão e amostra foi efetuado um branco, no qual se adicionaram todos os reagentes à exceção do agente cromóforo (MFF 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH). Foram adicionados 100 µL de MFF aos restantes tubos, agitados manualmente e deixados a reagir no escuro à temperatura ambiente durante 30 min [72]. No final do tempo de reação, agitaram-se novamente os tubos e leu-se a absorvância a 520 nm num leitor de microplacas (*BioTek*).

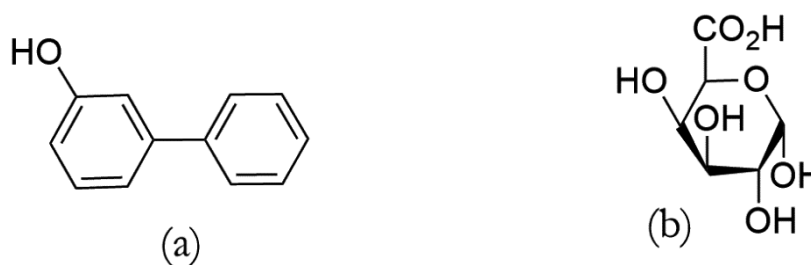


Figura 13-Estrutura química do agente cromóforo (a): *m*-fenilfenol e do padrão (b): ácido galacturónico

2.7.2.3. Análise de ligações glicosídicas

De modo a caracterizar os polissacarídeos existentes nas amostras procedemos a uma análise das ligações glicosídicas pela análise dos acetatos de alditol parcialmente metilados (*PMAs* – *Partially Methylated Alditol Acetate*) [73]. Esta análise foi realizada aos extratos de água e os seus resíduos tanto do interior da semente como da casca. O processo de obtenção dos *PMAs* divide-se em três etapas: a) metilação; b) hidrólise; e c) redução e acetilação.

- a) Metilação: pesaram-se 1 a 2 mg de amostra para tubos speedvac e colocaram-se durante uma noite numa estufa de vazio sob a presença de pentóxido de fósforo (P_2O_5) garantindo a menor percentagem de humidade possível na amostra. De seguida foi adicionado 1 mL de DMSO, seco com peneiros moleculares de 3 Å, a cada tubo, e ficou sob agitação durante a noite para a dissolução total da amostra. Após a dissolução, adicionaram-se 40 mg de NaOH triturado sob atmosfera de argón e deixou-se reagir sob agitação durante 30 min à temperatura ambiente. Promovido o meio básico na solução, procedeu-se à adição de 80 µL de iodeto de metilo (CH_3I) e a mistura foi colocada novamente sob agitação vigorosa durante 20 min – este passo foi repetido mais duas vezes. Em seguida foram adicionados 2 mL de uma mistura de solventes (clorofórmio: metanol 1:1 v/v) e agitados. Transferiu-se a amostra para uma manga de diálise com *cut-off* 12-14 kDa e foram colocadas a dialisar numa solução etanólica a 50% (a solução foi mudada 3 vezes). No final da diálise, transferiram-se os dialisados para tubos e foram concentrados até à secura no evaporador rotativo. Na amostra seca foram repetidos todos os passos desta etapa, iniciando na adição do DMSO.
- b) Hidrólise: às amostras metiladas foram adicionados 500 µL de TFA e incubação num bloco de aquecimento a 121 °C durante 1 h, seguida de evaporação do solvente no evaporador rotativo.
- c) Redução e acetilação: às amostras hidrolisadas foram adicionados 20 mg de NaBD₄ e 300 µL de NH₃ (2 M) que reagiram durante 1 h a 30 °C. Posteriormente, arrefeceram-se os tubos em gelo e foram adicionados por duas vezes 50 µL de ácido acético glacial para a destruição do NaBD₄. Quanto à acetilação foi realizado tal como descrito na análise de açúcares totais para a obtenção dos acetatos de alditol (secção 2.7.1).

Nos extratos de água também se realizou a redução dos grupos carboxílicos de modo a entender como os ácidos urónicos estão ligados nos polissacarídeos. Para a realização desta análise, os polissacarídeos depois de metilados e dialisados de cada amostra foram divididos para 2 tubos (um para análise dos acetatos de alditol parcialmente metilados e outro para a análise dos acetatos de alditol parcialmente metilados com redução dos grupos carboxílicos). Partindo da amostra seca e metilada, procedeu-se à adição de 20 mg de LiAlD₄ (um agente redutor forte capaz de reduzir um ácido carboxílico a álcool) e 1 mL de tetraidrofurano (THF), seco com peneiros moleculares de 3 Å, que reagiram durante 4 h a 65 °C num bloco de aquecimento. No final do tempo de reação adicionaram-se 2 a 3 gotas de etanol seguidas de 2 a 3 gotas de água cujo objetivo foi a destruição do LiAlD₄ e foi-se adicionando HCl

1 M para a neutralização da solução. Posteriormente foram adicionados 2 mL de uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e centrifugou-se 30 s a 3000 rpm. Retirou-se a fase orgânica para novos tubos e repetiu-se este passo mais duas vezes. Quanto aos sobrenadantes recolhidos foram adicionados e levados à secura no evaporador rotativo. A partir deste passo, procedeu-se à hidrólise, redução e acetilação como descrito anteriormente [72]. Posteriormente, foi injetada uma alíquota de 1 µL num cromatógrafo em fase gasosa (Shimadzu CG-MS-QP2010 ULTRA) equipado com uma coluna HT5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,10 µm de espessura de filme), com o injetor a 250 °C e em modo split (razão de 2). O forno foi programado para uma temperatura inicial de 80 °C seguida de três rampas de aquecimento: a 1ª um aquecimento de 7,5 °C/min até 140 °C à qual permaneceu durante 5 min, a 2ª a 0,20 °C/min até 143,2 °C e por último um aumento de 15 °C/min até 250 °C à qual permaneceu 5 min, perfazendo um tempo total de corrida de 41,12 min. A velocidade linear do gás de arraste (He) foi definida a 50 cm/s. Os espectros de massa foram adquiridos entre 700 e 50 m/z com uma energia de ionização a 70 eV.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Composição química das sementes

O objetivo deste trabalho foi a caracterização das sementes do cardo. Para a concretização do objetivo, as diferentes partes da semente foram separadas, isto é, a casca do miolo. A casca corresponde a 40% e o miolo a 60% da semente. Às duas partes foi determinada a sua composição química, nomeadamente o conteúdo em compostos lipofílicos, proteína, carboidratos, compostos fenólicos, cinzas e humidade (Tabela 3).

Tabela 3- Composição química das sementes de *Cynara cardunculus* L. e dos seus componentes, miolo e casca.

	Óleo (mg/g)*	Carboidratos (mg/g)*	Lenhina (mg/g)*	Proteína (mg/g)*	Compostos fenólicos EAC (mg/g)*	Cinzas (mg/g)*	Humidade (mg/g)*	Total
Semente	240	138	150	181	26	35	4	774
Miolo	390	92		268	24	53	7	834
Casca	10	208	379	50	30	6		683

*Os resultados apresentados são a média de três ensaios independentes (n=3)

O miolo apresentou um rendimento de 39% em óleo, 27% proteína e 9% em açúcares, enquanto que a casca apresentou 38% de lenhina, 21% de açúcares, 5% de proteína e apenas 1% em óleo. No global, foi possível caracterizar cerca de 80% da semente (24% de óleo, 18% em proteína, 15% em lenhina e 14% em açúcares). O óleo representa 24% da semente e é constituído essencialmente por ácidos gordos saturados (ácido palmítico e esteárico) e poli-insaturados (ácido oleico e linoleico) sob o perfil de triacilglicerídeos. No entanto é o miolo que tem o teor mais elevado em óleo, o qual foi possível caracterizar 98% (92% ácidos gordos esterificados e 6% compostos lipofílicos livres).

O conteúdo em proteína existente no miolo (27%) é aproximadamente 5 vezes superior ao conteúdo em proteína da casca (5%). Observando a semente na sua íntegra, verificamos que poderá ser uma fonte de proteína (18%) interessante assim como outras sementes [74], por exemplo, sementes de abóbora que têm sido alvo de estudo para incorporação de produtos alimentares, como ração animal, devido ao seu elevado teor em proteína (24,5% a 36,0%) [75].

O teor em lenhina representa 38% da casca, correspondendo a 15% da semente de cardo, sendo a lenhina insolúvel em ácido (35%), aproximadamente 10 vezes superior à lenhina solúvel em ácido (3%). O facto de a lenhina insolúvel ser o componente maioritário está de acordo com a literatura, que refere que as lenhinas são fibras insolúveis dificilmente hidrolisadas. Comparativamente às outras partes morfológicas do cardo, o conteúdo em lenhina é similar ao dos caules (17%) [18]. Em relação a outras sementes, segundo a literatura, a casca de pinhão, noz e amêndoa possuem valores (39,9%, 29,9 e 28,8% de lenhina, respetivamente) semelhantes do cardo [76]. A lenhina é caracterizada por ser formada por uma estrutura macromolecular tridimensional amorfa. A polimerização das lenhinas pode ser resultante de monómeros de álcoois hidroxicinâmicos como o álcool cumarílico (4-(3-hidroxi-prop-1-enil) fenol); álcool coniferílico (4-(3-hidroxi-prop-1-enil) -2-metoxifenol e álcool sinapílico (4-(3-hidroxi-prop-1-enil) -2,6-dimetoxifenol) [77]. As lenhinas são consideradas fibras dietéticas indigeríveis que podem ter efeitos benéficos à saúde (efeitos prébioticos) e estão presentes em sementes, frutas e alguns vegetais [78].

A parte interior da semente, miolo, e a sua casca, após o seu desengorduramento, foram sujeitas a uma extração com uma solução de etanol a 85% com o objetivo de separar o material de elevado peso molecular, como polissacarídeos e proteínas, que precipitam em etanol (AIR, *alcohol insoluble residue*). Na tabela 4 estão representados os rendimentos obtidos para as extrações para cada parte da semente. Na casca foi obtido um rendimento de 90% em AIR e apenas 9% no sobrenadante do AIR (SnAIR), enquanto que o miolo apresenta um menor teor em AIR (69%) e uma percentagem superior de material solúvel em álcool (27%). O facto de a percentagem de AIR na casca ser elevada e ser essencialmente constituído por açúcares (62%), está associado ao facto das cascas, barreiras de proteção, serem constituídas por celulose, hemiceluloses e lenhina que lhe conferem rigidez, impermeabilidade e proteção contra ataques de agentes patogénicos. O SnAIR da casca da semente, apesar do baixo rendimento, é um extrato rico essencialmente em compostos fenólicos (33%). O miolo apresenta um rendimento superior de material solúvel em etanol (27%) constituído maioritariamente por açúcares (43%), embora também contenha compostos fenólicos (15%), estes devem ser açúcares de baixo peso molecular, que servem como fonte de alimento para a germinação das sementes [43]. O AIR do miolo é constituído por uma mistura de açúcares (25%) e proteína (19%), devido também à sua função nutritiva para o crescimento da nova planta.

Tabela 4-Rendimento obtido, em mg/g, de cada extrato (AIR, SnAIR, EA e REA) obtido para o miolo e casca e a quantificação de proteína, carboidratos e compostos fenólicos (equivalentes de ácido cafeico, EAC)

		Rendimento % (m/m)	Proteína (mg/g)	Compostos fenólicos EAC (mg/g)	Carboidratos (mg/g)
Miolo	AIR ^a	69	185		252
	SnAIR ^a	27	72	148	429
	EA ^b	7	471	9	167
	REA ^b	71	623		121
Casca	AIR ^a	90	45		620
	SnAIR ^a	9	5	331	43
	EA ^b	0,6	110	117	362
	REA ^b	86	59		752

^a Obtido através da amostra desengordurada; ^b obtido através do AIR (Os resultados apresentados são a média \pm desvio-padrão de ensaios independentes (n=3))

Ao material insolúvel em álcool (AIR) foi realizada uma extração em água quente (EA) durante 2 h para promover a solubilização dos compostos solúveis em água, entre os quais, polissacarídeos. Na tabela 4 estão representados os rendimentos obtidos para a extração com água quente (EA) para cada parte da semente, onde se verifica que, tal como na extração com etanol 85%, a casca é a que apresenta menor rendimento na extração (0,6%), enquanto que o miolo apresenta um rendimento de 7% para o EA. O EA e o resíduo obtido após a extração (REA) do miolo são ricos em proteína (47% e 62%, respetivamente), enquanto que os EA e REA da casca são ricos em açúcares (37% e 75%, respetivamente). Este teor elevado em proteína do miolo da semente, além de serem proteínas de reserva da semente que estão armazenadas em organismos próprios, vacúolos de reserva proteica ("protein storage vacuoles"), são também proteínas menores onde se incluem proteases, lipoxigenases, proteínas de defesa, entre outras [79].

O teor em compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido cafeico (EAC), foi determinado para extratos de água, sobrenadantes da extração com álcool de ambas as partes e material lipofílico extraído com a mistura de solventes. Os resultados obtidos indicam que o teor em compostos fenólicos em EAC varia de 9 a 331 mg/g (Tabela 4), sendo estes valores correspondentes às frações EA do miolo e SnAIR da casca, respetivamente. Verifica-se que em ambas as partes os sobrenadantes da extração em

etanol, são os extratos mais ricos nesta família de compostos. No entanto, o SnAIR da casca (331 mg EAC/g de extrato) tem um teor em compostos fenólicos duas vezes mais do que o SnAIR do miolo (148 mg EAC/g de extrato). Quanto aos EA verifica-se que ainda foi possível extrair alguns compostos fenólicos, verificando-se também que o teor em compostos fenólicos é bastante superior na casca (117 mg EAC/g de extrato) quando comparado com o miolo (9 mg EAC/g de extrato). Sendo a casca uma camada protetora da semente, constituída por materiais lignocelulósicos, isto é, celulose, hemiceluloses e lenhina [76], os resultados obtidos seriam os esperados, visto que a lenhina é composta por vários monómeros de compostos fenólicos, o que contribui para o elevado valor de compostos fenólicos obtido, associado a esta parte da semente.

Analisando os valores obtidos por extração, isto é, 9-331 mg EAC/g de extrato, para as sementes, verifica-se que o teor de compostos fenólicos destas é superior a outros subprodutos provenientes da *Cynara cardunculus* L., como dos capítulos (recetáculos e brácteas), caules e folhas (59,4, 52,9 e 22,6 mg EAG/g de extratos (metanol/ água/ ácido acético 49,5:49,5:1 v/v, respetivamente) [18]. Apesar de os rendimentos, dos extratos das sementes serem inferiores às das outras partes morfológicas, (18,7% (m/m) para os capítulos, 17,5% (m/m) para os caules e 28% (m/m) para as folhas [18]), calculando o teor de compostos fenólicos no miolo e casca inicial, obtemos 24 mg EAC/g de miolo e 30 mg EAC/g de casca, o que corresponde a 26 mg EAC/g de semente (Tabela 3), dado que a miolo corresponde a 60% da semente e a casca a 40%. Este valor de compostos fenólicos em EAC por g de semente, é superior ao teor determinado para as folhas, caules e capítulos (6,3 mg EAG/g peso seco, 9,2 mg EAG/g peso seco e 11 mg EAG/g peso seco, respetivamente) [18]. O conteúdo em compostos fenólicos das sementes do cardo revelou também ser superior ao de outras sementes estudadas na literatura, como da espécie *Abelmoschus esculentus* (quiabo), que apresentam um teor em compostos fenólicos de 13-16 mg EAG/g de extrato [80], e *Salvia hispanica* L. (chia), que têm um teor em compostos fenólicos de aproximadamente de 0,9 mg EAG/g de semente [81]. Estes resultados revelam o potencial das sementes do cardo como fonte de compostos fenólicos com atividade antioxidante.

3.2 Caracterização dos compostos lipofílicos

O miolo e casca da semente foram sujeitos a uma extração do material lipofílico (óleo) pelo método de Soxhlet com o solvente *n*-hexano. No miolo foi obtido um rendimento de 39% (m/m) e na casca, apenas de 1%. O valor obtido nesta extração para o miolo foi bastante superior comparativamente ao que está descrito na literatura, em que o óleo das sementes de *Cynara cardunculus* corresponde a um conteúdo entre 21 e 26% [60]. A diferença entre estes valores deve-se ao facto de, neste ensaio, a casca da semente ter sido retirada. Se relacionarmos a percentagem de óleo obtida para cada fração com o facto de o miolo corresponder a 60% e a casca a 40% na semente, obtemos um rendimento em óleo de 24% para a semente na totalidade, que está de acordo com os valores da literatura (21-26%) onde a

extração do óleo é feita sempre com a semente na íntegra. O miolo é mais rico em gordura do que a casca pois a função da semente é a germinação sendo a gordura do miolo usada como fonte de energia enquanto que a casca atua apenas como barreira de proteção a ataques microbiológicos [82].

No óleo do miolo e da casca foram identificados os seguintes ácidos gordos: ácido palmítico ($C_{16:0}$), ácido esteárico ($C_{18:0}$), ácido oleico ($C_{18:1}$) e ácido linoleico ($C_{18:2}$). O perfil cromatográfico dos ácidos gordos esterificados existentes nos óleos extraídos é apresentado na figura 14.

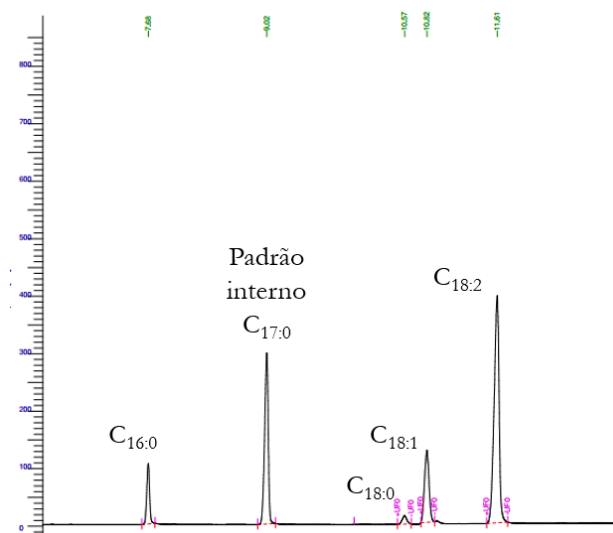


Figura 14-Cromatograma obtido por GC- FID com o perfil em ácidos gordos esterificados do óleo extraído do miolo da semente do cardo

No miolo das sementes os ácidos gordos esterificados correspondem a 916 mg/g de óleo dos quais 68% correspondem ao ácido linoleico, 20% ao ácido oleico, 10% ao ácido palmítico e 2% de ácido esteárico (Figura 15). Na casca os ácidos gordos esterificados apenas representam 462 mg/g dos quais 52% correspondem ao ácido linoleico, 31% ao ácido oleico, 13% ao ácido palmítico e 4% de ácido esteárico (Figura 15). Relacionando os dois óleos, verifica-se que o do miolo tem um conteúdo em TGA cerca de duas vezes superior ao da casca, devido ao maior conteúdo em ácidos gordos poli-insaturados, nomeadamente, o ácido linoleico. No entanto, a proporção dos diferentes ácidos gordos é idêntica em ambas as partes da semente. Esta composição em ácidos gordos esterificados está de acordo com a literatura, em que o óleo das sementes de *Cynara cardunculus* L. é maioritariamente constituído por ácido linoleico (62-65%), ácido oleico (21-22%), ácido palmítico (9-11%) e, minoritariamente em ácido esteárico (2-3%) [43], [17], [83].

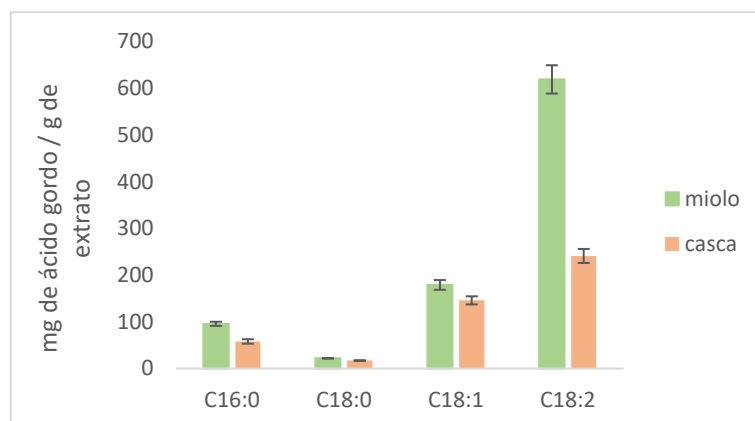


Figura 15-Composição em ácidos gordos esterificados do óleo do miolo e casca da semente do cardo. (Os resultados apresentados são a média \pm desvio-padrão de ensaios independentes (n=3))

Os compostos lipofílicos livres apenas foram analisados no óleo proveniente do interior da semente, pois é o que apresenta um rendimento maior. Na figura 16 está representado o perfil do cromatograma obtido da análise dos compostos lipofílicos livres do óleo extraído com *n*-hexano, assim como a identificação dos picos maioritários, e em anexo é apresentada a lista de todos os compostos identificados com o respetivo espectro de massa (Tabela I). Os compostos lipofílicos livres quantificados representam aproximadamente 6% (56 mg/g de óleo) da composição do óleo extraído das sementes. A tabela 5 mostra a quantidade de cada composto identificado no óleo do miolo. Foram identificados 14 compostos dos quais 50% são ácidos gordos, 21% são fitoesteróis, 7% de α -tocoferol, 7% de ácido benzoico e 14% de compostos não identificados. Nos ácidos gordos foi identificado o ácido linoleico (30 mg/g de óleo), ácido oleico (11 mg/g), ácido palmítico (7 mg/g), ácido esteárico (2 mg/g), ácido azelaico (1 mg/g), ácido eláidico (1 mg/g) e ácido subérico (1 mg/g). Quanto aos fitoesteróis, o composto maioritário encontrado foi o estigmasterol (1,3 mg/g) seguido pelo β -sitosterol (0,6 mg/g). Esta análise mostra que os compostos maioritários sob a forma livre no óleo proveniente da semente de cardo são os ácidos gordos sendo o principal o ácido linoleico, correspondendo a cerca de 50 % dos compostos lipofílicos livres. A composição em ácidos gordos livres é idêntica à proporção de ácidos gordos esterificados (Figura 15). Os 14 % de compostos não identificados dizem respeito a 2 compostos, 1 pertencente à classe dos fitoesteróis pois de acordo com espectro de massa há produções características desta família (471, 213, 129, 75 e 73 m/z).

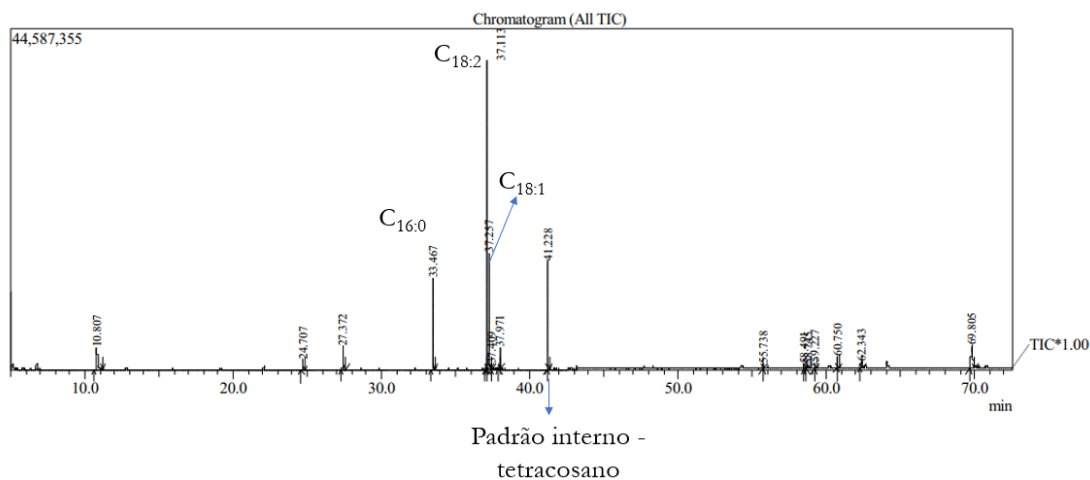


Figura 16-Cromatograma dos compostos lipofílicos livres existentes no óleo extraído do miolo da semente com *n*-hexano.

Tabela 5 -Quantificação dos compostos lipofílicos livres identificados no óleo extraído do miolo da semente do cardo.

Composto	Conteúdo (mg/ g de óleo) ^a
Ácido linoleico	30±12,7
Ácido oleico	11±4,54
Ácido palmítico	7,0±2,33
Ácido esteárico	2,0±0,54
Ácido azelaico	1,4±0,23
Ácido eláidico	1,0±0,41
Ácido subérico	1,0±0,09
Estigmasterol	1,3 ±0,08
β-sitosterol	0,6±0,07
α-tocoferol	0,4±0,10
Campesterol	0,3±0,01
Total	56±19

^aOs resultados apresentados são a média ± desvio-padrão de ensaios independentes (n=3)

Após a extração com *n*-hexano foi realizada uma segunda extração, ao interior da semente com uma mistura de clorofórmio: metanol, com o objetivo de extrair compostos lipofílicos mais polares. O material extraído com esta mistura de solventes apresentou um rendimento de 31% (m/m). Na figura

17 está representado o perfil do cromatograma obtido da análise dos compostos lipofílicos livres deste extrato e na tabela II (anexo) é apresentada a lista de composto identificados. Neste extrato foram identificados 18 compostos, tais como ácidos gordos (ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico) e ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico e 3,4 – hidroxicinamato de metilo). Nesta análise foi ainda possível identificar dois picos correspondentes a dissacarídeos, provavelmente turanose, palatinose, maltose ou maltulose, e também de polióis, possivelmente o D-sorbitol e o inositol. O D-sorbitol é utilizado na indústria alimentar como adoçante e excicante e na indústria farmacêutica desempenha papéis como diurético e incorpora pastas dentífricas. O inositol é a base de sinalizadores celulares e mensageiros secundários nos organismos eucariotas e, ao nível das plantas, tem impacto no seu crescimento e desenvolvimento [84]. Foram também detetados dois compostos pertencentes à classe das cumarinas, possivelmente a esculina e a escopolina que são derivados glicosilados da escopoletina, isto é, pela ação da enzima glicosiltransferase escopoletina [18]. Pela percentagem de área, verifica-se que os compostos maioritários nesta fração são os dissacarídeos e cumarinas glicosiladas. As curmarinas têm vindo a ser alvo de estudo devido às suas propriedades biológicas como atividade antioxidante e antibacteriana [85]. Neste extrato obtido com a mistura de clorofórmio: metanol, em relação ao extrato obtido com *n*-hexano, revela a presença de compostos com um carácter mais hidrofílico, tais como os glicosídeos e ácidos hidroxicinâmicos, devido à natureza dos solventes usados na extração.

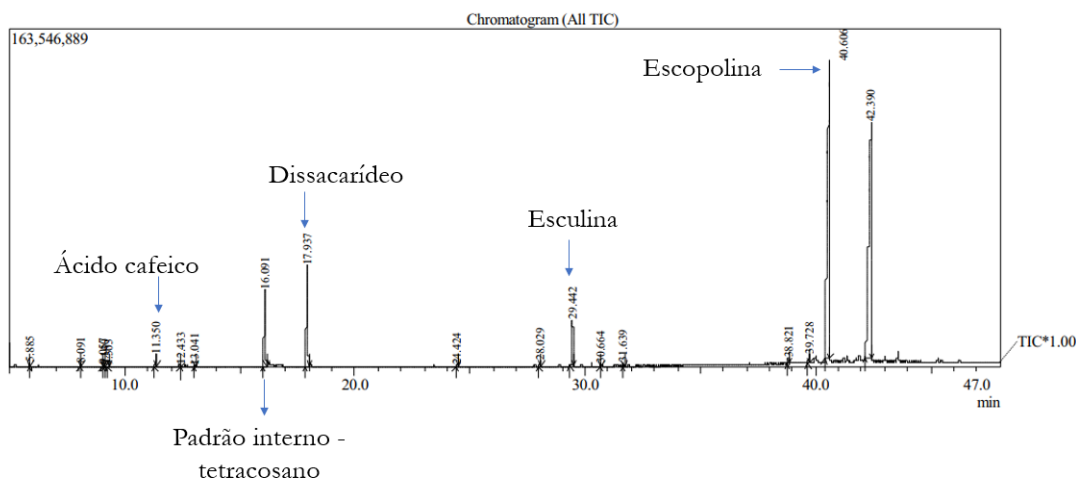


Figura 17-Cromatograma dos compostos lipofílicos livres existentes no material extraído com a mistura de solventes (clorofórmio: metanol 2:1v/v)

O extrato obtido com 85% etanol foi também analisado quanto à sua composição compostos lipofílicos (Figura 19, Tabela III, anexo). A análise permitiu identificar 14 compostos, sendo a sua composição similar ao óleo extraído com mistura de clorofórmio: metanol (Tabela II), sendo os constituintes maioritários os dissacarídeos (sacarose, palatinose ou turanose) e cumarinas glicosiladas (esculina e escopolina), verificando-se também a presença de alguns ácidos gordos (ácido palmítico, ácido linoleico e ácido oleico), polióis (inositol) e ácidos hidroxicinâmicos.

Tabela 6-Compostos lipofílicos identificados no extrato de clorofórmio: metanol e SnAIR do miolo da semente de *Cynara cardunculus* L.

Tempo de Retenção (min)	Composto	% Área	
		Extrato clorofórmio: metanol (2:1 v/v)	SnAIR
5,885	D-Sorbitol	0,11	0,16
7,063	Ácido glucónico	-	0,20
8,091	Ácido cafeico	0,15	-
9,057	Inositol	0,08	0,14
9,140	3,4 Hidroxicinamato de metila	0,02	-
9,303	Ácido palmítico	0,03	0,02
11,350	Ácido cafeico	0,61	1,02
12,292	Ácido linoleico	-	0,12
12,433	Ácido oleico	0,10	0,04
13,041	Ácido esteárico	0,04	-
17,937	Sacarose [56]possivelmente)	9,26	12,6
24,424	Não identificado (Açúcar)	0,10	0,32
28,029	Não identificado (Açúcar)	0,32	1,60
29,442	Cumarina glicosilada / esculina	3,52	10,0
30,664	Não identificado	0,15	-
31,639	Composto aromático	0,19	-
38,821	Dissacarídeo	0,27	2,65
39,728	Dissacarídeo	0,59	-
40,606	Escopolina	44,5	39,4
42,390	Dissacarídeo	34,2	28,7

A análise por espectrofotometria UV-Visível foi realizada para verificar se o material extraído com clorofórmio:metanol contém compostos que absorvam na zona do UV-Vis, como por exemplo os compostos fenólicos. De acordo com a análise do teor em compostos fenólicos, o extrato obtido com clorofórmio: metanol possui 27 EAC mg/g de extrato. As bandas observadas neste espetro, a $\lambda = 250$ nm e a 280 nm visível na figura 18, estão associadas aos compostos aromáticos, como os presentes nos compostos fenólicos, confirmando a sua presença neste extrato, nomeadamente ácidos hidroxicinâmicos, como se verificou na análise dos compostos lipofílicos (Tabela 6). No entanto este espetro induz a presença de flavonas e flavonóides, pois esta classe de compostos fenólicos são caracterizados por duas bandas, uma na zona entre os 240-280 nm que corresponde ao anel benzóil e outra entre os 300-380 nm que corresponde ao anel cinamoil [86].

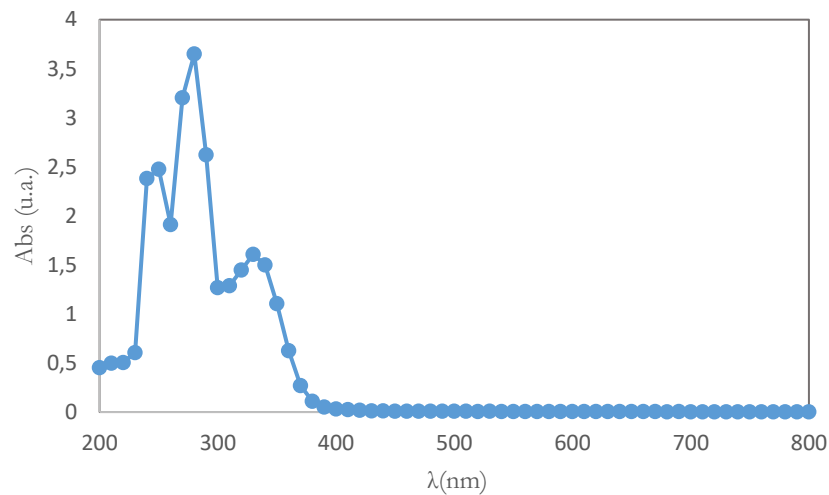


Figura 18-Espectro de absorção do extrato clorofórmio: metanol (2:1 v/v) do miolo da semente do cardo

As membranas biológicas são maioritariamente compostas por lípidos, proteínas, glicolípidos e glicoproteínas, ou seja, lípidos e proteínas com pequenas porções de sacarídeos ligados covalentemente. Os lípidos estão maioritariamente ligados a um grupo fosfato, designados de fosfolípidos e formam uma bicamada onde as proteínas estão incorporadas de maneira intrínseca ou extrínseca – modelo de mosaico fluido. As proteínas membranares estão associadas a funções estruturais, transporte de substâncias ou ação como recetores. Associado às interações com a membrana estão os compostos fenólicos, uma vez que este tipo de compostos têm a capacidade de agir como agentes redutores, dadores de prótons, sequestradores de radicais livres e supressores do anião superóxido [87]. A sua ingestão está correlacionada com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e preservação cardíaca e neurológica [88]. Naturalmente, o metabolismo de seres expostos ao oxigénio, como o ser humano, produz espécies reativas de oxigénio (do inglês: “ROS – reactive oxygen species”) através da fosforilação oxidativa e a formação de ligações dissulfeto em proteínas que são eliminadas por via enzimática (por exemplo: a catalase) ou por antioxidantes (exemplo: glutatona).

O corpo humano está constantemente sujeito ao contacto com substâncias que não fazem parte do metabolismo normal, cuja presença pode ser tóxica às células. Essas substâncias são designadas de xenobióticos onde estão incluídas drogas sintéticas e venenos [89]. À presença de xenobióticos no organismo está relacionado o stress oxidativo que é o desequilíbrio entre a produção espécies reativas de oxigénio e a sua eliminação através dos sistemas enzimáticos ou não enzimáticos, ou seja, existe um maior número de agentes oxidantes no corpo que podem danificar estruturas celulares (desde lípidos ao DNA). O enriquecimento da dieta com alimentos ricos em compostos fenólicos propicia a destruição de radicais livres diminuindo o stress oxidativo.

3.3 Análise dos carboidratos da semente do cardo

Os subprodutos, neste caso, os extratos obtidos de ambas as partes das sementes de cardo, além de serem constituídas por compostos lipofílicos e proteína, são também constituídos por carboidratos. Assim, foi determinado o perfil de açúcares totais para cada extrato obtido, nomeadamente, amostra desengordurada (após a realização do método de Soxhlet) e os extratos obtidos da precipitação com 85% etanol (AIR e SnAIR) e após a extração em água quente (EA e REA) em ambas as partes da semente (Tabelas 7 e 8). Na figura 21 (anexo) é apresentado o cromatograma obtido por GC-FID do perfil cromatográfico resultante da análise da composição em açúcares neutros.

Tabela 7- Concentração total (mg/g) e composição dos açúcares (% molar) do miolo desengordurado e das diferentes frações da precipitação com 85% etanol (AIR e snAIR) e extração com água quente (EA e REA) do miolo da semente do cardo.

	Monossacarídeos (mol %) ^a								Total de carboidratos (mg /g)
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA	
Miolo desengordurado			17	5	2	8	68		92±32
AIR	1		30	6	2	6	27	28	252±15
SnAIR			0,5	0,5	2	8	87	2	429±15
EA			64	7	2	9	4	14	167±11
REA	1	1	34	11	2	5	24	22	121±11

^aOs resultados apresentados são a média ± desvio-padrão de ensaios independentes (n=3)

No miolo da semente desengordurado os açúcares totais correspondem a 92 mg/g, constituído principalmente por glucose (68 mol%) e arabinose (17 mol%). Comparando os diferentes extratos, o sobrenadante da extração em álcool (SnAIR) é a fração mais rica em açúcares, 429 mg/g, essencialmente glucose (87 mol%). Este resultado confirma que esta parte da semente é essencialmente constituída por açúcares pequenos, isto é, monossacarídeos, dissacarídeos e/ou trissacarídeos. O AIR e o REA têm baixa quantidade de açúcares, 252 e 121 mg/g respetivamente, sendo constituídos por arabinose (30-34 mol%), glucose (24-27 mol%) e ácido urónico (22-28 mol%). O extrato obtido com água quente apresenta um

conteúdo baixo em polissacarídeos (167 mg/g) e é constituído principalmente por arabinose (64 mol%) e ácido urónico (14 mol%).

Tabela 8 - Concentração total (mg/g) e composição dos açúcares (% molar) da casca desengordurada e das diferentes frações da precipitação com 85% etanol (AIR e SnAIR) e extração com água quente (EA e REA) da casca da semente do cardo.

	Monossacarídeos (mol %) ^a								Total de carboidratos (mg /g)
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA	
Casca desengordurada	1		6	21	1	2	29	40	208±20
AIR	1		6	33	1	2	49	8	620±33
SnAIR			9		8	12	56	15	43±8
EA	3		41	8	11	12	9	16	362±29
REA	1	0,1	5	33	1	1,4	36	22	752±30

*amostra inicial após desengorduramento; ^aOs resultados apresentados são a média ± desvio-padrão de ensaios independentes (n=3)

Por sua vez, na casca verifica-se uma quantidade superior de açúcares totais (208 mg/g) para a amostra desengordurada, contendo ácidos urónicos (40 mol%), glucose (29 mol%) e xilose (21 mol%). Contrariamente ao miolo o SnAIR é a fração mais pobre em açúcares (43 mg/g), sendo também constituído essencialmente por glucose (56 mol%). O facto de o SnAIR ser pobre em carboidratos induz que a casca é essencialmente constituída por polissacarídeos. As frações com maior rendimento de carboidratos corresponde ao AIR (620 mg/g) e ao resíduo insolúvel proveniente da extração em água quente (752 mg/g) que são essencialmente compostos por glucose (36-49 mol%), xilose (33 mol%) e ácidos urónicos (8-22 mol%). O extrato solúvel em água quente contém 362 mg/g de carboidratos e é principalmente constituído por arabinose (41 mol%) e menores quantidades de ácido urónico, galactose, manose, glucose e xilose (16-8 mol%).

O elevado conteúdo em glucose, xilose e arabinose nos resíduos insolúveis (AIR e REA) do miolo e casca da semente está relacionado com a presença de amido, celulose e hemiceluloses (glucanas,

xilanas, arabinoxilanas e arabinanas) que constituem as paredes celulares de tecidos celulares que são insolúveis em água. Relativamente à presença de ácidos urónicos em ambas as partes da semente, poder-se-á associar a presença de polissacarídeos pécticos que estão presentes na lamela média das paredes celulares das plantas.

Como o material lipofílico extraído com a mistura de solventes clorofórmio:metanol (2:1 v/v) do miolo da semente revelou conter dissacarídeos (Tabela 6), foi também analisada a sua composição em açúcares, apresentada na tabela 9. Este extrato contém cerca de 29 % (m/m) de carboidratos constituídos maioritariamente por glucose (95 mol%), tal como se verificou para o SnAIR do miolo (Tabela 7). Este resultado parece indicar que o dissacarídeo identificado neste extrato pode ser maltose.

Tabela 9 - Conteúdo total (mg/g) e composição dos açúcares totais (% molar) do material lipofílico extraído com clorofórmio: metanol (2:1 v/v).

	Monossacarídeos (mol %)				Total de carboidratos (mg/g)
	Xyl	Man	Gal	Glc	
Óleo	1±0,1	2±0,2	2±0,4	95±0,6	295±20

Com o objetivo de identificar as ligações glicosídicas, permitindo inferir quais os tipos de polissacarídeos existentes nas sementes da espécie *Cynara cardunculus* L. realizou-se uma análise por metilação às frações obtidas pela extração com água quente do miolo e casca da semente, isto é, extratos de água (EA) e respetivo resíduo insolúvel (REA). Os resultados da análise das ligações glicosídicas encontram-se na tabela 10.

Tabela 10-Identificação e quantificação, em % molar, das ligações glicosídicas identificadas na análise dos acetatos de alditol parcialmente metilados por GC-MS (* - não detetados por GC-FID, mas detetado por GC-MS)

Ligações glicosídicas	EA	EA	REA	REA
	Miolo	Casca	Miolo	Casca
<i>t-Fucp</i>		0,4±0,06*	0,72±0,15	0,4±0,03
<i>2-Fucp</i>		0,9±0,30*		0,8±0,03
Total		1,3±0,36*	0,72±0,15 (1%)	1,2±0,05 (0,2%)
<i>t-Araf</i>	21,8±2,49	16±0,6	19,6±0,04	3,6±0,61
<i>t-Arap</i>	2±0,81	1,4±0,24		
<i>2-Araf</i>	0,3±0,05	0,6±0,09		1,6±0,12
<i>3-Araf</i>	4,7±0,92	13±0,32		
<i>5-Araf</i>	22,5±0,71	7,4±0,22	16,4±1,50	4,5±1,3
<i>3,5-Araf</i>	19,2±8,9	1,2±0,04	21,5±0,10	1,2±0,77
<i>2,5-Araf</i>	11,3±2,4	16±0,97		
Total	82±1,60 (74%)	55±0,53 (49%)	57,5±1,65 (44%)	11±2,79 (7%)
<i>t-Xylp</i>	1,8±0,4	1,1±0,29	4,2±0,43	1,7±0,05
<i>2-Xylp</i>			1,3±0,03	
<i>4-Xylp</i>	1,7±0,08	7,6±0,05	2,5±0,03	29,1±3,07
Total	3,5±0,32 (9%)	9±0,33 (9%)	8±0,38 (14%)	30,8±3,02 (43%)
<i>t-Manp</i>	0,6±0,18	0,8±0,19	0,83±0,16	0,5±0,27
<i>4-Manp</i>		11,6±0,88		4,2±1,46
Total	0,6±0,18 (2%)	12±0,86 (13%)	0,83±0,16 (2%)	4,7±1,73 (1%)
<i>t-Galp</i>	0,6±0,05	1,4±0,33	1,06±0,20	0,8±0,3
<i>2-Galp</i>	0,4±0,06	0,2±0,07	0,33±0,20	
<i>4-Galp</i>		0,4±0,16		
<i>6-Galp</i>	1,1±0,38	2,7±0,16		
<i>3,6 -Galp</i>	4,9±0,32	5±0,6		
Total	7±0,59 (10%)	10±0,46 (14%)	1,4±0,39 (7%)	0,8±0,3 (1%)
<i>t-Glcp</i>	0,7±0,44	1,9±0,18	0,81±0,41	1,7±0,06
<i>4-Glcp</i>	5,9±0,29	9,8±1,32	26,2±,69	47,8±2,39
<i>4,6-Glcp</i>	0,7±0,18	0,6±0,19	4,6±1,37	2±0,47
Total	7,3±0,33 (5%)	12±1,48 (11%)	31,6±1,65 (31%)	51,5±1,86 (47%)
<i>t-GlcpA</i>		4,6±0,5		
<i>3-GlcpA</i>		1,8±0,02		
<i>3,4-GlcpA</i>		0,8±0,1		
<i>3,4-GalpA</i>		0,5±0,01		
Total		8±0,01 (16%)		

O EA do miolo é essencialmente composto pelas ligações (1→5)-*Araf* (22,5%), (1→3,5)*Araf* (19,2%) e (1→2,5)*Araf* (11,3%). A presença destas ligações juntamente com *t-Araf* (21,8%) é característica das arabinanas constituída por (1→5)-*Araf* na cadeia principal com ramificações nos C₂ e C₃ [90],[91]. No entanto, o conteúdo total em resíduos ramificados de arabinose ((1→3,5)*Araf* e (1→2,5)*Araf*) no EA proveniente do miolo é de 30,5%, sendo um valor superior à percentagem de *t-Araf* (21,8%), o que indica que não são apenas resíduos de Ara que estão nos terminais das cadeias laterais. Esta situação também se verifica nos dois extratos aquosos com a galactose, onde a percentagem

da ligação $(1\rightarrow3,6)\text{Galp}$ (5%) é superior à de $t\text{-Galp}$ (0,6-1,4%). Estes resultados levam a ponderar a presença de outros compostos na estrutura do polissacarídeo que estejam ligados ao terminal da ramificação. Esses compostos podem ser compostos fenólicos que muitas vezes estão presentes na estrutura dos polissacarídeos presentes nas paredes celulares [92], [90], [93]. Por exemplo, os polifenóis da maçã apresentam grau de polimerização de 5 pelo que difundem ao longo na membrana num processo de diálise, a não ser que sejam retidos por algum tipo de interação, isto é, polissacarídeo-polifenóis [92]. Também no vinho já foi descrito a presença de polifenóis no material de elevado peso molecular que podem ser fruto de interações entre polissacarídeos pécticos e frações de glucose [94], [95]. As paredes celulares são compostas por polissacarídeos e pequenas porções de proteínas e compostos fenólicos. Estas são estruturas bastante complexas com diversas funções ao longo da vida da célula, como por exemplo o transporte e comunicação intercelular e, por vezes podem contribuir como reserva alimentar [96]. Segundo o modelo clássico, a fase matricial da parede celular é composta por uma variedade de polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos que variam a sua composição nas diferentes camadas da parede assim como no tipo de células e fase do ciclo celular [97]. Com os resultados obtidos para o teor em compostos fenólicos onde foram determinados 117 mg EAC/g de EA para a casca e 9 EAC mg/g de EA para o miolo, a hipótese de que poderão existir compostos fenólicos na estrutura dos polissacarídeos é credível.

O EA da casca é bastante semelhante sendo também constituído por $(1\rightarrow5)\text{-Araf}$ (7,4%), $(1\rightarrow3,5)\text{Araf}$ (1,2%) e $(1\rightarrow2,5)\text{Araf}$ (16%), no entanto as diferenças de percentagem de cada ligação indicam que o EA da casca possui proporcionalmente menor conteúdo de $(1\rightarrow5)\text{-Araf}$, em relação aos resíduos ramificados ($(1\rightarrow3,5)\text{Araf}$ e $(1\rightarrow2,5)\text{Araf}$), o que indica um polímero mais ramificado do que no miolo. Neste extrato não se verifica a diferença entre os resíduos ramificados e o terminal de arabinose, podendo indicar que não contém compostos fenólicos ligados covalentemente ao polissacarídeo.

Na figura 20A é possível ver uma representação de uma proposta da estrutura dos polissacarídeos constituídos por arabinose, as arabinanas, existentes nos EA. O R representa possíveis ramificações, que podem ser monómeros de arabinose originando as ligações $(1\rightarrow3,5)\text{Araf}$ ou $(1\rightarrow2,5)\text{Araf}$. No caso do EA do miolo, a razão entre $(1\rightarrow5)\text{Araf}$ e $(1\rightarrow3,5)\text{Araf}$ e $(1\rightarrow5)\text{Araf}$ $(1\rightarrow2,5)\text{Araf}$ é 1:1 e 2:1, respetivamente. Ainda assim é de salientar que neste caso, a ramificação poderá terminar com um composto fenólico (Figura 20B).

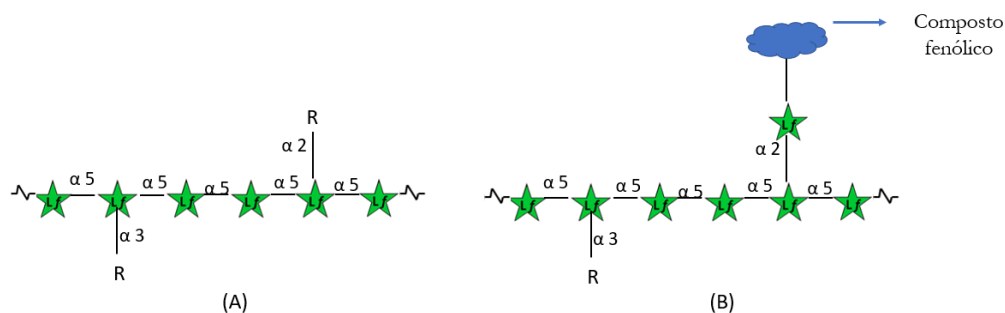



Figura 19-Proposta de estrutura da arabinana existente nos EA

Legenda: Arabinose:  (96)

No REA do miolo, sendo esta fração rica em arabinose (44%), verifica-se uma elevada percentagem das ligações *t-Araf* (19,6%), $(1 \rightarrow 5)Araf$ (16,4%) e $(1 \rightarrow 3,5)Araf$ (21,5%). No caso do REA da casca existem as mesmas ligações, mas em percentagens inferiores, o que indica um polímero com menos ramificações, à semelhança do que se verificou no EA. Comparando com o EA, nos REA observa-se que existem menos ramificações de arabinose e galactose, apenas existe $(1 \rightarrow 3,5)Araf$ e deixou de existir $(1 \rightarrow 2,5)Araf$ e $(1 \rightarrow 3,6)Galp$, respetivamente. No REA proveniente do miolo observa-se a presença de ligações como *t-Fucp*, $(1 \rightarrow 2)Xylp$, e $(1 \rightarrow 2)Galp$ que em conjunto com as ligações $(1 \rightarrow 4)Glc p$ e $(1 \rightarrow 4,6)Glc p$ suportam a proposta de presença de xiloglucanas [98]–[100]. Quanto ao REA da casca, foi possível identificar *t-Fucp* e $(1 \rightarrow 2)Fucp$ em pequenas percentagens. No entanto não foi identificado $(1 \rightarrow 2)Xylp$, e $(1 \rightarrow 2)Galp$ o que nos leva a crer a presença de xilanas na casca e não xiloglucanas como no miolo. A presença de *t-Glc p* e a elevada percentagem de $(1 \rightarrow 4)Glc p$ assim como alguma percentagem de $(1 \rightarrow 4,6)Glc p$ indica a presença de amido, cuja estrutura é a mistura de dois polímeros: amilose ($\approx 10-30\%$) e amilopectina ($\approx 70-90\%$). A amilose é um polímero linear formado por monómeros de glucose em $\alpha(1 \rightarrow 4)Glc p$ (adotando uma estrutura em espiral) já a amilopectina é formada por uma cadeia principal de $\alpha(1 \rightarrow 4)Glc p$ com ramificações em C_6 por monómeros de glucose [101].

A figura 21 representa uma proposta de estrutura dos polissacarídeos existentes, as xiloglucanas que são compostas por uma cadeia linear de $(1 \rightarrow 4)Glc p$ com ramificações na posição C_6 onde podem

estar ligados monómeros de xilose ou cadeias laterais de xilose unidas pela ligação $(1\rightarrow2)\text{Xyl}\beta$, representado pelo “R”.

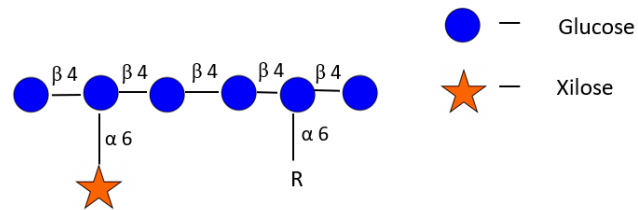


Figura 20-Proposta da estrutura da xilogucana existente no REA do miolo [102]

A figura 21 representada uma proposta de estrutura dos polissacarídeos existentes no REA da casca, as xilanas que são compostas por uma cadeia linear de $(1\rightarrow4)\text{Xyl}\beta$.



Figura 21- Proposta da estrutura da xilana existente no REA da casca [102]

Capítulo 4

Conclusão

Este estudo permitiu determinar que 60% da semente de *Cynara cardunculus* L. diz respeito ao miolo e 40% à sua casca. Determinou-se ainda que o miolo é rico em gordura (39%), proteína (27%), açúcares (9%) e compostos fenólicos ($\approx 2\%$). A casca apresentou um teor superior em açúcares (21%), 38% em lenhina, 3% em compostos fenólicos e apenas 1% em gordura. O óleo extraído do miolo é constituído por 92% de ácidos gordos esterificados (ácido linoleico, oleico, palmítico e esteárico) e 6% em compostos lipofílicos livres, nomeadamente ácidos gordos (95%), esteróis (3%) e tocoferóis (1%). Aumentando a polaridade do solvente (clorofórmio: metanol, 2:1 v/v), foi possível a extração de compostos mais polares tais como 29% em açúcares (dissacarídeos) e 3% em compostos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos), o que poderá indicar potencialmente atividade antioxidante. O facto de o miolo ser rico em proteína e compostos fenólicos pode vir a ser uma fonte de interesse para enriquecimento, por exemplo, de rações animais, potenciando a ingestão de rações enriquecidas com substâncias que podem potenciar o bem-estar do animal. Relativamente à casca, o elevado conteúdo em lenhinas revela interesse pois estas são fibras dietéticas insolúveis associadas a efeitos benéficos ao nível da microflora intestinal.

Relativamente ao conteúdo em carboidratos, verificou-se que a casca tem um teor em açúcares superior ao miolo. A análise da estrutura permitiu verificar que os polissacarídeos solúveis em água são provavelmente arabinanas presentes nas duas partes, sendo que no miolo o polímero tem uma cadeia principal mais longa e com mais ramificações. A análise da estrutura permitiu identificar que os polissacarídeos insolúveis em água são arabinanas, xiloglucanas, xilanas e amido, característicos das paredes celulares das plantas. Nas arabinanas parecem existir compostos fenólicos ligados covalentemente na estrutura polímero, que poderá indiciar atividade antioxidante deste polímero devido aos compostos fenólicos.

Os resultados obtidos são promissores devido a todos os compostos bioativos existentes no cardo, como os compostos fenólicos, carboidratos, óleo e proteína. Os compostos fenólicos estão associados a diversas propriedades biológicas (antioxidante e antimicrobiana). Também as fibras solúveis e insolúveis presentes em ambas as partes da semente poderão apresentar propriedades biológicas devido a substâncias libertadas durante a sua digestão, no caso das solúveis e, também, ao facto de nas suas estruturas poderem estar associados compostos fenólicos. Como trabalho futuro é importante identificar os compostos fenólicos presentes, tal como avaliar a citotoxicidade, estudos de permeação e possível capacidade antioxidante dos diferentes extratos de modo a determinar as suas possíveis atividades biológicas e, conseqüentemente, aplicação em diferentes áreas como a alimentar, nutracêutica ou cosmética.

Bibliografia

- [1] A. WIKLUND, “The genus *Cynara* L. (Asteraceae-Cardueae),” *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 109, no. 1, pp. 75–123, 1992.
- [2] A. Rottenberg, “The wild gene pool of globe artichoke,” *Isr. J. Plant Sci.*, vol. 62, no. 1–2, pp. 33–38, 2014.
- [3] A. Ierna and G. Mauromicale, “*Cynara cardunculus* L. genotypes as a crop for energy purposes in a Mediterranean environment,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 34, no. 5, pp. 754–760, 2010.
- [4] S. Lanteri, E. Saba, M. Cadinu, G. M. Mallica, L. Baghino, and E. Portis, “Amplified fragment length polymorphism for genetic diversity assessment in globe artichoke,” *Theor. Appl. Genet.*, vol. 108, no. 8, pp. 1534–1544, 2004.
- [5] S. A. Raccuia, A. Mainolfi, G. Mandolino, and M. G. Melilli, “Genetic diversity in *Cynara cardunculus* revealed by AFLP markers: Comparison between cultivars and wild types from Sicily,” *Plant Breed.*, vol. 123, no. 3, pp. 280–284, 2004.
- [6] A. Rottenberg, D. Zohary, and E. Nevo, “Isozyme relationships between cultivated artichoke and the wild relatives,” *Genet. Resour. Crop Evol.*, vol. 43, no. 1, pp. 59–62, 1996.
- [7] A. Rottenberg and D. Zohary, “The wild ancestry of the cultivated artichoke,” *Genet. Resour. Crop Evol.*, vol. 43, no. 1, pp. 53–58, 1996.
- [8] A. Acquadro, E. Portis, D. Lee, P. Donini, and S. Lanteri, “Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L.,” *Genome*, vol. 48, no. 2, pp. 217–225, 2005.
- [9] L. B. Roseiro, M. Barbosa, J. M. Ames, and R. A. Wilbey, “Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses,” *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 56, no. 2, pp. 76–85, 2003.
- [10] P. Pinelli, F. Agostini, C. Comino, S. Lanteri, E. Portis, and A. Romani, “Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 4, pp. 1695–1701, 2007.
- [11] J. Fernández, M. D. Curt, and P. L. Aguado, “Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 24, no. 3, pp. 222–229, 2006.
- [12] J. Gominho *et al.*, “Large scale cultivation of *Cynara cardunculus* L. for biomass production-A case study,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–6, 2011.
- [13] A. Lourenço *et al.*, “Biomass production of four *Cynara cardunculus* clones and lignin composition analysis,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 76, pp. 86–95, 2015.
- [14] “Jardim Botânico UTAD.” - acedido a 20 de maio de 2020.

- [15] J. Gominho, J. Fernandez, and H. Pereira, “Cynara cardunculus L. - A new fibre crop for pulp and paper production,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–10, 2001.
- [16] S. V. Archontoulis, P. C. Struik, J. Vos, and N. G. Danalatos, “Phenological growth stages of Cynara cardunculus: Codification and description according to the BBCH scale,” *Ann. Appl. Biol.*, vol. 156, no. 2, pp. 253–270, 2010.
- [17] M. D. Curt, G. Sánchez, and J. Fernández, “The potential of Cynara cardunculus L. for seed oil production in a perennial cultivation system,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 23, no. 1, pp. 33–46, 2002.
- [18] P. A. B. Ramos, “Chemical characterization and evaluation of biological activity of Cynara cardunculus extractable compounds,” Universidade de Aveiro, 2015 - Tese de doutoramento.
- [19] K. Kraft, “Artichoke leaf extract — Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts,” *Phytomedicine*, vol. 4, no. 4, pp. 369–378, 1997.
- [20] T. Adzet, J. Camarasa, and J. C. Laguna, “Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from cynara scolymus against ccl 4 toxicity in isolated rat hepatocytes,” *J. Nat. Prod.*, vol. 50, no. 4, pp. 612–617, 1987.
- [21] R. Kirchhoff, C. Beckers, G. M. Kirchhoff, H. Trinczek-Gärtner, O. Petrowicz, and H. J. Reimann, “Increase in choleresis by means of artichoke extract,” *Phytomedicine*, vol. 1, no. 2, pp. 107–115, 1994.
- [22] R. Gebhardt, “Choleretic and anticholestatic activities of flavonoids of artichoke (Cynara cardunculus L. subsp. scolymus (L.) Hayek),” *Acta Hort.*, vol. 681, no. 1989, pp. 429–436, 2005.
- [23] T. Saénz Rodríguez, D. García Giménez, and R. De la Puerta Vázquez, “Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats,” *Phytomedicine*, vol. 9, no. 8, pp. 687–693, 2002.
- [24] O. R. R. A. Proença da Cunha, Alda Pereira da Silva, *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.
- [25] P. Duarte, R. Figueiredo, S. Pereira, and J. Pissarra, “Structural characterization of the stigma-style complex of Cynara cardunculus (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development,” *Can. J. Bot.*, vol. 84, no. 5, pp. 737–749, 2006.
- [26] P. Verissimo, C. Esteves, C. Faro, and E. Pires, “The vegetable rennet of Cynaraa cardunculus L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities,” vol. 17, no. 6, pp. 621–626, Universidade de Coimbra, 1995 - Tese de doutoramento.
- [27] A. C. Sarmiento *et al.*, “Multiplicity of aspartic proteinases from Cynara cardunculus L.,” *Planta*, vol. 230, no. 2, pp. 429–439, 2009.

- [28] A. Raquel and F. Rodrigues, “Otimização do processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado,” Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2014 - Tese de mestrado.
- [29] B. Moiola, F. Pilla, and C. Tripaldi, “Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: A review,” *Small Rumin. Res.*, vol. 27, no. 3, pp. 185–195, 1998.
- [30] J. Benedito, J. A. Carcel, R. Gonzalez, and A. Mulet, “Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes,” *Ultrasonics*, vol. 40, no. 1–8, pp. 19–23, 2002.
- [31] D. J. McMahon and R. J. Brown, “Enzymic Coagulation of Casein Micelles: A Review,” *J. Dairy Sci.*, vol. 67, no. 5, pp. 919–929, 1984.
- [32] C. Cooper, M. Corredig, and M. Alexander, “Investigation of the colloidal interactions at play in combined acidification and rennet of different heat-treated milks,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 8, pp. 4915–4922, 2010.
- [33] F. V. de Sá and M. Barbosa, *O leite e os seus derivados*, 5ª. Lisboa: Clássica Editora.
- [34] J. Fernández-Salguero, F. Prados, F. Calixto, M. Vioque, P. Sampaio, and L. Tejada, “Use of Recombinant Cyprosin in the Manufacture of Ewe’s Milk Cheese,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 25, pp. 7426–7430, 2003.
- [35] S. Bornaz, N. Guizani, N. Fellah, A. Sahli, M. Ben Slama, and H. Attia, “Effect of plant originated coagulants and chymosin on ovine milk coagulation,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 13, no. 1, pp. 10–22, 2010.
- [36] S. V. Silva and F. X. Malcata, “Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*,” *Food Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 19–26, 2005.
- [37] P. J. M. Reis and F. X. Malcata, “Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks,” *Small Rumin. Res.*, vol. 101, no. 1–3, pp. 122–133, 2011.
- [38] I. Q. Macedo, C. J. Faro, and E. M. Pires, “Specificity and Kinetics of the Milk-Clotting Enzyme from Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward Bovine κ -Casein,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, no. 10, pp. 1537–1540, 1993.
- [39] A. Picon, J. Fernandez, P. Gaya, M. Medina, and M. Nuñez, “Short communication: Stability of chymosin and cyprosin under milk-coagulation and cheese-ripening conditions,” *J. Dairy Sci.*, vol. 82, no. 11, pp. 2331–2333, 1999.
- [40] J. M. L. D. Valente, “Subprodutos alimentares: novas alternativas e possíveis aplicações farmacêuticas,” Universidade Fernando Pessoa, 2015 - Tese de mestrado.
- [41] P. Grammelis, A. Malliopolou, P. Basinas, and N. G. Danalatos, “Cultivation and characterization of *Cynara cardunculus* for solid biofuels production in the mediterranean

- region,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 9, no. 7, pp. 1241–1258, 2008.
- [42] A. Ierna, R. P. Mauro, and G. Mauromicale, “Biomass, grain and energy yield in *Cynara cardunculus* L. as affected by fertilization, genotype and harvest time,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 36, pp. 404–410, 2012.
- [43] S. A. Petropoulos, C. Pereira, N. Tzortzakis, L. Barros, and I. C. F. R. Ferreira, “Nutritional value and bioactive compounds characterization of plant parts from *cynara cardunculus* L. (asteraceae) cultivated in central Greece,” *Front. Plant Sci.*, vol. 9, no. April, pp. 1–12, 2018.
- [44] P. A. B. Ramos *et al.*, “Lipophilic extracts of *cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC): A source of valuable bioactive terpenic compounds,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 35, pp. 8420–8429, 2013.
- [45] P. A. B. Ramos *et al.*, “Antiproliferative effects of *cynara cardunculus* L. Var. *altilis* (DC) lipophilic extracts,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 1, 2016.
- [46] R. S. do Carmo, “Extração de cinaropicrina a partir do cardo cultivado utilizando solventes eutéticos profundos,” Universidade de Aveiro, 2016 - Tese de mestrado.
- [47] D. E. Wedge, J. C. G. Galindo, and F. A. Macías, “Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs,” *Phytochemistry*, vol. 53, no. 7, pp. 747–757, 2000.
- [48] M. Canales *et al.*, “Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 97, no. 3, pp. 429–439, 2005.
- [49] E. Rodriguez, G. H. N. Towers, and J. C. Mitchell, “Biological activities of sesquiterpene lactones,” *Phytochemistry*, vol. 15, no. 11, pp. 1573–1580, 1976.
- [50] F. C. Seaman, “Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in Asteraceae,” vol. 48, no. 2, pp. 121–592, 1982.
- [51] M. M. Pandey, S. Rastogi, and A. K. S. Rawat, “*Saussurea costus*: Botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 110, no. 3, pp. 379–390, 2007.
- [52] J. Y. Cho, K. U. Baik, J. H. Jung, and M. H. Park, “In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 398, no. 3, pp. 399–407, 2000.
- [53] J. Y. Cho, A. R. Kim, J. H. Jung, T. Chun, M. H. Rhee, and E. S. Yoo, “Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 492, no. 2–3, pp. 85–94, 2004.
- [54] F. Emendörfer *et al.*, “Antispasmodic activity of fractions and cynaropicrin from *Cynara*

- scolymus on guinea-pig ileum,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 5, pp. 902–904, 2005.
- [55] H. Falleh *et al.*, “Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities,” *Comptes Rendus - Biol.*, vol. 331, no. 5, pp. 372–379, 2008.
- [56] S. Petropoulos *et al.*, “Bioactivities, chemical composition and nutritional value of *Cynara cardunculus* L. seeds,” *Food Chem.*, vol. 289, no. March, pp. 404–412, 2019.
- [57] P. A. B. Ramos *et al.*, “Phenolic composition and antioxidant activity of different morphological parts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC),” *Ind. Crops Prod.*, vol. 61, pp. 460–471, 2014.
- [58] E. Maccarone, B. Fallico, F. Fanella, G. Mauromicale, S. A. Raccuia, and S. Foti, “Possible alternative utilization of *Cynara* spp. II. Chemical characterization of their grain oil,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 10, no. 3, pp. 229–237, 1999.
- [59] S. Nouraei, M. Rahimmalek, G. Saeidi, and B. Bahreininejad, “Variation in Seed Oil Content and Fatty Acid Composition of Globe Artichoke Under Different Irrigation Regimes,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 93, no. 7, pp. 953–962, 2016.
- [60] S. Ferreira-Dias, J. Gominho, I. Baptista, and H. Pereira, “Pattern recognition of cardoon oil from different large-scale field trials,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 118, no. March, pp. 236–245, 2018.
- [61] M. Mancini *et al.*, “Characterization of cardoon accessions as feedstock for biodiesel production,” *Fuel*, vol. 235, no. May 2018, pp. 1287–1293, 2019.
- [62] S. Foti, G. Mauromicale, S. A. Raccuia, B. Fallico, F. Fanella, and E. Maccarone, “Possible alternative utilization of *Cynara* spp. I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 10, no. 3, pp. 219–228, 1999.
- [63] N. Gavarić *et al.*, “Natural Products as Antibacterial Agents — Antibacterial Potential and Safety of Post-distillation and Waste Material from *Thymus vulgaris* L., Lamiaceae,” *Concepts, Compd. Altern. Antibacterials*, 2015.
- [64] Biorefinery, “Biorefinery Test Methods L 2:2016,” *Inventia AB*, no. Ic, 2016.
- [65] D. J. Nicholson, A. T. Leavitt, and R. C. Francis, “A three-stage klason method for more accurate determinations of hardwood lignin content,” *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 53–59, 2014.
- [66] A. S. Ferreira *et al.*, “Reserve, structural and extracellular polysaccharides of *Chlorella vulgaris*: A holistic approach,” *Algal Res.*, vol. 45, no. July 2019, p. 101757, 2020.
- [67] C. Vilela *et al.*, “Lipophilic phytochemicals from banana fruits of several *Musa* species,” *Food Chem.*, vol. 162, pp. 247–252, 2014.
- [68] “NIST.” .

- [69] “WILEY.” .
- [70] V. M. R. Martins, J. Simões, I. Ferreira, M. T. Cruz, M. R. Domingues, and M. A. Coimbra, “In vitro macrophage nitric oxide production by *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. inflorescence polysaccharides,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 176–184, 2017.
- [71] D. Ferreira, S. Guyot, N. Marnet, I. Delgadillo, C. M. G. C. Renard, and M. A. Coimbra, “Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L. var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 16, pp. 4537–4544, 2002.
- [72] M. A. Coimbra, I. Delgadillo, K. W. Waldron, and R. R. Selvendran, “Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp,” in *Plant Cell Wall Analysis*, vol. 17, 1996.
- [73] Ionel Ciucanu and Francis Kerek, “A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR THE PERMETHYLATION OF CARBOHYDRATES,” *Carbohydr. Res.*, vol. 131, no. 1, pp. 209–217, 1984.
- [74] M. Duranti and C. Gius, “Legume seeds: Protein content and nutritional value,” *F. Crop. Res.*, vol. 53, no. 1–3, pp. 31–45, 1997.
- [75] L. Quanhong and F. Caili, “Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein,” *Food Chem.*, vol. 92, no. 4, pp. 701–706, 2005.
- [76] C. S. G. P. Queirós *et al.*, “Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition,” *Biomass Convers. Biorefinery*, vol. 10, no. 1, pp. 175–188, 2020.
- [77] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- [78] USDA, “Dietary, Functional and Total fibre,” in *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, fibre, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*, 2005, pp. 1–83.
- [79] E. Bekele, R. J. Fido, A. S. Tatham, and P. R. Shewry, “Heterogeneity and Polymorphism of Seed Proteins in Tef (*Eragrostis Tef*),” *Hereditas*, vol. 122, no. 1, pp. 67–72, 1995.
- [80] S. Petropoulos, Â. Fernandes, L. Barros, A. Ciric, M. Sokovic, and I. C. F. R. Ferreira, “The chemical composition, nutritional value and antimicrobial properties of: *Abelmoschus esculentus* seeds,” *Food Funct.*, vol. 8, no. 12, pp. 4733–4743, 2017.
- [81] E. Reyes-Caudillo, A. Tecante, and M. A. Valdivia-López, “Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds,” *Food Chem.*, vol. 107, no. 2, pp. 656–663, 2008.
- [82] Wendy M. Vincent, *The Complete Guide to Growing Healing and Medicinal Herbs*. Atlantic Publishing

- Company, 2011.
- [83] S. A. Raccuia and M. G. Melilli, “Biomass and grain oil yields in *Cynara cardunculus* L. genotypes grown in a Mediterranean environment,” *F. Crop. Res.*, vol. 101, no. 2, pp. 187–197, 2007.
- [84] F. A. Loewus and P. P. N. Murthy, “myo-Inositol metabolism in plants,” *Plant Sci.*, vol. 150, no. 1, pp. 1–19, 2000.
- [85] L. Xu, X.-Y. Zhao, Y.-L. Wu, and W. Zhang, “The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins,” no. Ap3er, pp. 135–138, 2015.
- [86] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, T. J. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Thomas, “The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols,” in *The Systematic Identification of Flavonoids*, no. see 111, 1970, pp. 41–164.
- [87] P. Neves, “Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde,” Faculdade Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, 2015.
- [88] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: Food sources and bioavailability,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.
- [89] S. D. Krämer and B. Testa, “The Biochemistry of Drug Metabolism - An Introduction,” *Chem. Biodivers.*, vol. 3, no. 7, pp. 1144–1144, 2006.
- [90] P. A. R. Fernandes *et al.*, “Apple pomace extract as a sustainable food ingredient,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 6, 2019.
- [91] C. M. G. C. Renard, A. G. J. Voragen, J. F. Thibault, and W. Pilnik, “Studies on apple protopectin V: Structural studies on enzymatically extracted pectins,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 16, no. 2, pp. 137–154, 1991.
- [92] S. Guyot, C. Le Bourvellec, N. Marnet, and J. F. Drilleau, “Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 35, no. 3, pp. 289–291, 2002.
- [93] B. Suárez, Á. L. Álvarez, Y. D. García, G. del Barrio, A. P. Lobo, and F. Parra, “Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace,” *Food Chem.*, vol. 120, no. 1, pp. 339–342, 2010.
- [94] F. J. Gonçalves, S. M. Rocha, and M. A. Coimbra, “Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material,” *Food Chem.*, vol. 134, no. 2, pp. 957–963, 2012.
- [95] F. J. Gonçalves, P. A. R. Fernandes, D. F. Wessel, S. M. Cardoso, S. M. Rocha, and M. A. Coimbra, “Interaction of wine mannoproteins and arabinogalactans with anthocyanins,” *Food Chem.*, vol. 243, pp. 1–10, 2017.

- [96] J. M. D. de Matos, “Estudo da secagem da flor de cardo e análise de polissacarídeos e compostos fenólicos,” Instituto Politécnico de Viseu - Escola Superior Agrária de Viseu, 2014 - Tese de mestrado.
- [97] Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, “Isolamento e Caracterização dos Polissacarídeos das Paredes Celulares da Azeitona,” Universidade de Aveiro, 1993 - Tese de doutoramento.
- [98] B. Quémener, J. Vigouroux, E. Rathahao, J. C. Tabet, A. Dimitrijevic, and M. Lahaye, “Negative electrospray ionization mass spectrometry: A method for sequencing and determining linkage position in oligosaccharides from branched hemicelluloses,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 50, no. 1, pp. 247–264, 2015.
- [99] S. Ray, J. Vigouroux, B. Quémener, E. Bonnin, and M. Lahaye, “Novel and diverse fine structures in LiCl-DMSO extracted apple hemicelluloses,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 108, no. 1, pp. 46–57, 2014.
- [100] J. P. Vincken, G. Beldman, W. M. A. Niessen, and A. G. J. Voragen, “Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 29, no. 1, pp. 75–85, 1996.
- [101] G. E. Vandeputte and J. A. Delcour, “From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: A focus on rice starch,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 58, no. 3, pp. 245–266, 2004.
- [102] “Glycopedia.” [Online]. Available: <https://www.glycopedia.eu/> - acedido a 25 de maio de 2020.

Apêndice

Tabela I.- Identificação dos compostos derivados TMS presentes no óleo extraído com n-hexano, tempo de retenção, área e íons produzidos (m/z)

Nº	Tempo de Retenção (min)	Área	Composto	[M ⁺] (m/z)	Íons produzidos (m/z)
1	10,807	15953013	Ácido benzoico	194 (7)	179 (100)[M-CH ₃] ⁺ , 135 (66), 105 (97)[M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 77(93), 75(12)[(CH ₃) ₂ SiOH] ⁺ , 73(9)[(CH ₃) ₃ Si] ⁺
2	24,707	3647749	Ácido subérico	303(6)	217(9), 187(26), 147(21), 129(20), 75(90)[(CH ₃) ₂ SiOH] ⁺ , 73(100)[(CH ₃) ₃ Si] ⁺
3	27,372	7459400	Ácido azelaico	317(12)	302(0,03)[M-CH ₃] ⁺ , 201(14), 129(20), 117(19), 75(82), 73(100)
4	33,467	33162643	Ácido palmítico	328(2)	313(28)[M-CH ₃] ⁺ , 145(21), 132(31), 129(5), 117(79), 75(70), 73(100)
5	37,113	122371448	Ácido linoleico	352(0,7)	337(12)[M-CH ₃] ⁺ , 145(6), 129(29), 117(24), 95(33), 75(97), 73(100)
6	37,257	45158144	Ácido oleico	354(0,9)	339(17) [M-CH ₃] ⁺ , 185(4), 145(18), 129(6), 117(59), 96(16), 81(20), 75(84), 73(100)
7	37,409	2870030	Ácido eláidico	354(0,3)	339(6) [M-CH ₃] ⁺ , 185(1,5), 145(9), 129(50), 117(38), 96(14), 81(11), 75(100), 73(86)
8	37,971	8235800	Ácido esteárico	356(2)	341(25) M-CH ₃ ⁺ , 145(24), 132(31), 129(32), 117(77), 75(64), 73(100)
9	55,738	2056032	α-tocoferol	502(27)	277(14)[C ₆ (CH ₃) ₃ CH ₂ OSi(CH ₃) ₃ OCCH ₂ CH ₃] ⁺ , 237(46)[C ₆ (CH ₃) ₃ CH ₂ OSi(CH ₃) ₃ OH] ⁺ , 221(5), 193(3), 75(5), 73(100)
10	58,491	2172940	Não identificado	444(14)	429(0,15)[M-CH ₃] ⁺ , 406 (4), 351(2), 209(100), 179(42), 151(43), 75(8), 73(81)
11	58,745	1926525	Campesterol	472(6)	457(0,24) [M-CH ₃] ⁺ , 382(19) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 367(7) [M-(CH ₃) ₃ SiO-CH ₃] ⁺ , 343(38), 303(0,02), 261(8), 255(9), 213(10), 129(81), 75(19), 73(50)
12	59,227	3236376	B-sitosterol	486(3)	471 (2)[M-CH ₃] ⁺ , 396 (0,17)[M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 381(5) [M-(CH ₃) ₃ SiO-CH ₃] ⁺ , 303(3), 275(2), 255(27), 213(10), 129(65), 75(43), 73(57)
13	60,750	6800017	Estigmasterol	484(0,12)	469(0,42)[M-CH ₃] ⁺ , 394(1) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 355(2), 303(2), 273(3), 255(9), 213(11), 159(13), 129(14), 83(19), 75(60), 73(79)
14	62,343	3606116	Esterol não identificado	486(33)	471(12) [M-CH ₃] ⁺ , 396(3) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 381(10) [M-(CH ₃) ₃ SiO-CH ₃] ⁺ , 213 (19), 129(22), 81(40), 75(70), 73(40)

Nota: o valor entre parêntesis representa a intensidade relativa do íon produzido

Tabela II.-Identificação dos compostos derivados TMS presentes no óleo extraído com clorofórmio: metanol (2:1 v/v), tempo de retenção, área e iões produzidos (m/z):

Nº	Tempo de Retenção (min)	Área	Composto	[M ⁺] (m/z)	Iões produzidos (m/z)
1	5,885	2516424	D-Sorbitol	319(10)	307(5), 229(2) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 217(11), 147(26), 129(6), 103(23), 73(100)
2	8,091	3395668	Ácido cafeico	396(6)	381(4) [M-CH ₃] ⁺ , 339(0,3), 307(2), 249(3), 219(31), 191(8), 147(3), 75(12), 73(100)
3	9,057	1869419	Inositol	612(0,01)	367(0,6), 318(8), 305(12) [C ₃ H ₂ ((CH ₃) ₃ SiO) ₃] ⁺ , 265(5), 217(25), 191(11), 147(33), 129(8), 103(2), 75(8), 73(100)
4	9,140	445729	3,4 Hidroxicinamato de metila	338(11)	308(1,5) [M-C ₂ H ₆] ⁺ , 219(49), 191(2), 131(8), 89(11), 73(100)
5	9,303	574748	Ácido palmítico	328(4)	313(11)[M-CH ₃] ⁺ , 145(8), 132(21), 129(19),117(33), 75(100), 73(100)
6	11,350	13820173	Ácido cafeico	396(11)	381(3) [M-CH ₃] ⁺ , 307(2), 249(3), 219(34), 191(8), 147(3), 73(100)
7	12,433	2296359	Ácido oleico	339(10)	264(4), 222(6), 199(4), 185(4), 145(22), 132(11), 129(40), 117(45), 96(11), 81(7), 75(92), 73(100)
8	13,041	850262	Ácido esteárico	356(2)	341(10) M-CH ₃ ⁺ , 145(13), 132(26), 129(2), 117(58), 75(41), 73(100)
9	17,937	210074130	Sacarose [56]possivelmente)	451(1)	437(4)[M-CH ₃] ⁺ , 367(0,04) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 319(4), 271(12), 217(46), 191(8), 169(19), 147(36), 129(24), 103(39), 73(100)
10	24,424	2246151	Não identificado (Açúcar)	434(1)	419(2)[M-CH ₃] ⁺ , 361(4), 306(5), 217(19), 204(92), 191(31), 147(36), 129(22), 103(20), 73(100)
11	28,029	7222352	Não identificado (Açúcar)	345(12)	307(8), 255(14), 219(6), 191(7), 147(14), 73(100)
12	29,442	79946395	Cumarina glicosilada / esculina	451(2)	437(5)[M-CH ₃] ⁺ , 367(0,12) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 319(3), 271(8), 217(37), 204(39), 191(9),169(14), 147(21), 129(28), 103(27), 73(100)
13	30,664	3362403	Não identificado	349(2)	305(1) [M-(CH ₃) ₃] ⁺ , 259(4) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 217(22), 204(100), 191(5), 147(23), 129(21), 105(50), 73(91)
14	31,639	4257189	Composto aromático	314(16)	299(1)[M-CH ₃] ⁺ , 284(4) [M-HCHO] ⁺ , 259(14), 242(26), 217(20), 147(19), 129(11), 103(13), 89(3), 73(100)
15	38,821	6225871	Dissacarídeo	451(3)	361(38)[M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 319(0,8), 271(9), 217(57), 204(89), 169(16), 147(22), 129(40), 103(28), 97(3), 73(100)
16	39,728	13370989	Dissacarídeo	450(3)	361(9)[M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 307(4), 271(6), 217(17), 204(1), 169(16), 151(49), 147(16), 129(14), 103(31), 73(100)
17	40,606	1008854775	Escopolina	532(8)	517(0,8) [M-CH ₃] ⁺ , 450(14), 396(5), 361(63), 319(7), 271(23), 217(78), 204(8), 169(43), 151(98), 147(79), 129(62), 103(75), 75(2), 73(100)
18	42,390	776043574	Dissacarídeo	444(34)	429(0,7)[M-CH ₃] ⁺ , 361(42), 319(5), 271(15), 217(62), 169(32), 151(78), 147(63), 129(51), 103(61), 89(5), 75(68),74(100) 73(93)

Nota: o valor entre parêntesis representa a intensidade relativa do ião produzido

Tabela III.-Identificação dos compostos derivados TMS presentes no SnAIR do miolo, tempo de retenção, área e iões produzidos (m/z):

Nº	Tempo de Retenção (min)	Área	Composto	[M ⁺] (m/z)	Iões produzidos (m/z)
1	5,863	7182188	D-Sorbitol	319(9)	307(12), 229(1) [M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 217(13), 147(25), 129(6), 103(24), 73(100)
2	7,063	9012536	Ácido glucónico	333(5)	319(2), 292(4), 217(6), 189(3), 147(22), 129(2), 117(5), 103(13), 75(6), 73(100)
3	9,044	6216205	Inositol	612	367(0,2), 318(6), 305(12) [C ₃ H ₂ ((CH ₃) ₃ SiO) ₃] ⁺ , 265(4), 217(21), 191(13), 147(32), 129(6), 117(0,6), 103(5), 75(6), 73(100)
4	9,285	869687	Ácido palmítico	328(3)	313(31)[M-CH ₃] ⁺ , 145(17), 132(33), 129(25),117(66), 75(79), 73(100)
5	11,361	45325504	Ácido cafeico	396(8)	381(3) [M-CH ₃] ⁺ , 307(2), 249(3), 219(32), 191(8), 147(3), 73(100)
6	12,292	5130892	Ácido linoleico	352(0,01)	337(9)[M-CH ₃] ⁺ , 145(3), 132(3), 129(20), 117(20), 95(20), 75(67), 73(100)
7	12,426	1821855	Ácido oleico	339(10)	264(1), 222(2), 199(1), 185(1), 145(11), 132(7), 129(26), 117(46), 96(4), 81(12), 75(55), 73(100)
8	17,998	560138820	Sacarose [56](possivelmente)	451(2)	437(9)[M-CH ₃] ⁺ , 319(8), 271(22), 217(85), 191(16), 169(37), 147(71), 129(44), 103(73), 74(60), 73(100)
9	24,358	14031405	Açúcar	433(2)	361(3), 305(5), 217(27), 204(84), 191(21), 147(27), 129(16), 103(15), 75(5), 73(100)
10	28,013	70973546	Não identificado (Açúcar)	345(16)	307(10), 255(16), 219(8), 191(7), 147(17),75(7), 73(100)
11	29,472	445589431	Cumarina glicosilada / esculina	451(6)	437(13)[M-CH ₃] ⁺ , 319(8), 271(20), 217(97), 204(92), 191(20),169(37), 147(47), 129(66), 103(61), 73(83)
12	38,840	117850794	Dissacarídeo	451(5)	361(48)[M-(CH ₃) ₃ SiO] ⁺ , 319(3), 271(11), 217(53), 204(100), 169(18), 147(21), 129(34), 103(26), 97(0,4), 73(86)
13	40,668	1750225712	Escopolina	532(11)	517 (1)[M-CH ₃] ⁺ , 450(19), 396(8), 361(83), 319(11), 271(32), 217(95), 204(11), 169(60), 151(87), 147(92), 129(80), 103(92), 75(73), 73(100)
14	42,437	1275862071	Dissacarídeo	444(42)	429(1)[M-CH ₃] ⁺ , 361(54), 319(6), 271(22), 217(78), 169(44), 151(91), 147(83), 129(64), 103(74), 89(6), 75(99), 73(100)

Nota: o valor entre parêntesis representa a intensidade relativa do ião produzido

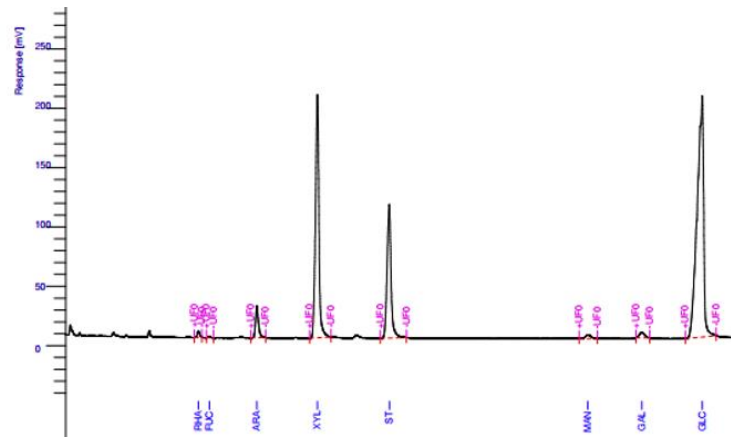


Figura 22-Perfil cromatográfico obtido por GC-FID dos acetatos de alditol presentes ambas as partes da semente

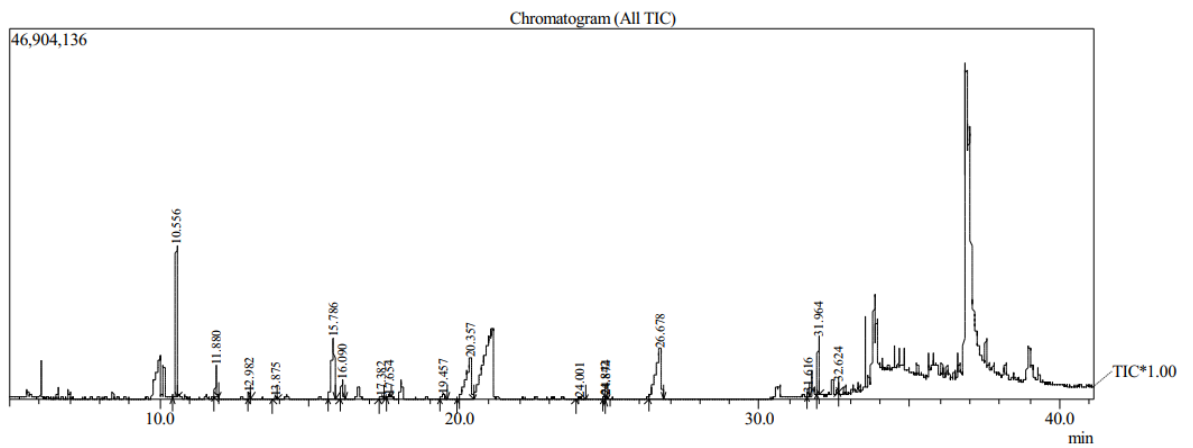


Figura 23-Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existentes no resíduo da extração com água quente proveniente do miolo

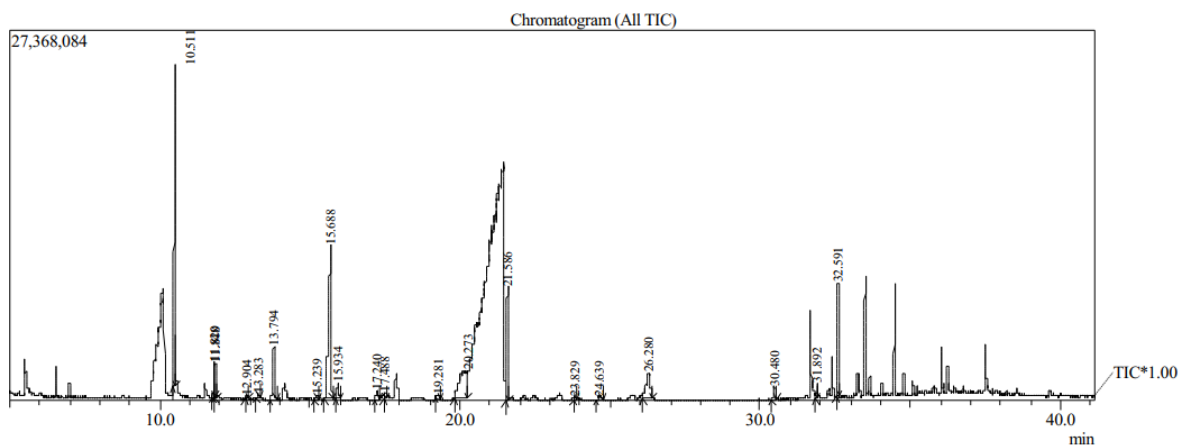


Figura 24-Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existente no extrato de água proveniente do miolo

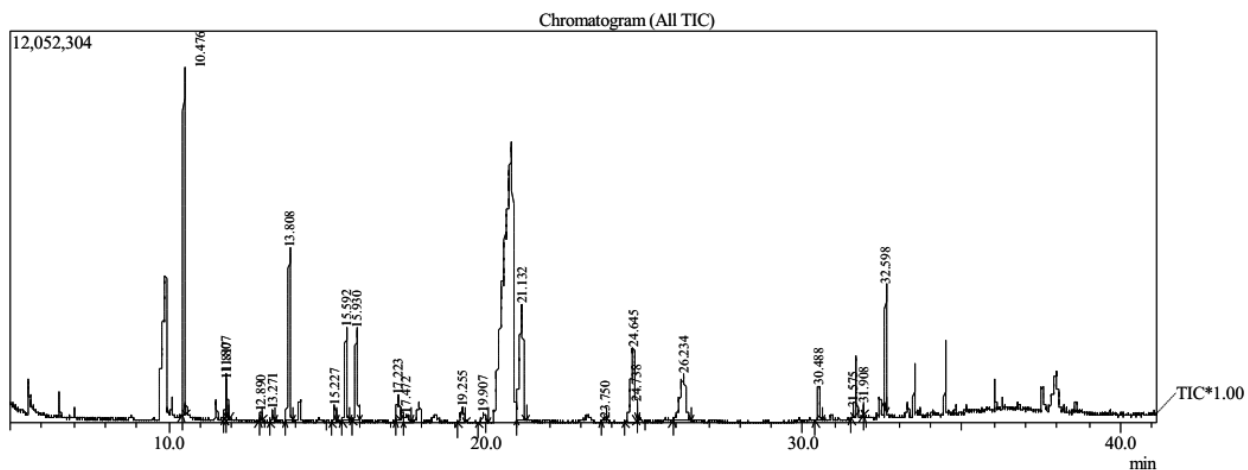


Figura 25-Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existentes no resíduo da extração com água quente proveniente da casca

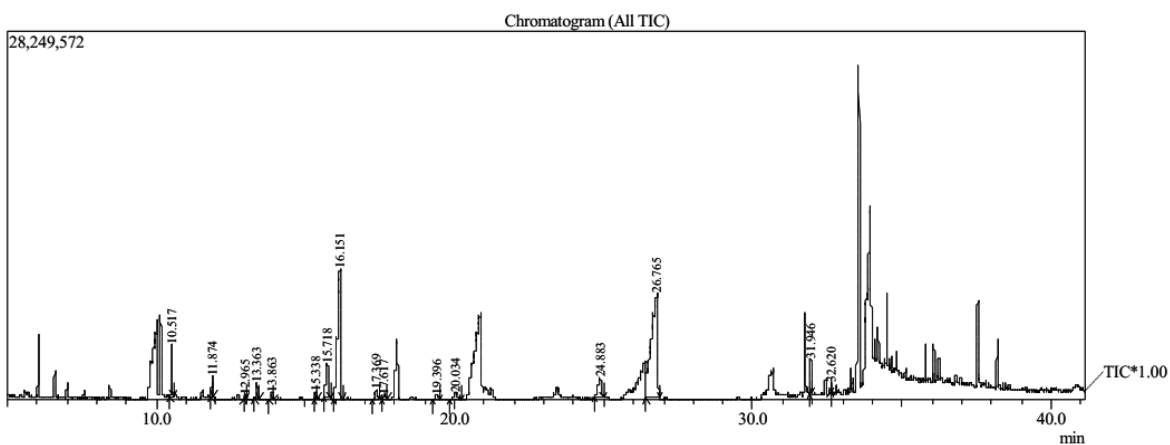


Figura 26-Cromatograma dos acetatos de alditol parcialmente metilados existente no extrato de água proveniente da casca