



**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SALINIDADE E DO AZOTO NA COMPOSIÇÃO
NUTRICIONAL, QUÍMICA E BIOATIVA DE CULTIVARES DE MANJERICÃO**

Luís Royer Oliveira da Cruz

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca
no âmbito do Mestrado em Farmácia e Química dos Produtos Naturais

Orientado por

Ângela Fernandes

Lillian Barros

Bragança, outubro de 2020

Este trabalho é financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E e TRANSCoLAB 0612_TRANS_CO_LAB_2_P.



AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento a todos os que me ajudaram neste percurso, à minha família nuclear que me dispensou o tempo necessário para fazer este mestrado e me motivaram a cada passo em especial à minha excelentíssima esposa Ana Perez que foi simplesmente perfeita, à Dra. Isabel Ferreira e à Dra. Gorete Baptista que foram responsáveis pela minha vinda a Bragança, ao ISP Jean Piaget de Benguela que facilitou a minha vinda e por último às minhas dedicadíssimas orientadoras Dra. Lillian Barros e Dra. Ângela Fernandes que me guiaram muitíssimo bem no desenrolar desta tese.

Uma palavra de agradecimento ao Dr. Spyridon Petropoulos com o qual desenvolvi uma parte do trabalho desta tese, através da parceria do CIMO com a Universidade de Tessalónica na Grécia.

Um abraço especial ao Mestre Luís Palmeira colega e amigo com o qual tive a sorte de partilhar esta caminhada.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
RESUMEN.....	xv
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1. Plantas aromáticas.....	18
1.1.1. História.....	18
1.2. Família <i>Lamiaceae</i>	19
1.2.1. <i>Ocimum basilicum</i> L.....	20
1.2.2. Composição nutricional e química.....	23
1.2.3. Propriedades bioativas	25
1.3. Importância das condições agronómicas no perfil químico e bioativo de plantas ...	26
1.3.1. Stress salino	27
1.3.2. Concentração de N	29
2. OBJETIVO.....	31
3. METODOLOGIA	33
3.1. Padrões e reagentes	33
3.2. Preparação das amostras	33
3.2.1. Condições de aplicação da salinidade.....	33
3.2.2. Condições de aplicação do nitrogénio	34
3.3. Caracterização nutricional e química das cultivares de manjeriço	35
3.3.1. Composição Proximal.....	35

3.3.2.	Açúcares Livres	35
3.3.3.	Ácidos Orgânicos.....	36
3.3.4.	Ácidos Gordos	36
3.3.5.	Tocoferóis	37
3.3.6.	Preparação dos extratos hidroalcoólicos das folhas.....	38
3.3.7.	Compostos fenólicos.....	38
3.4.	Propriedades bioativas	39
3.4.1.	Atividade Antioxidante.....	39
3.4.2.	Atividade Antimicrobiana.....	41
3.5.	Análise estatística.....	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1.	Tolerância à salinidade	44
4.1.1.	Composição proximal e valor energético	44
4.1.2.	Açúcares livres.....	46
4.1.3.	Ácidos orgânicos.....	47
4.1.4.	Ácidos gordos	49
4.1.5.	Tocoferóis	50
4.1.6.	Compostos Fenólicos	52
4.1.7.	Atividade Antioxidante.....	54
4.1.8.	Atividade Antimicrobiana.....	55
4.2.	Tolerância ao nitrogénio	58
4.2.1.	Composição proximal e valor energético	58
4.2.2.	Açúcares Livres	60
4.2.3.	Ácidos Orgânicos.....	61
4.2.4.	Ácidos Gordos	63
4.2.5.	Tocoferóis	66
4.2.6.	Compostos Fenólicos	67

4.2.7. Actividade Antioxidante	71
4.2.8. Atividade Antimicrobiana.....	72
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	76
5.1. Conclusão.....	76
5.2. Perspectivas Futuras.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	78
ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variabilidade genética das folhas de <i>Ocimum</i> ..	21
Figura 2. Cultivares utilizadas neste trabalho	22
Figura 3. Exemplo dos principais compostos presentes no óleo essencial de <i>O. Basilicum</i> ..	24
Figura 4. Estrutura do ácido rosmarínico.....	26
Figura 5. Taxa de crescimento com os dois tipos de <i>stress</i> salino e a sensibilidade das plantas, ao longo do tempo e adição gradual de sal.	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonómica de <i>O. basilicum</i>	20
Tabela 2. Breve descrição das espécies de manjeriço mais comuns e especificidades.....	22
Tabela 3. Humidade (g/planta), composição proximal (g/100 g ms) e valor energético (kcal/100 g ms) das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (média \pm DP, $n=3$).	46
Tabela 4. Composição em açúcares livres das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (g/100g ms) (média \pm DP, $n=3$).	47
Tabela 5. Composição em ácidos orgânicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (g/ 100g ms) (média \pm DP, $n=3$).	48
Tabela 6. Ácidos gordos maioritários (%), grupos de ácidos gordos e razão $n-6/n-3$ identificados nas cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (média \pm DP, $n=3$).	50
Tabela 7. Composição em tocoferóis das cultivares de manjeriço estudados (mg/100 g ms) em relação aos níveis de salinidade aplicados (média \pm DP, $n=3$).	51
Tabela 8. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados.	53
Tabela 11. Atividade antibacteriana (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) (mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados.....	56
Tabela 12. Atividade antifúngica (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados.....	57
Tabela 13. Humidade (g/planta), composição proximal (g/100 g ms) e valor energético (kcal/100 g ms) das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm DP, $n=3$).	59
Tabela 14. Composição em açúcares livres das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (g/100g ms) (média \pm DP, $n=3$).	61
Tabela 15. Composição em ácidos orgânicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (g/100g ms) (média \pm DP, $n=3$).	63

Tabela 16. Ácidos gordos maioritários (%), grupos de ácidos gordos e razão n-6/n-3 identificados nas cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm DP, $n=3$).	65
Tabela 17. Composição em tocoferóis das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicado (mg/100 g ms) (média \pm DP, $n=3$).	67
Tabela 18. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm SD, $n=3$).	69
Tabela 19. Quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (mg/g de extrato) (média \pm DP, $n=3$).	70
Tabela 20. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm DP, $n=3$).	72
Tabela 19. Atividade antibacteriana (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) (mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados.	73
Tabela 20. Atividade antifúngica (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

±	Mais ou menos
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture collection</i>
BHT	Hidróxitolueno butilado
CG	Cromatografia gasosa
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima de inibição
DAD	Detetor de Díodos
DMSO	Dimetildulfóxido
DP	Desvio Padrão
ds/m	Decisiemens por metro
E211	Benzoato de sódio
E224	Metabissulfito de potássio
EC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante
EC _e	Condutividade do extrato saturado do solo
FID	Detetor de Ionização de Chama
FL	Detetor de Fluorescência
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSD de Tukey	Teste de Tukey da diferença honestamente significativa
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima
INT	Violeta de <i>p</i> -iodonitrotetrazolium
Kg N.ha-1	kilograma de Nitrogénio por hectare
L	Litro
m/v	Relação massa/volume
m/z	Relação massa/carga
MDA	Complexo malondialdeído
mM	Milimolar
mmol/L	Milimole por litro
ms	Massa seca
MS	Espectrometria de massa

MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
N	Nitrogénio
N:P:K	Nitrogénio:fósforo:potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCTC	<i>National Culture Type Collection</i>
OxHLIA	Inibição da hemólise oxidativa
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Padrão interno
ppm	Partes por milhão
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
Rt	Tempo de retenção
S1	Solução teste de salinidade com 3,0 ds/m
S2	Solução teste de salinidade com 4,5 ds/m
SFA	Ácidos gordos saturados
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TF	Flavonoides totais
TPA	Total de ácidos fenólicos
TPC	Compostos fenólicos totais
tr	Traços
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV-VIS	Ultravioleta/visível
v/v	Relação volume/volume
λ_{\max}	Comprimento de onda máxima

TRABALHO APRESENTADO EM ENCONTROS CIENTÍFICOS

Os resultados deste trabalho de mestrado deram origem à seguinte comunicação em painel num encontro científico:

Luís R.O. Cruz, Nikolaos Polyzos, Francesco Di Gioia, Ângela Fernandes, Spyridon Petropoulos, Lillian Barros, Isabel C.F.R. Ferreira. Salinity effect on yield, nutritional and chemical content of red basil varieties (*Ocimum basilicum* L.). ASHS Annual Conference, Orlando, USA, 09 a 13 de agosto, 2020.

ARTIGOS COM ARBITRAGEM CIENTÍFICA INSERIDOS EM PUBLICAÇÕES PERIÓDICAS INTERNACIONAIS

1. **Cruz et al.** (2020). The effect of saline conditions on the chemical profile and the bioactive properties of three red-colored basil cultivars. *Food Chemistry*, **submitted**
2. **Cruz et al.** (2020). The effect of nitrogen input on chemical profile and bioactive properties of basil cultivars. *Antioxidants*, **aceite para publicação**

RESUMO

As plantas aromáticas e medicinais são usadas desde tempos imemoriais pelo ser humano e hoje em dia têm uma importância acrescida devido às suas propriedades bioativas e sensoriais. O *Ocimum basilicum* L., vulgarmente conhecido por manjeriço, é uma planta usada tradicionalmente tanto pela medicina como pela culinária, especialmente na zona do Mediterrâneo e Índia, o que levou ao desenvolvimento de novas cultivares de elevado interesse nestas áreas.

A qualidade do solo tem vindo a diminuir, nomeadamente no que diz respeito à quantidade de sais presentes bem como ao excesso de adubação para atingir determinado fim. Este problema, de difícil solução, assenta no custo/benefício para os produtores no momento de escolher as melhores práticas de cultivo. Assim, é imperativo avaliar as cultivares e as taxas de salinidade/adubação de modo a obter plantas com elevada qualidade em condições menos propícias ao seu natural desenvolvimento.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da salinidade e do nitrogénio, veiculada na água de rega, na composição proximal (lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e valor energético), composição química (açúcares livres, tocoferóis, ácidos orgânicos, ácidos gordos e compostos fenólicos) e bioatividades (atividade antioxidante e antimicrobiana) de quatro cultivares de *O. basilicum*.

Os teores de lípidos, cinzas e glúcidos aumentaram com a salinidade na cultivar ‘Dark-opal’, enquanto que o valor energético foi afetado negativamente. Os açúcares livres (totais e individuais) aumentaram com as condições de salinidade (S2) na cultivar ‘Basilico-rosso’, enquanto que os ácidos orgânicos e tocoferóis diminuíram em todas as cultivares. Os ácidos gordos maioritários foram os ácidos α -linolénico, linoleico e palmítico sem variações significativas com o aumento da salinidade, e os polifenóis mais abundantes foram os ácidos sagerínico e o eriodictiol-*O*-malonilhexósido. Por fim, os extratos de manjeriço apresentaram atividade antioxidante moderada e atividade antifúngica elevada. Em conclusão, verificou-se que os efeitos da salinidade, na composição química e nas propriedades bioativas, dependem do genótipo das cultivares testadas.

Verificou-se uma interação genótipo \times N significativa para a maioria dos parâmetros químicos medidos. Os teores de tocoferóis foram elevados nas folhas das plantas fertirrigadas

com 200 ppm de N e inferiores nas que receberam 600 ppm de N, especialmente nas cultivares ‘Dark-opal’ e ‘Red-basil’. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foram os ácidos gordos maioritários, e a ‘Red-basil’ apresentou a relação mais baixa $n-6$ (ómega 6)/ $n-3$ (ómega 3) (0,29) e, portanto, o melhor perfil de ácidos gordos. Os ácidos fenólicos, flavonoides e compostos fenólicos totais foram elevados no ‘Red-basil’ e ‘Dark-opal’ (em média 25 mg/g de extrato), inferiores nas amostras ‘Mitikas’ e, diminuíram com o aumento da concentração de N. Do mesmo modo, a atividade antioxidante foi elevada nas cultivares ‘Dark-opal’ e ‘Red-basil’ fertirrigados com 200 ppm de N, e verificou-se que todos os extratos testados tiveram atividade antibacteriana e antifúngica elevada. Em conclusão, o perfil químico e bioativo do manjeriço foi significativamente influenciado tanto pelo genótipo como pela concentração de N. O manjeriço de cor púrpura apresentou o melhor perfil químico, e as concentrações moderadas de N podem proporcionar o melhor equilíbrio entre rendimento, valor nutricional e bioatividade para a espécie.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum* L.; salinidade; fertilização com nitrogénio; composição química; propriedades bioativas.

ABSTRACT

Aromatic and medicinal plants have been used since immemorial times by human beings and today are gaining increasing importance due to their bioactive and sensorial properties. *Ocimum basilicum* L., commonly known as basil, is a plant traditionally used in medicine and cuisine, especially in the Mediterranean area and India, which has led to the development of new cultivars of high interest in these areas.

The soil quality has been decreasing, in particular in terms of the quantity of salts present as well as the possibility of over fertilization to reach a certain goal. This problem, which is difficult to solve, is based on the cost/benefit for producers when choosing the best cultivation practices. It is therefore imperative to assess cultivars and salinity/fertilization rates in order to obtain high quality plants under conditions less favorable to their natural development.

This study aims to evaluate the effect of salinity and amount of nitrogen conveyed in the irrigation on the centesimal composition (lipids, proteins, ashes, carbohydrates and energy value), chemical composition (free sugars, tocopherols, organic acids, fatty acids and phenolic compounds) and bioactivity (antioxidant and antimicrobial activities) of four cultivars of *O. basilicum* L..

Fat, ash and carbohydrates content increased by salinity in ‘Dark-opal’, whereas energetic value was negatively affected. Free sugars (total and individual compounds) increased under saline conditions (S2) in ‘Basilico-rosso’, whereas reducing trends were observed for the main organic acids and tocopherols in all the cultivars. The main fatty acids were α -linolenic, linoleic and palmitic acids with no consistent salinity effects, while the richest polyphenols were sagerinic acid and eriodictyol-*O*-malonylhexoside. Finally, basil extracts showed moderate antioxidant and strong antifungal activity. In conclusion, salinity showed a genotype dependent effect on the chemical composition and bioactivities of the tested cultivars.

A significant genotype \times N input interaction was observed for most of the chemical parameters measured. Tocopherols contents were consistently higher in the leaves of plants fertigated with 200 ppm of N and lower in those receiving 600 ppm of N, especially in ‘Dark-opal’ and ‘Red-basil’ cultivars. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) constituted the main category of fatty acids and ‘Red-basil’ had the lowest $n-6$ (omega-6)/ $n-3$ (omega 3) ratio (0.29) and thus the best fatty acid profile. Phenolic acids, flavonoids and total phenolic compounds

were the highest in 'Red-basil' and 'Dark-opal' (25 mg/g of extract on average) and the lowest in 'Mitikas' and decreased with increasing N input. Similarly, antioxidant activity was the highest in 'Dark-opal' and 'Red-basil' fertigated with 200 ppm of N, whereas all the leaf extracts tested had good antibacterial and antifungal activity. In conclusion, basil chemical and bioactive profile was significantly influenced by both genotype and N input. Red-colo'Red-basil's had the best chemical profile, and moderate levels of N input may provide the best compromise between yield, nutritional value and bioactivity for the species.

Keywords: *Ocimum basilicum* L .; salinity; nitrogen fertilization; chemical composition; bioactive properties.

RESUMEN

Las plantas aromáticas y medicinales han sido utilizadas desde tiempos inmemoriales por los seres humanos y hoy en día han adquirido una importancia creciente debido a sus propiedades bioactivas y sensoriales. *Ocimum basilicum* L., conocida como albahaca, es una planta que se utiliza tradicionalmente tanto en la medicina como en la cocina, especialmente en la zona del Mediterráneo y en la India, lo que ha dado lugar al desarrollo de nuevos cultivos de gran interés en esas zonas.

La calidad del suelo ha ido disminuyendo, en particular en lo que respecta a la cantidad de sales presentes, así como a la posibilidad de sobrefertilización para alcanzar un cierto fin. Este problema, de difícil solución, se basa en la relación costo-beneficio para los productores a la hora de elegir las mejores prácticas de cultivo. Por lo tanto, es imperativo evaluar los cultivares y relación de salinidad/fertilización para obtener plantas de alta calidad en condiciones menos favorables para su desarrollo natural.

El presente trabajo tiene por objeto evaluar el efecto de la salinidad y la cantidad de nitrógeno, transportado en el agua de la irrigación, sobre el composición proximal (lípidos, proteínas, cenizas, carbohidratos y valor energético), la composición química (azúcares libres, tocoferoles, ácidos orgánicos, ácidos grasos y compuestos fenólicos) y la bioactividad (actividad antioxidante y antimicrobiana) de cuatro cultivares de *O. basilicum* L..

El contenido de grasa, cenizas y carbohidratos aumentó por la salinidad en la 'Dark-opal', mientras que el valor energético se vio afectado negativamente. Los azúcares libres (totales e individuales) aumentaron en condiciones salinas (S2) en 'Basilico-rosso', alternadamente, se observó una tendencia de reducción de los principales ácidos orgánicos y tocoferoles en todos los cultivares. Los principales ácidos grasos fueron α -linolénico, linoleico y palmítico, sin efectos de salinidad constatados, mientras que los polifenoles más ricos fueron el ácido sagerínico y el eriodictiol-*O*-malonilhexósido. Por último, los extractos de albahaca mostraron una actividad antioxidante moderada y una fuerte actividad antimicótica. En conclusión, la salinidad mostró un efecto dependiente del genotipo en la composición química y las bioactividades de los cultivares probados.

Se observó una interacción significativa de genotipo \times N para la mayoría de los parámetros químicos medidos. El contenido de tocoferoles fue sistemáticamente mayor en las

hojas de las plantas fertilizadas con 200 ppm de N y menor en las que recibieron 600 ppm de N, especialmente en los cultivos de 'Dark-opal' y 'Red-basil'. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) constituyen la principal categoría de ácidos grasos y la 'Red-basil' tenía la proporción más baja de $n-6$ (omega-6)/ $n-3$ (omega 3) (0,29) y, por lo tanto, el mejor perfil de ácidos grasos. Los ácidos fenólicos, los flavonoides y los compuestos fenólicos totales fueron los más altos en las cultivares 'Red-basil' y 'Dark-opal' (25 mg/g de extracto en media) y los valores más bajos en las 'Mitikas', que disminuyen con el aumento del aporte de N. Del mismo modo, la actividad antioxidante fue la más alta en el 'Dark-opal' y la 'Red-basil' fertilizada con 200 ppm de N, mientras que todos los extractos de hoja analizados tenían una buena actividad antibacteriana y antifúngica. En conclusión, el perfil químico y bioactivo de la albahaca se vio considerablemente influido por el genotipo y el aporte de N. Las albahacas rojas, tenían el mejor perfil químico, y los niveles moderados de aporte de N pueden proporcionar el mejor compromiso entre rendimiento, valor nutritivo y bioactividad para la especie.

Palabras clave: *Ocimum basilicum* L.; salinidad; fertilización con nitrógeno; composición química; propiedades bioactivas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a realização da revisão bibliográfica foi realizada uma pesquisa aprofundada do estado da arte relativo à planta *Ocimum basilicum* L.. Foi utilizada bibliografia recente, proveniente de livros e artigos científicos encontrados em diferentes bases de dados nacionais e internacionais.

Nesta revisão bibliográfica, irão ser abordadas as problemáticas da salinidade do solo e da adubação com nitrogénio, relativamente às suas interações com as plantas, nomeadamente nas questões da produtividade e componentes nutricionais e bioativos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Plantas aromáticas

1.1.1. História

A vida do reino Animal evoluiu com estreita dependência das plantas, assim como o Homem, que as usa desde a sua existência. Inicialmente não havia distinção entre a colheita de plantas para a alimentação ou para fins medicinais (Yaniv, 2014). O Homem primitivo como recolector, dependia inteiramente das plantas para a sua subsistência e hoje, depois de tantas revoluções sociais, culturais, industriais e tecnológicas continua a depender destas para as suas necessidades diárias (Silpa *et al.*, 2018; Vishwanathan, 2018).

Estima-se que haja entre 50 mil a 70 mil plantas aromáticas e medicinais no planeta e são usadas pela maioria da população mundial (Albuquerque, Patil, & Máthé, 2018). Assim, é imperativo aumentar o conhecimento sobre estas plantas, não só na sua biodiversidade mas também na sua caracterização química e valor nutricional, com o intuito de explorar os compostos responsáveis pela capacidade nutritiva e/ou medicinal/terapêutica (Albuquerque *et al.*, 2018).

As plantas têm sido uma grande fonte de compostos bioativos, derivados do seu metabolismo secundário, e têm servido de base para o desenvolvimento de diversos medicamentos; têm a versatilidade de servirem como produtores eficientes de compostos bioativos de qualidade e através da manipulação genética permitirão aumentar a biomassa produzida (Nitish Kumar, 2018; Shasany & Chittaranjan, 2018; Silpa *et al.*, 2018). Os compostos provenientes do metabolismo secundário são usados pela planta para a sua autodefesa, quer por *stress* biótico quer abiótico, para o ser humano são usados como: fármacos, inseticidas, aromatizantes, “drogas”, entre outros. Além destes, existem metabolitos secundários como os compostos fenólicos, terpenos, flavonoides e derivados de enxofre e nitrogénio (N) que têm um papel fundamental na prevenção de doenças no ser humano (Rajkumari & Sanatombi, 2018). Segundo o mesmo autor, os compostos provenientes do metabolismo secundário dividem-se em três grandes classes: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

Os terpenos são formados por unidades isoprénicas (isopreno, 5 carbonos), provenientes da via metabólica do mevalonato e têm a sua denominação consoante o número de unidades

isoprénicas, isto é 5 carbonos (C) denominam-se de hemiterpenos, 10 C - terpenos, 15 C - sesquiterpenos, 20 C - diterpenos, 25 C - sesterpenos, 30 C - triterpenos e 40 C - tetraterpenos (Dewick, 2009). Desta classe são exemplos o geraniol, farnesol, escaleno, mentol, entre outros.

Os compostos fenólicos são maioritariamente derivados da via metabólica do xiquimato, na sua constituição base têm um anel aromático benzénico com um ou mais grupos hidroxilo como um dos substituintes. São provavelmente o maior grupo de fitoquímicos com capacidades terapêuticas, e desta família fazem parte os flavonoides, taninos, estilbenos, cumarinas e ácidos fenólicos (Dewick, 2009; Garde-Cerdán *et al.*, 2017).

Por sua vez, os compostos nitrogenados ou alcaloides são um grupo muito heterogêneo de compostos, provenientes de várias vias metabólicas e estima-se que haja 12.000 alcaloides isolados. Dos quais, há 3 grupos maioritários: glicosídeos cianogénicos, glucosinolatos e não aaminados/proteínados (Dewick, 2009; Silpa *et al.*, 2018).

1.2. Família *Lamiaceae*

Esta família tem como características principais os caules quadrados, folhas decussadas (oposto-cruzadas) com muitas glândulas e flores zigomórficas. Muitas espécies são aromáticas e contêm óleos essenciais compostos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Como exemplo encontramos os géneros *Rosmarinus*, *Thymus*, *Salvia* e *Ocimum* que pertencem a esta família (Aguiar, 2018; Hiltunen & Holm, 2006).

Em particular, o género *Ocimum* foi descrito por Linnaeus em 1753 com 5 espécies segundo Shasany & Chittaranjan (2018), e hoje tem entre 180 a 250 espécies, entre ervas e arbustos sendo anuais ou perenes. Outros autores que, devido à taxonomia problemática deste género, definem um limite entre 30 a 160 espécies (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008).

Dentro do género *Ocimum*, as espécies que se destacam são as *Ocimum basilicum* L., *O. americanum* e os seus híbridos, *O. x citriodorum* e *O. tenuiflorum*. São usadas para extração de óleos essenciais, na culinária e também como planta medicinal (Hiltunen & Holm, 2006; Smith *et al.*, 2019).

1.2.1. *Ocimum basilicum* L.

A espécie *O. basilicum* é uma planta herbácea da família das *Lamiaceae* e é nativa da Índia e Pérsia (The Plant List, 2020). Existem muitas variedades e cultivares desta planta, que diferem em tamanho, forma, cor das folhas e do caule, flor e aroma (Shasany & Chittaranjan, 2018).

Os nomes “*Ocimum*” e “*basilicum*” provêm do Grego e significam “ter fragrância” e “real”, respetivamente (Makri & Kintzios, 2008). Os nomes vernaculares mais usados segundo Tropicos (2020) são: “Basil” (em inglês), “luo le” (em chinês) e segundo Shasany and Chittaranjan (2018): “Holy Basil” ou “Thulasi” (em índico). Em Portugal usa-se o nome comum “manjeriço” ou “alfavaca” (Jardim Botânico, 2020) e em Espanha de “albahaca” (Fitoterapia, 2020).

É uma espécie utilizada há muitos anos, havendo registos de cultivos há mais de 5000 anos (Nadeem *et al.*, 2020) e ainda hoje tem um valor comercial elevado devido a ter múltiplos usos, como medicinal (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008; Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy, 2016), alimentar (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008; Nadeem *et al.*, 2020; Oppel, 2008), ornamental (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008; Oppel, 2008), cosmética e perfumaria (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008), religioso (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008) e como inseticida (Makri & Kintzios, 2008).

Tabela 1. Classificação taxonómica de *O. basilicum* (Cole *et al.*, 2017; USDA, 2020)

Segundo Cronkvist		Segundo APG IV	
Reino	<i>Plantae</i>	Clado	<i>Early Angiosperms</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>	Clado	<i>Eudicots</i>
Superdivisão	<i>Spermatophyta</i>	Clado	<i>Core Eudicots</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>	Clado	<i>Pentapetalae</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Clado	<i>Superasterids</i>
Subclasse	<i>Asteridae</i>	Clado	<i>Asterids</i>
Ordem	<i>Lamiales</i>	Clado	<i>Lamids</i>
Família	<i>Lamiaceae</i>	Ordem	<i>Lamiales</i>
Género	<i>Ocimum</i>	Família	<i>Lamiaceae</i>
Espécie	<i>basilicum</i>	Género	<i>Ocimum</i>
		Espécie	<i>basilicum</i>

O. basilicum é uma planta herbácea anual que pode atingir entre 60 a 90 cm de altura, tem uma raiz primária apumada, com caules quadrados e glabros, maioritariamente verde mas com cultivares ligeiramente púrpuras; as folhas são simples, opostas com 1 a 5 cm longitudinalmente. As folhas mais compridas são ovadas e pontiagudas de margens lobadas ou dentadas com um pecíolo de 1,3 a 2,5 cm e com glândulas secretoras (tricomas peltados) nas folhas (**Figura 1**). As inflorescências do Manjeriço são racemos terminais, de 10 a 20 cm de comprimento e formam pequenos glomérulos ao longo do racemo. As flores são sésseis e zigomórficas, com 5 sépalas unidas, pilosas e glandulosas onde a sépala superior é maior e mais arredondada que as restantes. Tem 5 pétalas, pilosas, unidas, sendo que a superior é maior, contem 4 estames e estiletos com 2 estigmas com a mesma altura que os estames. O fruto é seco, dividido em 4 núculas ovóides envoltos em cálice persistente (De Masi *et al.*, 2006; Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008; Malerbo-Souza *et al.*, 2000).



Figura 1. Variabilidade genética das folhas de *Ocimum*. Retirado de Shasany & Chittaranjan (2018).

Três “cultivares” de cor púrpura, nomeadamente, *O. basilicum* cv. ‘Red-basil’, *O. basilicum* cv. ‘Dark-opal’ e *O. basilicum* cv. ‘Basilico-rosso’ e uma “cultivar” verde, *O. basilicum* cv. ‘Mitikas’, serão focadas neste trabalho (**Figura 2**).

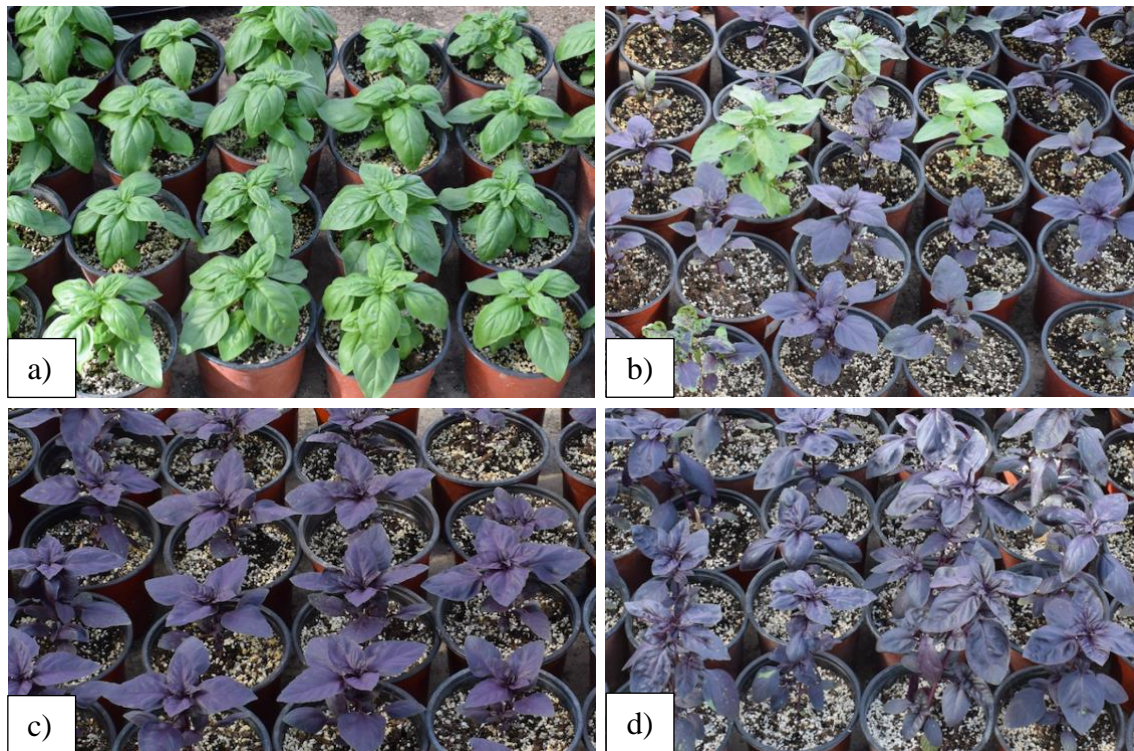


Figura 2. Cultivares utilizadas neste trabalho, **a)** ‘Mitikas’, **b)** ‘Red-basil’, **c)** ‘Basilico-rosso’ e **d)** ‘Dark-opal’. Imagens fornecidas por Spyridon Petropoulos, durante o ciclo vegetativo da planta.

Tabela 2. Breve descrição das espécies de manjeriço mais comuns e especificidades. Adaptado de Makri & Kintzios (2008).

<i>Nome Comum</i>	<i>Nome Latino</i>	<i>Descrição</i>
<i>Sweet Basil</i>	<i>O. basilicum</i>	O mais comumente produzido, caule ereto, verde brilhante, folhas com 1 cm de comprimento. O aroma assemelha-se ao cravinho.
<i>Genovese Basil</i>	<i>O. basilicum</i> var <i>Genovese</i>	Cultivar italiana, preferida para os pratos de pesto e pratos com alho; caule ereto, folhas verde escuro até 5 cm de comprimento.
<i>Bush ou Greek Basil</i>	<i>O. basilicum</i> var <i>minimum</i>	Cultivar anã, de folhas pequenas (< 1cm) e pujantes, flores brancas, ornamental. Existem muitas variedades como a “Fine Green”, “Green Bouquet” e “Spicy Globe”.
<i>Purple Basil</i>	<i>O. basilicum</i> var <i>purpurascens</i>	Cultivada para efeitos ornamentais e culinários, flores tipo lavanda, folhas semelhantes em forma e tamanho às de sweet basil. Inclui as variedades “Opal”, “Purple Ruffles”, “Red Rubin” e “Rosso”.

O valor comercial desta espécie é elevado, anualmente são comercializadas pelo menos 5000 toneladas desta planta, sob a forma de folhas secas, óleos essenciais ou químicos derivados (Shasany & Chittaranjan, 2018). Nos Estados Unidos, em 2018, *O. tenuiflorum* L. teve um total de vendas - como suplemento alimentar, de 3.421.090 \$ (3.104.570 €), ocupando a 27 posição dos suplementos mais vendidos nesse ano (Smith *et al.*, 2019).

1.2.2. Composição nutricional e química

Existe, hoje em dia, uma crescente preocupação com a qualidade nutricional e inclusive bioativa do que se consome na dieta, ao mesmo tempo que existem cada vez mais preocupações ambientais e económicas. Este paradigma obriga a encontrar soluções, ao mesmo tempo rentáveis, sustentáveis, ecológicas e nutricionalmente vantajosas num mercado claramente em expansão (Beszterda & Nogala-Kałużka, 2019; Chatzigianni *et al.*, 2019; Petropoulos *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2019).

O. basilicum L. é uma espécie que, devido à sua variabilidade genética, é de difícil caracterização química, isto é, houve uma hibridização exógena (antropogénica) ao longo do tempo, existindo hoje inúmeras cultivares que não diferem significativamente em termos morfológicos (Da Costa *et al.*, 2014; Makri & Kintzios, 2008). Apesar desta grande variedade, nos óleos essenciais predominam os monoterpenos e fenilpropanóides e em 38 genótipos analisados, os resultados demonstraram concentrações de linalol que variaram entre os 9 a 75% e de epi- α -cadinol entre 0 a 53% (Da Costa *et al.*, 2014).

Segundo Hiltunen & Holm (1999), o *O. basilicum* contém entre 0,5 e 1,5 % de óleo essencial de composição variada, 5 % de taninos e *p*-sitosterol. As sementes contêm mucílagos, planteoses, polissacarídeos e aproximadamente 20 % de óleo cujos compostos maioritários são o ácido linoleico (50 %), linolénico (22 %) e oleico (15 %).

A composição do óleo essencial do manjeriço é muito variável e complexa, os compostos que prevalecem são os monoterpenos e fenilpropanóides, como referido anteriormente. Os mais abundantes são os eugenol, metil eugenol, chavicol, estragole, metil cinamato e linalol (**Figura 3**). Tem monoterpenos (ocimeno, geraniol e alcanfor), sesquiterpenos (bisaboleno e cariofileno) e como fenilpropanóides possui os metil cinamato e

metil eugenol; esta composição mantém-se nas cultivares de cor púrpuras (Makri & Kintzios, 2008).

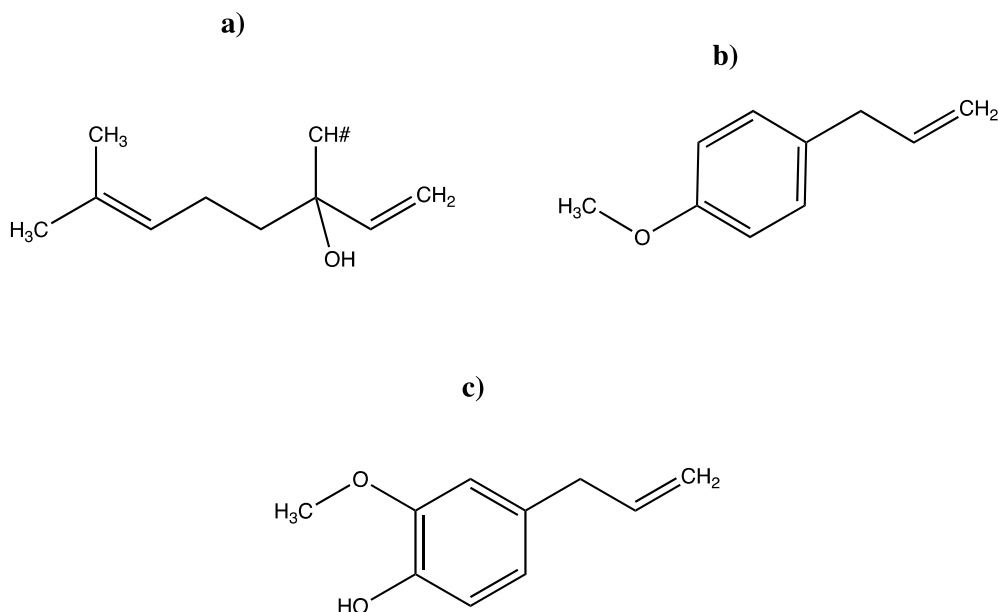


Figura 3. Exemplo dos principais compostos presentes no óleo essencial de *O. Basilicum*. **a)** linalol, **b)** metilchavicol e **c)** eugenol. (Adaptado de Nadeem *et al.* (2020), desenhado no ChemDraw 16.0)

O. basilicum contém também flavonoides, ácidos fenólicos, triterpenos, esteroides, entre outros compostos considerados nutracêuticos (Ahmed *et al.*, 2019; Da Costa *et al.*, 2014; Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008; Zhan *et al.*, 2019). O termo nutracêutico é descrito como o componente nutricional ou medicinal, que provem de qualquer matriz natural, e tem como finalidade melhorar a saúde quer por ação preventiva, quer como aplicação terapêutica (Lockwood, 2007).

Diariamente, apesar de não se consumir uma quantidade suficiente de manjeriço para ser determinante na nossa alimentação, este, contém uma variedade de compostos nutritivos valiosos, nomeadamente: vitaminas (C e A, β -caroteno, tiamina, riboflavina, niacina, tocoferol), minerais (potássio, cálcio, fosforo, ferro, magnésio), proteínas e fibras (teores elevados nas sementes) (Hiltunen & Holm, 2006; Nadeem *et al.*, 2020), para além de ser hipocalórico e apresentar teores reduzidos de lípidos.

A cultivar Red Rubin, assim como outras de cor púrpura, apresentam teores elevados de compostos fenólicos (Incrocci *et al.*, 2019), a sua coloração vermelha deve-se à presença de antocianinas, este facto poderá ajudar a explicar o seu potencial antioxidante muito superior em relação às cultivares verdes (Dewick, 2009; Incrocci *et al.*, 2019). A quantidade de

antocianinas pode ser variável devido à sua instabilidade genética, podendo haver folhas com riscas verdes pronunciadas durante a fase de crescimento (Makri & Kintzios, 2008). Segundo o mesmo autor, existem cultivares de cor púrpuras que atingem um valor de antocianinas de 200 $\mu\text{g/g}$ de folha fresca, num total de 14 antocianinas diferentes, sendo a mais abundante a cianidina-3-(di-*p*-comarilglucosídeo)-5-glucósido.

1.2.3. *Propriedades bioativas*

O manjeriço tem variadíssimas propriedades bioativas, as quais se podem salientar: atividade antibacteriana e antifúngica, antivírica, inseticida, repelente, anti-inflamatória, anti cancerígena, hipoglicémica, radioprotetora, analgésica, antiulcerinogénica, hepatoprotetora, antidiabética, antimalárico, antistress, antipirético, antiarrítmico, ansiolítico e sedativo, efeitos cardiovasculares, anti osteoporose, anti colérico, citotóxico, efeito anti hematóxico, anti hipertensivo, vaso relaxante e anti agregante plaquetário e antitrombótico (Hiltunen & Holm, 2006; Nadeem *et al.*, 2020). Segundo (Zhan *et al.*, 2019) estas propriedades podem ser atribuídas à presença, entre outros, de polissacáridos, esteroides, flavonas, cumarinas e vitaminas.

Da Costa *et al.* (2014) refere ainda, que esta espécie é usada para tratamentos de problemas intestinais, respiratórios e disfunção renal. Outros autores, referem que combate a acne, queda de cabelo, frieiras, febre, atua contra amigdalites e aftas (Malerbo-Souza *et al.*, 2000).

Asthana *et al.* (2015) demonstrou que os extratos aquosos de *O. basilicum* têm atividade antioxidante, aumentando a longevidade de vermes, uma vez que diminuíram a quantidade de espécies reativas de oxigénio (ROS). Os responsáveis por essa atividade foram, neste caso, os ácidos cafeico, rosmarínico (**Figura 4**), ferúlico e rutina. Makri e kintzios (2008) também referem que alguns dos elementos antioxidantes poderosos do manjeriço são os ácidos cafeico, rosmarínico e ferúlico.

É imperativo medir a significância e atividade biológica das plantas no ser humano, isto é, não basta ter compostos bioativos para que o seu efeito seja benéfico, os compostos bioativos têm de estar biodisponíveis para que o organismo possa utilizá-los de forma eficiente. A bioacessibilidade é definida como a parte de uma substância ingerida, que fica potencialmente disponível para ser absorvida durante a digestão. Esta é determinante no que toca à

biodisponibilidade e posterior atividade fisiológica do nutracêutico (Minekus *et al.*, 2014; Seczyk *et al.*, 2020).

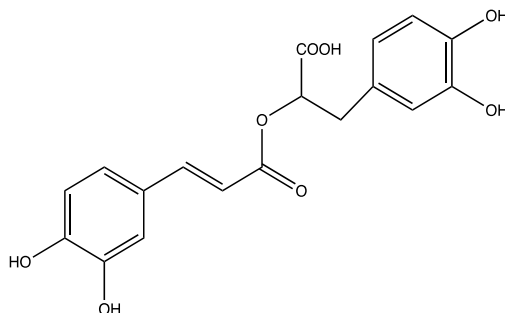


Figura 4. Estrutura do ácido rosmarínico (ChemDraw professional 16.0).

1.3. Importância das condições agronômicas no perfil químico e bioativo de plantas

É reconhecido que as condições agronômicas afetam a cultura, quer em termos quantitativos quer em termos qualitativos. Estas condições vão desde a escolha do genótipo, condições climáticas, estação do ano, técnicas agronômicas e suas interações (Murillo-amador *et al.*, 2013; Primi *et al.*, 2019). É também consensual que o “melhoramento genético” altera a expressão de certos genes que por sua vez alteram o perfil químico e bioativo da planta, daí a importância da escolha do genótipo (Beszterda & Nogala-Kalucka, 2019; Murillo-amador *et al.*, 2013).

As condições agronômicas para produção de manjeriço já foram testadas (devido ao seu valor comercial) e o N é o principal fator para aumentar a produtividade dentro dos macronutrientes, e o único significativo uma vez que, quantidades excessivas de N fazem diminuir a produção exercendo um efeito tóxico na planta (Hiltunen & Holm, 2006). Em países quentes, é possível produzir esta espécie ao longo de todo o ano e consegue-se obter entre 4 a 5 colheitas por ano, exigindo adubação para não perder rendimento; a quantidade de água disponível também é um fator determinante para obter rendimentos aceitáveis de manjeriço, uma vez que esta planta não é tolerante ao *stress* hídrico (Hiltunen & Holm, 2006).

A colheita é decisiva para se obter rendimentos elevados de óleo essencial, onde o pico máximo de obtenção é imediatamente antes da abertura das flores (ântese). Este efeito também se faz sentir ao nível das percentagens dos compostos presentes no óleo essencial, de igual modo que a maturação das folhas, assim como a transplantação das sementes para o local de cultivo, secagem ou manipulação pós colheita, são fatores a ter em conta. A secagem ótima

deve ser feita a uma temperatura inferior a 40 °C, mas, há estudos que indicam que a secagem num forno a 50 °C se obtém rendimentos elevados quer em quantidade, quer em qualidade em comparação com a secagem ao ar (Da Costa *et al.*, 2014; Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008; Nadeem *et al.*, 2020).

1.3.1. *Stress salino*

A problemática do *stress* salino com o cloreto de sódio (NaCl), um tipo de *stress* abiótico, advém da constante deterioração do solo quer em zonas costeiras quer em zonas semiáridas, ou com excesso de adubação em que se utiliza sais de N e têm a facilidade de lixiviação (Eltarabily, Bali, Negm, & Yoshimura, 2019; Petropoulos *et al.*, 2017). Por outro lado, a rega com águas residuais tratadas ou provenientes de lençóis freáticos com elevada concentração salina, amplificam este efeito de aumentar o teor de iões Na⁺ e Cl⁻ nas raízes das plantas (Petropoulos *et al.*, 2017). Esta problemática é já uma das maiores ameaças à agricultura mundial, pois vem sendo considerado o maior inibidor da produtividade agrícola (Parihar *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2019).

Estes fatores, em conjunto com a pressão do uso do solo por parte do Homem, fazem com que a agricultura tenha de procurar formas alternativas e de se reinventar e/ou deslocar para zonas menos propícias à agricultura, e paralelamente de aumentar a sua produtividade global. Existe, hoje, um bilião de hectares de solo no planeta, 6% da área total, cujo teor em sal já é considerado como limitante para o crescimento normal das plantas (Parihar *et al.*, 2015; Petropoulos *et al.*, 2017)

O *stress* salino no solo provoca uma menor taxa metabólica uma vez que é mais ativo na zona meristemática e de alongamento celular, isto é, nos ápices das raízes, baixando a taxa de crescimento e produtividade da planta em termos globais (Petropoulos *et al.*, 2017; Rubio *et al.*, 2019).

Existem dois tipos de *stress* salino definidos, *stress* osmótico ou de *deficit* de água, e o efeito de excesso de iões (tóxico). O primeiro exerce um efeito no solo junto das raízes e limita a entrada de água na planta enquanto que o segundo exerce um efeito inter e intracelular em vários tecidos da planta, desde a raiz até às folhas, incluindo na germinação das sementes (**Figura 5**) (Parihar *et al.*, 2015; Rubio *et al.*, 2019).

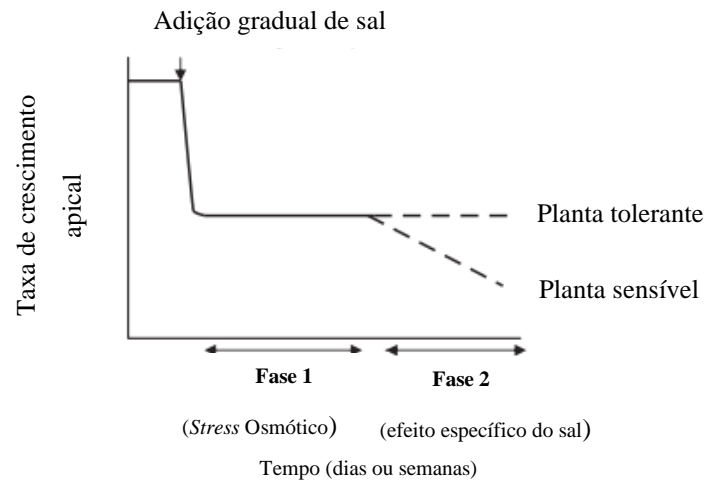


Figura 5. Taxa de crescimento com os dois tipos de *stress* salino e a sensibilidade das plantas, ao longo do tempo e adição gradual de sal (Munns, 2005).

A maioria das plantas cultivadas são sensíveis ao *stress* salino, havendo exceções como o tomate, couves e brócolos que são tolerantes, e há também espécies que são resistentes a este *stress* como o espinafre e os espargos (Petropoulos *et al.*, 2017).

Considera-se, por definição da *USDA Salinity Laboratory*, que um solo é salino quando este apresenta uma concentração elevada de sais solúveis perfazendo um $EC_e \geq 4$ dS/m (equivalente a 40 mM NaCl, sendo o EC_e a condutividade do extrato saturado do solo), embora haja culturas que sejam inibidas com valores inferiores a este (Munns, 2005).

Muito embora a produtividade baixe com o aumento do NaCl, verifica-se por vezes, um aumento da acumulação de compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário, tais como carotenoides, compostos fenólicos, organosulfurados, poliamidas, entre outros. Este efeito chama-se de *eustress*, isto é, um *stress* positivo que melhora os componentes nutricionais e bioativos da planta; este fator depende de várias outras condicionantes como a duração do *stress*, o grau de exposição, da espécie, da cultivar e das condições agronómicas (Chatzigianni *et al.*, 2019).

1.3.2. Concentração de N

O N é considerado um macronutriente, pois é necessário em quantidades significativas, devido ao facto de ser um dos constituintes das proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, aminoácidos e clorofilas (Beszterda & Nogala-Kałużka, 2019).

A adubação com N nos vegetais é de extrema importância, mas também pode ter os seus aspetos negativos como por exemplo, a excessiva quantidade de N consumida por parte do ser humano (Petropoulos *et al.*, 2019). O tipo de espécie nitrogenada também influencia o rendimento da colheita assim como a qualidade da mesma, nomeadamente no aumento de compostos benéficos de interesse (tocoferóis, compostos fenólicos e ácidos orgânicos) assim como na redução de compostos antinutricionais (ácido oxálico) (Petropoulos *et al.*, 2019; Petropoulos *et al.*, 2018).

Em espécies já estudadas, como *Chichorium spinosum* L., verificou-se o aumento de compostos bioativos (como por exemplo ácidos fenólicos e flavonoides) associados a uma baixa disponibilidade de N (Chatzigianni *et al.*, 2019; Petropoulos *et al.*, 2019). Verificou-se também que existe maior variabilidade associada à cultivar do que à interação entre salinidade *versus* concentração de N, quanto ao aumento dos compostos bioativos na sua generalidade. Muito embora, hajam efeitos significativos destas variáveis na composição química e quantidade de compostos bioativos.

No manjeriço, os estudos indicam que uma fertilização base de 1:1:1 de nitrogénio:fósforo:potássio (N:P:K) é suficiente para melhorar a produção, muito embora se possa aumentar a taxa de N de forma a aumentar a biomassa, o rendimento da extração de óleo essencial e a sua qualidade. Este aumento é dependente da cultivar, e é de salientar que o aumento exagerado da adubação com N reduz a quantidade total de óleo, influenciando simultaneamente a qualidade do mesmo (Hiltunen & Holm, 2006; Makri & Kintzios, 2008).

Seczyk *et al.* (2020), sugerem que uma maior quantidade de azoto durante a adubação tem um efeito negativo na biodisponibilidade dos compostos nutracêuticos, aquando da digestão dessas plantas, isto é, a maiores quantidades de N correspondem menores taxas de biodisponibilidade quando se aduba acima de 30 kg N.ha⁻¹ (quantidade ótima de adubação).

OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram definidos em função de: em primeiro lugar, estado da arte e em segundo lugar, da evidente necessidade de aprofundar o estudo da caracterização nutricional, química e bioatividades de diferentes cultivares de *O. basilicum* L., em contextos de salinidade e nitrogénio crescentes, e de maximização da sua produtividade global.

2. OBJETIVO

Devido às alterações edafoclimáticas que estão a acontecer no Mundo, torna-se cada vez mais pertinente entender quais as plantas que se adaptam à nova realidade, em particular, ao aumento da salinidade do solo, sem perder a sua qualidade nutricional/organoléptica/nutracêutica e/ou terapêutica. Além deste fator, acresce a importância de diminuir a utilização excessiva de adubação, quer por questões económicas, quer ambientais, sem perder também a qualidade e produtividade final da planta. O conhecimento intrínseco das diferentes cultivares de manjerição é uma mais-valia para a produção das mesmas e inclusive evidenciar e/ou aumentar a sua importância económica.

O presente trabalho tem como OBJETIVO GERAL avaliar o efeito de diferentes concentrações de salinidade no valor nutricional, composição química e bioatividade de três cultivares de manjerição de cor púrpura: ‘Dark-opal’, ‘Red-basil’, e ‘Basilico-rosso’

O efeito de diferentes concentrações de N, nos mesmo parâmetros, foi também avaliado nas cultivares mencionadas, acrescido de uma cultivar de cor verde: ‘Mitikas’.

Para alcançar o objetivo geral do trabalho, foram delineados os seguintes OBJECTIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o valor nutricional (lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e energia) e a composição química (ácidos gordos, açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e compostos fenólicos) das 4 cultivares de manjerição;
- Determinar as bioatividades (atividade antioxidante e antimicrobiana);
- Avaliar a influência da salinidade (controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3 dS/m e S2 com 4,5 dS/m) nos parâmetros enumerados;
- Avaliar a influência do N (controlo (0 ppm); 200 ppm; 400 ppm e 600 ppm) nos parâmetros enumerados;
- Relacionar e determinar, dentro das cultivares, qual o método de cultivo (salinidade e/ou N) mais interessante;
- Definir qual a melhor cultivar/método de cultivo para cada parâmetro estudado.

METODOLOGIA

Neste capítulo, serão descritas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho, que estiveram de acordo, quer com a bibliografia mais recente, quer com o objetivo deste trabalho, por forma a que os resultados pudessem ser validados cientificamente.

Estão descritos detalhadamente, os procedimentos relativos à salinidade e da fertirrigação com nitrogénio, assim como os procedimentos para determinação da composição proximal (humidade, lípidos, proteínas, cinzas, glúcidos e energia), da composição nutricional (açúcares livres, ácidos orgânicos, ácidos gordos, tocoferóis e compostos fenólicos) e das propriedades bioativas (atividade antioxidante e atividade antimicrobiana).

3. METODOLOGIA

3.1. Padrões e reagentes

O acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8% de grau HPLC foram adquiridos da Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O etanol 99,8%, metanol 99,9%, hexano, éter de petróleo, ácido sulfúrico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O clorofórmio, 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH), ácido tricloroacético (TCA), tris e os padrões de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), açúcares (>98% pureza HPLC), ácidos orgânicos (≥99% pureza HPLC), e a mistura de ácidos gordos de ésteres metílicos (FAME) (padrão 47885-U) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de tocoferóis (>98% pureza HPLC), tocol 50 mg/mL (98% pureza HPLC), foram adquiridos na Matreya (Pleasant Gap, PA, EUA), os padrões de compostos fenólicos foram adquiridos da Extrasynthèse (S.A., Genay, França).

Agar Mueller-Hinton e agar malte foram obtidos do Instituto de Imunologia e Virology, Torlak (Belgrado, Sérvia). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido na Merck (KGaA, Alemanha). Os controlos positivos E211 e E224 foram adquiridos na Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Outros reagentes e solventes de grau analítico foram adquiridos de fontes comuns.

O tratamento da água foi realizado usando um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

3.2. Preparação das amostras

3.2.1. Condições de aplicação da salinidade

Sementes de três cultivares de manjeriço de cor púrpura (*O. basilicum*), nomeadamente 'Red-basil' (manjeriço púrpura, Geniki Fytotechniki SA; Atenas, Grécia), 'Dark-opal' (Opala escuro, De Corato Sementi; Andria, Itália) e 'Basilico-rosso' (Larosa Emanuele Sementi; Andria, Itália) foram selecionadas.

As sementes foram cultivadas em tabuleiros contendo turfa no dia 04/04/2019. As plântulas foram transplantadas para sacos de 2 L contendo turfa e perlite (1:1; v/v) no dia 23/04/2019 na Universidade Tessalónica, na Grécia.

Foram efetuados 3 tratamentos distintos de salinidade, com concentrações crescentes de NaCl, nomeadamente, controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. Todas as plantas foram fertirrigadas com uma solução nutritiva contendo 200 ppm de N:P:K (20:20:20) (até, aproximadamente, às 3 semanas após a transplantação).

Posteriormente, todas as plantas receberam o tratamento de salinidade e utilizaram-se 15 vasos com uma planta por vaso, perfazendo 45 vasos no total.

A colheita foi realizada a 14/06/2019, precedente à ântese (abertura da flor). Logo após a colheita, as plantas foram pesadas, liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, MO, USA), trituradas e armazenadas ao abrigo da luz até posterior análise.

3.2.2. Condições de aplicação do nitrogénio

Para além das cultivares anteriormente selecionadas para o ponto **3.2.1.**, foi utilizada adicionalmente uma cultivar local ‘Mitikas’ (verde) e as condições de cultivo foram idênticas às descritas no ponto anterior.

Foram efetuados 4 tratamentos distintos com concentrações crescentes de N, nomeadamente, controlo (0 ppm); 200 ppm, 400 ppm e 600 ppm. As plantas foram fertirrigadas com 50 a 300 mL dependendo das condições de crescimento. Para cada tratamento, foram utilizados 15 vasos com uma planta por vaso (60 vasos no total).

Para a colheita e preparação das amostras, procedeu-se de acordo com o descrito anteriormente no ponto **3.2.1.**

A origem e classificação taxonómica das amostras de manjeriço não é clara, havendo ambiguidades no que se refere à aplicação da nomenclatura botânica. As amostras estudadas, ‘Red-basil’ e ‘Dark-opal’ são consideradas cultivares selecionadas artificialmente, ‘Basilico-rosso’ é considerada uma cultivar comercial (*trade designation*) e a ‘Mitikas’ é uma subespécie com distribuição local.

Para facilitar a sua identificação e referência ao longo deste trabalho adotou-se a grafia correspondente para designar as cultivares, respetivamente ‘Dark-opal’, ‘Red-basil’, ‘Basilico-rosso’ e ‘Mitikas’.

3.3. Caracterização nutricional e química das cultivares de manjeriço

3.3.1. Composição Proximal

Foi avaliada a composição em macronutrientes (humidade, glúcidos, cinzas, proteínas e lípidos) conforme os métodos oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). O teor de humidade foi avaliado com base na diferença de massa obtida antes e depois da liofilização, utilizando a seguinte equação: $\text{Humidade (g/planta)} = [(g_{\text{ fresco}} - g_{\text{ seco}}) / g_{\text{ fresco}}] * 100$. O teor de proteínas totais foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total utilizando o fator de conversão ($N \times 6,25$). Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando-se o aparelho de Soxhlet. O teor de cinzas foi determinado por incineração numa mufla a 550 ± 15 °C. Os glúcidos foram calculados por diferença, segundo equação: $\text{Glúcidos (g/100 g massa seca (ms))} = 100 - (\text{g cinzas} + \text{g proteínas} + \text{g lípidos})$. A energia foi calculada com base no sistema de Atwater de acordo com a equação: $\text{Energia (Kcal/100 g ms)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos})$.

3.3.2. Açúcares Livres

A determinação dos açúcares livres foi realizada com base na metodologia descrita por Obodai *et al.* (2017), utilizando um sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de índice de refração (HPLC-RI). Às amostras liofilizadas (1,5 g), foi adicionado 1 mL de padrão interno (PI, melezitose, 25 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1h 30 min. Em seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico (deslipidificação da fase aquosa). Após concentração a 40 °C, o resíduo sólido foi redissolvido em água destilada para um volume final de 5 mL. Após filtração em filtros de nylon de 0,2 µm para *vials*, procedeu-se à análise por HPLC-RI a 35 °C utilizando um sistema de HPLC (Knauer, sistema Smartline) equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel utilizada foi

acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi realizada usando o método do PI e por comparação cromatográfica com padrões comerciais. Os resultados foram expressos em g por 100 g de ms.

3.3.3. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida ultra rápida com detetor de díodos (UPLC-DAD), conforme a metodologia descrita e otimizada por Barros *et al.* (2013). Procedeu-se à extração de 1,5 g das amostras liofilizadas com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) em agitação durante 25 min. As soluções obtidas foram filtradas através de papel Whatman N° 4 e seguidamente através de filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para *vials*. Os ácidos orgânicos foram analisados utilizando um sistema Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna de fase reversa C18 SphereClone (Phenomenex, 5 µm, 250 × 4,6 mm), termostaticada a 35 °C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 mL/min. A detecção foi efetuada num detetor DAD, utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda. Os ácidos orgânicos identificados foram quantificados por comparação da área dos picos com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de ms.

3.3.4. Ácidos Gordos

A partir da fração lipídica obtida anteriormente pela extração de Soxhlet, os ácidos gordos foram derivatizados por um processo de transesterificação previamente descrito por Obodai *et al.* (2017). 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno (2:1:1, v/v/v) foram adicionados à fração lipídica e incubados por 12 h a 50 °C e 160 rpm. Após a incubação, foram adicionados 3 mL de água destilada e 3 mL de éter dietílico, agitou-se vigorosamente com a ajuda de um *vortex*. A fase orgânica contendo os FAME foi removida, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada com filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para análise posterior.

O perfil de ácidos gordos foi determinado por cromatografia gasosa (GC 1000, DANI, Milão, Itália) equipado com um injetor *split/splitless* a 250 °C, detetor de ionização de chama (FID) a 250 °C e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm, *df*, Phenomenex,

Lisboa). O programa de temperatura do forno utilizado foi o seguinte: temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, durante 1,5 min., em seguida aumentou-se a temperatura 40 °C/min até os 160 °C, 5 °C/min até os 185 °C, 30 °C/min até os 260 °C durante 4 min. O caudal do gás de arraste (hidrogénio) foi de 0,6 mL/min, medido a 100 °C. A injeção *split* foi de 1:80.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da mistura padrão dos 37 FAMES e das amostras. Os resultados foram processados usando o *software* Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Podohradská, República Checa) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.3.5. Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados de acordo com o procedimento otimizado pelos autores Martins *et al.* (2016). Antes de se proceder à extração, adicionou-se às amostras liofilizadas (~500 mg) uma solução de BHT em hexano (10 mg/mL, 100 µL) e o padrão interno (PI) (tocol em hexano 50 µg/mL; 400 µL). Adicionaram-se 4 mL de metanol e posterior homogeneização no *vortex* durante 1 min. De seguida, adicionaram-se 4 mL de hexano procedendo-se, posteriormente, a nova homogeneização no *vortex* (1 min). Posteriormente adicionou-se ainda 2 mL de uma solução aquosa saturada de NaCl, homogeneizou-se no *vortex* (1 min), centrifugou-se (centrifuga refrigerada Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific, 5 min, 4000 g) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco âmbar. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano e desidratada com sulfato de sódio anidro. O extrato foi levado à *secura* recorrendo a uma corrente de azoto. De seguida foi re-dissolvido em 2 mL de hexano, filtrado (filtros de 0,22 µm) para *vials* âmbar e analisados por HPLC-FL.

Utilizou-se um sistema integrado de bomba quaternária (Knauer, sistema Smatline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (FL, Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o *software* Clarity 2,4 (DataApex, Praga, República Checa). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (5 µm, 250 × 4.6 mm, WMC Waters, Japão), operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min.

A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do PI e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de ms.

3.3.6. Preparação dos extratos hidroalcoólicos das folhas

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos, 3 g das folhas liofilizadas, foram extraídas com 60 mL de etanol/água (80:20, v/v) sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, durante uma hora. O preparado foi filtrado através de um filtro de papel Whatman N° 4 e o resíduo re-extraído repetindo-se o procedimento. Posteriormente, o etanol foi evaporado a 40 °C (Buchi R-2010), e procedeu-se à congelação e liofilização para a obtenção do extrato.

3.3.7. Compostos fenólicos

Os extratos foram submetidos a análise cromatográfica de acordo com o procedimento descrito pelos autores Bessada *et al.* (2016), em HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) utilizando um sistema composto por bomba quaternária e dupla detecção *on-line*: detetor de díodos (DAD), usando o λ de 280 nm, 330 nm e 370 nm, e um detetor de espectrometria de massas (MS). Para a separação utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 μ m, 150 \times 4,6 mm, Waters Milford, MA, USA), operando a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

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

Identificaram-se os compostos fenólicos através de comparações dos tempos de retenção, espectros de massa e de UV-Vis com os obtidos pelos padrões quando disponíveis, e/ou comparando com a informação disponível na literatura. Realizou-se a análise quantitativa de acordo com as retas de calibração (ácido cafeico, 3-quercetina-3-*O*-rutinosídeo e ácido rosmarínico), usando como base o sinal UV-Vis dos padrões comerciais no seu λ máximo e, quando não disponíveis, a partir de outros compostos com o mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

3.4. Propriedades bioativas

3.4.1. Atividade Antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante foi determinado *in vitro* nos extratos hidroalcoólicos preparados anteriormente e realizaram-se dos ensaios celulares: inibição da peroxidação lipídica, TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico) e o ensaio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA).

3.4.1.1. TBARS – inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico

Neste ensaio os TBARS foram obtidos a partir de tecidos cerebrais de porco, de animais oficialmente abatidos. O tecido cerebral foi homogeneizado em solução tampão Tris-HCl (20 mM e pH 7,4) para se obter uma porção de 1:2 (*m/v*) de homogeneizado cerebral após a centrifugação a 4000 g durante 10 min. Recolheu-se o sobrenadante, o qual foi adicionando (100 μ L) às soluções das amostras (200 μ L) na presença de 100 μ L de FeSO₄ (10 mmol/L e 100 μ L de ácido ascórbico (0.1 mmol/L). Após incubação a 37 °C durante 1 hora, parou-se a reação através da adição de 500 μ L de ácido tricloroacético (28%, *m/v*), seguido do ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, *m/v*, 380 μ L). Seguidamente a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min e centrifugada a 3000 g durante 10 min para remover o precipitado proteico. A intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA) – TBA no sobrenadante foi medida a 532 nm e a inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada segundo a equação:

Inibição de peroxidação lipídica (%) = $\left[\frac{A-B}{A} \right] \times 100$, onde A corresponde à absorvância do controlo e B à absorvância da amostra por Sarmento *et al.* (2015).

3.4.1.2. OxHLIA – ensaio da inibição da hemólise oxidativa

Para a realização deste ensaio celular, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelha do qual foram obtidos apenas os eritrócitos por centrifugação (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) a 2900 rpm, durante 5 min a 10 °C. Após eliminação do sobrenadante, a amostra centrifugada foi submetida a uma lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4), procedendo-se a centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem. Em seguida preparou-se uma solução de eritrócitos a 2,8% (v/v) tendo como diluente o PBS. Posteriormente, 200 μ L da solução de eritrócitos foram adicionados a 400 μ L de PBS, (servindo esta solução de controlo), bem como às diferentes concentrações de extrato dissolvidas em PBS (20 a 0,625 mg/mL). Realizou-se ainda a adição da solução de eritrócitos à água (para promover a hemólise completa), funcionando como um controlo negativo. Os ensaios foram realizados em microplacas de 48 poços, as quais foram incubadas a 37 °C durante 10 min com agitação. Após o período de incubação, foram adicionados 200 μ L de dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH; 160 mM) e a densidade ótica foi medida a 690 nm. As microplacas foram depois incubadas nas mesmas condições até hemólise completa, com medições a cada 10 min (Lockowandt *et al.*, 2019).

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

$$PE (\%) = (St - CH0 / S0 - CH0) \times 100$$

onde St e S0 correspondem à densidade ótica da amostra num instante de tempo t e 0 min, respetivamente, e CH0 é a densidade ótica correspondente à hemólise completa aos 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), calculado da seguinte equação:

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50} (\text{amostra}) - Ht_{50} (\text{controlo})$$

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

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

3.4.2. Atividade Antimicrobiana

Quatro bactérias Gram (+) [*Bacillus cereus* (isolado clínico), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), e *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973)] e bactérias Gram (-) [*Escherichia coli* (ATCC 35210)], *Enterobacter cloacae* (isolado humano), *Salmonella enteritidis* (isolado clínico) e *S. typhimurium* (ATCC 13311)] foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos de manjeriço. Sete fungos [*Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Cladosporium cladosporioides* (ATCC 11278), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), e *Penicillium verrucosum* var. *ciclopium*] foram utilizados para avaliar a atividade antifúngica. Os microrganismos foram obtidos no laboratório de micologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de investigação biológica "Sinisa Stanković", Universidade de Belgrado, Sérvia. O ensaio antimicrobiano foi realizado utilizando o método de microdiluição seguindo a metodologia anteriormente descrita pelos autores (Petropoulos *et al.*, 2017).

As concentrações que inibiram completamente o crescimento foram definidas como as concentrações mais baixas que não apresentaram crescimento visível após visualização no microscópio binocular, sendo determinadas pelo ensaio da viabilidade microbiana colorimétrica baseado na redução do corante INT (violeta *p*-iodonitrotetrazolium) e pela reinoculação de 10 μL de meio com o inóculo. Após 24 horas, observou-se o crescimento de microrganismos, e a ausência de crescimento foi considerada como a concentração mínima inibitória (CMI). A concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) foram também calculadas, indicando 99,5% de inibição do inóculo original. Os aditivos alimentares E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio) foram utilizados como controlos positivos e 5% de DMSO foi utilizado como controlo negativo.

3.5. Análise estatística

O desenho experimental foi realizado através do bloco completo randomizado com três repetições. Para todos os ensaios, três amostras foram preparadas para cada tratamento e cada ensaio foi realizado em triplicado ($n=3$) e expressos como média \pm desvio padrão (DP). Foi efetuada a análise de variância bidirecional (ANOVA), considerando como fatores as cultivares e os tratamentos de salinidade e nitrogênio, enquanto as médias foram comparadas de acordo com o teste Tukey's HSD ($p=0.05$). Todas as outras análises foram realizadas com o programa SPSS v.23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão discutidos, à luz de diferentes autores, os resultados obtidos nos ensaios realizados no que concerne à caracterização nutricional e química assim como propriedades bioativas.

Serão analisados os resultados referentes aos efeitos salinidade e à adubação nitrogenada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tolerância à salinidade

4.1.1. Composição proximal e valor energético

Para todos os parâmetros avaliados, a análise ANOVA a duas vias mostrou uma interação significativa entre os fatores testados. Portanto, todas as combinações possíveis de tratamentos foram comparadas entre si e os resultados são apresentados nas tabelas correspondentes.

Os resultados da composição proximal e o valor energético encontram-se representados na **Tabela 3**. Observaram-se diferenças significativas entre as cultivares testadas relativamente à humidade, sendo a ‘Red-basil’ a que apresentou teores mais elevados em todos os níveis de salinidade testados, exceto para o nível mais elevado (S2) (27 ± 3 g/g planta) onde não difere significativamente da cultivar ‘Dark-opal’ (27 ± 3 g/g planta). Por outro lado, as cultivares ‘Dark-opal’ e Basílico Rosso não foram afetadas pelo aumento da salinidade. Em contraste, a cultivar ‘Red-basil’ apresentou uma diminuição significativa nos teores de humidade das folhas quando foi submetida ao nível mais elevado de salinidade (4,5 dS/m). Estes resultados estão de acordo com os descritos da literatura, onde várias cultivares de manjerição foram testadas sob as mesmas condições, e observaram uma resposta variável à salinidade (Maia *et al.*, 2017). Além disso, Bione *et al.* (2014) evidenciaram uma diminuição linear dos teores de humidade com o aumento da salinidade, o que não foi observado no nosso estudo. Este resultado contraditório pode ser devido, ao facto de Bione *et al.* (2014), terem utilizado as amostras controlo com uma concentração muito baixa de salinidade (0,29 dS/m) e uma gama mais ampla de concentrações de salinidade do que as utilizadas no nosso estudo (1,45dS/m a 8,43 dS/m).

Os teores de lípidos variaram entre 1,38 g/100 g ms e 2,10 g/100 g ms para as amostras controlo na cultivar ‘Red-basil’ e o tratamento S2 na cultivar ‘Dark-opal’, respetivamente. Em geral, o aumento da salinidade resultou num aumento do teor de lípidos para todas as cultivares, sendo que os teores mais elevados foram obtidos para a cultivar ‘Dark-opal’.

Da mesma forma, os teores de cinzas variaram entre 12,2 g/100 g ms (‘Basílico-rosso’; tratamento controlo) e 15,5 g/100 g ms (‘Dark-opal’; tratamento S1); observou-se uma tendência crescente em todas as cultivares com o aumento da concentração de salinidade,

especialmente a cultivar ‘Dark-opal’ que apresentou os teores mais elevados (25,0% e 22,5% para os tratamentos S1 e S2, respetivamente).

Os teores de proteínas variaram entre 38,4 g/100 g ms (‘Dark-opal’; tratamento S2) e 52,2 g/100 g ms (‘Red-basil’; tratamento de controlo), em contraste com os teores de lípidos e cinzas, em que se verificou uma diminuição significativa com o aumento da concentração de salinidade (até 17% na cultivar ‘Dark-opal’).

Os glúcidos também foram afetados significativamente, e os teores variaram entre 35,2 g/100 g ms (‘Basilico-rosso’; tratamento de controlo) e 44,3 g/100 g ms (‘Dark-opal’; tratamento S2), verificando-se que o aumento da salinidade resultou no aumento significativo nos teores dos glúcidos (até 12,1% para a cultivar ‘Dark-opal’).

Relativamente ao valor energético, os teores mais elevados foram registados no tratamento controlo em todas as cultivares estudadas, enquanto que o aumento da salinidade resultou numa concomitante redução do valor energético. Tal como no nosso estudo, Kaur *et al.* (2019), descreveram teores de proteínas e glúcidos dentro do mesmo intervalo, enquanto que os teores de lípidos e de proteínas foram mais elevados e reduzidos, respetivamente, do que os observados no nosso estudo. Além disso, Ghoola *et al.* (2020) relataram um conteúdo proteico, em microvegetais de manjeriço francês, dentro do mesmo intervalo (38 g/100 g ms) embora o conteúdo de cinzas fosse significativamente mais elevado do que o descrito no nosso estudo (22,7 g/100 g ms).

Outros autores, em diferentes espécies de *Ocimum* (*O. viride* e *O. gratissimum*) descreveram um perfil nutricional diferente em comparação com o nosso estudo (Danso-Boateng, 2013; Mlitan, 2014), enquanto que Naiji e Souri (2018) testaram o efeito do regime de fertilização (fertilização química × cultivo orgânico) nas folhas de manjeriço doce e também observaram uma composição nutricional diferente.

Estes resultados indicam um efeito significativo do genótipo e das práticas de cultivo no estado nutricional do manjeriço, e Ribas *et al.* (2019) referem que as diferenças entre os vários estudos podem ser atribuídas à presença de caules dentro das amostras.

Quanto ao efeito da salinidade, de acordo com a literatura, o *stress* salino induz a acumulação de vários osmólitos, como por exemplo os glúcidos, para a proteção do citoplasma e estruturas celulares, e a retenção da absorção de água, como também foi observado no nosso estudo (Dias *et al.*, 2019).

Tabela 3. Humidade (g/planta), composição proximal (g/100 g ms) e valor energético (kcal/100 g ms) das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar		Humidade	Lípidos	Proteínas	Cinzas	Glúcidos	Energia
'Dark-opal'	Controlo	27 \pm 3 ^{Ba}	1,70 \pm 0,04 ^{Ab}	46,4 \pm 0,2 ^{Cd}	12,4 \pm 0,5 ^{Bcd}	39,5 \pm 0,6 ^{Ac}	359 \pm 1 ^{Aa}
	S1	26 \pm 2 ^{Ba}	2,08 \pm 0,04 ^{Aa}	41,2 \pm 0,2 ^{Ce}	15,5 \pm 0,2 ^{Aa}	41,22 \pm 0,02 ^{Ab}	348,4 \pm 0,4 ^{Bc}
	S2	27 \pm 3 ^{Aa}	2,10 \pm 0,03 ^{Aa}	38,4 \pm 0,3 ^{Cf}	15,2 \pm 0,1 ^{Aa}	44,3 \pm 0,2 ^{Aa}	349,7 \pm 0,4 ^{Bc}
'Red-basil'	Controlo	30 \pm 3 ^{Aa}	1,38 \pm 0,02 ^{Ae}	52,2 \pm 0,6 ^{Aa}	11,8 \pm 0,3 ^{Be}	34,6 \pm 0,6 ^{Bf}	359,7 \pm 0,9 ^{Aa}
	S1	29 \pm 2 ^{Aa}	1,57 \pm 0,02 ^{Ad}	50,9 \pm 0,8 ^{Ab}	13,1 \pm 0,1 ^{Ab}	34,4 \pm 0,5 ^{Cf}	355,3 \pm 0,1 ^{Ab}
	S2	27 \pm 3 ^{Ab}	1,55 \pm 0,02 ^{Ad}	49,2 \pm 0,8 ^{Ac}	12,8 \pm 0,2 ^{Abc}	36,5 \pm 0,4 ^{Cd}	356,7 \pm 0,5 ^{Ab}
'Basilico-rosso'	Controlo	22,4 \pm 0,8 ^{Ca}	1,59 \pm 0,08 ^{AcD}	51,10 \pm 0,07 ^{Aab}	12,2 \pm 0,1 ^{Bde}	35,2 \pm 0,2 ^{Bef}	359,3 \pm 0,1 ^{Aa}
	S1	18 \pm 2 ^{Cb}	1,67 \pm 0,04 ^{Abc}	49 \pm 1 ^{Bc}	13,2 \pm 0,2 ^{Ab}	36,4 \pm 0,8 ^{Bde}	355,7 \pm 0,7 ^{Ab}
	S2	22 \pm 2 ^{Ba}	1,70 \pm 0,01 ^{Ab}	46,5 \pm 0,2 ^{Bd}	12,9 \pm 0,1 ^{Ab}	38,9 \pm 0,2 ^{Bc}	356,9 \pm 0,3 ^{Ab}

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto as letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$).

4.1.2. Açúcares livres

A composição em açúcares livres é apresentada na **Tabela 4**, onde apenas três compostos foram identificados. A glucose foi o açúcar maioritário, seguido da sacarose e da frutose. O mesmo perfil de açúcares foi descrito pelos autores Carcho *et al.* (2016), enquanto que Fernandes *et al.* (2019) detetaram, adicionalmente, a presença de trealose em quantidades semelhantes à sacarose e à frutose. A cultivar 'Basilico-rosso' apresentou teores elevados de açúcares totais e individuais comparativamente com as outras cultivares, especialmente no tratamento S2. É interessante salientar que os açúcares livres totais e individuais aumentaram com o aumento da salinidade em todas as cultivares testadas, exceto na cultivar 'Dark-opal', onde se verificou uma diminuição significativa da glucose. Esta diferença, na resposta das plantas aos tratamentos de salinidade, poderia ser associada aos resultados da humidade das cultivares (ver **Tabela 3**), onde a humidade da 'Dark-opal' aumentou ligeiramente com o tratamento de salinidade mais elevado (S2).

Os açúcares livres são considerados os principais osmólitos que as plantas utilizam para aumentar o potencial do citoplasma, como mecanismo de proteção contra o *stress* provocado

pela salinidade (Dias *et al.*, 2019), os resultados do nosso estudo indicam uma eventual tolerância à salinidade da cultivar ‘Dark-opal’ comparativamente com as outras duas cultivares.

O *stress* induzido pela salinidade está associado à indução das vias biossintéticas do óleo essencial em várias plantas aromáticas, sendo os açúcares considerados como os principais precursores, especialmente a sacarose (Becker *et al.*, 2015). Além disso, os fatores do *stress* abióticos como o déficit hídrico ou a elevada salinidade podem induzir a acumulação de açúcares como meio de mitigar os efeitos negativos no metabolismo celular (Dias *et al.*, 2019; Petropoulos *et al.*, 2020b).

Tabela 4. Composição em açúcares livres das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (g/100g ms) (média ± DP, n=3).

Cultivar		Frutose	Glucose	Sacarose	Açúcares livres totais
‘Dark-opal’	Controlo	0,93±0,03 ^e	2,59±0,02 ^h	0,95±0,01 ^h	4,47±0,01 ^{Ci}
	S1	1,65±0,01 ^{bc}	2,80±0,01 ^f	1,73±0,04 ^e	6,17±0,03 ^{Be}
	S2	1,69±0,01 ^b	1,35±0,06 ⁱ	1,79±0,02 ^d	4,84±0,08 ^{Ch}
‘Red-basil’	Controlo	1,52±0,04 ^d	2,67±0,02 ^g	0,88±0,02 ⁱ	5,08±0,01 ^{Bg}
	S1	1,61±0,04 ^c	2,90±0,01 ^e	1,11±0,01 ^g	5,63±0,05 ^{Cf}
	S2	1,92±0,01 ^a	3,15±0,01 ^d	1,57±0,03 ^f	6,64±0,02 ^{Bc}
‘Basilico-rosso’	Controlo	0,52±0,04 ^f	3,71±0,02 ^c	2,09±0,04 ^c	6,32±0,03 ^{Ad}
	S1	1,61±0,02 ^c	3,76±0,01 ^b	2,30±0,01 ^b	7,67±0,02 ^{Ab}
	S2	1,94±0,02 ^a	3,97±0,03 ^a	2,48±0,03 ^a	8,39±0,04 ^{Aa}

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizadas: frutose ($y = 1,04x$, $R^2 = 0,999$; Limite de deteção (LOD) = 0,05 mg/mL; Limite de quantificação (LOQ) = 0,18 mg/mL), glucose ($y = 0,935x$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,08 mg/mL; LOQ = 0,25 mg/mL) e sacarose ($y = 0,977x$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,06 mg/mL, LOQ = 0,21 mg/mL).

4.1.3. Ácidos orgânicos

A composição dos ácidos orgânicos é apresentada na **Tabela 5**, sendo o ácido quínico o ácido orgânico maioritário seguido dos ácidos oxálico e xiquímico, por sua vez, foram detetados apenas vestígios do ácido ascórbico. O ácido quínico foi descrito como sendo o ácido

orgânico mais abundante pelos autores Fernandes *et al.* (2019), que estudaram a composição química das folhas de manjeriço da cultivar Red Rubin (*O. basilicum* var. *purpurascens*), e também identificaram os ácidos oxálico, málico, cítrico, xiquímico, fumárico e ascórbico. Os mesmos ácidos orgânicos maioritários foram também descritos por Carochó *et al.* (2016) que identificaram os ácidos málico e cítrico, mas em quantidades menores.

O conteúdo mais elevado de ácidos oxálico, quínico e orgânicos totais foram registados para o tratamento controlo da cultivar ‘Basilico-rosso’. Em todas as cultivares testadas o aumento da salinidade resultou numa diminuição dos ácidos orgânicos maioritários (ácido quínico e oxálico), bem como no teor de ácidos orgânicos totais. Tendências semelhantes foram descritas por Petropoulos *et al.* (2020b) e Carvalho *et al.* (2009) em outros vegetais folhosos, e também observaram uma diminuição dos ácidos orgânicos com o aumento da concentração da salinidade.

Considerando os resultados obtidos relativamente à composição e teores de açúcares livres e de tocoferóis, parece evidente que o mecanismo protetor não enzimático do manjeriço contra o *stress* induzido pela salinidade está relacionado com a acumulação de açúcares, que são os principais osmólitos, enquanto que os tocoferóis e ácidos orgânicos têm um papel menos relevante.

Tabela 5. Composição em ácidos orgânicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (g/ 100g ms) (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar		Ácido Oxálico	Ácido Quínico	Ácido Xiquímico	Ácido Ascórbico	Ácidos Orgânicos Totais
‘Dark-opal’	Controlo	5,23 \pm 0,08 ^c	9,87 \pm 0,03 ^c	0,090 \pm 0,001 ^f	tr	15,2 \pm 0,1 ^{Cc}
	S1	4,08 \pm 0,01 ^g	8,19 \pm 0,08 ^f	0,100 \pm 0,001 ^e	tr	12,38 \pm 0,08 ^{Ch}
	S2	4,81 \pm 0,02 ^f	8,11 \pm 0,03 ^f	0,180 \pm 0,002 ^a	tr	13,11 \pm 0,01 ^{Bg}
‘Red-basil’	Controlo	5,49 \pm 0,03 ^b	10,5 \pm 0,2 ^b	0,110 \pm 0,001 ^d	tr	16,0 \pm 0,2 ^{Bb}
	S1	4,97 \pm 0,03 ^e	8,77 \pm 0,05 ^e	0,100 \pm 0,001 ^e	tr	13,85 \pm 0,02 ^{Bf}
	S2	4,97 \pm 0,02 ^e	7,4 \pm 0,1 ^g	0,130 \pm 0,001 ^b	tr	12,5 \pm 0,1 ^{Ch}
‘Basilico-rosso’	Controlo	5,80 \pm 0,05 ^a	11,97 \pm 0,01 ^a	0,120 \pm 0,002 ^c	tr	17,89 \pm 0,06 ^{Aa}
	S1	5,09 \pm 0,07 ^d	9,71 \pm 0,05 ^c	0,110 \pm 0,001 ^d	tr	14,90 \pm 0,03 ^{Ad}
	S2	5,17 \pm 0,06 ^{cd}	9,33 \pm 0,09 ^d	0,090 \pm 0,001 ^f	tr	14,60 \pm 0,04 ^{Ae}

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m; tr- traços; *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os

tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizada: ácido oxálico ($y = 9 \times 10^6x + 377,946$; $R^2 = 0,994$; LOD = 12,55 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 41,82 $\mu\text{g/mL}$); ácido quínico ($y = 612,327 \times + 16,563$; $R^2 = 1$; LOD = 24,18 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 80,61 $\mu\text{g/mL}$); ácido xiquímico ($y = 7 \times 10^7x + 175156$; $R^2 = 0,9999$; LOD = 10,2 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 56,5 $\mu\text{g/mL}$) e ácido fumárico ($y = 148,083x + 96,092$; $R^2 = 1$; LOD = 0,08 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0,26 $\mu\text{g/mL}$).

4.1.4. Ácidos gordos

Dezoito ácidos gordos individuais foram detetados em todas as amostras de manjeriço estudadas (**Tabela A1**), sendo os maioritários os ácidos α -linolénico, linoleico e palmítico (**Tabela 6**). Além disso, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foram a classe predominante de ácidos gordos, seguido dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados (SFA e MUFA, respetivamente). Perfil semelhante de ácidos gordos foi descrito para o manjeriço Red Rubin por Fernandes *et al.* (2019), não só para os compostos individuais mas também para as classes de ácidos gordos, enquanto que Ababutain (2019) e Suanarunsawat *et al.* (2016) identificaram os mesmos compostos em extratos de folhas de manjeriço doce e manjeriço sagrado (*O. sanctum*), respetivamente.

Jensen *et al.* (2018) testaram o efeito da qualidade da luz na fisiologia do manjeriço, e obtiveram um perfil diferente de ácidos gordos sendo que os ácidos palmítico e oleico representaram aproximadamente 92% do total de ácidos gordos.

O efeito da salinidade no conteúdo dos principais ácidos gordos variou entre as cultivares, apesar de Tarchoune *et al.* (2013) terem sugerido que a composição dos ácidos gordos permaneceu inalterada quando as plantas foram sujeitas a concentrações de salinidade elevada, quer aplicando 25 mM de Na_2SO_4 ou 50 mM de NaCl . Além disso, os teores elevados de PUFA no tratamento controlo da cultivar 'Red-basil', podem ser associadas com o perfil em tocoferóis (ver **Tabela 7**), uma vez que está confirmado o papel dos tocoferóis na prevenção da peroxidação lipídica (Petropoulos *et al.*, 2019).

Em contraste, Sgherri *et al.* (2011) descreveram que os tocoferóis têm pouca contribuição na atividade antioxidante lipofílica dos extratos de manjeriço, sugeriram também que o conteúdo em antioxidantes individuais não reflete a atividade antioxidante global devido às reações sinérgicas e *redox* entre as várias moléculas bioativas.

A cultivar 'Basilico-rosso' apresentou os valores mais baixos na razão n-6/n-3, com o aumento da salinidade, ao contrário das outras cultivares, pelo que o efeito da salinidade não foi linear.

Tabela 6. Ácidos gordos maioritários (%), grupos de ácidos gordos e razão n-6/n-3 identificados nas cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (média ± DP, n=3).

Cultivar		C16:0	C18:2n6c	C18:3n3	SFA	MUFA	PUFA	n-6/n-3
'Dark-opal'	Controlo	21,17±0,01 ^f	14,94±0,02 ^e	42,14±0,05 ^f	33,65±0,05 ^{Ac}	8,46±0,01 ^{Aa}	57,91±0,06 ^{Cf}	0,35±0,01 ^{Acd}
	S1	21,8±0,4 ^e	18,29±0,02 ^b	40,5±0,3 ^g	32,8±0,5 ^{Cd}	7,8±0,3 ^{Ac}	59,3±0,3 ^{Ad}	0,33±0,01 ^{Bd}
	S2	20,9±0,2 ^g	18,72±0,03 ^a	44,0±0,1 ^d	29,1±0,2 ^{Cf}	7,7±0,1 ^{Bc}	63,2±0,1 ^{Ab}	0,43±0,01 ^{Aa}
'Red-basil'	Controlo	19,6±0,1 ⁱ	14,4±0,3 ^f	49,2±0,1 ^a	28,7±0,2 ^{Bf}	7,3±0,1 ^{Cd}	64,1±0,2 ^{Aa}	0,294±0,006 ^{Be}
	S1	22,85±0,01 ^c	15,3±0,1 ^d	42,2±0,1 ^f	33,8±0,1 ^{Bc}	8,2±0,1 ^{Ab}	58,0±0,1 ^{Bf}	0,363±0,001 ^{Ac}
	S2	22,07±0,33 ^d	16,3±0,3 ^c	42,4±0,1 ^e	32,4±0,4 ^{Bd}	8,2±0,1 ^{Ab}	59,4±0,4 ^{Bd}	0,385±0,005 ^{Bb}
'Basilico-rosso'	Controlo	19,84±0,01 ^h	12,6±0,1 ^g	49,2±0,1 ^a	29,6±0,1 ^{Be}	7,8±0,1 ^{Bc}	62,6±0,1 ^{Bc}	0,256±0,003 ^{Cf}
	S1	30,16±0,06 ^a	10,3±0,1 ⁱ	47,3±0,1 ^c	36,5±0,1 ^{Aa}	5,4±0,1 ^{Bf}	58,1±0,1 ^{Bf}	0,217±0,003 ^{Cg}
	S2	29,86±0,01 ^b	10,67±0,04 ^h	47,59±0,06 ^b	35,7±0,1 ^{Ab}	5,7±0,1 ^{Ce}	58,7±0,1 ^{Be}	0,224±0,001 ^{Ch}

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m; C16:0 - ácido palmítico; C18:2n6c - ácido linoléico; C18:3n3 - ácido α -linolénico; SFA - Ácidos gordos saturados; MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey (p=0,05).

4.1.5. Tocoferóis

O perfil em tocoferóis é apresentado na **Tabela 7**. Foram detetadas três isoformas, nomeadamente α -, γ - e δ -tocoferol, sendo a primeira a maioritária em todas as amostras testadas. Os resultados do nosso estudo estão em contraste com o estudo descrito por Fernandes *et al.* (2019) que detetaram todas as isoformas, como também identificaram o γ -tocoferol como o composto mais abundante, enquanto Inoue *et al.* (2012) detetaram apenas as isoformas α -, β - e γ -tocoferol. Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos ao facto de terem sido testados diferentes genótipos nos referidos estudos.

Os teores elevados de γ - e δ -tocoferóis foram detetados no tratamento controlo da cultivar 'Dark-opal', enquanto o α -tocoferol foi elevado na cultivar 'Red-basil' para o mesmo tratamento.

O aumento da salinidade resultou numa diminuição dos teores nos tocoferóis totais e individuais em todas as cultivares, o que contrasta com o estudo de Tarchoune *et al.* (2013), que relataram o aumento de tocoferóis em folhas de manjeriço como parte do mecanismo de desintoxicação não enzimática das plantas. Contudo, os mesmos autores relataram uma resposta variada em função da cultivar (cv. Genovese e Fine), da duração do *stress* (15 ou 30 dias) e do tipo de sal (NaCl ou Na₂SO₄) aplicado, o que poderia justificar parcialmente os diferentes resultados em comparação com o nosso estudo.

Outra explicação para esta diferença poderia ser a contribuição de outros compostos bioativos, tais como polifenóis e ácidos orgânicos na proteção das plantas contra o *stress* oxidativo (Petropoulos *et al.*, 2019) ou o facto de as plantas do nosso estudo terem sido colhidas no início da floração onde, segundo Petropoulos *et al.* (2017), a fase de desenvolvimento pode ter um impacto na composição dos tocoferóis.

Além disso, é de salientar que apesar dos teores mais baixos terem sido registados na cultivar Basílico Rosso, a maior redução foi observada na cultivar ‘Red-basil’, onde os teores elevados foram detetados a 43,7%, 31,2%, 68,7% e 45,2% para as isoformas α -, γ -, δ - e tocoferóis totais, respetivamente), o que indica que este mecanismo antioxidante foi menos eficaz em condições de salinidade elevada.

Tabela 7. Composição em tocoferóis das cultivares de manjeriço estudados (mg/100 g ms) em relação aos níveis de salinidade aplicados (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar		α -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol	Tocoferóis Totais
‘Dark-opal’	Controlo	6,11 \pm 0,04 ^b	1,35 \pm 0,04 ^a	1,15 \pm 0,09 ^a	8,61 \pm 0,08 ^{Bb}
	S1	3,49 \pm 0,05 ^f	1,04 \pm 0,01 ^c	0,49 \pm 0,02 ^{cd}	5,02 \pm 0,04 ^{Bd}
	S2	3,84 \pm 0,05 ^e	1,07 \pm 0,04	0,40 \pm 0,01 ^{ef}	5,32 \pm 0,08 ^{Ac}
‘Red-basil’	Controlo	7,07 \pm 0,02 ^a	1,12 \pm 0,01 ^b	1,12 \pm 0,05 ^a	9,31 \pm 0,02 ^{Aa}
	S1	4,11 \pm 0,02 ^c	0,83 \pm 0,02 ^d	0,43 \pm 0,02 ^{de}	5,37 \pm 0,02 ^{Ac}
	S2	3,98 \pm 0,07 ^d	0,77 \pm 0,01 ^e	0,35 \pm 0,01 ^f	5,10 \pm 0,06 ^{Bd}
‘Basílico-rosso’	Controlo	1,29 \pm 0,02 ^g	0,49 \pm 0,04 ^f	0,90 \pm 0,02 ^b	2,68 \pm 0,03 ^{Ce}
	S1	1,07 \pm 0,01 ^h	0,47 \pm 0,01 ^f	0,53 \pm 0,02 ^c	2,07 \pm 0,02 ^{Cf}
	S2	0,75 \pm 0,01 ⁱ	0,41 \pm 0,01 ^g	0,38 \pm 0,01 ^{ef}	1,54 \pm 0,01 ^{Cg}

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizadas: α -tocoferol ($y = 1,295x$; $R^2 = 0,991$; LOD: 18,06 ng/mL, LOQ: 60,20 ng/mL); γ -tocoferol ($y = 0,567x$;

$R^2 = 0,991$; LOD: 14,79 ng/mL, LOQ: 49,32 ng/mL); δ -tocoferol ($y = 0,678x$; $R^2 = 0,992$; LOD: 20,09 ng/mL, LOQ: 66,95 ng/mL).

4.1.6. Compostos Fenólicos

Os resultados relativos à identificação e quantificação de compostos fenólicos são apresentados nas **Tabelas 8 e 9**, respetivamente. Foram identificados seis compostos individuais em todas as amostras estudadas, nomeadamente quatro compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido chicórico (ácido hidroxicinâmico), ácido sagerínico, e ácido salvianólico F) e dois flavonoides-*O*-glicosilados (derivados da quercetina e eriodictiol). Os polifenóis maioritários foram os ácidos fenólicos, que representaram 63,0% - 83,4% do total de compostos fenólicos.

Resultados semelhantes foram descritos por Majdi *et al.* (2020) e Fernandes *et al.* (2019), embora o perfil dos compostos individuais fosse diferente do nosso estudo. Vários estudos, sugerem diversos perfis de compostos fenólicos nas folhas de manjeriço, sugerindo também vários fatores que podem afetar a composição química, incluindo o regime de fertilização com nitrogénio (Nguyen & Niemeyer, 2008), o método de extração e genótipo (Majdi *et al.*, 2020), ou a inoculação com fungos micorrízicos (Scagel & Lee, 2012).

A quantificação de compostos individuais evidenciou um perfil variável nas amostras estudadas, sendo os ácidos sagerínico e eriodictiol-*O*-malonilhexósido, os polifenóis mais abundantes, seguido dos ácidos salvianólico F e ácido chicórico. Ao contrário da maioria dos estudos mencionados na literatura, o ácido rosmarínico não foi detetado no nosso estudo, enquanto o eriodictiol-*O*-malonilhexósido e o ácido chicórico também foram identificados por Fernandes *et al.* (2019).

Os teores mais elevados de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e ácidos fenólicos totais foram registadas no tratamento S2 da cultivar ‘Red-basil’ devido ao maior teor de ácido sagerínico e eriodictiol-*O*-malonilhexósido, enquanto que o tratamento controlo da cultivar Basílico Rosso apresentou os menores teores de polifenóis individuais e totais.

Além disso, o aumento de compostos fenólicos individuais e totais foram observados na cultivar ‘Basílico-rosso’, o que pode ser atribuído ao aumento concomitante do teor de açúcares redutores, que estão associados com a biossíntese de compostos fenólicos (Shen *et al.*, 2015).

Tabela 8. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de Identificação
1	8.91	323	179	135(100)	Ácido cafeico
2	14.96	323	473	313(61),293(100)	Ácido chicórico
3	16.8	334	609	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -desoxihexosídeo-hexosídeo
4	19.5	290/325	535	491(100),287(34)	Eriodictiol- <i>O</i> -malonilhexosídeo
5	20.76	282/327	719	359(100),197(31),179(42),161(50),135(5)	Ácido sagerínico
6	35.36	287/333	313	269(51),203(12),179(5),161(100),135(5)	Ácido salvianólico F

Tabela 9. Quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (mg/g de extrato) (média ± DP, n=3).

Cultivar	Pico	1	2	3	4	5	6	TPA	TF	TPC
'Dark-opal'	Controlo	1,54±0,04 ^d	3,52±0,04 ^a	0,34±0,01 ^g	8,5±0,2 ^b	10,3±0,3 ^e	3,34±0,03 ^b	18,7±0,3 ^{Bcd}	8,9±0,2 ^{Ab}	27,6±0,1 ^{Bc}
	S1	1,11±0,02 ^f	2,94±0,01 ^c	0,859±0,001 ^d	4,40±0,06 ^f	11,6±0,5 ^d	1,57±0,01 ^g	17,2±0,5 ^{Be}	5,3±0,1 ^{Bf}	22,4±0,6 ^{Ae}
	S2	1,39±0,04 ^e	3,37±0,01 ^b	1,62±0,03 ^a	5,96±0,03 ^c	11,94±0,01 ^d	1,37±0,08 ⁱ	18,1±0,1 ^{Bd}	7,6±0,1 ^{Bc}	25,7±0,2 ^{Bd}
'Red-basil'	Controlo	2,18±0,04 ^a	1,98±0,03 ^e	0,429±0,003 ^f	8,4±0,1 ^b	16,51±0,06 ^b	4,99±0,05 ^a	25,7±0,1 ^{Ab}	8,9±0,1 ^{Ab}	34,5±0,1 ^{Ab}
	S1	1,69±0,01 ^c	1,11±0,03 ^g	0,756±0,004 ^e	3,0±0,2 ^g	14,3±0,6 ^c	2,04±0,02 ^e	19,1±0,6 ^{Ac}	3,8±0,2 ^{Cg}	22,9±0,4 ^{Ae}
	S2	1,99±0,03 ^b	2,23±0,04 ^d	1,48±0,01 ^b	10,5±0,3 ^a	19,8±0,2 ^a	3,19±0,02 ^c	27,2±0,2 ^{Aa}	12,0±0,3 ^{Aa}	39,2±0,1 ^{Aa}
'Basilico-rosso'	Controlo	0,63±0,01 ^g	0,84±0,02 ⁱ	0,215±0,003 ⁱ	3,25±0,05 ^g	2,96±0,01 ^g	1,47±0,04 ^h	5,90±0,01 ^{Ch}	3,47±0,05 ^{Bh}	9,37±0,06 ^{Ch}
	S1	1,65±0,02 ^c	1,05±0,02 ^h	1,12±0,01 ^c	5,35±0,03 ^e	6,5±0,3 ^f	1,82±0,02 ^f	11,1±0,3 ^{Cg}	6,47±0,02 ^{Ae}	17,5±0,3 ^{Bg}
	S2	1,66±0,01 ^c	1,25±0,02 ^f	1,43±0,08 ^b	5,67±0,03 ^d	6,6±0,3 ^f	2,28±0,02 ^d	11,8±0,2 ^{Cf}	7,1±0,1 ^{Bd}	18,9±0,1 ^{Cf}

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. TPA: ácidos fenólicos totais; TF-Total flavonoides, TPC-Total compostos fenólicos. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizadas: 1 e 2 - ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,9939$; LOD = 0,78 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 1,97 $\mu\text{g/mL}$), 3 e 4- quercetina-3-*O*-rutinosídeo ($y = 13343x + 76751$, $R^2 = 0,9998$; LOD = 0,18; LOQ = 0,65), 5 e 6- ácido rosmarínico ($y = 191291x - 652903$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,15 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0,68 $\mu\text{g/mL}$).

4.1.7. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de folhas de manjeriço foi determinada mediante os ensaios TBARS e OxHLIA e os resultados são apresentados no **Tabela 10**.

A atividade elevada (menor EC₅₀) para o ensaio TBARS foi observada no tratamento controlo da cultivar ‘Dark-opal’, enquanto que os valores IC₅₀ do ensaio OxHLIA após os 60 min foram baixos para a cultivar ‘Red-basil’ (tratamento controlo) e para as ‘Dark-opal’ e ‘Basilico-rosso’ (tratamento S1), e para o tempo de 120 min na cultivar ‘Red-basil’ (tratamento controlo). Nenhum dos extratos testados mostrou maior atividade do que o Trolox, que foi o controlo positivo utilizado.

Os resultados variáveis, dependendo do ensaio implementado, são habituais em matrizes naturais uma vez que vários antioxidantes estão envolvidos nos mecanismos antioxidantes globais das plantas, incluindo tocoferóis, polifenóis, açúcares livres e ácidos orgânicos (Petropoulos *et al.*, 2020b).

Os resultados do nosso estudo podem ser parcialmente atribuídos à presença de tocoferóis e ao ácido chicórico no caso do ensaio TBARS, em que a atividade mais elevada foi associada a estes compostos abundantes observados na ‘Dark-opal’ (tratamento controlo). Por outro lado, o α -tocoferol, o ácido cafeico e salvianólico F poderiam ser responsáveis pela maior atividade no ensaio OxHLIA a $\Delta t=120$ min descrito na cultivar ‘Red-basil’ (tratamento controlo).

Vários autores referem que o *stress* induzido pela salinidade e a deprivação do N incitam a biossíntese dos polifenóis como meio de adaptação das plantas de manjeriço ao *stress* oxidativo (Nguyen & Niemeyer, 2008; Scagel *et al.* , 2019).

O aumento dos compostos fenólicos totais e individuais em paralelo com a concentração crescente de salinidade na cultivar ‘Red-basil’ não foi evidenciado com o aumento da atividade antioxidante dos extratos, indicando assim um mecanismo antioxidante complexo a ser explorado.

Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar		TBARS (EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	OxHLIA (IC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	
			$\Delta t = 60 \text{ min}$	$\Delta t = 120 \text{ min}$
'Dark-opal'	Controlo	13,0 \pm 0,5 ⁱ	66 \pm 3 ^b	155 \pm 5 ^b
	S1	14,5 \pm 0,4 ^h	41 \pm 1 ^e	104 \pm 3 ^c
	S2	30 \pm 1 ^f	50 \pm 1 ^d	100 \pm 2 ^c
'Red-basil'	Controlo	24,6 \pm 0,7 ^g	35 \pm 1 ^e	73 \pm 2 ^d
	S1	45,3 \pm 0,5 ^c	69 \pm 2 ^b	168 \pm 13 ^b
	S2	49,4 \pm 0,6 ^b	58 \pm 3 ^c	112 \pm 3 ^c
'Basilico-rosso'	Controlo	31,4 \pm 0,2 ^e	86 \pm 5 ^a	209 \pm 4 ^a
	S1	35,6 \pm 0,9 ^d	38 \pm 2 ^e	99 \pm 2 ^c
	S2	51,0 \pm 0,9 ^a	51 \pm 1 ^d	100 \pm 2 ^c
Trolox		5,4 \pm 0,3	19,6 \pm 0,7	41 \pm 1

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. A atividade antioxidante foi expressa em valores de EC₅₀, o que significa que valores elevados correspondem a baixo potencial antioxidante. EC₅₀: corresponde à concentração de extrato necessária para obter 50% de atividade antioxidante. IC₅₀ corresponde à concentração de extrato necessária para manter 50% da população de eritrócitos intacta por 60 e 120 min. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de salinidade, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de salinidade testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$).

4.1.8. Atividade Antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos testados é apresentada na **Tabela 11**. Na maioria dos casos, os controlos positivos (E211 e E224) foram mais eficazes do que os extratos obtidos a partir de folhas de manjeriço, embora tenha havido tratamentos com valores semelhantes aos controlos CMI contra as bactérias *S. aureus* (controlo e tratamentos S1 da cultivar 'Red-basil' e 'Basilico-rosso', respectivamente), *B. cereus* (controlo e tratamento S1 da cultivar 'Basilico-rosso') e *S. tympimurium* (S2 e controlo da cultivar 'Red-basil' e 'Basilico-rosso', respetivamente).

Por outro lado, a atividade dos extratos hidroalcoólicos contra os fungos testados (**Tabela 12**) é mais evidente que os controlos positivos (E211 e E224), especialmente contra *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. Versicolor*, onde todos os extratos tiveram valores de CMI e CMF mais baixos do que os controlos. Foi também observada uma atividade significativa contra a estirpe *T. viride*, onde quase todos os extratos avaliados apresentaram valores de CMI e CMF inferiores e

semelhantes aos controlos, respetivamente (exceto para o tratamento S1 da cultivar ‘Basilico-rosso’).

Além disso, os extratos das cultivares ‘Red-basil’ e ‘Dark-opal’ (apenas o tratamento controlo) foram eficazes contra a estirpe *P. verrucosum* var. *ciclopium*, enquanto todos os extratos (exceto o tratamento S1 da cultivar ‘Red-basil’) apresentaram valores de CMI inferiores aos dos controlos positivos contra *P. funiculosum*.

De acordo com Ababutain (2019), a composição de ácidos gordos está relacionada com as propriedades antimicrobianas e o comprimento da cadeia pode afetar a atividade contra as estirpes de bactérias, sendo os ácidos gordos insaturados mais eficazes do que os saturados contra *S. aureus*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacteria*.

Tabela 9. Atividade antibacteriana (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) (mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados.

Cultivares			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. cloacae</i>
‘Dark-opal’	Controlo	CMI	4	1	2	2	2	4
		CMB	8	2	4	4	4	8
	S1	CMI	2	1	2	2	2	2
		CMB	4	2	4	4	4	4
	S2	CMI	2	1	1	2	2	2
		CMB	4	2	2	4	4	4
‘Red-basil’	Controlo	CMI	1	1	1	1	2	1
		CMB	2	2	2	2	4	2
	S1	CMI	2	1	1	2	2	2
		CMB	4	2	2	4	4	4
	S2	CMI	2	1	1	2	1	2
		CMB	4	2	2	4	2	4
‘Basilico-rosso’	Controlo	CMI	2	0.5	1	2	1	2
		CMB	4	1	2	4	2	4
	S1	CMI	1	0.5	1	2	2	1
		CMB	2	1	2	4	4	2
	S2	CMI	2	1	1	2	2	2
		CMB	4	2	2	4	4	4
Controlos positivos	E211	CMI	4	0.5	1	1	1	2
		CMB	4	0.5	2	2	2	4
	E224	CMI	1	2.0	0.5	0.5	1	0.5
		CMB	1	4.0	1	1	1	0.5

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. E211 - benzoato de sódio e E224 - metabissulfito de potássio.

Tabela 10. Atividade antifúngica (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjerição estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados.

Cultivares			<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>P. v. var. cyclopium</i>	<i>T. viride</i>
'Dark-opal'	Controlo	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
		CMF	1	1	1	1	1	0.5
	S1	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.25
		CMF	1	1	1	1	2	0.5
	S2	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.25
		CMF	1	1	1	1	2	0.5
'Red-basil'	Controlo	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
		CMF	1	1	1	1	1	0.5
	S1	CMI	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.25
		CMF	1	1	1	2	1	0.5
	S2	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
		CMF	1	1	1	1	1	0.5
'Basilico- rosso'	Controlo	CMI	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
		CMF	0.5	1	1	1	1	0.5
	S1	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5
		CMF	1	1	1	1	2	1
	S2	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.25
		CMF	1	1	1	1	2	0.5
Controlos positivos	E211	CMI	1	1	2	1	2	1
		CMF	2	2	2	2	4	2
	E224	CMI	1	1	1	0.5	1	0.5
		CMF	1	1	1	0.5	1	0.5

Controlo com 1,8 dS/m; S1 com 3,0 dS/m e S2 com 4,5 dS/m. E211 - benzoato de sódio e E224 - metabissulfito de potássio.

4.2. Tolerância ao nitrogênio

4.2.1. Composição proximal e valor energético

Observou-se uma interação significativa entre as cultivares e a concentração de N em todos os parâmetros avaliados do valor nutricional (**Tabela 13**). Nas quatro cultivares, a humidade respondeu à concentração crescente de N. Independentemente da concentração de N, a cultivar ‘Mitikas’ foi a que apresentou teores superiores de humidade em comparação com as cultivares ‘Dark-opal’, ‘Red-basil’ e ‘Basilico-rosso’. Resultados semelhantes foram descritos pelos autores Prinsi *et al.* (2020), comparando o manjericão verde italiano com o manjericão Red Rubin cultivado em sistema sem solo.

As quatro cultivares de manjericão estudadas apresentaram teores semelhantes de lípidos (1,9 g/100 g ms); contudo, a concentração de N aplicada teve um impacto significativo, e os teores de lípidos foram geralmente elevados nas amostras controlo e os teores menores foram encontrados nas plantas fertirrigadas com 200 ppm de N.

Os teores de proteínas variaram entre 24,8 e 63,6 g/100 g ms e verificou-se que com o aumento da concentração de N, os teores de proteínas aumentaram, embora se tenham observado diferenças mínimas ou nulas entre as plantas fertirrigadas com 200 e 400 ppm de N nas cultivares ‘Red-basil’ e ‘Basilico-rosso’. As plantas não fertilizadas apresentaram consistentemente os teores mais baixos de proteínas.

Os teores de cinzas variaram entre 12,2 e 14,2 g/100 g ms e, diferiram entre as cultivares avaliadas e a concentração de N, sem se verificar uma tendência uniforme.

Os teores de glúcidos variaram entre 21,4 e 60,1 g/100 g ms e, foram menores nas plantas que receberam 600 ppm e elevados nas plantas que não receberam N.

O valor energético variou entre 351 a 362 kcal/100 g ms e foi influenciado tanto pela cultivar como pela concentração de N, mas sem se observarem tendências consistentes. De acordo com estudos anteriores, as proteínas e os glúcidos foram os principais macronutrientes encontradas nas folhas de manjericão (Fernandes *et al.*, 2019; Murillo-amador *et al.*, 2013), embora no nosso estudo tenham sido observados teores elevados de proteínas nas plantas fertirrigadas com as concentrações mais altas de N ao contrário dos glúcidos, que diminuíram com o aumento da concentração de N.

Pereira *et al.* (2015) determinou o valor nutricional de manjeriço verde e observaram teores semelhantes de cinzas, teores substancialmente elevados de glúcidos e teores reduzidos de proteínas, em comparação com o nosso estudo.

Tais diferenças podem estar associadas aos diferentes métodos de secagem (Siti Mahirah *et al.*, 2018), a diferentes condições ambientais de crescimento e particularmente, a concentrações inferiores de N durante o cultivo, bem como a diferenças genotípicas.

Tabela 11. Humidade (g/planta), composição proximal (g/100 g ms) e valor energético (kcal/100 g ms) das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar	ppm	Humidade	Lípidos	Proteínas	Cinzas	Glúcidos	Energia
'Dark-opal'		23\pm2^C	1,9\pm0,2^{A*}	47\pm14^A	12,9\pm0,2^B	38\pm14^B	358\pm1^A
	0	18 \pm 1 ^j	2,17 \pm 0,01 ^{a,b}	26 \pm 2 ^h	12,8 \pm 0,1 ^h	59 \pm 1 ^b	359,8 \pm 0,2 ^b
	200	26 \pm 2 ^g	1,69 \pm 0,01 ^g	46,8 \pm 0,2	12,8 \pm 0,3 ^h	38,71 \pm 0,08 ^c	357 \pm 1 ^{e,f,g}
	400	27 \pm 3 ^f	1,79 \pm 0,02 ^e	51,1 \pm 0,6 ^{d,e}	13,1 \pm 0,1 ^{e,f}	34,0 \pm 0,5 ^g	356,5 \pm 0,3 ^{g,h}
	600	22 \pm 1 ^{h,i}	1,97 \pm 0,03 ^d	63,6 \pm 0,6 ^a	13,0 \pm 0,3 ^{f,g}	21,4 \pm 0,7 ^j	357,7 \pm 0,8 ^{e,f}
'Red-basil'		27\pm1^B	1,9\pm0,3^A	45\pm11^B	13,0\pm0,6^A	40\pm11^A	357\pm2^A
	0	21 \pm 0,8 ⁱ	2,19 \pm 0,01 ^{a,b}	25,4 \pm 0,8 ^{h,i}	12,9 \pm 0,1 ^{f,g,h}	59,5 \pm 0,6 ^{a,b}	359,3 \pm 0,3 ^{b,c}
	200	307 \pm 1 ^e	1,40 \pm 0,02 ⁱ	51,5 \pm 0,5 ^d	12,1 \pm 0,2 ⁱ	35,0 \pm 0,2 ^{d,e,f}	358,7 \pm 0,7 ^{c,d}
	400	27 \pm 1 ^f	1,78 \pm 0,01 ^{e,f}	50,4 \pm 0,8 ^e	13,6 \pm 0,5 ^c	34,3 \pm 0,2 ^{f,g}	355 \pm 1 ⁱ
	600	31 \pm 2 ^d	2,06 \pm 0,07 ^c	52,3 \pm 0,1 ^c	13,3 \pm 0,1 ^{d,e}	32,3 \pm 0,1 ^h	356,9 \pm 0,4 ^{f,g}
'Basilico-rosso'		20\pm1^D	1,9\pm0,2^A	45\pm11^B	12,7\pm0,6^{A,B}	40\pm12^A	359\pm3^A
	0	15 \pm 1 ^k	2,17 \pm 0,02 ^b	25,5 \pm 0,9 ^{h,i}	12,2 \pm 0,4 ⁱ	60,1 \pm 0,9 ^a	362 \pm 1 ^a
	200	22 \pm 2 ^h	1,58 \pm 0,03 ^h	51,08 \pm 0,06 ^{d,e}	12,2 \pm 0,3 ⁱ	35,1 \pm 0,3 ^{d,e}	359,0 \pm 0,8 ^{b,c,d}
	400	26 \pm 2 ^g	1,79 \pm 0,04 ^{e,f}	50,6 \pm 0,7 ^e	13,4 \pm 0,2 ^{c,d}	34,1 \pm 0,6 ^g	355,2 \pm 0,7 ⁱ
	600	18 \pm 2 ^j	2,06 \pm 0,01 ^c	52,9 \pm 0,9 ^c	13,0 \pm 0,1 ^{f,g}	32,0 \pm 0,6 ^h	358,2 \pm 0,1 ^{d,e}
'Mitikas'		50\pm5^A	1,9\pm0,2^A	46\pm14^A	13,6\pm0,5^A	38\pm13^B	355\pm3^B
	0	34 \pm 5 ^{cd}	2,21 \pm 0,05 ^a	24,8 \pm 0,4 ⁱ	13,9 \pm 0,1 ^b	59,1 \pm 0,4 ^b	355,5 \pm 0,1 ^{h,i}
	200	60 \pm 5 ^a	1,60 \pm 0,07 ^h	48,9 \pm 0,6 ^f	14,2 \pm 0,2 ^a	35,3 \pm 0,5 ^d	351,0 \pm 0,8 ^j
	400	58 \pm 5 ^a	1,75 \pm 0,03 ^f	50,4 \pm 0,8 ^e	13,4 \pm 0,3 ^{c,d}	34,4 \pm 0,8 ^{e,f,g}	355,0 \pm 0,8 ⁱ
	600	49 \pm 8 ^b	2,08 \pm 0,01 ^c	61,5 \pm 0,8 ^b	12,86 \pm 0,04 ^{g,h}	23,5 \pm 0,5 ⁱ	358,9 \pm 0,1 ^{b,c,d}

*Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogénio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogénio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$).

4.2.2. Açúcares Livres

Observou-se uma interação significativa entre as cultivares e a concentração de N no que se refere à composição em açúcares livres determinados nas amostras de manjerição (**Tabela 14**). Foram identificados e quantificados três açúcares solúveis: glucose, frutose e sacarose, enquanto que a trealose foi referida em estudos anteriores (Fernandes *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2015) mas não foi detetada no nosso estudo.

A glucose foi o açúcar maioritário detetado (3,4 g/100 g ms em média), seguido da frutose (1,5 g/100 g ms em média) e da sacarose (0,95 g/100 g ms em média) em todas as cultivares, com exceção da ‘Basilico-rosso’ que, independentemente da concentração de N fornecido, obteve os teores mais elevados de sacarose (2,2 g/100 g ms em média) e teores relativamente menores de frutose (0,9 g/100 g ms em média) em comparação com as outras cultivares estudadas. As plantas não fertilizadas, caracterizaram-se por teores relativamente menores de glucose e teores elevados de frutose em todas as cultivares, excepto na ‘Basilico-rosso’.

Os teores elevados de açúcares livres totais foram consistentemente observados nas plantas fertirrigadas com o nível mais elevado de N. Com exceção da ausência de trealose, estes resultados estão de acordo com os estudos anteriores (Fernandes *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2015) e, sugerem que em todas as cultivares avaliadas, os níveis elevados de N estão associados ao aumento dos teores de açúcares livres totais.

Tabela 12. Composição em açúcares livres das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (g/100g ms) (média ± DP, n=3).

Cultivar	ppm	Frutose	Glucose	Sacarose	Açúcares Livres Totais
'Dark-opal'		1,7±0,5^{A*}	3±1^C	0,9±0,2^B	5±2^C
	0	1,65±0,04 ^f	0,87±0,01 ^l	0,62±0,01 ⁱ	3,14±0,06 ^j
	200	0,92±0,01 ^j	2,51±0,01 ^j	0,95±0,01 ^g	4,38±0,01 ⁱ
	400	2,05±0,09 ^b	3,25±0,06 ^h	1,04±0,05 ^f	6,34±0,07 ^f
	600	2,32±0,03 ^a	3,45±0,02 ^g	1,07±0,01 ^e	6,84±0,06 ^c
'Red-basil'		1,7±0,4^A	3±1^C	0,6±0,2^C	5±1^{B,C}
	0	1,40±0,02 ^h	0,64±0,02 ^m	0,53±0,05 ^j	2,57±0,09 ^k
	200	1,55±0,01 ^g	2,69±0,04 ⁱ	0,878±0,004 ^h	5,11±0,04 ^h
	400	1,40±0,05 ^h	3,73±0,01 ^f	0,442±0,006 ^k	5,57±0,05 ^g
	600	2,29±0,02 ^a	3,76±0,02 ^e	0,51±0,03 ^j	6,57±0,07 ^e
'Basilico-rosso'		0,9±0,4^B	3,5±0,6^{A,B}	2,2±0,1^A	7±1^A
	0	0,55±0,04 ^k	2,48±0,04 ^j	2,03±0,04 ^d	5,06±0,05 ^h
	200	0,52±0,02 ^k	3,71±0,03 ^f	2,09±0,03 ^c	6,31±0,02 ^f
	400	1,08±0,01 ⁱ	3,96±0,02 ^d	2,17±0,02 ^b	7,21±0,05 ^b
	600	1,40±0,05 ^h	3,98±0,01 ^d	2,41±0,01 ^a	7,79±0,04 ^a
'Mitikas'		1,8±0,2^A	4±2^A	0,11±0,03^D	6±2^{A,B}
	0	1,52±0,04 ^g	0,95±0,06 ^k	0,096±0,004 ^m	2,57±0,09 ^k
	200	1,74±0,05 ^e	4,48±0,05 ^c	0,092±0,003 ^m	6,32±0,01 ^f
	400	1,85±0,06 ^d	4,82±0,03 ^b	0,109±0,001 ^m	6,78±0,09 ^d
	600	2,01±0,06 ^c	4,99±0,01 ^a	0,160±0,004 ^l	7,16±0,05 ^b

*Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogénio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogénio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizadas: frutose ($y = 1,04x$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,05 mg/mL; LOQ = 0,18 mg/mL), glucose ($y = 0,935x$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,08 mg/mL; LOQ = 0,25 mg/mL) e sacarose ($y = 0,977x$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,06 mg/mL, LOQ = 0,21 mg/mL).

4.2.3. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos identificados e quantificados nas amostras de manjeriço foram os ácidos quínico, oxálico e xiquímico, enquanto que o ácido ascórbico foi identificado apenas vestigialmente (**Tabela 15**).

Fernandes *et al.* (2019) relataram um perfil diferente de ácidos orgânicos em folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, uma vez que também identificaram o ácido málico, cítrico, fumárico, e ascórbico, contudo, de forma consistente com o nosso estudo, o ácido quínico foi o ácido orgânico maioritário.

As folhas das três cultivares de manjerição púrpura apresentaram teores semelhantes de ácido quínico, variando de 9 a 11 g/100 g ms, enquanto que o teor de ácido quínico da cultivar 'Mitikas' foi em média de 6 g/100 g ms. O teor do ácido oxálico foi elevado na cultivar 'Darkopal', enquanto que as outras três cultivares apresentaram teores semelhantes de ácido oxálico.

Os teores totais de ácidos orgânicos, foram significativamente elevados nas três cultivares de manjerição púrpura em comparação com a cultivar verde. Ao avaliar o impacto da concentração de N, verificou-se que em geral, o teor de cada ácido orgânico e os teores de ácidos orgânicos totais aumentaram em paralelo com o aumento da concentração de N nas quatro cultivares. Estes resultados sugerem que a deficiência de N nas plantas não fertirrigadas limita a síntese de ácidos orgânicos.

De acordo com outros estudos, a fertilização com N pode afetar a composição e o teor de ácidos orgânicos quando se aplica concentrações crescentes de N, resultando assim, num elevado teor de ácidos orgânicos (Petropoulos *et al.*, 2019; Petropoulos *et al.*, 2020a; Petropoulos *et al.*, 2020b).

Tabela 13. Composição em ácidos orgânicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (g/100g ms) (média ± DP, n=3).

Cultivar	ppm	Ácido Oxálico	Ácido Quínico	Ácido Xiquímico	Ácido Ascórbico	Ácidos Orgânicos Totais
'Dark-opal'		5,7±0,8^{A*}	9±3^B	0,11±0,01^A		15±4^{A,B}
	0	4,67±0,01 ⁱ	4,45±0,01 ⁿ	0,120±0,001 ^b	tr	9,24±0,01 ^m
	200	5,27±0,05 ^h	9,80±0,08 ^h	0,100±0,003 ^{e,f}	tr	15,18±0,02 ⁱ
	400	6,01±0,09 ^{c,d}	10,57±0,06 ^f	0,100±0,001 ^e	tr	16,68±0,03 ^g
	600	6,78±0,07 ^a	12,41±0,02 ^b	0,100±0,001 ^{e,f}	tr	19,29±0,05 ^b
'Red-basil'		5±1^B	10±3^{A,B}	0,09±0,04^B		15±4^{A,B}
	0	3,17±0,01 ^j	4,50±0,03 ^m	0,020±0,001 ^j	tr	7,69±0,03 ⁿ
	200	5,33±0,02 ^g	10,37±0,02 ^g	0,100±0,007 ^f	tr	15,80±0,05 ^h
	400	5,76±0,06 ^f	11,07±0,02 ^e	0,110±0,001 ^d	tr	16,94±0,04 ^f
	600	6,04±0,01 ^c	12,41±0,04 ^b	0,130±0,001 ^a	tr	18,59±0,05 ^c
'Basilico-rosso'		5±2^B	11±4^A	0,09±0,04^A		16±5^A
	0	2,41±0,01 ^l	4,95±0,06 ^l	0,030±0,001 ⁱ	tr	7,39±0,06 ^o
	200	5,97±0,01 ^{de}	11,40±0,02 ^d	0,110±0,002 ^c	tr	17,48±0,02 ^e
	400	6,31±0,09 ^b	11,50±0,05 ^c	0,110±0,001 ^{c,d}	tr	17,92±0,04 ^d
	600	6,78±0,01 ^a	14,90±0,06 ^a	0,120±0,001 ^b	tr	21,80±0,07 ^a
'Mitikas'		5±1^B	6±1^C	0,04±0,02^C		12±3^C
	0	2,90±0,02 ^k	4,14±0,04 ^o	0,020±0,001 ^j	tr	7,06±0,01 ^p
	200	5,25±0,01 ^h	6,81±0,02 ^k	0,030±0,001 ⁱ	tr	12,09±0,02 ^l
	400	5,77±0,03 ^f	7,14±0,02 ^j	0,060±0,003 ^h	tr	12,97±0,02 ^k
	600	5,95±0,07 ^e	7,89±0,01 ⁱ	0,070±0,003 ^g	tr	13,92±0,09 ^j

*Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogénio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogénio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizada: ácido oxálico ($y = 9 \times 10^6x + 377,946$; $R^2 = 0,994$; LOD = 12,55 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 41,82 $\mu\text{g/mL}$); ácido quínico ($y = 612,327 \times + 16,563$; $R^2 = 1$; LOD = 24,18 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 80,61 $\mu\text{g/mL}$); ácido xiquímico ($y = 7 \times 10^7x + 175156$; $R^2 = 0,9999$; LOD = 10,2 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 56,5 $\mu\text{g/mL}$) e ácido fumárico ($y = 148,083 \times + 96,092$; $R^2 = 1$; LOD = 0,08 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0,26 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.4. Ácidos Gordos

Foram identificados e quantificados quinze ácidos gordos nas quatro cultivares de manjeriço estudadas (**Tabela 16 e A2**). Os ácidos gordos maioritários encontrados foram os

ácidos α -linolénico (ómega 3) e linoleico (ómega 6) de entre os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e, o ácido palmítico de entre os ácidos gordos saturados (SFA). O ácido α -linolénico foi o ácido gordo maioritário e variou entre 31,3% e 51% do teor total de ácidos gordos, sendo em média mais elevado na cultivar 'Red-basil', seguido das cultivares 'Basilico-rosso' e 'Dark-opal' e significativamente mais baixo na cultivar verde 'Mitikas'. Avaliando a proporção das diferentes categorias de ácidos gordos mencionados neste trabalho, os resultados estão de acordo com os encontrados pelos autores Fernandes *et al.* (2019) na cultivar *O. basilicum* var. *purpurascens*.

No presente estudo, nas quatro cultivares estudadas, os PUFA constituíram o grupo principal de ácidos gordos, seguido pelos SFA e ácidos gordos monoinsaturados (MUFA). A percentagem de PUFA foi elevada na cultivar 'Red-basil' e menor na 'Mitikas', que por sua vez, apresentou teores elevados de MUFA, enquanto que a 'Red-basil' apresentou os menores teores de SFA.

Avaliando a razão $n-6/n-3$, teores menores indicam elevado valor nutricional, e foram observados na cultivar 'Red-basil' (0,29) e a razão mais elevada foi encontrada na cultivar 'Mitikas' (0,33). O efeito da concentração de N no perfil dos ácidos gordos variou com a cultivar. A razão $n-6/n-3$ foi influenciada pela concentração de N e, foi menor nas plantas fertirrigadas com 200 ppm, com exceção da 'Dark-opal' que apresentou a razão mais baixa de $n-6/n-3$ a 400 ppm e a mais alta a 200 ppm. Globalmente, estes resultados confirmam que o manjericão, e particularmente as cultivares púrpura, têm um perfil interessante de ácidos gordos, caracterizado por uma baixa razão $n-6/n-3$ e por teores elevados de ácido α -linolénico ($n-3$), que apresenta efeitos benéficos potenciais para a saúde (Saini & Keum, 2018; Shahidi & Ambigaipalan, 2018).

Tabela 14. Ácidos gordos majoritários (%), grupos de ácidos gordos e razão *n-6/n-3* identificados nas cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogênio (ppm) aplicados (média ± DP, *n*=3).

Cultivar	ppm	C16:0	C18:2n6c	C18:3n3	SFA	MUFA	PUFA	<i>n-6/n-3</i>
'Dark-opal'		20,8±0,8 ^{A,B*}	14,4±0,7 ^A	46±3 ^B	31±2 ^A	7,8±0,4 ^{B,C}	61±2 ^B	0,34±0,01 ^A
	0	20,9±0,2 ^d	14,6±0,4 ^c	44,6±0,3 ⁱ	32,1±0,1 ^c	8,2±0,1 ^g	59,7±0,2 ^h	0,45±0,01 ^a
	200	21,8±0,2 ^b	15,2±0,2 ^b	41,8±0,1 ^j	34,1±0,2 ^b	8,2±0,2 ^g	57,8±0,4 ⁱ	0,36±0,01 ^b
	400	20,5±0,7 ^e	13,4±0,4 ⁱ	48,9±0,2 ^{d,e}	29,7±0,6 ^d	7,5±0,1 ^{h,i}	62,8±0,6 ^e	0,274±0,006 ^j
	600	19,87±0,07 ^f	14,4±0,4 ^{c,d,e}	49,08±0,04 ^{c,d}	28,8±0,4 ^{e,f}	7,3±0,1 ^j	64,0±0,5 ^c	0,292±0,008 ^{gh}
'Red-basil'		18,5±0,6 ^C	14,4±0,4 ^A	49,5±0,6 ^A	27,9±0,8 ^C	7,7±0,5 ^{B,C}	64,4±0,7 ^A	0,29±0,01 ^B
	0	18,89±0,05 ^h	14,17±0,07 ^{e,f,g}	48,6±0,4	28,5±0,2 ^f	8,12±0,1 ^g	63,3±0,4 ^d	0,29±0,01 ^h
	200	19,4±0,1 ^g	14,06±0,07 ^{f,g}	50,03±0,06 ^b	28,5±0,1 ^f	7,0±0,1 ^l	64,5±0,1 ^b	0,281±0,002 ^{hi}
	400	18,06±0,01 ⁱ	14,29±0,06 ^{d,e,f}	50,08±0,07 ^b	27,69±0,02 ^g	7,43±0,04 ⁱ	64,9±0,1 ^{a,b}	0,285±0,002 ^h
	600	17,78±0,08 ^j	15,13±0,01 ^b	49,3±0,1 ^c	26,7±0,1 ^j	8,31±0,02 ^f	65,0±0,1 ^a	0,307±0,001 ^e
'Basilico-rosso'		20±1 ^B	14±1 ^A	47±2 ^B	29±1 ^{A,B}	8,3±0,5 ^B	62±2 ^B	0,30±0,01 ^B
	0	21,5±0,5 ^{b,c}	15,5±0,2 ^a	45,4±0,4 ^h	30,0±0,5 ^d	8,8±0,1 ^d	61,2±0,6 ^g	0,341±0,002 ^c
	200	18,43±0,01 ^{ij}	13,3±0,1 ⁿ ⁱ	51,0±0,2 ^a	27,2±0,1 ^h	7,6±0,1 ^h	65,2±0,1 ^a	0,261±0,002 ^k
	400	20,5±0,8 ^e	15,2±0,1 ^b	45,5±0,7 ^h	29,8±0,8 ^d	8,5±0,1 ^e	61,7±0,8 ^f	0,33±0,01 ^d
	600	20,3±0,6 ^e	13,17±0,05 ⁱ	47,3±0,5 ^f	29,9±0,6 ^d	8,4±0,1 ^f	61,8±0,6 ^f	0,278±0,002 ^j
'Mitikas'		22±3 ^A	13,9±0,4 ^{A,B}	43±7 ^C	30±5 ^A	12±2 ^A	57±7 ^C	0,33±0,01 ^A
	0	27,36±0,01 ^a	13,4±0,3 ⁱ	31,3±0,1 ^k	38,5±0,1 ^a	16,2±0,3 ^a	45,3±0,3 ^j	0,43±0,01 ^a
	200	19,12±0,06 ^{g,h}	14,04±0,57 ^g	48,5±0,5 ^e	26,2±0,1 ⁱ	10,8±0,1 ^c	63,0±0,1 ^{d,e}	0,29±0,01 ^h
	400	19,8±0,2 ^f	14,45±0,04 ^{c,d}	46,5±0,1 ^g	27,3±0,2 ^{g,h}	11,3±0,1 ^b	61,4±0,1 ^{f,g}	0,311±0,002 ^e
	600	21,2±0,6 ^{c,d}	13,7±0,2 ^h	45,7±0,6 ^h	29,1±0,6 ^e	10,8±0,2 ^c	60,1±0,8 ^h	0,300±0,001 ^f

C16:0 - ácido palmítico; C18:2n6c - ácido linoléico; C18:3n3 - ácido α -linolénico; SFA - Ácidos gordos saturados; MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogênio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogênio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$).

4.2.5. Tocoferóis

O perfil de tocoferóis foi influenciado pelo efeito interativo da cultivar e pela concentração de N (**Tabela 17**). Nas quatro cultivares, foram detetadas as três isoformas α -, γ - e δ -tocoferóis. A isoforma maioritária foi a α -tocoferol seguida das γ - e δ -tocoferóis. O teor de α -tocoferol variou em média entre 0,8 mg/100 g ms na cultivar ‘Basilico-rosso’ a 4 mg/100 ms na ‘Dark-opal’ e ‘Red-basil’. Avaliando as cultivares, o teor de α -tocoferol foi elevado nas plantas fertirrigadas com 200 ppm, enquanto que o aumento adicional de N, resultou numa diminuição de α -tocoferol.

Em média, os teores de γ - e δ -tocoferóis foram equivalentes dentro de cada cultivar, os teores elevados foram observados na ‘Dark-opal’ e os inferiores foram observados na cultivar verde, ‘Mitikas’. O perfil em tocoferóis encontrado neste estudo, foi semelhante ao perfil observado por Sgherri *et al.* (2010) em amostras de manjeriço verde, mas, não correspondeu ao perfil encontrado por Fernandes *et al.* (2019), que descreveram as quatro isoformas da vitamina E (α -, β -, γ -, e δ -tocoferóis) nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens*, prevalecendo o γ -tocoferol.

Os teores totais de tocoferóis variaram entre 1,3 a 9,34 mg/100 g ms e, foram elevados nas plantas fertirrigadas com 200 ppm, seguido pelas fertirrigadas com 400 ppm e pelas amostras controlo, enquanto que os teores mais baixos de tocoferóis totais foram observados nas plantas fertirrigadas com a concentração mais elevada de N (600 ppm).

A grande variação no conteúdo de tocoferóis dentro da mesma cultivar, sugere que a disponibilidade de N desempenha um papel fundamental na determinação do conteúdo total de tocoferóis e, tanto a deficiência como o excesso de N parecem afetar negativamente o conteúdo de vitamina E.

Tabela 15. Composição em tocoferóis das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicado (mg/100 g ms) (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar	ppm	α -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol	Tocoferóis Totais
'Dark-opal'		4\pm1 ^{A*}	0,8\pm0,3 ^A	0,8\pm0,3 ^A	5\pm2 ^A
	0	3,60 \pm 0,03 ^d	0,44 \pm 0,03 ^f	0,325 \pm 0,008 ^h	4,37 \pm 0,05 ^d
	200	6,07 \pm 0,03 ^b	1,32 \pm 0,01 ^a	1,18 \pm 0,03 ^a	8,58 \pm 0,01 ^b
	400	2,71 \pm 0,01 ^g	0,94 \pm 0,02 ^c	0,97 \pm 0,02 ^c	4,63 \pm 0,01 ^c
	600	2,41 \pm 0,02 ^h	0,60 \pm 0,03 ^e	0,76 \pm 0,03 ^e	3,77 \pm 0,03 ^f
'Red-basil'		4\pm2 ^{A,B}	0,6\pm0,3 ^B	0,5\pm0,4 ^B	5\pm3 ^A
	0	3,14 \pm 0,02 ^e	0,447 \pm 0,001 ^f	0,31 \pm 0,02 ^h	3,90 \pm 0,01 ^e
	200	7,09 \pm 0,02 ^a	1,13 \pm 0,01 ^b	1,12 \pm 0,01 ^b	9,34 \pm 0,02 ^a
	400	3,80 \pm 0,03 ^c	0,41 \pm 0,01 ^g	0,40 \pm 0,02 ^f	4,61 \pm 0,01 ^c
	600	1,71 \pm 0,01 ^j	0,340 \pm 0,002 ^h	0,259 \pm 0,003 ⁱ	2,31 \pm 0,01 ^j
'Basilico-rosso'		0,8\pm0,3 ^D	0,5\pm0,1 ^{B,C}	0,5\pm0,3 ^B	1,8\pm0,6 ^C
	0	0,55 \pm 0,02 ^o	0,44 \pm 0,01 ^f	0,313 \pm 0,004 ^h	1,30 \pm 0,01 ⁿ
	200	1,257 \pm 0,001 ^l	0,49 \pm 0,02 ^e	0,91 \pm 0,04 ^d	2,66 \pm 0,01 ⁱ
	400	0,87 \pm 0,02 ^m	0,67 \pm 0,03 ^d	0,370 \pm 0,002 ^g	1,92 \pm 0,02 ^l
	600	0,66 \pm 0,02 ⁿ	0,35 \pm 0,04 ^h	0,32 \pm 0,02 ^h	1,33 \pm 0,08 ⁿ
'Mítikas'		1,9\pm0,7 ^C	0,36\pm0,07 ^D	0,27\pm0,06 ^C	2,6\pm0,8 ^B
	0	2,36 \pm 0,04 ⁱ	0,445 \pm 0,003 ^f	0,315 \pm 0,002 ^h	3,13 \pm 0,05 ^h
	200	2,76 \pm 0,05 ^f	0,396 \pm 0,004 ^g	0,325 \pm 0,001 ^h	3,48 \pm 0,04 ^g
	400	1,55 \pm 0,01 ^k	0,321 \pm 0,005 ⁱ	0,255 \pm 0,004 ⁱ	2,12 \pm 0,01 ^k
	600	1,13 \pm 0,01 ^m	0,278 \pm 0,004 ^j	0,171 \pm 0,002 ^j	1,58 \pm 0,01 ^m

*Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogénio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogénio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizadas: α -tocoferol ($y = 1,295x$; $R^2 = 0,991$; LOD: 18,06 ng/mL, LOQ: 60,20 ng/mL); γ -tocoferol ($y = 0,567x$; $R^2 = 0,991$; LOD: 14,79 ng/mL, LOQ: 49,32 ng/mL); δ -tocoferol ($y = 0,678x$; $R^2 = 0,992$; LOD: 20,09 ng/mL, LOQ: 66,95 ng/mL).

4.2.6. Compostos Fenólicos

Os resultados relativos à identificação e quantificação de compostos fenólicos são apresentados nas Tabelas 18 e 19, respetivamente. As cultivares de manjeriço e a concentração de N adicionado tiveram um efeito interativo significativo sobre o perfil fenólico.

Nas quatro cultivares foram detetados seis compostos fenólicos, incluindo quatro ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido chicórico (ácido hidroxicinâmico), ácido sagerínico, e ácido salvianólico F, e dois flavonóides-*O*-glicosilados (derivados da quercetina e eriodictiol). O ácido sagerínico foi o composto fenólico maioritário detetado, seguido do derivado do eriodictiol e o ácido salvianólico F. Estes resultados contrastam com as conclusões de estudos anteriores que relatavam que o ácido rosmarínico ou o ácido chicórico foram os principais compostos fenólicos identificado no manjeriço, dependendo da cultivar de manjeriço examinada (Javanmardi *et al.* , 2002; Kwee & Niemeyer, 2011; Lee & Scagel, 2009; Nguyen & Niemeyer, 2008).

No entanto, no presente trabalho e em estudos anteriores, foi observado que a cultivar exerce um papel fundamental na composição do perfil fenólico. De facto, foram observadas grandes variações no conteúdo dos compostos fenólicos maioritários, entre as quatro cultivares de manjeriço estudadas, o que reforça ainda mais este argumento.

O ácido sagerínico variou em média de 3 mg/g de extrato no manjeriço verde ('Mitikas') até 11 mg/g de extrato nas cultivares 'Dark-opal' e 'Red-basil'. O derivado eriodictiol variou entre o mínimo de 1 mg/g de extrato na cultivar 'Mitikas' e 7 mg/g de extrato na cultivar 'Red-basil'. As cultivares 'Red-basil' e 'Dark-opal' apresentaram os teores mais elevado de ácidos fenólicos totais e flavonóides totais e, por conseguinte, apresentaram os teores mais elevados de compostos fenólicos totais (25 mg/g de extrato em média), enquanto que a 'Mitikas' apresentou o teor mais baixo de compostos fenólicos totais (em média 9 mg/g de extrato).

Estes resultados estão de acordo com o descrito pelos autores Nguyen e Niemeyer (2008), que observaram teores substancialmente menores de compostos fenólicos no manjeriço verde Genovese em comparação com o manjeriço 'Dark-opal'. Variações significativas no conteúdo de ácidos fenólicos e derivados de flavonóides também foram observadas em função da concentração de N.

Na cultivar 'Dark-opal' por exemplo, a concentração de ácido sagerínico variou entre 24,6 mg/g de extrato nas plantas não fertirrigadas até o mínimo de 4,6 mg/g de extrato nas cultivares fertirrigadas com 600 ppm de N.

Nas quatro cultivares de manjeriço, o conteúdo de ácidos fenólicos totais e flavonóides totais, bem como o conteúdo total de compostos fenólicos, diminuiram com o aumento da concentração de N, sugerindo assim que, na presença de concentrações elevadas de N o

crescimento das plantas pode estar a inibir a biossíntese de compostos fenólicos, enquanto que o *stress* associado à deficiência de N poderá ter ativado a biossíntese de compostos fenólicos.

Estes resultados estão de acordo com o descrito pelos autores Nguyen & Niemeyer (2008), que avaliaram o efeito da concentração do N no perfil fenólico das cultivares Sweet Thai, ‘Dark-opal’ e Genovese e, observaram níveis significativamente elevados de compostos fenólicos, especialmente, do ácido rosmarínico na concentração mais baixa de N para as cultivares ‘Dark-opal’ e Genovese.

Da mesma forma, Prinsi *et al.* (2020), observaram um aumento no conteúdo do ácido rosmarínico e fenólicos totais nas cultivares de manjerição verde e púrpura cultivado em sistema hidropónico após o suprimento de N, 5 dias antes da colheita.

Tabela 16. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{\max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjerição estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm SD, $n=3$).

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de Identificação
1	8.91	323	179	135(100)	Ácido cafeico
2	14.96	323	473	313(61),293(100)	Ácido chicórico
3	16.8	334	609	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -desoxihexosídeo-hexosídeo
4	19.5	290/325	535	491(100),287(34)	Eriodictiol- <i>O</i> -malonilhexosídeo
5	20.76	282/327	719	359(100),197(31),179(42),161(50),135(5)	Ácido sagerínico
6	35.36	287/333	313	269(51),203(12),179(5),161(100),135(5)	Ácido salvianólico F

Tabela 17. Quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (mg/g de extrato) (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar	ppm	Pico						TPA	TF	TPC
		1	2	3	4	5	6			
'Dark-opal'		1,6\pm0,6^{A*}	2\pm1^A	1\pm2^{A,B}	6\pm2^A	11\pm8^A	2,9\pm0,5^A	18\pm10^A	7\pm4^A	25\pm13^A
	0	2,55 \pm 0,07 ^b	2,84 \pm 0,01 ^c	3,58 \pm 0,05 ^a	8,0 \pm 0,4 ^c	24,6 \pm 0,4 ^a	3,49 \pm 0,06 ^c	33,5 \pm 0,2 ^b	11,6 \pm 0,5 ^b	45,0 \pm 0,3 ^b
	200	1,51 \pm 0,06 ^e	3,98 \pm 0,06 ^a	0,275 \pm 0,006 ⁱ	8,1 \pm 0,1 ^c	10,56 \pm 0,03 ^d	3,17 \pm 0,02 ^d	19,2 \pm 0,1 ^d	8,4 \pm 0,1 ^c	27,6 \pm 0,2 ^d
	400	1,59 \pm 0,01 ^d	0,761 \pm 0,003 ^h	tr	3,86 \pm 0,06 ^f	5,08 \pm 0,09 ^f	2,33 \pm 0,01 ^g	9,76 \pm 0,08 ^f	3,86 \pm 0,06 ^g	13,62 \pm 0,02 ^g
	600	0,901 \pm 0,007 ^j	1,73 \pm 0,04 ^e	tr	3,1 \pm 0,2 ^g	4,61 \pm 0,03 ^{h,i}	2,43 \pm 0,03 ^f	9,67 \pm 0,05 ^f	3,1 \pm 0,2 ^h	12,8 \pm 0,1 ^h
'Red-basil'		1,7\pm0,8^A	2\pm1^A	1\pm1^A	7\pm4^A	11\pm8	3\pm2^A	18\pm12^A	8\pm5^A	25\pm17^A
	0	2,68 \pm 0,04 ^a	3,06 \pm 0,02 ^b	3,55 \pm 0,01 ^b	11,5 \pm 0,4 ^a	23,2 \pm 0,4 ^b	4,93 \pm 0,04 ^b	33,9 \pm 0,4 ^a	15,1 \pm 0,4 ^a	48,9 \pm 0,8 ^a
	200	2,23 \pm 0,02 ^c	2,12 \pm 0,02 ^d	0,226 \pm 0,001 ^j	8,4 \pm 0,3 ^b	14,9 \pm 0,4 ^c	4,93 \pm 0,03 ^b	24,2 \pm 0,4 ^c	8,6 \pm 0,3 ^c	32,8 \pm 0,7 ^c
	400	1,15 \pm 0,01 ^h	1,00 \pm 0,01 ^g	0,34 \pm 0,01 ^g	4,43 \pm 0,02 ^e	4,43 \pm 0,02 ^g	1,227 \pm 0,005 ^l	7,807 \pm 0,004 ^h	4,77 \pm 0,03 ^f	12,58 \pm 0,03 ^h
	600	0,61 \pm 0,02 ⁿ	0,51 \pm 0,01 ^j	0,074 \pm 0,004 ^k	1,74 \pm 0,09 ⁱ	2,782 \pm 0,03 ^l	1,12 \pm 0,03 ^m	5,0 \pm 0,1 ^j	1,82 \pm 0,09 ^j	6,8 \pm 0,1 ^l
'Basilico-rosso'		0,9\pm0,2^B	0,9\pm0,2^B	1\pm1^A	4\pm1^B	3,8\pm0,7^B	1,6\pm0,4^B	7\pm1^B	5\pm2^B	12\pm3^B
	0	1,20 \pm 0,02 ^g	1,00 \pm 0,01 ^g	2,89 \pm 0,01 ^c	4,42 \pm 0,07 ^e	4,42 \pm 0,07 ^h	1,46 \pm 0,04 ^k	8,4 \pm 0,2 ^g	7,3 \pm 0,1 ^d	15,7 \pm 0,2 ^f
	200	1,08 \pm 0,01 ⁱ	1,03 \pm 0,02 ^f	0,41 \pm 0,01 ^f	5,1 \pm 0,2 ^d	3,98 \pm 0,05 ^j	2,12 \pm 0,02 ^h	8,20 \pm 0,01 ^g	5,5 \pm 0,2 ^e	13,7 \pm 0,2 ^g
	400	0,726 \pm 0,003 ^m	1,01 \pm 0,01 ^{f,g}	0,624 \pm 0,005 ^d	3,2 \pm 0,2 ^g	3,7 \pm 0,1 ^k	1,88 \pm 0,04 ⁱ	7,3 \pm 0,1 ^h	3,8 \pm 0,2 ^g	11,1 \pm 0,3 ⁱ
	600	0,80 \pm 0,03 ^l	0,59 \pm 0,02 ⁱ	0,298 \pm 0,004 ^h	2,32 \pm 0,01 ^h	2,7 \pm 0,1 ^l	1,05 \pm 0,01 ⁿ	5,17 \pm 0,03 ^j	2,61 \pm 0,01 ⁱ	7,8 \pm 0,1 ^k
'Mitikas'		1,0\pm0,4^B	0,8\pm0,6^B	-	1\pm1^C	3\pm3^B	3\pm2^A	8\pm5^B	2\pm1^C	9\pm6^C
	0	1,34 \pm 0,03 ^f	1,72 \pm 0,02 ^e	0,52 \pm 0,01 ^e	3,22 \pm 0,03 ^g	7,6 \pm 0,5 ^e	4,97 \pm 0,02 ^a	15,6 \pm 0,5 ^e	3,74 \pm 0,04 ^g	19,4 \pm 0,5 ^e
	200	1,31 \pm 0,01 ^f	0,45 \pm 0,01 ^k	tr	1,49 \pm 0,01 ^j	2,21 \pm 0,03 ^m	3,02 \pm 0,04 ^e	6,99 \pm 0,01 ⁱ	1,49 \pm 0,01 ^k	8,48 \pm 0,01 ^j
	400	0,84 \pm 0,02 ^k	0,51 \pm 0,01 ^j	tr	1,08 \pm 0,01 ^k	1,77 \pm 0,06 ⁿ	1,50 \pm 0,02 ^j	4,6 \pm 0,1 ^k	1,08 \pm 0,01 ^l	5,7 \pm 0,1 ^m
	600	0,33 \pm 0,02 ^o	0,41 \pm 0,01 ^l	tr	0,065 \pm 0,006 ^l	0,98 \pm 0,01 ^o	1,25 \pm 0,02 ^l	3,0 \pm 0,1 ^l	0,065 \pm 0,006 ^m	3,0 \pm 0,1 ⁿ

tr - traços; TPA: ácidos fenólicos totais; TF-Total flavonoides, TPC-Total compostos fenólicos. *Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogénio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogénio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$). Curvas de calibração utilizadas: 1 e 2 - ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,9939$; LOD = 0,78 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 1,97 $\mu\text{g/mL}$), 3 e 4- quercetina-3-*O*-rutinosídeo ($y = 13343x + 76751$, $R^2 = 0,9998$; LOD = 0,18; LOQ = 0,65), 5 e 6- ácido rosmarínico ($y = 191291x - 652903$, $R^2 = 0,999$; LOD = 0,15 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0,68 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.7. *Actividade Antioxidante*

A atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das folhas de manjeriço foi avaliada através de dois métodos celulares, nomeadamente o método TBARS e o método OxHLIA (**Tabela 20**). No ensaio TBARS, observou-se que as folhas de manjeriço ‘Dark-opal’ fertirrigadas com 200 ppm apresentaram menores valores de EC_{50} (13,1 $\mu\text{g/mL}$) e portanto, a maior atividade antioxidante, seguida das cultivares ‘Red-basil’ (25,2 $\mu\text{g/mL}$) e ‘Basilico-rosso’ (31 $\mu\text{g/mL}$) fertirrigadas com 200 ppm de N. Por sua vez, as cultivares ‘Mitikas’ e a ‘Red-basil’ cultivadas com as concentrações elevadas de N apresentaram valores de EC_{50} elevados e portanto, a menor atividade antioxidante.

No ensaio OxHLIA, as menores concentrações inibitórias (IC_{50}) calculadas após uma ou duas horas, foram observadas no extrato das cultivares ‘Dark-opal’ e ‘Red-basil’ fertirrigadas com 200 ppm de N, enquanto que os valores mais altos foram observados no extrato da ‘Mitikas’ fertirrigada com a concentração mais elevada de N.

O grau da atividade antioxidante é resultante da interação entre as cultivares e, a concentração de N foi correlacionada positivamente com o conteúdo total de tocoferóis, que foram elevados na cultivar ‘Dark-opal’ e ‘Red-basil’ fertirrigados com 200 ppm e menores na cultivar ‘Basilico-rosso’ e ‘Mitikas’, fertirrigados com os níveis mais elevados de N (**Tabela 17**).

Resultados semelhantes foram relatados por Majdi *et al.* (2020), que também observaram diferenças significativas entre duas espécies de *Ocimum* (*O. basilicum* cv. Cinnamon e *O. citriodorum*) e obtiveram valores de IC_{50} significativamente mais baixos do que o controlo positivo (Trolox).

Tabela 18. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm DP, $n=3$).

Cultivar	ppm	TBARS (EC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$)	OxHLIA (IC ₅₀ values, $\mu\text{g/mL}$)	
			$\Delta t = 60$ min	$\Delta t = 120$ min
'Dark-opal'		32\pm16 ^{D*}	106\pm56 ^B	198\pm89 ^B
	0	34 \pm 3 ^d	79 \pm 3 ^g	145 \pm 4 ^f
	200	13,1 \pm 0,3 ^g	30,8 \pm 0,9 ^l	82 \pm 1 ⁱ
	400	25,7 \pm 0,5 ^f	144 \pm 2 ^d	270 \pm 3 ^d
	600	55,4 \pm 0,6 ^b	171 \pm 4 ^c	293 \pm 4 ^c
'Red-basil'		50\pm15 ^B	68\pm26 ^D	170\pm84 ^C
	0	55,7 \pm 0,2 ^b	60 \pm 2 ^h	109 \pm 2 ^h
	200	25,2 \pm 0,2 ^f	40,0 \pm 0,9 ^{j,k}	79 \pm 3 ⁱ
	400	60 \pm 1 ^a	64 \pm 3 ^h	202 \pm 4 ^e
	600	61 \pm 2 ^a	109 \pm 6 ^f	289 \pm 6 ^c
'Basilico-rosso'		43\pm12 ^C	77\pm44 ^C	151\pm76 ^D
	0	32 \pm 1 ^d	38 \pm 1 ^{k,l}	65 \pm 2 ^j
	200	31,0 \pm 0,2 ^e	46 \pm 3 ^{i,j}	136 \pm 3 ^{f,g}
	400	54,9 \pm 0,7 ^b	147 \pm 4 ^d	271 \pm 7 ^d
	600	55,1 \pm 0,8 ^b	79 \pm 3 ^g	130 \pm 5 ^g
'Mitikas'		57\pm4 ^A	183\pm106 ^A	269\pm254 ^A
	0	54,3 \pm 0,8 ^b	51 \pm 2 ⁱ	105 \pm 2 ^h
	200	52,0 \pm 0,9 ^c	119 \pm 7 ^e	314 \pm 15 ^b
	400	59,7 \pm 0,5 ^a	250 \pm 11 ^b	na
	600	61,2 \pm 0,2 ^a	313 \pm 13 ^a	655 \pm 19 ^a
Trolox		5,4 \pm 0,3	19,6 \pm 0,7	41 \pm 1

*Diferentes letras latinas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cultivares testadas para o mesmo tratamento de nitrogénio, enquanto letras latinas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos de nitrogénio testados para a mesma cultivar, de acordo com o teste HSD de Tukey ($p=0,05$).

4.2.8. Atividade Antimicrobiana

Os resultados mais baixos de CMI e CMB e, portanto, maior atividade antibacteriana, foram observados contra a estirpe *B. cereus*, com concentrações inferiores às dos controlos positivos E211 e E224 (**Tabela 19**). Foram observados valores de CMI e CMB semelhantes ou menores aos controlos positivos também para as estirpes *S. aureus* e *S. Tympimum*, mas

não foi observada uma tendência particular no potencial da atividade antibacteriana das cultivares e/ou concentração de N.

Tabela 19. Atividade antibacteriana (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) (mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados.

Cultivar	ppm		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. cloacae</i>	
'Dark-opal'	0	CMI	4	1	2	2	2	4	
		CMB	8	2	4	4	4	8	
	200	CMI	2	1	1	2	2	2	
		CMB	4	2	2	4	4	4	
	400	CMI	1	1	2	1	2	1	
		CMB	2	2	4	2	4	2	
	600	CMI	2	1	2	2	2	2	
		CMB	4	2	4	4	4	4	
	'Red-basil'	0	CMI	2	1	2	1	1	2
			CMB	4	2	4	2	2	4
		200	CMI	1	1	1	1	2	1
			CMB	2	2	2	2	4	2
400		CMI	2	1	2	2	1	2	
		CMB	4	2	4	4	2	4	
600		CMI	2	0.5	2	1	1	2	
		CMB	4	1	4	2	2	4	
'Basilico-rosso'		0	CMI	1	1	1	2	2	1
			CMB	2	2	2	4	4	2
		200	CMI	1	0.5	1	2	1	1
			CMB	2	1	2	4	2	2
	400	CMI	2	1	2	2	2	2	
		CMB	4	2	2	4	4	4	
	600	CMI	1	1	2	2	2	1	
		CMB	2	2	4	4	4	2	
	'Mitikas'	0	CMI	2	1	2	2	2	2
			CMB	4	2	4	4	4	4
		200	CMI	2	1	2	2	1	2
			CMB	4	2	4	4	2	4
400		CMI	2	1	2	2	1	2	
		CMB	4	2	4	4	2	4	
600		CMI	2	1	2	1	2	2	
		CMB	4	2	4	2	4	4	
Controlos positivos		E211	CMI	4.0	0.5	1.0	1.0	1.0	2.0
			CMB	4.0	0.5	2.0	2.0	2.0	4.0
		E224	CMI	1.0	2.0	0.5	0.5	1.0	0.5
			CMB	1.0	4.0	1.0	1.0	1.0	0.5

Ao avaliar a atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos de folhas de manjeriço (**Tabela 20**), observou-se que os tratamentos aplicados de N apresentaram valores CMI e CMF inferiores ao tratamento controlo para as estirpes *A. fumigatus*, *A. versicolor* e *T. viride*. Além disso, os extratos específicos apresentavam valores de CMI e CMF inferiores aos apresentados para os dois controlos positivos contra as estirpes *A. niger*, *P. funiculosum* e *P. verrucosum* var. *cyclopium*, *A. fumigatus*. Tal como no nosso estudo, Fernandes *et al.* (2019), descreveram atividades antibacterianas significativas nas folhas de *O. basilicum* var. *purpurascens* e os extratos apresentaram valores de CMI, CMB e CMF inferiores aos controlos positivos

utilizados. No entanto, estes resultados não são comparáveis com os do nosso estudo devido às diferentes cultivares e controlos positivos utilizados.

Tabela 20. Atividade antifúngica (concentração mínima de inibição (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos das cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados.

Cultivar	ppm		<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>P. funiculosus</i>	<i>P. v. var. cyclopium</i>	<i>T. viride</i>	
'Dark-opal'	0	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	1	1	1	1	1	0.5	
	200	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	1	1	1	1	1	0.5	
	400	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	1	1	1	1	1	0.5	
	600	CMI	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	0.5	1	1	1	1	0.5	
	'Red-basil'	0	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
			CMF	1	1	1	1	1	0.5
		200	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
			CMF	1	1	1	1	1	0.5
400		CMI	0.25	0.5	0.25	0.5	1	0.25	
		CMF	0.5	1	0.5	1	2	0.5	
600		CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	1	1	1	1	1	0.5	
'Basilico- rosso'		0	CMI	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
			CMF	0.5	1	1	1	1	0.5
		200	CMI	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5
			CMF	1	1	1	2	2	1
	400	CMI	0.25	0.5	0.25	0.5	1	0.25	
		CMF	0.5	1	0.5	1	2	0.5	
	600	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	1	1	1	1	1	0.5	
	'Mitikas'	0	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.125
			CMF	1	1	1	1	1	0.25
		200	CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
			CMF	1	1	1	1	1	0.5
400		CMI	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
		CMF	1	1	1	1	1	0.5	
600		CMI	0.25	0.5	0.5	0.5	1	0.25	
		CMF	0.5	1	1	1	2	0.5	
Controlos positivos		E211	CMI	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0
			CMF	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0
		E224	CMI	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.5
			CMF	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apresentam-se as conclusões, a partir dos objetivos e resultados alcançados neste trabalho. Posteriormente, serão referidas as possibilidades de alargar o âmbito deste estudo, de forma a acrescentar ainda mais conhecimento relativamente à espécie *O. basilicum* L. no intuito de melhorar o seu uso por parte da investigação e sociedade.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1. Conclusão

No que se refere aos efeitos da salinidade, os resultados do nosso estudo mostraram que as cultivares testadas foram moderadamente tolerantes à salinidade, sem efeitos significativos sobre os teores de humidade das folhas. No que se refere ao valor nutricional, o efeito da salinidade foi variado, verificaram-se teores elevados de gordura, cinzas e glúcidos, e uma diminuição do valor proteico e energético em todas as cultivares.

Além disso, as plantas das cultivares ‘Red-basil’ e Basilico Rosso sujeitas ao *stress* da salinidade, tenderam a acumular açúcares livres e compostos fenólicos como principais osmólitos, para contribuir para o mecanismo antioxidante global das plantas, enquanto que os tocoferóis e ácidos orgânicos foram negativamente afetados pela salinidade em todas as cultivares. No entanto, a ligeira redução do ácido oxálico é considerada benéfica devido aos efeitos antinutricionais deste composto.

A atividade antioxidante variou nos ensaios avaliados, para o ensaio TBARS, o tratamento controlo apresentou maior atividade (menor EC₅₀). Por outro lado, os resultados do ensaio OxHLIA, indicam que a elevada salinidade pode aumentar a atividade antioxidante para as cultivares específicas (‘Dark-opal’ e ‘Basilico-rosso’).

Curiosamente, a maioria dos extratos apresentou elevada atividade antifúngica contra os fungos patogénicos testados, com valores de CMI e CMF semelhantes ou inferiores aos dos controlos positivos. Por conseguinte, poder-se-á concluir que o cultivo do manjeriço sob *stress* de salinidade moderado é uma opção viável, que permite a valorização de solos ligeiramente salinizados ou a utilização de água salobra. Contudo, são necessários mais estudos para identificar e seleccionar as cultivares que são adequadas para o cultivo em condições salinas.

No que se refere aos efeitos da fertilização com N, encontrar o equilíbrio certo entre rendimento, valor nutricional e bioatividade em plantas aromáticas como o manjeriço pode ser um desafio devido à complexa interação entre a cultivar e as condições ambientais.

O presente estudo contribui para aumentar significativamente o nosso conhecimento sobre a complexa interação do N, um dos nutrientes mais importantes no rendimento, perfil químico, e bioatividade das cultivares avaliadas.

O estudo revelou um impacto interativo significativo de ambos os fatores (cultivar \times N). As folhas de cor púrpura, apresentavam um perfil nutricional e bioativo elevado, apresentando teores elevado de α -, γ -, δ - e tocoferóis totais, percentagem elevada de PUFA's e menor razão de $n-6/n-3$, juntamente com teores elevado de flavonoides totais e compostos fenólicos totais, o que resultou numa elevada atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos.

No entanto, o perfil químico de cada cultivar foi modulado pela concentração de N, e enquanto os teores de compostos fenólicos totais diminuíram com o aumento da concentração de N, os teores de α -, γ -, δ - e tocoferóis totais aumentaram nas plantas fertirrigadas com 200 ppm e diminuíram nas que receberam 600 ppm.

Do mesmo modo, o teor de ácidos gordos e PUFA aumentaram nas plantas fertirrigadas com 200 ppm, e apresentaram a menor razão de $n-6/n-3$ nas cultivares de manjeriço avaliadas, com exceção do manjeriço 'Dark-opal' que apresentou o melhor perfil de ácidos gordos e a menor razão de $n-6/n-3$ quando fertirrigado com 400 ppm.

As plantas fertirrigadas com 200 ppm apresentaram melhor atividade antioxidante, especialmente no caso dos extratos das cultivares 'Dark-opal' e 'Red-basil', enquanto que todas as cultivares apresentaram elevada atividade antibacteriana e antifúngica, independentemente da concentração de N.

5.2. Perspectivas Futuras

Em futuros trabalhos seria interessante avaliar um conjunto mais alargado de cultivares, bem como a interação dos fatores ambientais e culturais, que podem ter um impacto significativo na composição química e propriedades bioativas, como por exemplo o fotoperíodo, exposição solar, tempo de colheita, macro e micronutrientes, entre outros. Tentar correlacionar estes dados através de programas específicos de estatística.

Avaliar as biodisponibilidades dos compostos nutracêuticos das cultivares de manjeriço em simuladores de digestão, para medir o real impacto na alimentação humana e como potenciar a absorção metabólica.

Comprovar outras características medicinais, como as propriedades anticancerígenas, em ensaios laboratoriais com linhas diferenciadas de células tumorais. Procurando possíveis associações com outras plantas, que potenciem o efeito, com base na etnofarmacologia botânica.

BIBLIOGRAFIA

- Ababutain, I. M. (2019). Antimicrobial Activity and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of Saudi Arabian *Ocimum basilicum* Leaves Extracts. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13, 823–833.
- Aguiar, C. F. (2018). *Manual de Botânica. Volume I - Estrutura e reprodução: Vol. I* (pp. 22, 97, 105.). Instituto Politécnico de Bragança.
- Ahmed, A. F., Attia, F. A. K., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, 184, 1–7.
- Asthana, J., Pant, A., Yadav, D., Lal, R. K., Gupta, M. M., & Pandey, R. (2015). *Ocimum basilicum* (L.) and *Premna integrifolia* (L.) modulate stress response and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Industrial Crops and Products*, 76, 1086–1093.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740.
- Becker, C., Urli, B., Juki, M., & Kläring, H. (2015). Nitrogen Limited Red and Green Leaf Lettuce Accumulate Flavonoid Glycosides, Caffeic Acid Derivatives, and Sucrose while Losing Chlorophylls, B-Carotene and Xanthophylls. *PLoS ONE*, 1–22.
- Beszterda, M., & Nogala-Kałucka, M. (2019). Current Research Developments on the Processing and Improvement of the Nutritional Quality of Rapeseed (*Brassica napus* L.). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121, 1–18.
- Bione, M. A. A., Paz, V. P. da S., Silva, F. da, Ribas, R. F., & Soares, T. M. (2014). Crescimento e produção de manjericão em sistema hidropônico NFT sob salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18, 1228–1234.
- Carocho, M., Barros, L., Barreira, J. C. M., Calhelha, R. C., Soković, M., Fernández-Ruiz, V., Buelga, C. S., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Basil as functional and preserving ingredient in “serra da Estrela” cheese. *Food Chemistry*, 207, 51–59.
- Carvalho, Isabel; Teixeira, Mónica; Brodelius, M. (2009). Effect of salt stress on Purslane and Potential Health Benefits: Oxalic Acid and Fatty Acids Profile. In UC Davis (Ed.), *The proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI*.

- Chatziagianni, M., Ntatsi, G., Theodorou, M., Stamatakis, A., Livieratos, I., Roupael, Y., & Savvas, D. (2019). Functional Quality, Mineral Composition and Biomass Production in Hydroponic Spiny Chicory (*Cichorium spinosum* L.) Are Modulated Interactively by Ecotype, Salinity and Nitrogen Supply. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–14.
- Cole, T., Hilger, H., & Stevens, P. (2017). *Angiosperm phylogeny poster - Flowering plant systematics*.
- Da Costa, A. S., Arrigoni-Blank, M. D. F., Carvalho Filho, J. L. S. De, De Santana, A. D. D., Santos, D. D. A., Alves, P. B., & Blank, A. F. (2014). Chemical diversity in basil (*Ocimum* sp.) Germplasm. *Scientific World Journal*, *2015*, 1–9.
- Danso-Boateng, E. (2013). Effect of drying methods on nutrient quality of basil (*Ocimum viride*) leaves cultivated in Ghana. *International Food Research Journal*, *20*, 1569–1573.
- De Masi, L., Siviero, P., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F., & Laratta, B. (2006). Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Food Research and Technology*, *223*, 273–281.
- Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition* (pp. 142–147, 150, 167–226, 292, 307, 311, 315, 346.). John Wiley & Sons, LTD.
- Dias, A., Neto, D. A., Menezes, R. V., Gheyi, H. R., Conceição, P. C., Mitsue, A., Cova, W., Ribas, R. F., & Ribeiro, M. D. O. (2019). Salt-induced changes in solutes, pigments and essential oil of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes under hydroponic cultivation. *Australian Journal of Crop Science*, *13*, 1856–1864.
- Eltarabily, M. G., Bali, K. M., Negm, A. M., & Yoshimura, C. (2019). Evaluation of root water uptake and urea fertigation distribution under subsurface drip irrigation. *Water (Switzerland)*, *11*, 1–15.
- Fernandes, F., Pereira, E., Cirić, A., Soković, M., Calhelha, R. C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens* leaves (red rubin basil): A source of bioactive compounds and natural pigments for the food industry. *Food and Function*, *10*, 3161–3171.
- Fitoterapia.net. (2020). *O. basilicum* L.- *Albahaca*.
<https://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/index.html?planta=109>
- Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago, A., & Pérez-Álvarez, E. P. (2017). Phenolic compounds: Types, effects and research. *Phenolic Compounds: Types, Effects and Research*, 1–245.
- Ghoora, M. D., Babu, D. R., & Srividya, N. (2020). Nutrient composition, oxalate content and

- nutritional ranking of ten culinary microgreens. *Journal of Food Composition and Analysis*, *91*, 103495.
- Hiltunen, R., & Holm, Y. (2006). Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. In R. Hardman (Ed.), *Basil - The Genus Ocimum* (1st ed., pp. 1–39, 67–136). Harwood Academic publishers.
- Incrocchi, L., Carmassi, G., Maggini, R., Poli, C., Saidov, D., Tamburini, C., Kiferle, C., Perata, P., & Pardossi, A. (2019). Iodine accumulation and tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) with green or purple leaves grown in floating system technique. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1494.
- Inoue, T., Tatemori, S., Muranaka, N., Hirahara, Y., & Homma, S. (2012). The Identification of Vitamin E Homologues in Medicinal Plant Samples Using ESI(+)-LC-MS3. *Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 9581–9588.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P., & Vivanco, J. M. (2002). Chemical Characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Found in Local Accessions and Used in Traditional Medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5878–5883.
- Jensen, N. B., Clausen, M. R., & Kjaer, K. H. (2018). Spectral quality of supplemental LED grow light permanently alters stomatal functioning and chilling tolerance in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Scientia Horticulturae*, *227*, 38–47.
- Kaur, G., Singla, N., & Singh, A. (2019). Effect of Vacuum Drying on Nutrient Retention of Some Commonly Consumed Herbs. *Studies on Ethno-Medicine*, *13*, 62–70.
- Kumar, Nitish. (2018). Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants - Conservation, Genetic Improvement and Utilization. In *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*. Springer Nature.
- Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, *128*, 1044–1050.
- Lee, J., & Scagel, C. F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, *115*, 650–656.
- Lockwood, B. (2007). Foods or medicines? The relationship between nutraceuticals, foods and medicines. In *Nutraceuticals* (2nd ed., pp. 1–5). Pharmaceutical Press.
- Maia, S. S. S., da Silva, R. C. P., de Oliveira, F. de A., da Silva, O. M. do P., da Silva, A. C., & Candido, W. dos S. (2017). Responses of basil cultivars to irrigation water salinity.

- Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21, 44–49.
- Majdi, C. P. C., Maria Inês Dias, R. C. C., & Maria José Alves, Boutayna Rhourri-Frih, Zoubida Charrouf, Lillian Barros, J. S. A. and I. C. F. R. F. (2020). Phytochemical Characterization and Bioactive. *Antioxidants*, 2, 1–17.
- Makri, O., & Kintzios, S. (2008). *Ocimum sp.* (Basil): Botany, Cultivation, Pharmaceutical Properties, and Biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, May, 37–41.
- Malerbo-Souza, D. T., Mota, M. O. S., Nogueira-Couto, R. H., & Souza, J. C. (2000). Insetos associados a inflorescencias do manjericao (*Ocimum basilicum* L.). In *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* (Vol. 2, Issue 2, pp. 27–30).
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5, 1113–1124.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: Bringing them together. In *New Phytologist* (Vol. 167, Issue 3, pp. 645–663).
- Murillo-amador, B., Nieto-garibay, A., Troyo-diéguez, E., Flores-hernández, A., Cordoba-matson, M. V, & Villegas-espinoza, A. (2013). *Proximate analysis among Ocimum cultivars under two cultivation environments: A comparative study*. 11, 2842 - 2848.
- Nadeem, F., Hanif, M. A., Bhatti, I. A., Jilani, M. I., & Al-Yahyai, R. (2020). Medicinal Plants of South Asia - Novel sources for drug discovery. In M. A. Hanif, M. M. Khan, H. Nawaz, & H. J. Byrne (Eds.), *Elsevier* (1st ed., pp. 47–62). Elsevier Ltd.
- Naiji, M., & Souiri, M. K. (2018). Nutritional value and mineral concentrations of sweet basil under organic compared to chemical fertilization. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 17, 167–175.
- Nguyen, P. M., & Niemeyer, E. D. (2008). Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8685–8691.
- Obodai, M., Mensah, D. L. N., Fernandes, Â., Kortei, N. K., Dzomeku, M., Teegarden, M., Schwartz, S. J., Barros, L., Prempeh, J., Takli, R. K., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Chemical characterization and antioxidant potential of wild ganoderma species from Ghana. *Molecules*, 22, 1–18.

- Oppel, M. (2008). Basil - review of the diversity of the genus *Ocimum*. *HerbalClip*, HC# 040682. Retrieved from <http://cms.herbalgram.org/herbclip/360/review040682-360.html>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4056–4075.
- Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). A Comparison of the Nutritional Contribution of Thirty-nine Aromatic Plants used as Condiments and/or Herbal Infusions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 176–183.
- Petropoulos, S. A., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Di Gioia, F., Kolovou, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical composition and bioactive properties of *Cichorium spinosum* L. in relation to nitrate/ammonium nitrogen ratio. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 6741–6750.
- Petropoulos, S. A., Fernandes, Â., Dias, M. I., Pereira, C., Calhelha, R. C., Chrysargyris, A., Tzortzakis, N., Ivanov, M., Sokovic, M. D., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020b). Chemical composition and plant growth of *Centaurea raphanina* subsp. *mixta* plants cultivated under saline conditions. *Molecules*, 25, 1–26.
- Petropoulos, S. A., Fernandes, Â., Dias, M. I., Vasilakoglou, I. B., Petrotos, K., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Nutritional value, chemical composition and cytotoxic properties of common purslane (*Portulaca oleracea* L.) in relation to harvesting stage and plant part. *Antioxidants*, 8, 1–15.
- Petropoulos, S. A., Levizou, E., Ntatsi, G., Fernandes, Â., Petrotos, K., Akoumianakis, K., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Salinity effect on nutritional value, chemical composition and bioactive compounds content of *Cichorium spinosum* L. *Food Chemistry*, 214, 129–136.
- Petropoulos, S. A., Xyrafis, E., Polyzos, N., Antoniadis, V., Fernandes, Â., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020a). The optimization of nitrogen fertilization regulates crop performance and quality of processing tomato (*Solanum lycopersicum* l. cv. heinz 3402). *Agronomy*, 10, 1–19.
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Karkanis, A., Antoniadis, V., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Nutrient solution composition and growing season affect yield and chemical composition of *Cichorium spinosum* plants. *Scientia Horticulturae*, 231, 97–107.
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Karkanis, A., Ntatsi, G., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Successive harvesting affects yield, chemical composition and antioxidant activity

- of *Cichorium spinosum* L. *Food Chemistry*, 237, 83–90.
- Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy. (2016). *The Ayurvedic Pharmacopoeia of India* (Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy (ed.); Vol. 1). Government of India - Ministry of Ayush.
- Primi, R., Ruggeri, R., Ronchi, B., Bernabucci, U., Rossini, F., Martin-Pedrosa, M., & Danieli, P. P. (2019). Sowing date and seeding rate affect bioactive compound contents of chickpea grains. *Animals*, 9, 1–11.
- Rajkumari, S., & Sanatombi, K. (2018). In Vitro Production of Some Important Secondary Metabolites from Zingiber Species. In Nitish Kumar (Ed.), *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants - Conservation, Genetic Improvement and Utilization* (pp. 213–234). Springer Nature.
- Ribas, J. C. R., Matumoto-Pintro, P. T., Vital, A. C. P., Saraiva, B. R., Anjo, F. A., Alves, R. L. B., Santos, N. W., Machado, E., Agostinho, B. C., & Zeoula, L. M. (2019). Influence of basil (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) addition on functional, technological and sensorial characteristics of fresh cheeses made with organic buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5214–5224.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Horie, T., & Shabala, S. (2019). Doing ‘business as usual’ comes with a cost: evaluating energy cost of maintaining plant intracellular K⁺ homeostasis under saline conditions. *New Phytologist*, 1097–1104.
- Saini, R. K., & Keum, Y. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids : Dietary sources , metabolism , and signi fi cance — A review. *Life Sciences*, 203, 255–267.
- Sarmiento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Valorization of traditional foods: Nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 179–185.
- Scagel, C. F., & Lee, J. (2012). Phenolic composition of basil plants is differentially altered by plant nutrient status and inoculation with mycorrhizal fungi. *HortScience*, 47, 660–671.
- Scagel, C. F., Lee, J., & Mitchell, J. N. (2019). Salinity from NaCl changes the nutrient and polyphenolic composition of basil leaves. *Industrial Crops and Products*, 127, 119–128.
- Seczyk, L., Król, B., & Kolodziej, B. (2020). In vitro bioaccessibility and activity of Greek oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum (Link) Ietswaart) compounds as affected by nitrogen fertilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 2410–241
- Sgherri, C., Cecconami, S., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., & Izzo, R. (2010). Levels of

- antioxidants and nutraceuticals in basil grown in hydroponics and soil. *Food Chemistry*, *123*, 416–422.
- Sgherri, C., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., & Izzo, R. (2011). Contribution of major lipophilic antioxidants to the antioxidant activity of basil extracts: An EPR study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*, 1128–1134.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, *January*, 1–37.
- Shasany, A. K., & Chittaranjan, K. (2018). *The Ocimum Genome*. Springer Nature B V.
- Shen, Y., Prinyawiwatkul, W., Lotrakul, P., & Xu, Z. (2015). Comparison of phenolic profiles and antioxidant potentials of the leaves and seeds of Thai holy and sweet basil. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*, 1651–1657.
- Silpa, P., Roopa, K., & Dennis Thomas, T. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Current Status and Future Prospects. In Nithish Kumar (Ed.), *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants - Conservation, Genetic Improvement and Utilization* (pp. 3–6). Springer Nature.
- Siti Mahirah, Y., Rabeta, M. S., & Antora, R. A. (2018). Effects of different drying methods on the proximate composition and antioxidant activities of ocimum basilicum leaves. *Food Research*, *2*, 421–428.
- Smith, T., Eckl, V., Morton, C., Gillespie, M., & Knepper, J. (2019). Herbal supplement sales in US increase 9,4% in 2018. *HerbalGram*, *123*, 62–73. Retrieved from www.herbalgram.org
- Suanarunsawat, T., Anantasomboon, G., & Piewbang, C. (2016). Anti-diabetic and anti-oxidative activity of fixed oil extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in diabetic rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *11*, 832–840.
- Tarchoune, I., Baâtour, O., Harrathi, J., Hamdaoui, G., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., & Marzouk, B. (2013). Effects of two sodium salts on fatty acid and essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, *35*, 2365–2372.
- Theplantlist. (2020). *O. basilicum* L. - *The Plant List*. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Ocimum+basilicum>
- Trajano, A., & Albuquerque, P. (2018). South American Biodiversity and Its Potential in Medicinal and Aromatic Plants. In U. Paulino Albuquerque, U. Patil, & Á. Máthé (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants of South America* (1st ed., pp. 3–10). Springer Nature.
- Tropicos. (2020). *O. basilicum* L. - *Tropicos*. Retrieved from

- <http://www.tropicos.org/Name/17600210>
- USDA. (2020). *O. basilicum* L.- USDA 2020.
<https://www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=OCBA>
- UTAD. (2020). *O. basilicum* L.- Jardim Botânico UTAD.
https://jb.utad.pt/especie/Ocimum_basilicum
- Vishwanathan, A. S. (2018). Ethnobotany: A Bridge Between Traditional Knowledge and Biotechnological Studies on Medicinal and Aromatic Plants. In Nitish Kumar (Ed.), *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants - Conservation, Genetic Improvement and Utilization* (pp. 383–393). Springer Nature.
- Yaniv, Z. (2014). Introduction: Medicinal Plants in Ancient Traditions. In Z. Yaniv & N. Dudais (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East* (1st ed., pp. 1–8). Springer Nature B V.
- Zhan, Y., An, X., Wang, S., Sun, M., & Zhou, H. (2019). Basil polysaccharides: A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28, 115179.

ANEXOS

Nos anexos apresentam-se as tabelas suplementares de ácidos gordos em relação aos níveis de salinidade e nitrogénio aplicados.

ANEXO 1 – Tabela suplementar de ácidos gordos

Tabela A1. Composição (%) dos Ácidos Gordos nas cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de salinidade aplicados (média ± DP, n=3).

	'Dark-opal'			'Red-basil'			Rosso		
	Controlo	S1	S2	Controlo	S1	S2	Controlo	S1	S2
C12:0	0,067±0,001	0,057±0,002	0,030±0,001	0,122±0,001	0,144±0,003	0,109±0,009	0,140±0,005	0,184±0,001	0,143±0,001
C13:0	3,35±0,01	3,82±0,07	2,22±0,07	2,75±0,01	3,53±0,01	3,37±0,05	2,94±0,01	0,91±0,06	0,540±0,008
C14:0	0,326±0,003	0,34±0,02	0,261±0,006	0,348±0,008	0,450±0,005	0,399±0,002	0,271±0,004	0,444±0,003	0,342±0,001
C15:0	0,300±0,004	0,32±0,01	0,249±0,003	0,354±0,005	0,426±0,003	0,359±0,006	0,282±0,004	0,254±0,001	0,249±0,006
C15:1	0,25±0,01	0,441±0,004	0,73±0,03	0,928±0,004	0,84±0,01	1,03±0,01	0,94±0,02	0,860±0,008	0,848±0,007
C16:0	21,17±0,01	21,8±0,4	20,9±0,2	19,6±0,1	22,85±0,01	22,07±0,33	19,84±0,01	30,16±0,06	29,86±0,01
C16:1	3,92±0,01	3,1±0,2	3,6±0,1	2,63±0,01	2,88±0,01	2,88±0,03	3,02±0,01	0,89±0,06	0,654±0,007
C17:0	1,45±0,05	1,40±0,02	1,62±0,07	1,62±0,01	1,85±0,03	1,76±0,07	1,71±0,04	0,34±0,01	0,346±0,001
C18:0	4,33±0,01	4,0±0,1	3,27±0,02	3,55±0,03	4,12±0,01	3,93±0,04	4,04±0,01	3,58±0,06	3,53±0,01
C18:1n9c	3,06±0,04	3,32±0,03	2,78±0,05	3,28±0,02	3,97±0,05	3,75±0,03	3,37±0,01	3,44±0,01	3,93±0,01
C18:2n6c	14,94±0,02	18,29±0,02	18,72±0,03	14,4±0,3	15,3±0,1	16,3±0,3	12,6±0,1	10,3±0,1	10,67±0,04
C18:3n3	42,14±0,05	40,5±0,3	44,0±0,1	49,2±0,1	42,2±0,1	42,4±0,1	49,2±0,1	47,3±0,1	47,59±0,06
C20:2	0,829±0,004	0,54±0,01	0,472±0,004	0,436±0,001	0,51±0,01	0,704±0,003	0,756±0,001	0,448±0,008	0,423±0,004
C23:0	2,66±0,01	1,06±0,09	0,57±0,01	0,313±0,001	0,447±0,008	0,404±0,001	0,396±0,001	0,63±0,02	0,66±0,02
C24:0	1,23±0,03	1,02±0,04	0,58±0,02	0,439±0,006	0,495±0,008	0,511±0,009	0,46±0,02	0,230±0,007	0,247±0,008
SFA	33,65±0,05	32,8±0,5	29,1±0,2	28,7±0,2	33,8±0,1	32,4±0,4	29,6±0,1	36,5±0,1	35,7±0,1
MUFA	8,46±0,01	7,8±0,3	7,7±0,1	7,3±0,1	8,2±0,1	8,2±0,1	7,8±0,1	5,4±0,1	5,7±0,1
PUFA	57,91±0,06	59,3±0,3	63,2±0,1	64,1±0,2	58,0±0,1	59,4±0,4	62,6±0,1	58,1±0,1	58,7±0,1

C12:0 - ácido láurico; Ácido C13:0 – ácido tridecanóico; C14:0 - ácido mirístico; C15:0 - ácido pentadecanóico; C15:1 - ácido 1-pentadecenóico; C16:0 - ácido palmítico; C16:1 - ácido palmitoléico; C17:0 – ácido heptadecanóico; C18:0 - ácido esteárico; C18:1n9c - ácido oleico; C18:2n6c - ácido linoléico; C18:3n3 - ácido alfa-linolénico; C20:2 - ácido eicosadienóico; C23:0 - ácido tricosanóico; C24:0 - ácido lignocérico; SFA - Ácidos gordos saturados; MUFA - ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - Ácidos gordos polinsaturados.

Tabela A2. Composição (%) dos Ácidos Gordos nas cultivares de manjeriço estudadas em relação aos níveis de nitrogénio (ppm) aplicados (média \pm DP, $n=3$).

	'Dark-opal'				'Red-basil'			
	0 ppm N	200 ppm N	400 ppm N	600 ppm N	0 ppm N	200 ppm N	400 ppm N	600 ppm N
C12:0	0,052 \pm 0,005	0,068 \pm 0,001	0,096 \pm 0,003	0,114 \pm 0,001	0,194 \pm 0,007	0,125 \pm 0,001	0,145 \pm 0,004	0,144 \pm 0,003
C13:0	1,14 \pm 0,02	3,48 \pm 0,04	2,53 \pm 0,01	2,33 \pm 0,01	1,04 \pm 0,07	2,70 \pm 0,04	2,44 \pm 0,01	2,47 \pm 0,06
C14:0	0,242 \pm 0,007	0,358 \pm 0,008	0,240 \pm 0,005	0,249 \pm 0,003	0,353 \pm 0,001	0,332 \pm 0,001	0,239 \pm 0,004	0,249 \pm 0,006
C15:0	0,130 \pm 0,007	0,297 \pm 0,006	0,347 \pm 0,004	0,370 \pm 0,006	0,244 \pm 0,003	0,280 \pm 0,006	0,370 \pm 0,007	0,344 \pm 0,003
C15:1	0,39 \pm 0,01	0,273 \pm 0,009	0,86 \pm 0,03	0,869 \pm 0,008	0,48 \pm 0,01	0,877 \pm 0,002	0,647 \pm 0,001	0,624 \pm 0,003
C16:0	20,9 \pm 0,2	21,8 \pm 0,2	20,5 \pm 0,7	19,87 \pm 0,07	18,89 \pm 0,05	19,4 \pm 0,1	18,06 \pm 0,01	17,78 \pm 0,08
C16:1	2,15 \pm 0,01	4,17 \pm 0,08	2,76 \pm 0,02	2,7 \pm 0,1	3,58 \pm 0,08	2,46 \pm 0,01	3,28 \pm 0,06	3,44 \pm 0,02
C17:0	1,49 \pm 0,01	1,56 \pm 0,01	1,54 \pm 0,02	1,67 \pm 0,03	3,8 \pm 0,2	1,61 \pm 0,04	2,43 \pm 0,04	2,04 \pm 0,15
C18:0	7,5 \pm 0,1	4,09 \pm 0,05	4,1 \pm 0,2	3,8 \pm 0,3	3,26 \pm 0,02	3,73 \pm 0,01	3,38 \pm 0,07	3,16 \pm 0,04
C18:1n9c	4,3 \pm 0,1	3,02 \pm 0,09	3,48 \pm 0,07	3,46 \pm 0,04	3,37 \pm 0,02	3,30 \pm 0,06	3,09 \pm 0,01	3,72 \pm 0,01
C18:2n6c	14,6 \pm 0,4	15,2 \pm 0,2	13,4 \pm 0,4	14,4 \pm 0,4	14,17 \pm 0,07	14,06 \pm 0,07	14,29 \pm 0,06	15,13 \pm 0,01
C18:3n3	44,6 \pm 0,3	41,8 \pm 0,1	48,9 \pm 0,2	49,08 \pm 0,04	48,6 \pm 0,4	50,03 \pm 0,06	50,08 \pm 0,07	49,3 \pm 0,1
C20:2	0,56 \pm 0,04	0,82 \pm 0,05	0,55 \pm 0,01	0,53 \pm 0,01	0,606 \pm 0,004	0,445 \pm 0,003	0,52 \pm 0,05	0,55 \pm 0,03
C23:0	0,63 \pm 0,05	2,37 \pm 0,01	0,39 \pm 0,04	0,373 \pm 0,009	0,759 \pm 0,008	0,373 \pm 0,008	0,63 \pm 0,02	0,537 \pm 0,008
C24:0	1,27 \pm 0,03	0,729 \pm 0,001	0,37 \pm 0,01	0,315 \pm 0,001	0,639 \pm 0,007	0,344 \pm 0,001	0,41 \pm 0,02	0,524 \pm 0,001
SFA	32,1 \pm 0,1	34,1 \pm 0,2	29,7 \pm 0,6	28,8 \pm 0,4	28,5 \pm 0,2	28,5 \pm 0,1	27,69 \pm 0,02	26,7 \pm 0,1
MUFA	8,2 \pm 0,1	8,2 \pm 0,2	7,5 \pm 0,1	7,3 \pm 0,1	8,12 \pm 0,1	7,0 \pm 0,1	7,43 \pm 0,04	8,31 \pm 0,02
PUFA	59,7 \pm 0,2	57,8 \pm 0,4	62,8 \pm 0,6	64,0 \pm 0,5	63,3 \pm 0,4	64,5 \pm 0,1	64,9 \pm 0,1	65,0 \pm 0,1

Tabela A2. continuação

	'Basilico-rosso'				'Mitikas'			
	0 ppm N	200 ppm N	400 ppm N	600 ppm N	0 ppm N	200 ppm N	400 ppm N	600 ppm N
C12:0	0,174±0,001	0,159±0,006	0,198±0,006	0,162±0,004	0,195±0,003	0,160±0,006	0,161±0,002	0,179±0,001
C13:0	0,539±0,006	2,35±0,01	2,94±0,01	3,26±0,09	2,27±0,07	2,76±0,01	2,77±0,05	3,03±0,01
C14:0	0,669±0,007	0,37±0,01	0,344±0,002	0,365±0,004	0,500±0,008	0,260±0,008	0,29±0,02	0,337±0,006
C15:0	0,248±0,008	0,251±0,001	0,240±0,009	0,39±0,01	0,789±0,009	0,370±0,008	0,356±0,002	0,315±0,002
C15:1	0,465±0,001	0,835±0,001	0,541±0,009	1,07±0,03	0,62±0,03	0,95±0,01	1,05±0,01	0,87±0,05
C16:0	21,5±0,5	18,43±0,01	20,5±0,8	20,3±0,6	27,36±0,01	19,12±0,06	19,8±0,2	21,2±0,6
C16:1	3,939±0,009	2,67±0,04	3,52±0,01	3,8±0,1	10,5±0,1	7,14±0,01	7,05±0,07	6,66±0,23
C17:0	1,04±0,01	1,44±0,02	0,742±0,001	0,648±0,007	0,506±0,004	0,363±0,001	0,340±0,005	0,343±0,001
C18:0	5,14±0,01	3,86±0,02	3,84±0,02	3,76±0,06	6,16±0,03	2,70±0,08	2,97±0,01	3,045±0,003
C18:1n9c	4,18±0,08	3,64±0,02	4,15±0,01	3,15±0,02	4,0±0,2	2,18±0,07	2,58±0,07	2,63±0,05
C18:2n6c	15,5±0,2	13,3±0,1	15,2±0,1	13,17±0,05	13,4±0,3	14,0±0,6	14,45±0,04	13,7±0,2
C18:3n3	45,4±0,4	51,0±0,2	45,5±0,7	47,3±0,5	31,3±0,1	48,5±0,5	46,5±0,1	45,7±0,6
C20:2	0,311±0,004	0,85±0,03	1,00±0,01	1,27±0,05	0,68±0,04	0,434±0,002	0,466±0,002	0,630±0,008
C23:0	0,737±0,007	0,37±0,02	1,00±0,02	0,97±0,01	0,710±0,007	0,500±0,006	0,62±0,03	0,62±0,03
C24:0	0,259±0,004	0,450±0,005	0,299±0,004	0,39±0,03	1,00±0,01	0,529±0,008	0,61±0,04	0,67±0,01
SFA	30,0±0,5	27,2±0,1	29,8±0,8	29,9±0,6	38,5±0,1	26,2±0,1	27,3±0,2	29,1±0,6
MUFA	8,8±0,1	7,6±0,1	8,5±0,1	8,4±0,1	16,2±0,3	10,8±0,1	11,3±0,1	10,8±0,2
PUFA	61,2±0,6	65,2±0,1	61,7±0,8	61,8±0,6	45,3±0,3	63,0±0,1	61,4±0,1	60,1±0,8