



Maria João Primitivo dos Reis

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Caracterização da atividade antioxidante e antimicrobiana da *Helichrysum italicum* – Estudo da viabilidade de incorporação em novos produtos alimentares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientador: Prof. Doutor Fernando Reboredo, FCT-UNL

Co-orientador: Prof. Doutora Vânia Ribeiro, ESSLEI-IPL

Setembro 2018



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Maria João Primitivo dos Reis

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Caracterização da atividade antioxidante e antimicrobiana da *Helichrysum italicum* – Estudo da viabilidade de incorporação em novos produtos alimentares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientador: Prof. Doutor Fernando Reboredo, FCT-UNL

Co-orientador: Prof. Doutora Vânia Ribeiro, ESSLEI-IPL

Setembro 2018



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Caracterização da atividade antioxidante e antimicrobiana da *Helichrysum italicum* – Estudo da viabilidade de incorporação em novos produtos alimentares

Copyright © Maria João Primitivo dos Reis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Henrique Reboredo, pela exigência que sempre demonstrou e que me levou a procurar e a fazer sempre mais.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro, pela presença constante ao longo de todo este projeto e pela rapidez e segurança de resposta a todas as minhas dúvidas.

À Professora Doutora Ana Cristina Rodrigues, pela sua experiência e conhecimento na área de microbiologia, e pela sua disponibilidade para responder a qualquer outra questão.

À Professora Doutora Daniela Vaz, pelo enriquecimento deste trabalho, dando a oportunidade de realizar testes de viabilidade celular no departamento de Química da Universidade de Coimbra.

À Professora Fernanda Pessoa, pelo acompanhamento e apoio que prestou para este trabalho.

Ao Professor Mauro Guerra do departamento de Física da FCT/UNL, pela disponibilidade de acompanhamento das análises dos minerais

À equipa que me recebeu com toda a disponibilidade e empenho na Universidade de Coimbra, a Professora Doutora Maria João Moreno, a Doutora Patrícia Martins e a Cristiana pires.

À técnica de laboratório Maria Rodrigues, pela boa receção e atendimento às minhas dúvidas, durante grande parte da investigação realizada no Instituto Politécnico de Leiria.

Às pessoas que estiveram sempre comigo. À minha família, em particular os meus pais, que me apoiam e incentivam incondicionalmente. Aos meus amigos que me acompanham desde o secundário, e aos mais recentes, com especial atenção para os que seguiram o meu trabalho mais de perto, nunca me deixando vacilar, a Catarina Brito, a Sofia Santoalha, a Laura Fidalgo, a Inês Santos, a Marta Caldeira e o André Vidigueira.

Resumo

A espécie *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, comumente designada por erva-caril ou perpétua-das-areias, é uma planta característica do sul da Europa, existindo também ao longo da costa portuguesa. As flores secas são comumente utilizadas na medicina tradicional, especialmente como cloróticos e diuréticos. Os metabolitos secundários produzidos por esta espécie dão-lhe um alto valor medicinal, nomeadamente pela sua composição, pela quantidade de óleos essenciais, alcaloides, terpenóides, compostos fenólicos e péptidos. Vários estudos indicam que os seus compostos fenólicos poderão apresentar ação sobre diferentes problemas de saúde, tais como doenças coronárias, enfartes e alguns tipos de cancro.

Neste trabalho utilizaram-se diferentes extratos, em acetona a 70% e infusões, feitos a partir da flor de *H. italicum*. Verificou-se que esses extratos possuíam uma elevada capacidade antioxidante e um alto teor de polifenóis, quando comparada com algumas especiarias comerciais, caril e açafraão-das-índias. Nos extratos em acetona a 70% verificou-se atividade antimicrobiana sobre diferentes estirpes bacterianas. Também foi analisada a sua possível citotoxicidade, onde foram testadas diferentes concentrações de uma infusão em células da linha celular Caco-2, verificando-se uma baixa toxicidade. Pelas características analisadas, a *H. italicum* apresenta um grande potencial de incorporação em novos produtos alimentares, adicionando-lhes fitoquímicos e aromas distintos.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; capacidade antioxidante; citotoxicidade; *Helichrysum italicum*; teor de polifenóis.

Abstract

The species *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, commonly known as “curry-plant” and “everlasting”, is characteristically from southern Europe. Although it can also be found alongside the Portuguese coast. These dry flowers are frequently used in traditional medicine due to their use as chlorotic and diuretics. The secondary metabolites produced by this species gives it a high medicinal value. This is because of their composition—as well as amount of essential oils, alkaloids, terpenes, phenolic compounds and peptides. Moreover, numerous studies show that these phenolic compounds can act on different health issues, namely on coronary heart disease, strokes and cancer.

In this project, we used *H. italicum* extracts either in 70% acetone or as infusions. We found that these extracts possess a high antioxidant activity and a high polyphenols content when compared to other more commercial spices, such as curry and turmeric. Furthermore, the extracts in 70% acetone were found to have an antibacterial action against various bacterial strains. The cytotoxicity of this species was also tested using different concentrations of infusion extracts in a Caco-2 cell line. It was verified that its cytotoxicity is low. Altogether, the characteristics of *H. italicum* evince a great potential for its incorporation in food products, providing them with phytochemicals and distinct flavor.

Key words: antibacterial action; antioxidant activity; cytotoxicity; *Helichrysum italicum*; polyphenols content;

ÍNDICE DE MATÉRIAS

ÍNDICE DE MATÉRIAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
INTRODUÇÃO	1
<u>CAPÍTULO I : REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>3</u>
1. TAXONOMIA:	4
2. UTILIZAÇÃO TRADICIONAL:	6
3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA:	7
3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS:	9
3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS:	10
3.3. MINERAIS:	12
4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DA <i>H. ITALICUM</i> :	13
5. TOXICIDADE:	15
6. PRODUÇÃO:	15
<u>CAPÍTULO II : MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>17</u>
AMOSTRAGEM	18
PREPARAÇÃO DE EXTRATOS:	18
TESTE DE CONSUMIDOR:	27
ANALISE ESTATÍSTICA:	27
<u>CAPÍTULO III : RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>29</u>
1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE:	30
2. DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE POLIFENÓIS:	30
3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE:	33
4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA:	35
5. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL POR μ -FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X:	38
6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR:	42
7. INCORPORAÇÃO DE <i>H. ITALICUM</i> EM PRODUTOS PARA CONSUMO HUMANO:	44

<u>CAPÍTULO IV : CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS</u>	46
CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS:	47
BIBLIOGRAFIA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribuição das espécies <i>Helichrysum</i> de acordo com as sequências de cpDNA. (Adaptado de [10]).	5
Figura 1.2 Fotografia da <i>Helichrysum italicum</i> , tirada a 21/07/2018, S. Pedro de Moel.	6
Figura 1.3 Tipos de Compostos Fenólicos, adaptado de [18].	8
Figura 1.4 Estrutura química do arzanol [22].	9
Figura 1.5 Estrutura química do ácido quinico (a), ácido clorogénico (b) e ácido cafeico (c) [54][20][21].	10
Figura 1.6 Estrutura química de alpha-pineno (1), limoneno (2), nerol (3), nerilacetato (4) e nerilpropanoato (5) [22].	11
Figura 1.7 Estrutura química de alpha-selino (1), beta-selino (2), gama-curcumeno (3), trans-beta-cariofileno (4), eudesm-5-en-11-ol (5) [22].	11
Figura 2.1 Pastilha colocada no filme de Mylar e inserida no respetivo slide.	23
Figura 2.2 Sistema M4 Tornado (Espectrometria por Fluorescência de Raios-X).	24
Figura 3.1 Teor de Polifenóis Totais. a) comparação entre <i>H. italicum</i> , caril e açafão-das-índias; b) comparação entre extrato em acetona 70% de <i>H. italicum</i> das dunas e pinhal; c) comparação entre as infusões de <i>H. italicum</i> das dunas e pinhal.	32
Figura 3.2 Atividade antioxidante. a) comparação entre <i>H. italicum</i> , caril e açafão-das-índias; b) comparação entre extrato em acetona 70% de <i>H. italicum</i> das dunas e pinhal; c) comparação entre as infusões de <i>H. italicum</i> das dunas e pinhal.	35
Figura 3.3 Halos de inibição do crescimento bacteriano das diferentes estirpes (<i>Escherichia coli</i> (B1); <i>Staphylococcus epidermidis</i> (B2); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B3); <i>Enterococcus faecalis</i> (B4); <i>Staphylococcus aureus</i> (B5)) com os discos com os diferentes antibióticos Ciprofloxacina (CIP); Polimixina B (PB); Colistina (CT); ampicilina (AMP), 24h após a inoculação numa estufa a 37°C.	36
Figura 3.4 Efeitos do diferentes extrados (I- infusão 10 µL, II- Infusão 20 µL, III- Extrato com acetona 70% 10 µL, IV- Extrato com acetona 70% 20 µL) nas bactérias (<i>Escherichia coli</i> (B1); <i>Staphylococcus epidermidis</i> (B2); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B3); <i>Enterococcus faecalis</i> (B4); <i>Staphylococcus aureus</i> (B5)).	38

Figura 3.5 Placas analisadas no leitor de Elisa. 1-11 corresponde às diferentes concentrações do extrato, 1 mais concentrado, 11 menos concentrado. C corresponde aos poços de controlo.

42

Figura 3.6 Viabilidade celular obtida para as células Caco-2, avaliada pelo teste MTT, quando submetidas à presença (durante 6 horas de incubação) de diferentes concentrações de extrato de *H. italicum*.

43

Figura 3.7 Resultado do teste Hedónico para o controlo (Pantagrue! 70%) *C. officinalis* (Calêndulas), *H. italicum* (Perpétua) e *C. album* (Camarinha).

44

Figura 3.8 Resultado do teste de intensão de compra para o controlo (Pantagrue! 70%) *C. officinalis* (Calêndula), *H. italicum* (Perpétua) e *C. album* (Camarinha).

45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Distribuição geográfica das várias subespécies de *H. italicum*. (adaptação de [8]).
5

Tabela 2.1 Concentrações de extrato de *H. italicum* utilizadas no teste de viabilidade celular.
26

Tabela 2.2 Representação da distribuição da infusão liofilizada na placa de 96 poços, com as diferentes concentrações (representadas com os números de 1 a 11), os controlos (c) e os poços em branco vazios.
26

Tabela 3.1 Resultados do teor total de polifenóis obtidos pela técnica Folin-Ciocalteu em mg GAE/g flor para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos de acetona a 70%.
30

Tabela 3.2 Resultados do teor total de polifenóis obtidos pela técnica Folin Ciocalteu em mg GAE/g flor para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos aquosos (0,005 g/mL).
31

Tabela 3.3 Resultados do teor total de polifenóis obtidos pela técnica Folin-Ciocalteu em mg GAE/g especiarias para as diferentes especiarias testadas (Açafrão-das-Índias e Caril) em extratos de acetona a 70%.
31

Tabela 3.4 Resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS em mg/VEAC/g para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos de acetona a 70%.
33

Tabela 3.5 Resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS em mg VCEAC/200 mL para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos aquosos (0,005 g/mL).
34

Tabela 3.6 Resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS em mg/VEAC/g de especiarias para as diferentes especiarias testadas (Açafrão-das-Índias e Caril) em extratos de acetona a 70%.
34

Tabela 3.7 Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes selecionadas.
36

Tabela 3.8 Descrição dos efeitos inibitórios do extrato aquoso (infusão) e do extrato com acetona no desenvolvimento das bactérias (*Escherichia coli* (B1); *Staphylococcus epidermidis* (B2); *Pseudomonas aeruginosa* (B3); *Enterococcus faecalis* (B4); *Staphylococcus aureus* (B5)) 24h após a inoculação numa estufa a 37°C.

37

Tabela 3.9 Concentração dos diferentes elementos na flor de *H. italicum* recolhida em dois diferentes habitats. Os teores são expressos mg/kg± desvio padrão ou em %, caso do Ca e K; n=3. (Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%)

39

Tabela 3.10 Percentagem de viabilidade celular das células Caco-2 obtidas para cada concentração de extrato testada.

43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

AMP - Ampicilina

APG - *Angiosperm Phylogeny Group* (Grupo de Filogenia de Angiospérmicas)

CIP - Ciprofloxacina

CT - Colistina

DHC - Dihydrochalcone (Dihidrochalcona)

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E. coli - *Escherichia coli*

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

ECACC - *European Collection of Cell Cultures*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FBS - *Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino)

GAE - Equivalentes em ácido gálico

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

MHA - Muller-Hinton Agar

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]

NEAA - *Non-Essential Amino Acid* (Aminoácido não essencial)

OEs - Óleos essenciais

P - *P value*

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

PB - Polimixina B

PBS - *Phosphate Buffer Saline* (Tampão fosfato-salino)

ROS - *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

S. Epidermis - *Staphylococcus epidermidis*

TPC - Teor total de polifenóis

VCEAC - Capacidade Antioxidante equivalente em vitamina C

XRF - *X-Ray Fluorescence* (Fluorescência de Raios X)

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais estão cada vez mais em voga, captando por isso mesmo a atenção de diversas áreas como a cosmética e a alimentar. A indústria alimentar tem um papel preponderante sobre os alimentos que chegam aos consumidores. Na sociedade atual, os consumidores são cada vez mais exigentes, existindo um acréscimo na procura de alimentos nutricionalmente adequados e provenientes de processos sustentáveis [1].

Muitos dos benefícios alimentares das plantas medicinais são adquiridos, maioritariamente, pela utilização das mesmas em infusões, como é o caso da *Matricaria chamomilla* (camomila) e da *Equisetum arvense* (cavalinha). Pode-se também recorrer à produção de fitoquímicos, com o intuito de desenvolver potenciais alimentos funcionais. Ultimamente, tem-se notado uma tendência para aumentar a utilização de fitoquímicos, isto é, compostos bioativos naturalmente presentes em muitas plantas comuns, como nas bagas, folhas e frutos por exemplo [2][3]. Algumas das plantas silvestres comestíveis podem ter um elevado valor comercial ainda por explorar, tanto ao nível do desenvolvimento de medicamentos, como na produção de alimentos e bebidas benéficas para a saúde.

A espécie *Helichryum* é comercialmente conhecida pelos seus óleos essenciais, maioritariamente para a introdução dos mesmos em produtos de cosmética, loções, farmacêuticos, protetores solares e produtos para minimização dos sintomas de alergias, e menos utilizados, na produção de pratos na arte de culinária. O seu cultivo é por isso uma prática já comum. Em França são feitas produções biológicas que chegam aos 7,5 hectares de *H. italicum* para a utilização em produtos de cosmética pela sua fragância tão distinta [4]. A Croácia é também um grande produtor de *H. italicum*, com uma grande indústria de extração dos compostos voláteis das plantas, pelo que não é o único país europeu que aposta na produção de *H. italicum* sendo também muito estudada no mesmo.

A possibilidade de utilização da *H. italicum* numa vertente mais alimentar economicamente rentável e nutricionalmente favorável constitui assim uma oportunidade com um nicho de mercado ainda por desenvolver. Neste trabalho pretendeu-se explorar algumas das suas capacidades biológicas, como o teor de polifenóis totais, a capacidade antioxidante, comparando com algumas especiarias comerciais conhecidas, Açafrão-das-Índias (curcuma) e Caril (mistura de especiarias). Procurou-se também verificar a sua capacidade antimicrobiana e a sua viabilidade celular com a linha celular Caco-2.

Capítulo I : REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. TAXONOMIA:

As plantas angiospérmicas contribuem com cerca de 300000 espécies para o reino das plantas, todavia, a sua utilização mais comum é apenas para fim ornamental, pelo que a sua atividade biológica e fitoquímica tem sido bastante negligenciada. Apenas uma pequena parte deste número elevado de espécies tem sido profundamente estudado [5], existindo ainda um grande campo por explorar, que pode contribuir para a produção de produtos mais sustentáveis em diferentes áreas, como a alimentar, cosmética e farmacêutica.

Uma das maiores famílias de plantas com flor é a *Asteraceae*. Nela constam mais de 1600 géneros e perto de 23000 espécies. O género *Helichrysum* é relativamente conhecido. Nele estão contidas perto de 500 espécies distribuídas globalmente, surgindo nos continentes africano, asiático, australiano e europeu [6;7]. O nome *Helichrysum* tem origem grega, *helios* significa sol e *chrysos* ouro, palavras que descrevem a aparência de muitas das flores deste género, amarelas vivas [8].

As espécies do género *Helichrysum* são maioritariamente herbáceas, podendo ser também perenes ou arbustos. As suas folhas podem ser densas, oblongas a lanceoladas, ou simples [3]. Muitos dos membros desta grande família têm um elevado valor medicinal, ornamental e económico. Os extratos deste género são muito populares na medicina tradicional dos países onde ela se propaga devido à presença de compostos fenólicos, fitoaldeídos, α -piro derivados, terpinóis, óleos essenciais, voláteis e ácidos gordos [3]. Inúmeros estudos indicam que os seus compostos fenólicos poderão apresentar ação protetora sobre diferentes problemas de saúde, como doenças coronárias, enfartes e alguns tipos de cancros. Exibem também atividade anti-inflamatória, agentes estimulantes do sistema imunitário, antialérgicos, antiteratogénicos, antimicrobianos, anti trombóticos, antistress, anti hiperglicemia e efeitos vasodilatadores [3;6].

Quase 25 espécies são nativas da zona mediterrânea, sendo que 8 são originárias da Itália. Este trabalho pretende focar uma das suas espécies mais estudada, a *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, estando representadas na **Tabela 1.1** e **Figura 1.1**, a distribuição das subespécies mais prevalentes da zona do Mediterrâneo [7;8].

Tabela 1.1 Distribuição geográfica das várias subespécies de *H. italicum*. (adaptado de [7]).

Taxa	Distribuição
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don subsp. <i>italicum</i>	Bacia do Mediterrâneo
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (Willd.) Nyman	Ilhas Baleares, Sardenha, Córsega, Creta e Chipre
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>picardii</i> Franco	França, Itália, Portugal e Espanha
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>pseudolitoreum</i> (Fiori) Bacch. & al.	Itália
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>serotinum</i> (Boiss.) P.Fourn.	Península Ibérica
<i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>siculum</i> (Jord. & Fourn.) Galbany & al.	Itália

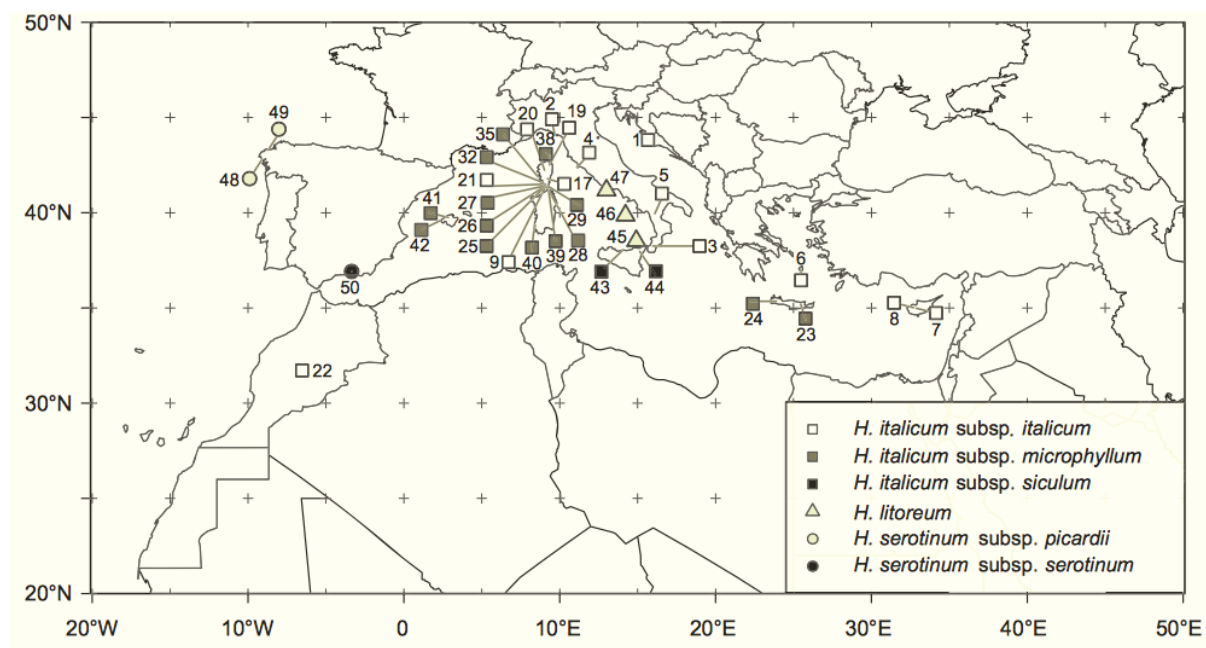


Figura 1.1 Distribuição das espécies do género *Helichrysum* de acordo com as sequências de cpDNA. (Adaptado de [9]).

A espécie *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don é uma planta aromática com uma altura que varia entre 30 e 70 cm. É especialmente conhecida na Europa, onde assume várias designações, como “perpétuas-das-areias”, “perpétuas-de-Itália”, “erva-do-caril”, “immortelle” ou “everlasting”. Possui um aroma intenso semelhante ao caril, mais concentrado na sua característica flor amarela que existe desde maio até ao final de setembro. É uma planta

xerófita, o que significa que está adaptada a ambientes onde a água é escassa, permitindo o seu crescimento e desenvolvimento em ambientes secos, arenosos e rochosos, perto de zonas costeiras e até mesmo em zonas acima dos 22000 metros de altura [8-10].

Na zona de Portugal pode-se encontrar a *Helichrysum italicum subsp. picardii Franco* (**Figura 1.2**) com maior facilidade. É um subarbusto amoitado, aromático e 12 a 33 cm, com caules angulosos, folhas inteiras estreitamente lineares, esverdeadas e tomentosas a glabrescentes ou raramente branco-tomentosas, capítulos reunidos num corimbo muito composto e denso, involúcro oblongo-cilíndrico a tubuloso-campanulado, de brácteas estreitas, numerosas e imbricadas, flores amarelas, tubulosas, as marginais femininas e as do disco hermafroditas e em maior número, cipselas castanho-escuras, ou com raras glândulas brancas e brilhantes [11].



Figura 1.2 Fotografia da *Helichrysum italicum*, tirada a 21/07/2018, S. Pedro de Moel.

2. UTILIZAÇÃO TRADICIONAL:

As espécies de *Helichrysum* têm tido muitas aplicações no que toca à formulação de produtos com fins medicinais e alimentares, podendo algumas das suas aplicações datar até 2000 anos atrás. Um dos primeiros registos da sua utilização como potencial medicamento, aparece no trabalho de Theophrastus de Eresos intitulado “*Historia Plantarum*”, no século 3-2 A.C na Grécia, onde era utilizada no tratamento de queimaduras e picadas ou mordeduras de animais venenosos [12]. É ainda possível encontrar relatórios da sua utilização em áreas menos expectáveis, por exemplo, para a produção de utensílios domésticos, como o caso de vassouras feitas a partir de várias plantas secas, que podem incluir a *H. italicum*, em alguns países europeus, como a Itália e a Bósnia [13].

Nos dias de hoje, o seu uso tradicional está ainda muito associado aos países europeus, muito provavelmente pela sua abundância e fácil acesso. Existem registos da sua utilização em países como a Itália, Espanha, Bósnia e Herzegovina, Croácia e até mesmo em Portugal [8]. Nestes países a utilização destas plantas recai maioritariamente sob o desenvolvimento de produtos com fins medicinais. Os medicamentos mais elementares têm como base tinturas, infusões, pós e outros tipos simples de formulações. As flores secas são comumente utilizadas como cloróticos, diuréticos, podendo tratar também de vários problemas de saúde, como alergias, constipações, tosse, problemas de pele, fígado e bexiga, inflamações, infeções e insónias. Esta planta possui potencialidades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antivirais e anti-HIV [8]. A sua utilização estende-se a problemas referentes ao trato-gastrointestinal, onde as partes aéreas da planta, como as flores, são as mais utilizadas, podendo ser utilizadas como alimento ou como preparações de remédios caseiros [7;12;14-16].

Como referido anteriormente, a subespécie *H. italicum* (Roth) G. Don subsp. *picardii* Franco é uma planta halófila facultativa encontrada no Sul da Europa, nomeadamente, em Portugal. Na medicina tradicional é utilizada sob a forma de infusões e decocções como analgésico, atuando sobre problemas dermatológicos, respiratórios e digestivos que tenham a ver com alergénios, infeções ou inflamações. No Algarve, esta planta é utilizada para diferentes fins. No mundo da culinária, são muito utilizadas para a aromatização de saladas, refeições e, mais especificamente, para temperar azeitonas. Os seus óleos essenciais são muito utilizados para realçar o sabor das frutas em doces, em produtos de panificação e, em alguns casos, refrigerantes [11]. Como nas outras partes da Europa, alguns Portugueses também beneficiam das suas propriedades medicinais, em particular, dos seus óleos essenciais. Estes têm ação antialérgica, anti-inflamatória e cicatrizante, e são também utilizadas para o tratamento de eczema, psoríase, acne, inflamação cutânea, urticária, escaras e como protetor solar [17].

A *H. italicum* subsp. *Picardii* poderá ter um elevado valor comercial ainda por explorar, quer no desenvolvimento de medicamentos, quer na produção de alimentos e bebidas com potenciais benefícios para a saúde. No entanto, é de notar que a maioria dos benefícios relacionados com as utilizações tradicionais ainda não foram testadas *in vivo*, pelo que não se sabe ao certo se funcionam, o que os influencia e se são seguros e livres de toxicidade [17;8].

3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA:

As plantas produzem um vasto reportório de metabolitos secundários como óleos essenciais, alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos (**Figura 1.3**) nos processos metabólicos normais. Estes metabolitos são muito importantes para a sobrevivência da própria planta, protegendo-a de infeções microbianas, pragas e radiação, enquanto atraem animais polinizadores e dispersores de sementes. Alguns deles são também importantes para promover o crescimento da própria planta. Até ao momento conhecem-se mais de 100000 metabolitos secundários,

sendo que, uma maioria tem funções ao nível do sistema imunitário da planta e exibindo atividade antimicrobiana. Os benefícios associados ao consumo de fitoquímicos estão relacionados com ações de sinergia entre os componentes bioativos da alimentação, micronutrientes e fitoquímicos. Por esta razão, existe muito interesse no seu estudo para a formulação de novos e mais eficazes medicamentos, que permitam ultrapassar o problema atual dos antibióticos e o desenvolvimento de patogénicos resistentes, diminuam a toxicidade na sua aplicação, que possa trazer uma diminuição de efeitos secundários comparativamente a medicamentos de síntese [15;18].

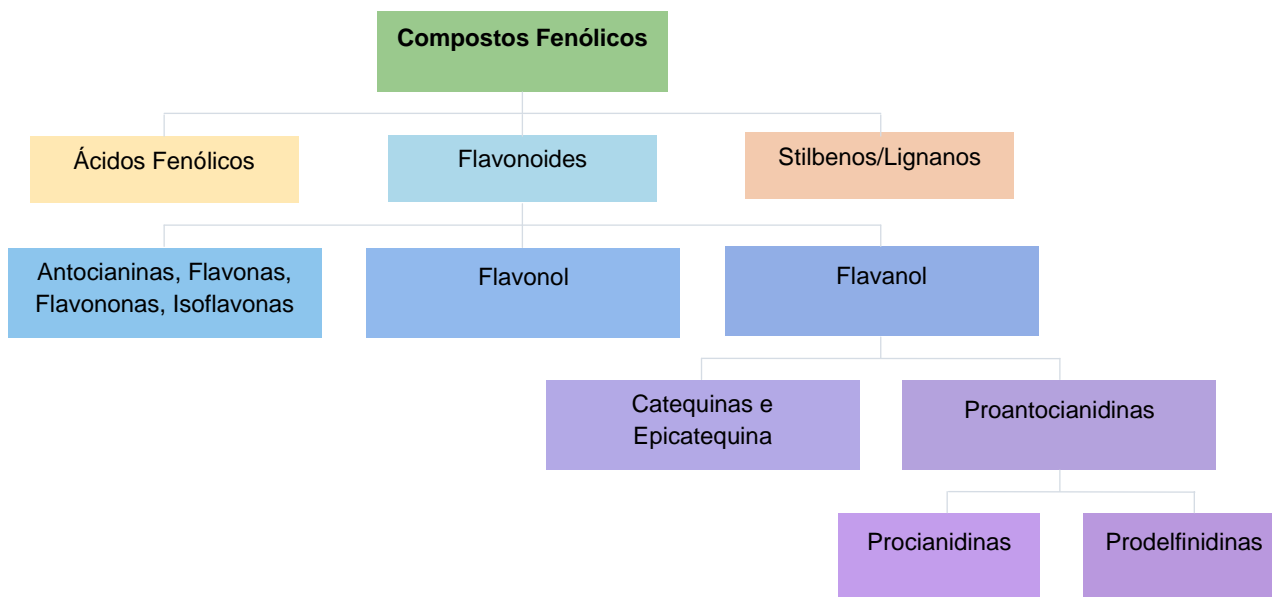


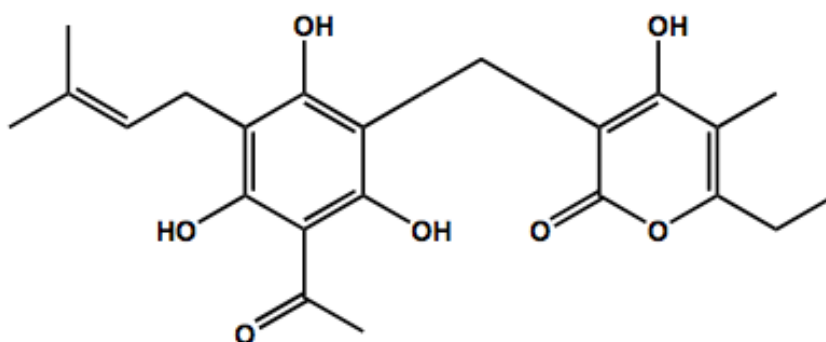
Figura 1.3 Tipos de Compostos Fenólicos, adaptado de [18].

As plantas halófilas sobrevivem e prosperam em biótipos salinos, geralmente, incompatíveis com a vida da maioria das plantas. Para sobreviverem a estas condições austeras desenvolveram um conjunto de respostas adaptativas. Nestas estão incluídas, a produção de moléculas bioativas com elevada capacidade antioxidante, os compostos fenólicos, os terpenóides e vitaminas, metabolitos secundários que inibem a produção e acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) protegendo as estruturas e funções celulares. Estes antioxidantes naturais exibem uma forte atividade biológica, como coletores de radicais, agentes quelantes e propriedades de inibição enzimática, que podem promover propriedades terapêuticas benéficas, que explicam a utilização deste tipo de plantas na medicina tradicional e justifica o interesse de um consumo em maior quantidade deste tipo de produtos pela promessa de amenizar alterações degenerativas e patológicas, como o envelhecimento, o cancro e a diabetes [2;17].

3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS:

Os flavonóides pertencem ao maior grupo que compõe os fitoquímicos, como é o caso dos compostos fenólicos. São especialmente conhecidos pelas suas ações antiviral, anti-inflamatória, citotóxica, antimicrobiana e antioxidante. Estas resultam da interação dos fitoquímicos com os mecanismos fisiológicos, e podem inibir ou atenuar o *stress* oxidativo podendo-se traduzir numa ação anticancerígena [17;18].

Através de extrações com solventes orgânicos como acetona, metanol, etanol, clorofórmio, éter de petróleo, diclorometano e éter dietílico, foi possível isolar e identificar vários compostos presentes na *H. italicum*, entre eles, flavonoides, acetofenonas, floroglucinois, tremetonas, coumarina e coumaratos, ácidos fenólicos e esterres. O arzanol (**Figura 1.4**) é o composto fenólico mais notório da *H. italicum*. Foi demonstrada a sua ação anti-inflamatória e antiviral através da inibição do fator nuclear Kappa B (NF-kB) ativação pela luciferase e libertação de mediadores pro-inflamatórios, a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-1(IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF) e a prostaglandina E2 (PGE2), no lipopolissacarido (LPS) estimulados por monócitos isolados de sangue de doadores humanos saudáveis [9;19]. O arzanol inibe também o ciclo-oxigenase1 (COX-1), Prostaglandina E Sintase Microsomal-1 (mPGES-1) e a 5-lipoxigenase de araquidonato (5-LO), a atividade anti-inflamatória já foi provada e teste *in vitro* e *in vivo* em células epiteliais intestinais humanas [8].



O ácido clorogénico é um éster do ácido cafeico e quinico. Este composto é muito conhecido pela sua atividade antioxidante e pela diminuição da velocidade de absorção da glicose para a corrente sanguínea [20].

O ácido cafeico é biodisponível oralmente, sendo facilmente assimilado pelo organismo. É um composto polifenólico com potenciais atividades antioxidantes, anti-inflamatória e antineoplásica. Este ácido reconhece e inibe o gene da oncoproteína da histona demetilase (HDM) que esteja amplificado em células cancerígenas 1(GASC1; JMJD2C; KDM4C) e impede a proliferação das mesmas [21].

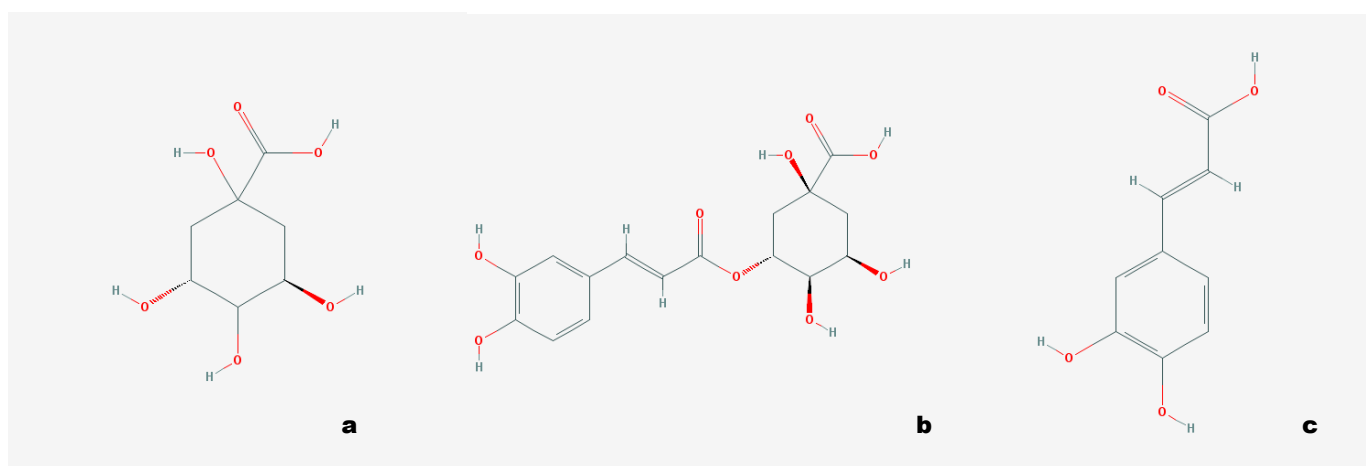


Figura 1.5 Estrutura química do ácido quinico (a), ácido clorogénico (b) e ácido cafeico (c) [20;21;23].

3.2. ÓLEOS ESSENCIAIS:

A *Helichrysum italicum* é uma planta aromática, como tal, é rica nos chamados óleos essenciais (OEs). Esses óleos são utilizados em técnicas de aromaterapia, possuindo propriedades cicatrizantes que auxiliam a regeneração da pele. Através da extração por destilação e extração supercrítica, é possível extrair os OEs das plantas isolá-los e identificá-los. Os OE apresentam composições diferentes de acordo com o ambiente onde a planta cresceu, isto é, aos fatores ambientais a que foi exposta. A composição de óleos essenciais é altamente influenciada por diversos fatores ambientais, sendo que a sua composição pode variar consoante as técnicas de gestão, condições ecológicas, climáticas, à fase do seu ciclo vegetativo em que é colhida e varia também com a sua localização geográfica. Estas diferenças têm maior notoriedade quanto maior for o seu teor de óleos essenciais, no entanto, segundo a bibliografia existente, os óleos essenciais principais da parte aérea da *H. italicum* são monoterpenos (**Figura 1.6**): alpha-pineno (1), limoneno (2), nerol (3), nerilacetato (4) e

nerilpropanoato (5) e sesquiterpenos (**Figura 1.7**): alpha-selino (1), beta-selino (2), gama-curcumeno (3), trans-beta-cariofileno (4), eudesm-5-en-11-ol (5), [7;8;17;19;23].

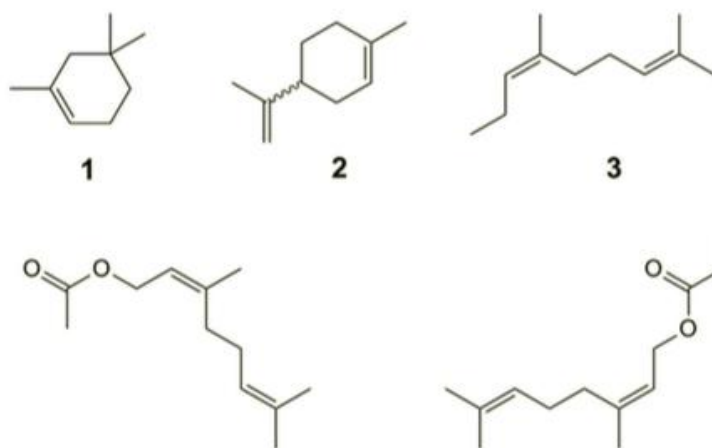


Figura 1.6 Estrutura química de alpha-pineno (1), limoneno (2), nerol (3), nerilacetato (4) e nerilpropanoato (5) [19].

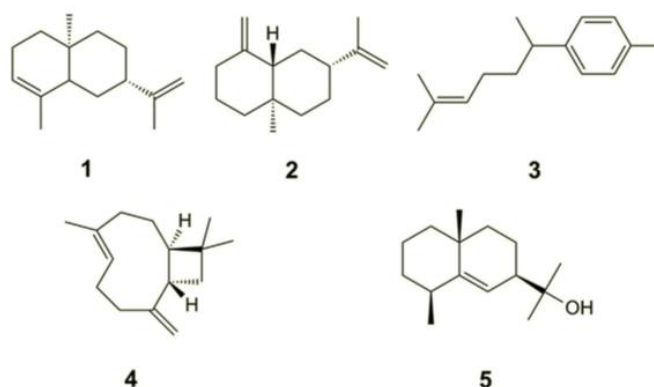


Figura 1.7 Estrutura química de alpha-selino (1), beta-selino (2), gama-curcumeno (3), trans-beta-cariofileno (4), eudesm-5-en-11-ol (5) [19].

O limoneno é um monoterpene cíclico natural com propriedades quimio-preventivas e anti tumorais. Este metabolito poderá inibir o crescimento tumoral através da inibição da p21Cip 1, inibidor da cinase ciclo-dependente 1, induzindo a apoptose pela alteração da via de sinalização do fator de crescimento, que impede as modificações pós-traducionais de proteínas e resulta na manutenção da célula na fase G1 do ciclo celular e na alteração da expressão do ciclo celular e de genes associados à apoptose [24].

O nerol é o composto que está na origem das propriedades inseticidas e repelentes de insetos. Apesar da capacidade de afastar mosquitos, moscas, pulgas, baratas, formigas e carraças, é também produzida por abelhas para marcação de flores polinizadas [25].

3.3. MINERAIS:

Os íons metálicos têm um papel importante no metabolismo de todos os organismos vivos, por isso, são também parte integral das plantas. As plantas absorvem minerais presentes no solo e concentram-nos na sua biomassa. Todavia, não são apenas absorvidos elementos essenciais - elementos não-essenciais, como alguns metais pesados conseguem ser assimilados pelas plantas através dos sistemas de transportes de nutrientes pela sua semelhança química aos mesmos. Para a produção controlada de plantas medicinais é necessária a criação de um limite ou concentrações ideais de minerais, para garantir a qualidade do produto [26;27] e evitar possíveis riscos para a saúde pública.

Nas plantas podem ser encontrados em maior concentração os íons potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), uma vez que estes elementos são necessários em grandes quantidades para o crescimento das plantas [27].

O K é o mineral encontrado com maior concentração nos tecidos da planta, cerca de 13,5 g/Kg na *H. italicum*. Este está muito envolvido nas funções metabólicas, principalmente ativação enzimática, síntese de proteínas, fotossíntese, transporte de floema e osmorregulação [27].

O Ca está presente nas paredes celulares e nos vacúolos e pode encontrar-se cerca de 7 g/Kg na *H. italicum*. Está envolvido na estabilização da parede celular e em processos secretores, também agindo como mensageiro secundário na transdução de sinais [27].

O Mg é um dos constituintes da clorofila e na *H. italicum* pode ser encontrado cerca de 1,9 g/Kg. O magnésio está envolvido na ativação de muitas enzimas dependentes de ATP e separação/quebra de hidratos de carbono [27].

As plantas também requerem a assimilação de alguns outros elementos metálicos, os chamados micronutrientes essenciais, ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni) molibdénio (Mo), que como o nome indica, são elementos essenciais, mas em pequenas quantidades e que em doses excessivas se tornam tóxicos. Existem também elementos benéficos, que correspondem a minerais que não são essenciais para todas as espécies, sendo obrigatórios para outras pois estimulam o crescimento e desenvolvimento da planta, como por exemplo, o silício (Si), o cobalto (Co) e o sódio (Na).

Na *H. italicum* podem ser encontrados 11,8 mg/Kg de cobre, 196 mg/Kg de ferro, 267 mg/Kg de manganês e 58 mg/Kg de zinco [27].

Como referido anteriormente, as plantas não absorvem apenas aquilo de que precisam, sendo por isso frequente encontrar compostos tóxicos, como metais pesados, em plantas medicinais e especiarias. Estas contaminações podem resultar de diferentes fatores como a poluição ambiental, a composição do solo e a utilização de alguns tipos de fertilizantes. A atividade humana é a causa principal dessas contaminações, como por exemplo, pela atividade

metalúrgica ou mais diretamente pela utilização de pesticidas com arsênio e mercúrio sobre as plantas ou pela contaminação dos lençóis freáticos [27].

4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DA *H. ITALICUM*:

Pela análise dos constituintes da perpétua-das-areias verifica-se as suas potenciais atividades biológicas. Foi possível identificar várias atividades biológicas por testes *in vitro* e *in vivo*, como as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, inseticida e repelente, antidiabética e antimicrobiana.

4.1. ANTIOXIDANTE

Grande parte da sua atividade antioxidante está relacionada com o elevado teor de polifenóis. Um outro fator que também ajuda no aumento de poder antioxidante é a existência de uma grande variedade de compostos fenólicos [17]. Vários tipos de extratos foram testados quanto à sua capacidade antioxidante, e esta capacidade está intimamente ligada com a capacidade anti-inflamatória [23]. Estudos comparativos entre infusões e decocções de *H. italicum*, demonstram o seu valor antioxidante em relação a produtos conhecidos e comercializados, como o chá verde [17].

4.2. ANTI-INFLAMATÓRIA

A atividade anti-inflamatória encontrada em extratos da planta pode-se dever ao efeito sinérgico da inibição de enzimas pro-inflamatórias, efeitos semelhantes aos corticoides ou pela recolha de radicais livres, estando muito associada à atividade antioxidante. A ação pode dever-se à existência de compostos específicos presentes na planta, como é o caso de arzanol através da inibição de complexos enzimáticos de ativação da resposta inflamatória.[9] Num estudo realizado por Sala [28], foi encontrada atividade anti-inflamatória utilizando extratos de metanol, hexano, diclorometano, etilacetato e butanol aquando a realização de testes *in vivo* em ratinhos em diferentes modelos, 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) e etil fenilpropiolato (EPP).

4.3. ANTIVIRAL

Testes que procurem a capacidade antiviral da *H. italicum* ainda são escassos, no entanto, atividades contra o HSV-1 e HIV já foram encontradas [23]. Extratos de acetona de *H. italicum* subsp. *Mycrophyllum* e arzanol foram utilizados para testar uma possível ação anti-HIV pela inibição da transativação da HIV-1-LTR nas células T com o plasmídeo que contém o gene para a luciferase cujo promotor é o HIV-1 LTR [9].

4.4. ANTIDIABÉTICA

Estudos comparativos entre chá verde e infusões de *H. italicum*, demonstraram que esta planta pode ter alguma atividade antidiabética pela inibição da alfa-glucosidase que ajudaria no tratamento da diabetes tipo 2. Todavia, a utilização de infusões poderá não ser o mais eficaz, a utilização de extratos com os compostos mais concentrados deve obter melhores resultados [17].

4.5. INSETICIDA E REPELENTE

A procura de pesticidas e repelente com origem natural contribui para a exploração das ações de vários compostos que possam ser extraídos das plantas, como os óleos essenciais. Várias doenças como o dengue e a febre amarela, requerem a ajuda de vetores (mosquitos) para que se possam propagar. Os óleos da *H. italicum* foram testados contra larvas de *Aedes albopictus*, revelando que os seus óleos essenciais são tóxicos para as larvas com um DL50 de 178,1 ppm. Foi testada também a sua atividade como repelente e verificou-se que 30% dos mosquitos (*Aedes aegypti*) foram repelidos. Estes resultados sugeriram uma possível adição destes compostos na formulação de repelentes e pesticidas [29].

4.6. ANTIMICROBIANA

A *H. italicum* apresenta um grande potencial antimicrobiano. Foram feitos vários estudos a compostos isolados e a diferentes extratos, como dos óleos essenciais, onde se verificou atividade antimicrobiana e antifúngica.

Bouزيد Djihane testou os óleos essenciais de *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don quanto à sua atividade antimicrobiana para bactéria Gram-negativas, Gram-positivas, fungos filamentosos e *Candida albicans*. Através do método de difusão em agar concluiu-se que a bactéria mais sensível foi a *Enterococcus cereus* ATCC 2035, com um mínimo bactericida e inibitório em concentrações de 0,79 µg/mL. Para obter atividade fungicida e atividade inibitória em fungos, foram utilizadas concentrações mínimas de 6,325 µg/mL e 12,65 µg/mL, respetivamente para *Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 97 63 [14].

Outros autores, focaram-se no estudo da atividade antimicrobiana da *H. italicum* contra a *Staphylococcus aureus*. No estudo realizado em 2001 por Nostro et al. [30], foram encontrados efeitos inibidores sobre a estirpe de *S. aureus*, com redução do seu crescimento e diminuição de produção de enzimas como a coagulase, DNase, termonuclease e lipase, sendo que esta atividade antimicrobiana se poderá dever aos compostos 14 flavonóides existentes na planta, como a apigenina, luteolina e carringenina. Em 2002, Nostro et al. [31], tentaram compreender a ação dos extratos de *H. italicum* sobre a *S. aureus*, tendo desta vez como foco, a inibição na

produção de enterotoxinas A-D. Para concentrações de 250-125 µg/mL de extrato, verificou-se inibição de crescimento de *S. aureus* e diminuição na produção de todos os tipos de enterotoxinas. Em concentrações de 62,5-31,25 µg/mL apenas se verificou efeito sobre as enterotoxinas B e C, que tiveram uma redução na sua produção.

5. TOXICIDADE:

No que toca à toxicidade da *H. italicum* foram realizados testes aos seus OEs para averiguar a citotoxicidade, a genotoxicidade e antígenotoxicidade, para os quais não foram encontrados níveis significantes de toxicidade em várias linhas celulares de mamíferos [8]. Em estudos mais recentes, a toxicidade de infusões de várias partes da *H. italicum subsp. Picardii* foi testada tendo em conta a viabilidade de três linhas celulares diferentes, células da micróglia murina (células N9), carcinoma hepatocelular humano (células HepG2) e células do estroma da medula (células S17). Esta última linha celular foi a mais sensível, principalmente à infusão das raízes da planta, todavia a *H. italicum subsp. Picardii* apresentou baixa toxicidade no geral [17].

6. PRODUÇÃO:

A procura de plantas medicinais tem vindo a aumentar, pelo que a simples recolha de plantas no seu habitat natural não é viável, não só pela incapacidade de satisfazer as quantidades necessárias de produto, mas também pela sobre exploração dessas áreas e possível perda de biodiversidade [32;33]. Assim, para poder responder às necessidades do consumidor, a melhor solução é o cultivo. Como referido anteriormente, já existem na Europa culturas de *H. italicum* para fins diversos. Todavia, nem todas as plantações seguem os princípios da agricultura biológica, pelo que a planta pode adquirir compostos tóxicos ou potencialmente tóxicos aquando da utilização de pesticidas, herbicidas e outros produtos sintéticos[34].

Nos dias de hoje, a população está cada vez mais esclarecida, pelo que apesar de uma grande parte da produção ter origem em plantações de cultivo intensivo, a procura de produtos com origem em agricultura sustentável está a aumentar. Como referido anteriormente, a *H. italicum* é muito procurada pelos seus óleos essenciais sendo a obtenção dos mesmos a principal finalidade. Não obstante à produção de produtos de maior qualidade e maior segurança, a produção biológica acaba por encarecer os produtos, tornando-os menos acessíveis.

Para o crescimento adequado da planta é necessário um solo equilibrado com as quantidades de nutrientes essenciais, sendo o azoto um nutriente de elevada importância para o desenvolvimento da planta [31]. Os fertilizantes têm também um papel relevante que aumenta a flexibilidade no local de produção, sendo que os fertilizantes orgânicos de origem industrial têm aumentado o interesse na produção de *H. italicum* [34]. Outra maneira mais eficaz de propagação da *H. italicum* é através da produção de plântulas, que é uma condição essencial

para uma produção de sucesso.

Capítulo II : MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

As amostras foram recolhidas em território português, mais especificamente na região costeira de Leiria, podendo corresponder às subespécies *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* e/ou *Helichrysum italicum* subsp. *Picardii* Franco [8]. As amostras foram recolhidas em diferentes praias: Vigão; Pedrogão; Praia velha, durante os meses de julho, agosto e setembro de 2017. Este trabalho teve como foco a utilização das flores. Escolheu-se, preferencialmente, as flores que aparentavam ser mais novas e estar em melhor estado. As plantas foram separadas quanto à zona de recolha, duna ou pinhal.

As amostras recolhidas foram lavadas com água destilada para retirar areia e outros resíduos. Para evitar o excesso de água, as plantas foram enxutas com papel absorvente antes de serem colocadas em sacos de congelação devidamente identificados e congeladas a -16°C.

As flores da *H. italicum* foram previamente desidratadas para a realização dos vários testes. Secou-se a amostra utilizando uma estufa (Heraeus D-6450 Hanau) a 60°C durante pelo menos 8 horas. Garantiu-se a ausência de água recorrendo a múltiplas pesagens do material saído da estufa após repousar 30 minutos num exsiccador, numa balança digital (Mettler Toledo AB204-S). Trituraram-se as amostras utilizando um moinho de café (Kunft). De seguida foram colocados em frascos específicos para armazenamento de amostras alimentares, para serem posteriormente usados para a formação de extratos ou para testar a amostra seca.

Foram utilizados para comparação o açafraão-das-índias (curcuma) e o caril (curcuma, grão de coentros, feno-grego, amido de batata, grão de mostarda, cebola desidratada, cardamomo, sal, gengibre, anis, funcho, cravo, alho desidratado, especiarias e plantas aromáticas) comerciais da Margão, adquiridos secos e em pó no mercado nacional

PREPARAÇÃO DE EXTRATOS:

Para a realização dos testes fizeram-se dois tipos de extratos:

- Aquosos (infusões) para a *H. italicum* baseado em [17];

Foram feitos dois extratos aquosos com concentrações diferentes

Para estes extratos aquosos, utilizaram-se amostras desidratadas e trituradas de *H. italicum*. Para o extrato de menor concentração foi pesado num goblé de vidro cerca de 1 g de flor, ao qual foram adicionados 200 mL de água destilada medidos recorrendo a uma proveta de vidro. Para o de maior concentração foi pesado 2 g de flor para 100 mL de água destilada. Ambas as soluções foram de seguida mantidas, durante 15 minutos, numa placa de aquecimento em agitação à temperatura de aproximadamente 90°C, verificada com um termómetro analógico.

Esperou-se que arrefecessem e filtrou-se o produto, com um filtro de 90 mm (xinxing- 202 moderate) e um funil de vidro, para um frasco de vidro graduado.

- Em acetona para a *H. italicum* e as especiarias comerciais adaptado de [19].

Retirou-se, aproximadamente, 1 g de cada amostra de *H. italicum* desidratada e triturada e das especiarias comerciais. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de acetona a 70% a cada amostra num frasco para a seguinte agitação. Com o auxílio de placas magnéticas de agitação, colocou-se um magneto em cada frasco, deixaram-se as soluções com as diferentes amostras em agitação de 500 a 700 RPM num ambiente escuro até 2 horas. Em seguida, as soluções foram transferidas para tubos de Falcon identificados e colocados numa centrífuga durante 20 minutos a 4000 RPM. Transferiu-se para outros tubos de Falcon através de um funil e um filtro de 90 mm (xinxing- 202 moderate). Os tubos das diferentes amostras foram refrigerados a -16°C até a sua utilização.

De modo a garantir a leitura através da espectrofotometria diluíram-se os extratos em acetona a 70% em duplicado.

Para os extratos com a amostra da *H. italicum*, fizeram-se diluições de 1:10 (0,5 mL de extrato em 4,5 mL de acetona a 70%).

Para as especiarias comerciais fizeram-se diluições de 1:20 (0,25 mL de extrato em 4,75 mL de acetona a 70%).

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE:

Para a verificação do teor de humidade das amostras de *H. italicum* foi realizado o método descrito em AOAC (2000), ao qual foram feitas algumas adaptações. O procedimento consistiu na pesagem aproximada de 1 g de flores congeladas num cadinho de porcelana. De seguida, as amostras foram secas na estufa a 100°C por um período de 3,5 horas. Após a secagem, as amostras foram colocadas no exsiccador e pesadas até obtenção de peso constante. De modo a calcular o teor de humidade seguiu-se a equação (1), onde ΔP corresponde à diferença entre o peso inicial (P_i) e o peso final. O teste foi realizado em triplicado [35].

$$(1) \quad \text{Teor de Humidade (\%)} = \frac{\Delta P}{P_i} \times 100$$

ΔP – diferença entre o peso inicial e o peso final;

P_i – peso inicial.

2. DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE POLIFENÓIS (TPC):

A determinação do teor total de polifenóis das amostras foi realizada através do método Folin-Ciocalteu, que se baseia na redução do complexo molibdénio-tungstato-fósforo pelos grupos fenólicos, dando origem a uma reação de produto azul que pode ser quantificado espectrofotometricamente [3].

O método foi feito em duplicado para cada extrato. Colocara-se 0,250 mL de amostra, correspondentes aos vários extratos anteriormente referidos, em seguida, adicionaram-se 0,250 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Scharlau). Agitou-se a solução durante alguns segundos com o auxílio de um vortex. Adicionou-se à mesma solução 5 mL de Carbonato de Sódio (Scharlau), (70 g/L) de 7 mL água destilada, agitou-se novamente no vortex e deixou-se repousar durante 1 hora na ausência de luz. Por fim, fez-se a leitura da absorvância a 760 nm, num espectrofotómetro (Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible) obtendo-se resultados expressos em gramas de equivalentes a ácido gálico (GAE), por 100 g de extrato seco, utilizando a reta da curva de calibração correspondente à equação (2), com R^2 de 0,99288. A solução correspondente ao branco foi realizada seguindo o mesmo procedimento, substituindo a amostra por água destilada [38].

$$(2) \quad y = 1,9779x + 0,0825$$

y – absorvância;

x – concentração de ácido gálico.

3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE:

A determinação da capacidade antioxidante baseia-se na transferência de eletrões por um dador de eletrões ou por um radical como o radical de hidrogénio (H^\bullet) para um antioxidante segundo a seguinte reação $R^\bullet + Aox-H \rightarrow RH + Aox^\bullet$. [37]. Neste trabalho, a capacidade antioxidante total obteve-se através da medição da capacidade antioxidante da *H. italicum* de inibir a atividade do $ABTS^{\bullet+}$ comparando com o ácido ascórbico (Panreac), calculando a percentagem de inibição segundo a equação (2) [39], onde A_B corresponde ao valor da absorvância inicial da solução de ABTS e A_E corresponde à absorvância do radical após 6 minutos em contacto com a amostra. Na reação com o $ABTS^{\bullet+}$ é originado um produto de cor azul, que muda de intensidade consoante a atividade antioxidante do composto a testar, isto é, quanto mais intensa for a cor azul menor a capacidade antioxidante do composto [40].

$$(3) \quad \%inibição = \left[\frac{A_B - A_E}{A_B} \right] * 100$$

A_B – absorvância inicial da solução de ABTS;

A_E – absorvância do radical após 6 min em contacto com a amostra.

Prepararam-se as soluções de ABTS concentrado com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$). Deixou-se reagir a solução durante pelo menos 16 horas à temperatura ambiente, em ausência de luz. Após este período, a solução foi retirada do escuro e filtrou-se a mesma recorrendo a uma bomba de vácuo, um filtro (n.º 1, Whatman). A solução filtrada foi diluída com água destilada até se obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,020$, a 734 nm. Para avaliar a atividade antioxidante das amostras foi adicionado 1 mL do radical diluído estabilizado numa cuvete descartável (Brand standard – PMMA semi-micro, Sigma-Aldrich) e 20 μ L de solução das diferentes amostras. Fez-se a leitura no espectrofotómetro (Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible), 734 nm, após deixar reagir a solução na cuvete durante 6 minutos [41;9].

O cálculo da atividade antioxidante foi feito em equivalente de vitamina C (VCEAC). A curva de calibração foi preparada com o padrão, ácido ascórbico (vitamina C, Panreac), correlacionando a sua concentração com a redução da absorvância que ocorre durante o ensaio VCEAC utilizando o radical ABTS, equação (4) com R^2 de 0,99613.

$$(4) \quad y = 429,04x + 2,7555$$

y - % inibição;

x – concentração de ácido ascórbico.

4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA:

Estirpes microbianas

A possível atividade antimicrobiana dos extratos foi testada em cinco estirpes bacterianas: *Escherichia coli* (B1); *Staphylococcus epidermidis* (B2); *Pseudomonas aeruginosa* (B3); *Enterococcus faecalis* (B4); *Staphylococcus aureus* (B5).

As estirpes bacterianas estudadas fazem parte da coleção de estirpes do Instituto Politécnico de Leiria.

Método de difusão em Agar

Para a averiguação de atividade antimicrobiana dos extratos, recorreu-se ao método de difusão em meio Agar Muller-Hinton (MHA), adaptado de [14]. O meio utilizado foi preparado de acordo com as indicações do fabricante, e esterilizado a 121°C e a 1 atm durante 15 minutos. Após arrefecimento até 50 °C, 15 mL do meio foram vertidos em placas de Petri estéreis, deixadas em repouso numa câmara de fluxo laminar até o meio solidificar.

As colônias de bactérias isoladas foram transferidas para tubos de ensaios devidamente identificados, com uma ansa, com 3 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%). Foram adicionadas bactérias até à obtenção de uma solução turva de acordo com a standardização de 10^8 UFC/mL (escala de 0,5 de Mac Farland).

1 mL de cada suspensão foi transferido para placas de Petri com meio MHA já endurecido. Foi espalhado por toda a superfície da placa recorrendo a um espalhador estéril. Em seguida, foram distribuídos na superfície do agar inoculado, discos esterilizados (*Xinxing quantitative filter paper*) com um diâmetro de 8 mm em cada placa, a distâncias equitativas.

Foram colocados cinco discos esterilizados (*Xinxing quantitative filter paper*) com um diâmetro de 90 mm em cada placa. De seguida, os discos foram impregnados, utilizando uma micropipeta, com dois volumes diferentes, 10 μ L e 20 μ L, dos extratos previamente preparados, extrato em acetona 70% e infusão 1/200 g/mL.

O disco impregnado somente com acetona a 70% foi utilizado como controlo negativo, para averiguar a sua influência na atividade antimicrobiana e para verificar a sua possível influência na atividade do extrato com acetona a 70%. Foi também feito o controlo positivo em duplicado para quantificar os halos de inibição, onde se utilizou vários tipos de antibióticos específicos: Ciprofloxacina 5 μ g (CIP); Polimixina B 300 units (PB); Colistina 10 μ g (CT); Ampicilina 10 μ g (AMP) e placas apenas com o meio.

Para o controlo do desenvolvimento bacteriano, colocaram-se placas de Petri somente inoculadas com as bactérias na estufa e duas placas de Petri sem inóculo. As placas de Petri inoculadas com as estirpes bacterianas foram colocadas com os discos numa estufa a 37°C durante 24h para que ocorra a difusão do disco de papel para o meio sólido.

Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

5. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL POR μ -FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X:

Para análise do conteúdo mineral, amostras desidratadas previamente de *H. italicum* das dunas e do pinhal, reduziram-se a pó em almofariz de ágata. Em seguida, foram pressionadas por uma força equivalente a 10 toneladas e transformaram-se em pastilhas de 2 cm de diâmetro e 1 mm de espessura. Utilizou-se um mínimo de 3 pastilhas por cada amostra para se poder inferir incertezas estatísticas relativas à homogeneização do processo de moagem. Cada pastilha com um peso de aproximadamente 0,3 mg, foi colocada num filme de Mylar e inserida no respetivo slide, tal como mostra a **Figura 2.1**. O slide foi então colocado diretamente em frente do feixe de raios-X para determinação elementar. Três análises foram efetuadas por cada amostra, uma em cada pastilha. Para cada espectro o tempo de aquisição foi de 1000 s.

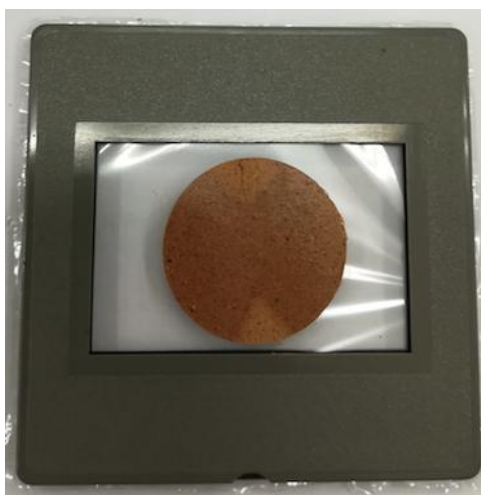


Figura 2.1 Pastilha colocada no filme de Mylar e inserida no respetivo slide.

A determinação mineral foi realizada utilizando diversos equipamentos/software, principalmente, como base de todo o estudo, o aparelho de Espectrometria por μ -XRF M4 Tornado da Bruker, como o representado na **Figura 2.2**. Este aparelho encontra-se equipado com um alvo de Rh como ânodo do tubo de raios-X. A sua ótica policapilar de raios-X foca a radiação do tubo em áreas muito pequenas, gerando pontos focais de radiação de elevada intensidade numa superfície de cerca de 25 μ m de diâmetro. O arranjo convexo de microcapilares de vidro que apresenta foca a radiação do tubo num ponto focal muito pequeno através de reflexões múltiplas. Isto resulta num aumento da intensidade focal de até 10000 vezes relativamente a um colimador. A elevada intensidade da radiação combinada com uma excelente resolução espacial conferem a este aparelho a capacidade de executar medições rápidas e com grande detalhe.

Este aparelho possui também, colimadores de Zircônio (Zr) que se encontram entre a amostra e o detetor. É ainda composto por um SDD XFlash® que lhe confere uma excelente resolução energética mesmo para contagens elevadas. Este tipo de detetor apresenta resoluções energéticas melhores que 145 eV, o que se traduz numa excelente capacidade de separação de picos.

A quantificação absoluta dos vários elementos foi realizada com o método dos parâmetros fundamentais. Este método permite obter a concentração relativa de cada elemento presente na amostra com a ajuda de parâmetros atômicos de interação de radiação com a matéria, como por exemplo os rendimentos de fluorescência ou secções eficazes de absorção. Validou-se o presente método através da comparação das concentrações obtidas com concentrações conhecidas presentes em materiais de referência padrão de matrizes de tipo orgânico. Entre estes materiais de referência estão as folhas de pomar (NIST-SRM1571), folhas de Choupo (GBW07604) e ramos de arbusto (GBW07603). Estes materiais contêm matrizes orgânicas leves com várias concentrações dos elementos de interesse, o que permite a avaliação do presente método para diferentes regimes de concentração. A preparação de pastilhas dos materiais de referência padrão seguiu o mesmo procedimento que as outras amostras testadas. No geral, o método de parâmetros fundamentais é capaz de obter as mesmas concentrações elementares que os valores certificados, dentro do nível de incerteza. No caso, a incerteza corresponde a limites de confiança de 68 %, isto é, a um desvio padrão.



Figura 2.2 Sistema M4 Tornado (Espectrometria por Fluorescência de Raios-X).

6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR:

Preparação do extrato:

Para este teste foi utilizada a infusão da flor da *H. italicum* com concentração de 0,02 g/mL, 2g de flor seca em 200 mL de água destilada.

Liofilizou-se a infusão obtida durante 5 dias. Ressuspendeu-se o resíduo resultante, cerca de 0,156 g de matéria sólida, em 2 mL de meio DMEM, ficando 50 vezes mais concentrado, preparando-se uma solução stock com cerca de 78 mg/mL. Este teste foi realizado para 11 concentrações (mg/mL) diferentes de infusão: 3; 4; 6; 9; 13; 20; 30; 45; 68; 101; 152 (**Tabela 2.1**). As concentrações foram maximizadas para entender a partir de qual concentração se torna tóxico.

Teste MTT:

O teste MTT foi utilizado com o objetivo de avaliar a citotoxicidade da infusão de *H. italicum*. Este teste baseia-se na redução do reagente amarelo de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) pela desidrogenase mitocondrial das células viáveis, dando origem a um composto insolúvel azul-arroxeadado de formazan [42]. Esse composto formado foi quantificado recorrendo à espectrofotometria com um comprimento de onda a 570 nm, refletindo a atividade metabólica existente [43].

Neste trabalho, utilizaram-se as células Caco-2, uma linha celular de origem em células humanas de adenocarcinoma no cólon [43]. Este teste foi realizado em duplicado, em placas de 96 poços com as 11 concentrações em triplicado, 12 poços de controlo (sem infusão) e 51 poços vazios. As células foram cedidas pela Universidade de Coimbra e cresceram em frascos 75 mL com humidade 5% e ar atmosférico CO₂/95% a 37°C (DMEM- meio de cultura celular, suplementado com 10% de FBS, 1% l-glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de penicilina/estreptomicina, mudado a cada 2 dias durante 7 dias).

As células foram levantadas utilizando tripsina e de seguida foram centrifugadas, seguindo-se a sua contagem recorrendo a uma câmara de *Neubauer* para ser possível fazer o seu plaqueamento com, aproximadamente, 10000 células em cada poço com 300 µL de meio. As placas foram deixadas em incubação durante 5 dias a 37°C (incubadora-Thermo Scientific BB15), tendo-se mudado o meio ao fim de 3 dias, até que as células tivessem uma distribuição confluyente nas placas. O meio dos poços foi substituído pelas diferentes concentrações de infusão liofilizada e pelos controlos como representado na **Tabela 2.2**. As placas foram incubadas durante 6 horas a 37°C. De seguida, retirou-se o meio e a infusão liofilizada das placas. Às células foi-lhes adicionada a solução de PBS (solução de lavagem) enquanto se preparava a solução de MTT. Foi retirado o tampão fosfato salino (PBS) e foram colocados 50

7. INCORPORAÇÃO DE *H. ITALICUM* EM PRODUTOS PARA CONSUMO HUMANO:

Para tentar compreender a aceitabilidade do sabor distinto da flor da *H. italicum*, desenvolveu-se um produto alimentar comum, ao qual foi incorporado a flor desidratada. Como o chocolate é um produto muito apreciado por uma grande parte da população mundial e na Europa tem uma das taxas de consumo mais elevadas, mais especificamente, nos países do norte da Europa, foi o produto escolhido para testar a incorporação da flor de *H. italicum* [46].

Formulação do produto:

Para a formulação do produto derreteu-se chocolate pantagruel 70% de cacau, em banho-maria até 45-60 °C. De seguida, ao chocolate foram adicionadas flores secas e trituradas de *H. italicum* de modo a obter uma formulação com 0,45% da planta, tendo cada chocolate 5 g. Para a prova dos consumidores foram apresentados mais três tipos de chocolate com 5 g, um controlo com apenas pantagruel 70%, e outros dois com outras plantas silvestres comestíveis, chocolate com *Callendula officinalis* (2%) e chocolate com o fruto da *Corema album* (0,6%).

TESTE DE CONSUMIDOR:

De forma a avaliar a aceitação dos chocolates e a intenção de compra dos mesmos foram realizados testes de consumidor a indivíduos de diferentes nacionalidades. Neste estudo participaram 60 indivíduos, com idades compreendidas entre os 19 e 63, com uma média de idades de 42 anos. A amostra inclui 47 indivíduos do sexo feminino (87,5%) e 13 indivíduos do sexo masculino (12,5%). A amostra é composta por indivíduos provenientes dos seguintes países: Alemanha (5%), Bósnia-Herzegovina (1,7%), Brasil (3,3%), Bulgária (6,7%), Croácia (3,3%), Eslováquia (6,75), Eslovénia (3,3%), Finlândia (11,7%), França (1,7%), Itália (3,3%), Letónia (3,3%), Lituânia (5%), Polónia (8,3%), Portugal (20%), República Checa (5%), Roménia (3,3%), Turquia (8,3%).

O teste continha 2 perguntas, uma referente à prova hedónica (escala de 1 a 9 do U.S. Army and Food Container Institute [47], onde o número 1 corresponde ao desagrado relativamente ao produto e o 9 corresponde ao agrado total) e a outra à intenção de compra (escala de 1 a 5 (7), número 1 corresponde à compra do produto e o número 5 corresponde à não aquisição do produto). Os chocolates foram dispostos em pratos devidamente assinalados com códigos de identificação, acompanhados com uma bolacha de água e sal e um copo de água.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística foi realizada através de ANOVA factor único ($P \leq 0.05$) - método de Tukey, por comparação de médias (intervalo de confiança de 95%). Utilização do programa GraphPadPrism® e Microsoft® Excel.

Capítulo III : RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE:

O valor médio para o teor de humidade das flores de *H. italicum* obtido foi de 39,14% com um desvio padrão de 1,34. As plantas foram colhidas durante o verão, pelo que é expectável um reduzido teor de humidade [48].

2. DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE POLIFENÓIS:

Neste trabalho procurou-se identificar qual o teor de polifenóis totais existente nas amostras de flor *H. italicum* colhidas em diferentes zonas, dunas e do pinhal. Utilizaram-se extratos com acetona a 70% e extratos aquosos (infusão) pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados dos extratos em acetona a 70% encontram-se resumidos na **Tabela 3.1**, enquanto que na **Tabela 3.2** encontram-se os resultados para as infusões de concentração 0,005 g/mL (1g de flor seca por 200 mL de água destilada). Foi também calculado o teor de polifenóis totais para especiarias comerciais comuns, Açafrão-das-Índias e Caril da Margão. Os seus resultados em extratos de acetona a 70% estão apresentados na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.1 Resultados do teor total de polifenóis obtidos pela técnica Folin-Ciocalteu em mg GAE/g flor para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos de acetona a 70%

Origem da amostra (<i>H. italicum</i>)	Data de recolha	Média e desvio padrão (mg GAE/g flor)
Praia do Pedrogão (Dunas)	24/07/17	37,77 ± 7,36
Praia do Vigão (Dunas)	31/08/17	34,58 ± 1,55
Praia do Vigão (Dunas)	28/09/17	30,96 ± 3,12
Praia do Pedrogão (Pinhal)	24/07/17	36,32 ± 0,67
Praia do Vigão (Pinhal)	31/08/17	31,95 ± 1,27
Praia do Vigão (Pinhal)	28/09/17	27,24 ± 1,17
Dunas (Total)	-	34,43 ± 1,49 a
Pinhal (Total)	-	31,87 ± 0,87 a

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

Tabela 3.2 Resultados do teor total de polifenóis obtidos pela técnica Folin Ciocalteu em mg GAE/g flor para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos aquosos (0,005 g/mL).

Origem da amostra (<i>H. italicum</i>)	Data de recolha	Média e desvio padrão (mg GAE/200 mL de infusão)
Praia do Vigão (Pinhal)	31/08/17	35,35 ± 1,39 b
Praia do Vigão (Dunas)	31/08/17	44,09 ± 3,85 a

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

Tabela 3.3 Resultados do teor total de polifenóis obtidos pelo método Folin-Ciocalteu em mg GAE/g especiarias para as diferentes especiarias testadas (Açafrão-das-Índias e Caril) em extratos de acetona a 70%.

Amostra	Média e desvio padrão (mg GAE/g especiarias)
Açafrão-das-Índias	23,44 ± 2,38 b
Caril	16,53 ± 4,58 b

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

Numa tentativa de averiguar se existem diferenças significativas entre as flores recolhidas na duna ou no pinhal foi realizada a comparação dos valores médios obtidos. Para as recolhidas nas dunas obteve-se uma média e desvio padrão de $34,43 \pm 1,49$ mg equivalentes em ácido gálico/g (mg GAE/g) de flor, enquanto para as do pinhal $31,87 \pm 0,87$ mg GAE/g de flor. Apesar de uma maior média para as plantas da zona dunar, quando aplicado o método de Tukey, não se verificaram diferenças significativas quanto à zona de recolha ($P \geq 0,05$), **Figura 3.1-b**).

Na comparação com as especiarias comerciais obtiveram-se as seguintes médias: $33,88 \pm 4,43$ mg GAE/g de nas flores de *H. italicum*, $23,44 \pm 2,53$ mg GAE/g no açafrão-das-Índias e $16,53 \pm 5,58$ mg GAE/g no caril **Figura 3.1-a**). As amostras de especiarias comerciais apresentam uma diferença significativa no que toca ao teor de polifenóis totais em relação à flor de *H. italicum* ($P \geq 0,05$).

Para as infusões também foram feitas comparações entre a duna e o pinhal, e tal como nos extratos com acetona 70%, o teor de polifenóis da zona dunar foi superior **Figura 3.1-c**). Para as recolhidas nas dunas obteve-se uma média e desvio padrão de $44,09 \pm 1,92$ mg GAE/200 mL de infusão, enquanto que para as do pinhal $35,35 \pm 0,69$ mg GAE/g em 200 mL de infusão. Neste teste a diferença entre ambas as zonas foi significativa ($P \leq 0,05$).

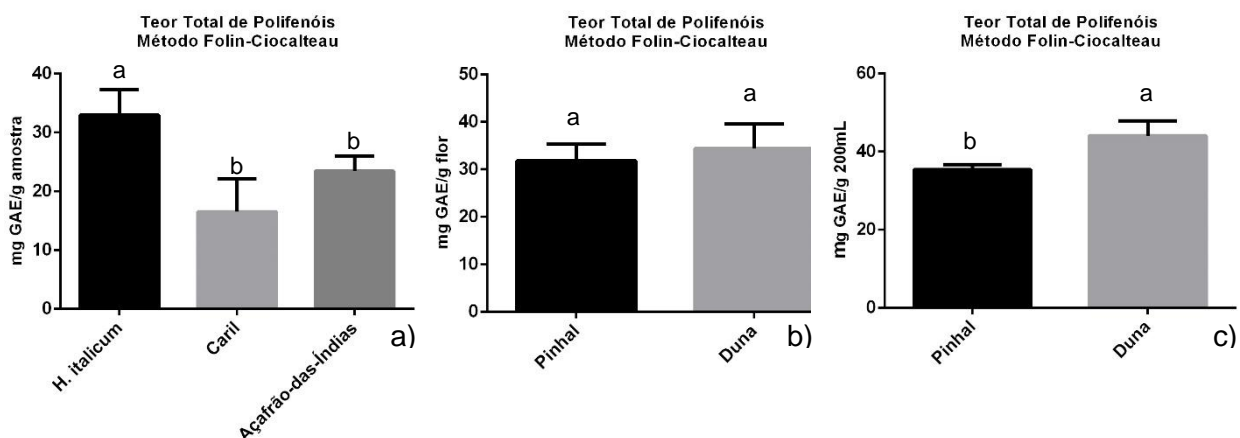


Figura 3.1 Teor de Polifenóis Totais. a) comparação entre *H. italicum*, caril e açafão-das-índias; b) comparação entre extrato em acetona 70% de *H. italicum* das dunas e pinhal; c) comparação entre as infusões de *H. italicum* das dunas e pinhal. (Quando assinalado com a mesma letra a, significa que não existe diferença significativa ($P > 0.05$), enquanto que quando tem a letra b, a diferença é significativa ($P \leq 0.05$)).

Na recolha da amostra é de notar que a dispersão de *H. italicum* pelo pinhal era muito mais reduzida, sendo que, no pinhal, as flores apenas se encontravam em locais com maior exposição solar, zonas de clareiras ou perto das estradas. Não foram por isso esperadas diferenças significativas na composição destas plantas, uma vez que, os meios onde se propagavam estavam em condições semelhantes e não se encontravam muito distantes.

A *H. italicum* é uma conhecida produtora de metabolitos secundários, entre os quais estão os polifenóis [9]. A maioria dos estudos relativos aos compostos fenólicos focam-se no isolamento de compostos específicos, para a sua quantificação e para a realização de outros estudos, como estudo de potenciais atividades antivirais [9], antimicrobianas e antioxidantes [8]. Por esta razão, os valores totais elevados obtidos neste ensaio são expectáveis. Os valores significativamente superiores em relação ao açafão-das-índias e ao caril, validam o potencial da incorporação da flor em diferentes produtos alimentares para benefícios nutricionais.

Num estudo realizado em 2017 [17], foi testada uma infusão com 1g de flor seca de *H. italicum* em 200 mL de água ultrapura, que esteve em aquecimento durante 5 minutos a 90°C. Nesse estudo, foi utilizada a mesma metodologia para a quantificação do teor de polifenóis totais, para os quais obtiveram o resultado de $69,9 \pm 3,88$ mg GAE/200 mL. O resultado que obtiveram é superior ao resultado obtido neste ensaio para as infusões, que apresentam uma média de $37,59 \pm 0,65$ mg GAE/200 mL. O local e a data de recolha das flores para as infusões foram diferentes. Neste ensaio, as flores foram colhidas na costa do distrito de Leiria no final de

agosto, enquanto para o estudo de 2017 foram recolhidas no sul de Portugal (Tavira), no mês de junho. Pela análise da **Tabela 4**, pode-se verificar uma tendência para a diminuição dos compostos fenólicos ao longo dos meses, o que justificaria esta diferença de valores. O teor de polifenóis total de uma flor varia ao longo do ano [49], e de acordo com o seu grau de maturação e a sua espécie [50]. Todavia, essas diferenças não são necessariamente significativas. Para a *Bellis perennis*, não ocorre grande flutuação do valor durante o ano [49]. Para os diferentes estadios de desenvolvimento da *Opuntia stricta* (vegetativo, floração inicial, floração máxima e pós-floração) [50].

Tendo em conta que a flor desta planta começa a aparecer em maio e junho [8], para verificar se esta seria uma justificação válida teria de se testar flores de diferentes alturas e estadios de desenvolvimento, para ver o quanto este influencia o teor total de polifenóis e qual seria a melhor altura de colheita de acordo com teor de polifenóis total desejado.

3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE:

Neste trabalho foi utilizado o método ABTS, em que foram preparados extratos de acetona a 70% e extratos aquosos (infusões) das amostras de flor *H. italicum* colhidas em diferentes meses e localidades. Os resultados dos extratos em acetona a 70% encontram-se resumidos na **Tabela 3.4**, na **Tabela 3.5** encontram-se os resultados para as infusões com 1 g de flor seca em 200 mL de água destilada. Como o calculado no teor de polifenóis para a *H. italicum*, também foi feita uma caracterização da atividade antioxidante para especiarias comerciais comuns, Açafraão-das-Índias e Caril da Margão. Os seus resultados em extratos de acetona a 70 % estão apresentados na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.4 Resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS em mg/VEAC/g para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos de acetona a 70 %.

Origem da amostra (<i>H. italicum</i>)	Data de recolha	Média e desvio padrão (mg/VEAC/g)
Praia do Pedrogão (Dunas)	24/07/17	16,28 ± 0,77
Praia do Vigão (Dunas)	31/08/17	15,22 ± 0,19
Praia do Vigão (Dunas)	28/09/17	14,56 ± 0,17
Praia do Pedrogão (Pinhal)	24/07/17	15,65 ± 0,10
Praia do Vigão (Pinhal)	31/08/17	13,85 ± 1,96
Praia do Vigão (Pinhal)	28/09/17	13,95 ± 0,04
Dunas (Total)	-	15,35 ± 0,86 a
Pinhal (Total)	-	14,48 ± 1,26 a

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

Tabela 3.5 Resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS em mg VCEAC/200 mL para as diferentes amostras de flor de *H. italicum* em extratos aquosos (0,005 g/mL).

Origem da amostra (<i>H. italicum</i>)	Data de recolha	Média e desvio padrão (mg VCEAC/200mL)
Praia do Vigão (Pinhal)	31/08/17	37,69 ± 0,98 a
Praia do Vigão (Duna)	31/08/17	37,49 ± 0,50 a

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

Tabela 3.6 Resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS em mg/VEAC/g de especiarias para as diferentes especiarias testadas (Açafrão-das-Índias e Caril) em extratos de acetona a 70%.

Amostra	Média e desvio padrão (mg/VCEAC/g)
Açafrão-das-Índias	8,45 ± 0,12 b
Caril	6,44 ± 0,78 b

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

Recorrendo ao método da capacidade de remoção do radical livre ABTS foi feita a comparação da atividade antioxidante entre as flores recolhidas na duna e no pinhal, através dos valores médios obtidos. Para as retiradas da duna obteve-se uma média e desvio padrão de 15,35 ± 0,86 mg/capacidade antioxidante em equivalentes de vitamina C (VCEAC)/g de flor, enquanto que para as do pinhal 14,48 ± 1,26 mg/VCEAC/g de flor. Apesar de uma maior média para as plantas da zona dunar, quando aplicando o método de Tukey, não se verificaram diferenças significativas quanto à zona de recolha ($P \geq 0,05$), como se pode ver pela **Figura 3.2-b**.

Na comparação com as especiarias comerciais obtiveram-se as seguintes médias: 14,92 ± 1, mg/VCEAC/g nas flores de *H. italicum*, 6,44 ± 0,78 mg/VCEAC/g no açafrão-das-Índias e 8,45 ± 0,12 mg/VCEAC/g no caril, **Figura 3.2-a**). As amostras de especiarias comerciais apresentam uma diferença significativa no que toca à atividade antioxidante em relação à flor de *H. italicum* ($P \geq 0,05$).

Para as infusões também foram feitas comparações entre a duna e o pinhal, e tal como nos extratos com acetona 70%, o teor de polifenóis da zona dunar foi superior, como se pode verificar no **Figura 3.2-c**). Para as retiradas das dunas obteve-se uma média e desvio padrão de 37,70 ± 0,70 mg VCEAC/200mL, enquanto que para as do pinhal 37,49 ± 0,36 mg VCEAC/200mL. Neste ensaio a diferença entre ambas as zonas não foi significativa ($P \geq 0,05$).

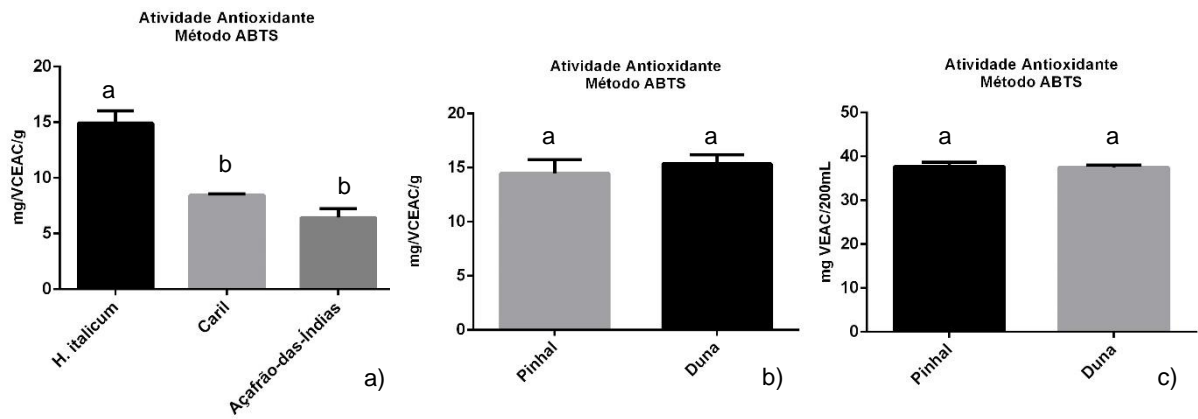


Figura 3.2 Atividade antioxidante. a) comparação entre *H. italicum*, caril e açafraão-das-índias; b) comparação entre extrato em acetona 70% de *H. italicum* das dunas e pinhal; c) comparação entre as infusões de *H. italicum* das dunas e pinhal. (Quando assinalado com a mesma letra a, significa que não existe diferença significativa ($P>0.05$), enquanto que quando tem a letra b, a diferença é significativa ($P<0.05$)).

Uma vez que os compostos fenólicos apresentam uma atividade antioxidante associada, isto é, maior número de polifenóis, maior atividade antioxidante [8;51], com os valores obtidos anteriormente pelo método de Folin-Ciocalteu, seria de esperar que o valor antioxidante também fosse elevado. O valor antioxidante das flores de *H. italicum* obtido é bastante elevado, sendo superior ao das especiarias testadas. No estudo de 2017 [17], também foi feita a comparação com produtos de consumo mais comum, verificando-se que a atividade antioxidante da *H. italicum* era igual ou superior à atividade antioxidante do chá verde comercial. A *H. italicum* apresenta possíveis vantagens de substituição ou utilização complementar de alguns produtos alimentares já muito utilizados.

4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA:

As placas de Petri que continham unicamente o meio Ágar Muller-Hinton mantiveram-se sem crescimento bacteriano, pelo que não se verificaram contaminações e comprovou-se a esterilidade do meio e das condições do ensaio.

Nas placas em que foram incorporados os antibióticos verificaram-se halos de inibição para todos os antibióticos com as 5 estirpes de bactérias diferentes. Verificaram-se a atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas diferentes estirpes utilizadas, **Tabela 3.7**. Sendo o CIP e AMP os que tiveram maior capacidade inibitória. O CIP teve maiores halos na B1, B3 e B5 ($30 \pm 1,41$ mm, $26 \pm 1,41$ mm e $33,5 \pm 0,71$ mm, respetivamente), enquanto que a AMP formou halos maiores para a B2 e B4 (>40 mm e 22mm, respetivamente). (**Figura 3.3**)

Tabela 3.7 Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes selecionadas.

	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
Ampicilina (AMP) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	17,00 ± 0,00 Susceptível	>40,00 Susceptível	8,00 ± 0,00 Resistente	22,00 ± 0,00 Susceptível	18,50 ± 0,70 Susceptível
Polimixina B (PB) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	12,00 ± 0,00 Susceptível	15,00 ± 0,00 Susceptível	9,00 ± 0,00 Intermédia	8,00 ± 0,00 Resistente	13,00 ± 1,41 Susceptível
Colistina (CT) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	11,00 ± 0,00 Susceptível	11,00 ± 0,00 Susceptível	8,00 ± 0,00 Resistente	8,00 ± 0,00 Resistente	9,50 ± 0,70 Intermédia
Ciprofloxacina (CIP) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	30,00 ± 1,41 Susceptível	30,50 ± 0,71 Susceptível	26,00 ± 1,41 Susceptível	20,00 ± 0,00 Intermédia	35,50 ± 0,70 Susceptível

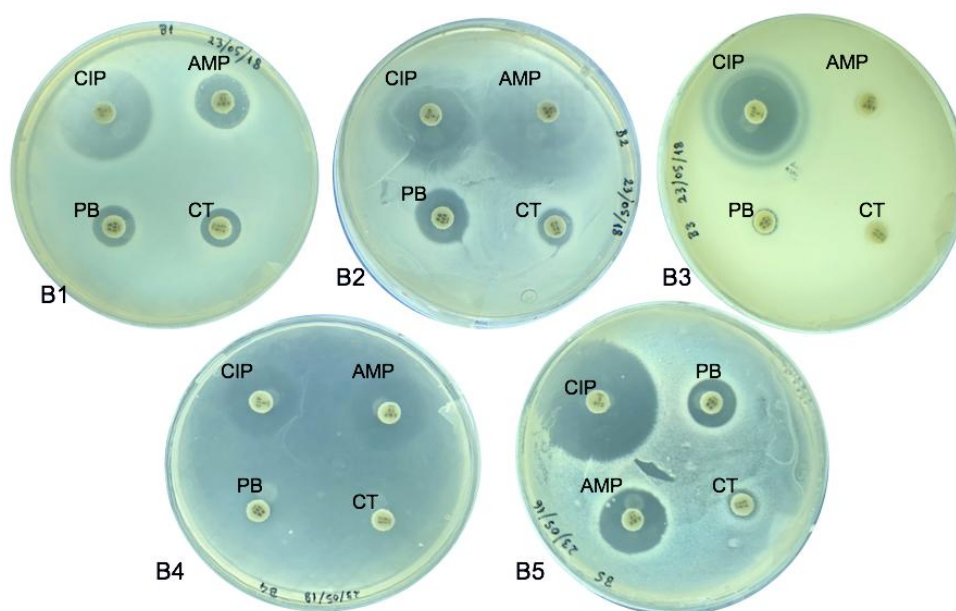


Figura 3.3 Halos de inibição do crescimento bacteriano das diferentes estirpes (*Escherichia coli* (B1); *Staphylococcus epidermidis* (B2); *Pseudomonas aeruginosa* (B3); *Enterococcus faecalis* (B4); *Staphylococcus aureus* (B5)) com os discos com os diferentes antibióticos Ciprofloxacina (CIP); Polimixina B (PB); Colistina (CT); ampicilina (AMP), 24h após a inoculação numa estufa a 37°C.

Na **Tabela 3.8** e **Figura 3.4**, encontram-se os resultados do efeito dos diferentes extratos testados nas diferentes estirpes bacterianas. Os halos de inibição foram difíceis de medir pois os extratos foram colocados com uma micropipeta nos discos já colocados na placa, pelo que os mesmos não absorveram o extrato na sua totalidade e este se afastou da zona do disco.

Tabela 3.8 Descrição dos efeitos inibitórios do extrato aquoso (infusão) e do extrato com acetona no desenvolvimento das bactérias (*Escherichia coli* (B1); *Staphylococcus epidermidis* (B2); *Pseudomonas aeruginosa* (B3); *Enterococcus faecalis* (B4); *Staphylococcus aureus* (B5)) 24h após a inoculação numa estufa a 37°C.

<i>H. italicum</i>	<i>Escherichia coli</i> (B1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (B2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B3)	<i>Enterococcus faecalis</i> (B4)	<i>Staphylococcus aureus</i> (B5)
Infusão 10 µL e 20 µL	Sem Efeito	Sem Efeito	Sem Efeito	Sem Efeito	Sem Efeito
Extrato com acetona 70% 10 µL	Sem Efeito	Inconclusivo	Halo de pequena dimensão	Halo de pequena dimensão	Halo de pequena dimensão
Extrato com acetona 20 µL	Halo de pequena dimensão	Inconclusivo	Halo de maior dimensão	Halo de maior dimensão	Halo de maior dimensão

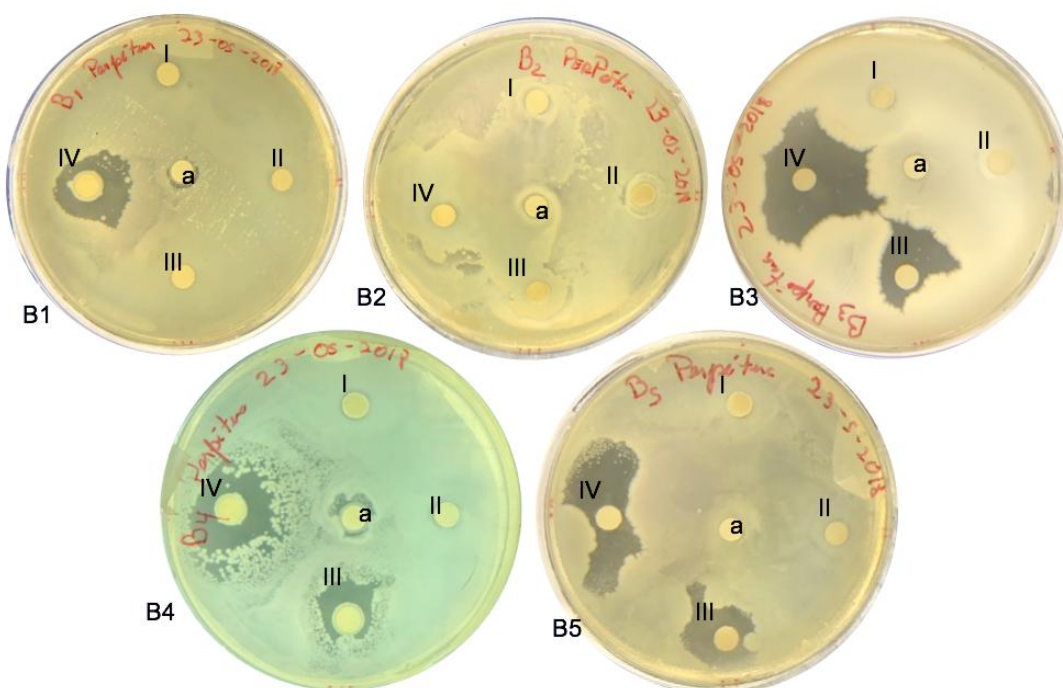


Figura 3.4 Efeitos dos diferentes extratos (I- infusão 10 µL, II- Infusão 20 µL, III- Extrato com acetona 70% 10 µL, IV- Extrato com acetona 70% 20 µL) nas bactérias (*Escherichia coli* (B1); *Staphylococcus epidermidis* (B2); *Pseudomonas aeruginosa* (B3); *Enterococcus faecalis* (B4); *Staphylococcus aureus* (B5)).

Nos extratos aquosos (infusões I e II) não se verificou qualquer efeito inibitório, quer com uma quantidade de 10 µL quer com 20 µL. Todavia, como se verifica atividade inibitória em extratos com maior concentração de compostos, como os óleos essenciais cuja atividade foi referida anteriormente, uma infusão mais concentrada poderá ter algum efeito.

A atividade inibitória também se verifica nos extratos com acetona 70% (III e IV), com a exceção da *S. epidermidis* cujos resultados foram inconclusivos nas placas em triplicado. Sobre a Gram - *E. coli*, existem estudos onde não foi encontrada qualquer atividade inibitória ou bacterioestática [52] ou apenas se verificou alguma inibição, mais notória a maiores concentrações [3]. Nos extratos com acetona a 70% (III e IV) observou-se pouca atividade inibitória contra a *E. coli*, verificando-se apenas no disco com maior quantidade de extrato (IV). Os óleos essenciais têm menor efeito sobre bactérias Gram – pelo que também demonstram uma atividade inibitória mais reduzida para a Gram - *P. aeruginosa*. Todavia, ambos os extratos com acetona a 70% (III e IV) apresentam atividade inibitória, podendo significar que os compostos presentes no óleos essenciais como os terpenos e esquiterpenos não têm grande efeito inibitório para estas bactérias podendo a resposta estar nos compostos fenólicos da *H. italicum*.

Estudos anteriores demonstraram atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em todas as bactérias testadas. Alguma atividade inibitória e bacterioestática na Gram+ *S. epidermidis* e atividade inibitória na *S. aureus* [52] e na *E. faecalis* [14]. Segundo a bibliografia disponível a *H. italicum* possui variadas ações biológicas como anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antimicrobiana. No que toca aos compostos fenólicos, estes apresentam uma elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória, principalmente devido a compostos como o arzanol [53]. Apesar de não serem os mais estudados, alguns testes demonstram atividade antibacteriana de compostos fenólicos como floroglucinol e derivados de acetofenonas [30]. A atividade antimicrobiana tem sido muito estudada no que toca aos seus óleos essenciais e os seus componentes. Estudos feitos revelam atividade inibitória no crescimento de fungos como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* [14], e em muitas bactérias, sendo a mais estudada por vários autores a sua atividade contra a *Staphylococcus aureus* [14][52][23].

5. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL POR µ-FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X:

A composição mineral da flor da *H. italicum* recolhida em dois locais diferentes (dunas e pinhal) encontra-se indicada na **Tabela 3.9**.

Tabela 3.9 Concentração dos diferentes elementos na flor de *H. italicum* recolhida em dois diferentes habitats. Os teores são expressos mg/kg \pm desvio padrão ou em %, caso do Ca e K; n=3.

Elemento	Duna	Pinhal
P	215 \pm 8,20 b	506 \pm 17,4 a
S	391 \pm 15,9 b	537 \pm 23,1 a
Mn	216 \pm 5,70 a	239 \pm 4,80 a
Fe	586 \pm 18,1 b	1068 \pm 32,30 a
Cu	92,0 \pm 4,30 a	100 \pm 3,10 a
Zn	310 \pm 10,2a	210 \pm 7,60 b
Ni	23,6 \pm 0,90 b	37,8 \pm 1,10 a
Sr	109 \pm 4,80 a	89,8 \pm 4,10 a
Rb	17,4 \pm 0,60 b	43,6 \pm 2,00 a
K	3,10 \pm 0,14 a	3,40 \pm 0,18 a
Ca	3,20 \pm 0,15 b	4,30 \pm 0,20 a

Valores médios, na mesma linha, que não seguidos por letras comuns, são significativamente diferentes para um nível de significância de 95%

As concentrações de P, S, Fe, Ni, Rb, e Ca, observadas nas flores provenientes do pinhal eram claramente superiores às observadas nas flores recolhidas nas dunas. Os teores de Mn, Cu e K, mais elevados foram igualmente detetados nas flores com origem no pinhal, embora estes valores não sejam significativamente diferentes para um nível de significância de 95%. Os teores de Zn e de Sr mais elevados por sua vez foram encontrados nas amostras dunares.

Ao estudarem a composição mineral de *Helichrysum italicum* em 2009 [54], apenas da parte aérea, recolhido na ilha da Córsega em 48 locais diferentes, observaram uma enorme variabilidade a que não deve ser alheio os diferentes estados de desenvolvimento das plantas em questão. De facto, no que respeita aos micronutrientes as concentrações de Fe, Mn, Zn e Cu variavam entre 88,5-950 mg/kg, 74-487,5 mg/kg, 20,1-240,4 mg/kg e 3.8-35,5 mg/kg, respetivamente.

No presente trabalho que analisou unicamente a parte floral, os teores encontrados são no caso do Cu e em grande parte para o Zn, superiores aos detetados por Bianchini et al. [54] sendo que o valor máximo de Fe por nós observado está próximo do máximo verificado por Bianchini (*op. cit.*). No caso do Mn os nossos valores médios estão dentro do intervalo definido por [54].

Num estudo realizado em 2014 [55], foram analisadas 6 espécies típicas da zona Mediterrânica pertencentes à família Asteraceae (*Taraxacum obovatum*, *Chondrilla juncea* L., *Sonchus oleraceus* L., *Cichorium intybus* L., *Scolymus hispanicus* L. e *Silybum marianum* L.), tendo-se observado que os níveis de K variavam entre 375 e 1772 mg/100 g de peso fresco e para o Ca

entre 16 e 472 mg/100 g, teores claramente inferiores aos observados no presente trabalho – os valores de K variavam entre 3,10 % e 3,40 % e de cálcio entre 3,20% e 4,30%. Aliás, os nossos resultados são igualmente superiores às concentrações observadas em Bianchini et al. [54], na parte aérea de *H. italicum* – 0,45%-1,01% para o caso do Ca e 0,43%-2,83% para o caso do K.

Independentemente das variações de concentração, a presença elevada do Ca e K nas plantas deve-se ao seu papel no crescimento das mesmas. O K costuma ser encontrado entre concentrações de 2% a 5% (peso seco) estando envolvido no processo de fotossíntese, no balanço iónico, na osmorregulação, entre outros. O Ca está presente entre 0,1% a 5%, participando na estabilização da membrana, em processos secretores e funcionando também como mensageiro secundário [27], embora a concentração considerada adequada em tecidos vegetais esteja fixada em 0,5% [56].

O ferro (Fe) é um elemento nutricional universal para praticamente todos os organismos, funcionando como transportador de eletrões na respiração e fotossíntese. É também componente essencial da hemoglobina, ferritina, para além de outras funções relacionadas com o normal funcionamento celular. O ferro existe sob duas formas - ferro heme que se encontra em alimentos de origem animal (carne vermelha, peixe e carne de aves), e ferro não heme que se encontra principalmente em alimentos de origem vegetal [57].

O Fe é o elemento presente em grande quantidade nas amostras das flores de *H. italicum*, quer com origem nas dunas quer com origem no pinhal, com valores médios de 586 mg/kg e 1068 mg/kg, respetivamente. Estes valores, não são preocupantes quer em termos da acumulação tecidual nos vegetais, quer em termos da saúde humana, pois o Fe apresenta baixa toxicidade.

Tal como o Fe, o Mn também desempenha um papel importante nos sistemas biológicos no caso das plantas com funções ligadas à fotossíntese, respiração e assimilação do azoto, enquanto para o metabolismo humano com um papel fundamental na manutenção dos ossos, sistema nervoso, cérebro, para além de sistemas enzimáticos. No presente trabalho os teores de Mn na flor variaram entre 216 a 239 mg/kg de Mn, valor inferior à concentração verificada em Bianchini et al. [54] na parte aérea de *H. italicum* que foi de 267 mg/kg, mas muito acima da concentração considerada adequada para tecidos vegetais, fixada em 50 mg/kg [56].

O Zn é um ativador de um grande número de enzimas e componente importante para a integridade estrutural dos ribossomas e essencial para a integridade da membrana. As concentrações de Zn observadas nas flores de *H. italicum* do presente estudo variavam entre 210 a 310 mg/kg, acima da concentração crítica em plantas [58] que se situa entre 150 e 200 mg/kg. Como anteriormente referido, [54] observaram uma ampla variação (20,1-240,4 mg/kg) nos teores de Zn na parte aérea de *H. italicum*, embora dos 48 locais de amostragem, apenas 4 forneceram teores superiores 100 mg/kg, o que significa que a esmagadora maioria dos

teores encontrados abaixo do limite mínimo definido [58].

Rb e Sr são considerados elementos metálicos vestigiais [27] apesar de serem comuns nalgumas plantas utilizadas para fins medicinais. No presente trabalho, a quantidade de Rb variou entre 17,4 e 43,6 mg/kg, enquanto os teores de Sr variaram entre 89,8 e 109 mg/kg, valores muito superiores aos obtidos para outras plantas medicinais que se situavam entre 2.2 e 23.1 mg/kg no caso do Sr, ou no caso do Rb entre 0,7 e 3,2 mg/kg [59]

O cobre é um elemento essencial para as plantas e animais estando envolvido em numerosas reações metabólicas. Nas plantas a concentração considerada adequada para tecidos numa base de peso seco, é de 6 mg/Kg [56] ocorrendo sob forma reduzida (Cu^+) e oxidada (Cu^{2+}) com funções tão distintas como ativador ou componente estrutural de enzimas envolvidos em processos de oxidação/redução [60].

As fontes de contaminação dos ecossistemas podem ser distintas, desde a atividade industrial como por exemplo a exploração mineira até às práticas agrícolas onde se destaca o uso de fertilizantes. De facto, ao estudar a concentração de metais pesados em diferentes fertilizantes inorgânicos (ureia, superfosfato de cálcio, sulfato de ferro e sulfato de cobre) concluiu-se que o superfosfato era o fertilizante que continha as concentrações mais elevadas de metais de Cd, Co, Cu e Zn, como impurezas [61]. Em 2016 verificou-se que as hortaliças e frutas cultivadas em redor de uma área de mineração na Roménia continham, em geral, concentrações excessivas de Cd, Cu, Pb e Zn, muito acima dos limites máximos admissíveis, indicando que o consumo deveria ser altamente restringido [62].

No nosso caso, a deteção de tão elevadas concentrações de Cu nas flores de *Helichrysum italicum* com valores que variavam entre 92 e 100 mg/kg, em áreas dunares ou de pinhal sendo que o próprio pinhal está implantado em solos arenosos, desafia qualquer explicação, por mais lógica que ela seja. Esta ampla zona dunar não parece estar sujeita a poluição antrópica, a não ser que a deposição atmosférica do elemento seja a causa principal. Neste contexto, alguns estudos apontam para um transporte de longa distância de vários elementos, como o Cu, Cd, Mn, Pb e Zn, a partir de zonas urbanas para zonas rurais [63], enquanto outros realçam o contributo de fogos florestais na emissão de vários elementos metálicos [64] associados a material particulado (PM_{2,5}) com risco para a saúde pública.

Podemos estar em presença de uma espécie com elevado potencial de acumulação de Cu sem que os seus mecanismos fisiológicos sejam por isso afetados. A concentração crítica em plantas de acordo com [58] varia entre 15 e 20 mg/kg, muito abaixo dos valores por nós observados. Na maioria dos casos o excesso de Cu interfere com a absorção de outros macronutrientes para além da fotossíntese e conseqüente redução da produção de biomassa [65], [66]. A nível celular, induz danos a nível cloroplastidial com a concomitante disfunção dos fotossistemas [67] com reflexos óbvios na produção de biomassa, como anteriormente referido.

Interessa futuramente confirmar, se a restante flora da área em estudo apresenta igualmente concentrações elevadas de Cu nos diferentes órgãos ou se se trata de uma singularidade específica desta espécie, que inclusive já está a ser avaliada em processos de fitoremediação [68]. De facto, observou-se que *H. italicum* apresentava uma grande capacidade de acumulação de Cu quando cultivada em solos contaminados – ao fim de um ano as raízes continham 60,1 mg/kg enquanto as plantas controlo 12,2 mg/kg. No que dizia respeito às folhas, os teores eram próximos, situando-se em redor dos 30 mg/kg, indicando que o sistema radicular foi particularmente eficiente em processos de remediação.

6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR:

Neste trabalho verificou-se que a *H. italicum* apresenta valores elevados de polifenóis, atividade antioxidante e alguma atividade antimicrobiana. Com o teste MTT foi procurada a relação entre a concentração do extrato e o seu efeito citotóxico na linha celular Caco-2. O MTT é um composto amarelo hidrossolúvel, que é metabolizado por células ativas transformando-se num composto insolúvel de cor azul-arroxeadado.

A infusão liofilizada foi testada com 11 concentrações diferentes, desde 3 a 152 mg/mL (**Figura 3.5**). A infusão esteve em contacto com as células durante 6 h em incubação a 37°C, e foi retirada e só então foi adicionado o MTT às células. Fez-se o cálculo da viabilidade e verificou-se que a concentrações mais elevadas a infusão apresentou citotoxicidade nas células Caco-2. Para as concentrações 13, 20, 30, 45, 68, 101 e 152 mg/mL obtiveram-se valores abaixo de 50% de viabilidade, 43,40% 6,64% 0,96%, 1,16%, 1,64%, 3,02% e 3,59%, respetivamente

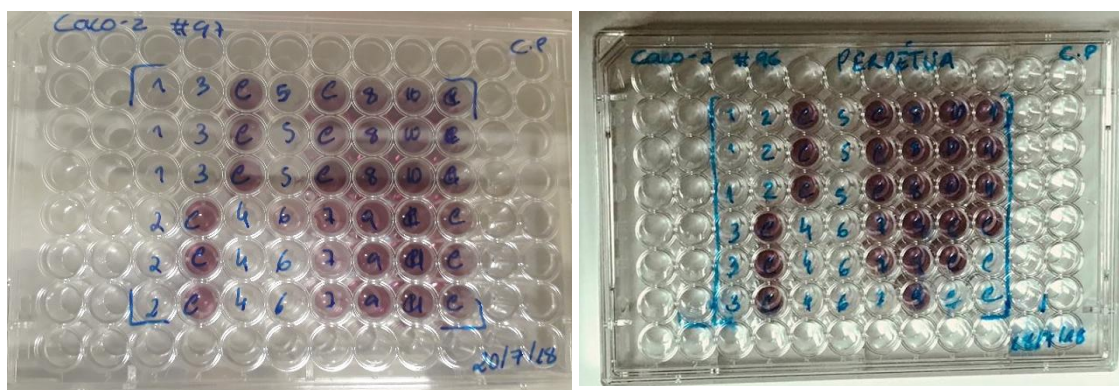


Figura 3.5 Placas analisadas no leitor de Elisa. 1-11 corresponde às diferentes concentrações do extrato, 1 mais concentrado, 11 menos concentrado. C corresponde aos poços de controlo.

Os poços com as infusões mais diluídas obtiveram valores mais elevados de viabilidade. Todavia, apenas os poços com a concentração de 6 mg/mL chegam a 90,95% de viabilidade, todos os outros apresentam valores inferiores. A partir do **Figura 3.6** e **Tabela 3.11**, é possível

verificar maior citotoxicidade aquando níveis de concentração mais elevados. No entanto, esperar-se-ia uma relação mais linear, isto é, quanto menor a concentração, maior a viabilidade [42].

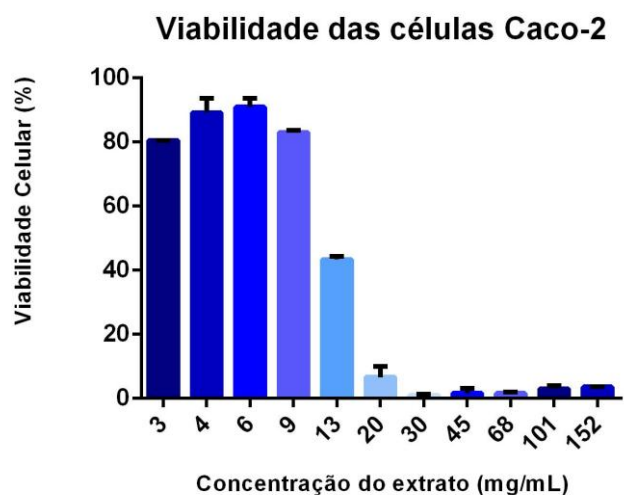


Figura 3.6 Viabilidade celular obtida para as células Caco-2, avaliada pelo teste MTT, quando submetidas à presença (durante 6 horas de incubação) de diferentes concentrações de extrato de *H. italicum*.

Tabela 3.10 Percentagem de viabilidade celular das células Caco-2 obtidas para cada concentração de extrato testada.

Concentração (mg/mL)	Viabilidade (%)
3	80,53 ± 0,06
4	89,20 ± 4,48
6	90,95 ± 2,77
9	82,98 ± 0,68
13	43,40 ± 0,90
20	6,67 ± 3,26
30	0,94 ± 0,31
45	1,59 ± 1,47
68	1,63 ± 0,40
101	3,01 ± 0,96
152	3,59 ± 0,13

No estudo realizado em 2017 sobre infusões e decocções de *H. italicum* subsp. *picardii* [17], foi testada a sua toxicidade em três linhagens celulares diferentes, células da micróglia murina (células N9), carcinoma hepatocelular humano (células HepG2) e células do estroma da medula (células S17). Apenas a concentração de 100 µg/mL foi testada, uma concentração cerca de 30 vezes menor que a menor concentração utilizada para este ensaio. As infusões das flores não apresentaram toxicidade para as células HepG2, baixa toxicidade para as células N9 e S17 >80% e 66%, respetivamente. Tal como neste ensaio, a infusão de *H. italicum* apresenta baixa toxicidade em concentrações mais baixas, mais próximas do valor real da concentração consumo, sendo valores promissores no que toca à produção de alimentos com a incorporação de flor de *H. italicum*.

7. INCORPORAÇÃO DE *H. ITALICUM* EM PRODUTOS PARA CONSUMO HUMANO:

Prova Hedónica:

Após a realização da análise estatística dos dados, verificou-se que apenas a formulação da *H. italicum* apresentou diferenças significativas aquando comparada com as restantes formulações. O chocolate controlo, o chocolate com *Callendula officinalis* (Calêndula) e o chocolate com *Corema album* (Camarinha) apresentaram uma média de 7, correspondendo à resposta “gosto moderadamente”, estando os resultados representados no **Figura 3.7**. No caso da *H. italicum* (Perpétua-das-areias) a média foi 5, correspondendo à resposta “não gosto, nem desgosto”.

Intenção de Compra:

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre a formulação controlo e todas as outras formulações. A média no caso da formulação controlo foi 2, correspondente à resposta “Provavelmente iria comprar”, enquanto que todas as restantes formulações obtiveram a classificação de 3, correspondente à resposta “talvez comprasse, talvez não”, os resultados encontram-se representados no **Figura 3.8**.

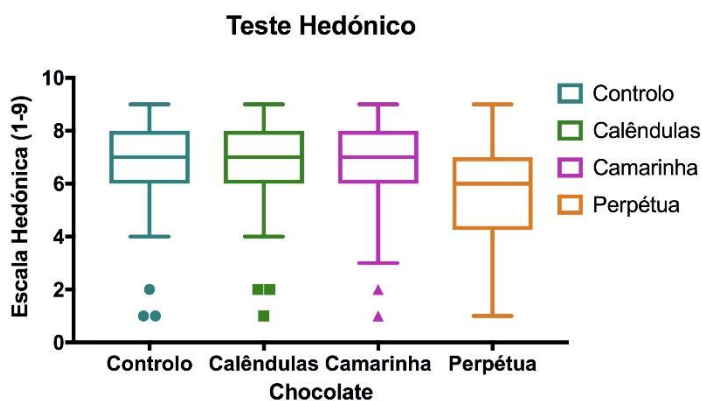


Figura 3.7 Resultado do teste Hedónico para o controlo (Pantagruel 70%) *C. officinalis* (Calêndulas), *H. italicum* (Perpétua) e *C. album* (Camarinha).

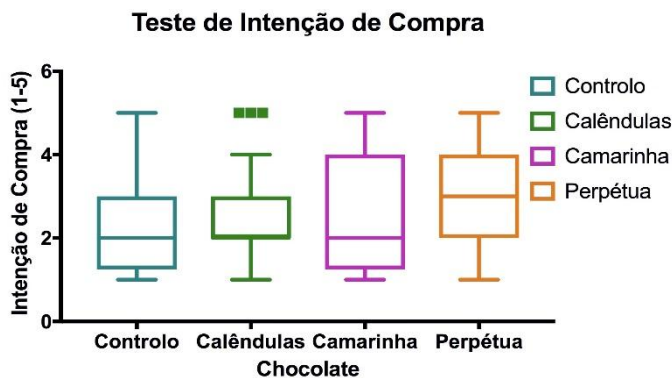


Figura 3.8 Resultado do teste de intensão de compra para o controlo (Pantagruel 70%) *C. officinalis* (Calêndula), *H. italicum* (Perpétua) e *C. album* (Camarinha).

Após análise das observações do questionário verificou-se que o painel de consumidores conseguiu identificar alguns atributos presentes na *H. italicum* como o sabor amargo, que se destacava. O sabor amargo dos alimentos de origem vegetal está muito associado à presença de compostos fenólicos, flavonoides, isoflavonas, terpenos e glucosinolatos, que podem agir como defesa da própria planta, pois torna-as pouco atrativas como alimentos. Não obstante de muitos destes compostos serem benéficos para o Homem, em elevadas quantidades poderão tornar-se tóxicos, assim, através da nossa sensibilidade para o amargo, as doses que são ingeridas destes alimentos serão mais reduzidas quanto mais amargos forem [69]. Este comportamento acaba por justificar a difícil aceitação deste produto que utilizou chocolate amargo (70% de cacau) e *H. italicum*, que possui um elevado valor de polifenóis, aumentando o seu cariz amargo.

Capítulo IV : CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS:

As plantas são parte essencial de um ecossistema e constituem uma grande porção da nossa dieta. No entanto, apenas uma pequena parte do reino das plantas é valorizada. Segundo a FAO, 95% da totalidade de plantas consumidas corresponde apenas a 30 culturas. É importante apelar ao consumo mais variado, para garantir uma maior biodiversidade nos ecossistemas no futuro.

A área das plantas silvestres comestíveis tem muitas espécies ainda por explorar. A *H. italicum* é pouco conhecida entre a população, sendo que quando o é, é utilizada com maior frequência numa vertente medicinal sob a forma de óleos essenciais. A promoção da utilização desta planta sob a forma de diferentes produtos para a alimentação, como bebidas, infusões, especiarias, entre outros, torna-se muito pertinente, tanto a nível nutricional como a nível económico. A utilização da *H. italicum* na alimentação humana é uma mais-valia devido aos seus elevados teores de polifenóis, às suas características antioxidantes e ao seu reduzido nível de citotoxicidade.

As plantas com elevados teores de polifenóis e atividade antioxidante, podem ser uma alternativa aos conservantes sintéticos utilizados pelas indústrias alimentares, para evitar a deterioração oxidativa dos alimentos, que, quando consumidos em elevadas quantidades, estão associados a atividades mutagénicas e cancerígenas. Plantas compostas por fitoquímicos como a *H. italicum*, são uma solução apelativa para muitos consumidores, uma vez que poderiam atuar como aditivos de origem natural, em detrimento dos artificiais (BHA e BHT) e estão relacionados a benefícios promotores da saúde, como antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, anti obesidade, hipoglicémicos e substâncias com propriedades protetoras do sistema neurológico, hepático e gastro respiratório [70].

Aumentar o tempo de prateleira dos produtos alimentares tem sido um dos grandes objetivos da indústria alimentar. Muitos dos métodos de conservação recaem sobre o uso de aditivos de origem sintética, embalagem mais eficazes, e criação de barreiras físicas que evitem a degradação oxidativa de produtos e o contacto com microrganismos contaminantes. Através deste trabalho e da bibliografia existente, verificou-se que para além da atividade antioxidante, existe atividade antimicrobiana de vários extratos de *H. italicum* e de alguns dos seus compostos isolados sobre diferentes tipos de microrganismos. O potencial desta planta cativa investigadores para a utilização destas suas propriedades. Num estudo de 2018 [71], procuraram averiguar a possibilidade de serem introduzidos extratos aquosos de *H. italicum* em filmes comestíveis biodegradáveis (película fina colocado sobre ou entre os produtos alimentares) reforçados com proteínas e partículas de hidrogel. Os resultados foram

promissores, todavia, será necessária mais investigação para a criação deste tipo de produtos.

Um dos problemas do consumo de flores é garantir a ausência de toxicidade. Como referido neste trabalho, extratos de *H. italicum* apresentam níveis de citotoxicidade muito reduzidos para concentrações normais de consumo, pelo que a sua introdução na área alimentar terá maior aceitabilidade. Apesar do elevado teor de polifenóis, para verificar os seus efeitos reais quando consumidos é necessário realizar testes de biodisponibilidade. A biodisponibilidade varia consoante o polifenol, pelo que o facto da *H. italicum* ter um elevado número de polifenóis, não significa necessariamente que eles sejam ativos e que cheguem aos tecidos alvos. O ácido gálico e as isoflavonas são os polifenóis absorvidos pelo organismo, seguido pelas catequinas, em contraste com as antocianinas que têm dificuldade em ser absorvidas [72]. Para além dos compostos em si, a matriz alimentar também é importante para garantir a biodisponibilidade dos vários elementos.

A procura de matérias-primas benéficas para a saúde que não causem alterações sensoriais indesejáveis ao produto alimentar tem vindo a aumentar o interesse de produtos que possuem compostos bioativos de origem vegetal. A introdução de novos ingredientes em produtos alimentares promove a diversificação alimentar individual e a introdução de novos sabores. Sendo também uma planta comum na zona costeira de Portugal, o cultivo desta espécie pode ser economicamente vantajoso e sustentável.

Para que haja a aceitação da população em geral, é preciso divulgação da planta e da sua potencial utilização quer em infusões ou como especiarias, pelo que estudos como este são um passo em frente na promoção de plantas silvestres comestíveis. Neste trabalho foi possível realizar provas hedónicas de um produto que incorporava flores secas de *H. italicum* a um painel de consumidores de diferentes nacionalidades. O sabor desta planta destacou-se pela sua singularidade, um sabor amargo que não agrada a todos os consumidores nem combina com todos os produtos alimentares, no entanto merecedor de ser explorado visto ter um *flavour* semelhante ao do caril. Esta planta deverá ter mais sucesso quando introduzida como mistura de especiarias que possam ser adicionadas, por exemplo, em arroz, como substituição ou em conjunto com o caril e o açafrão das índias, diversificando o teor de nutrientes e dando distinção ao prato. Para produzir alimentos que a incorporem serão necessários estudos de mercado para entender em que nicho se enquadrará melhor.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Federação das indústrias Portuguesas Agroalimentares (2009). Compromissos da indústria alimentar sobre Alimentação, Actividade Física e Saúde: Reformulação nutricional e informação aos consumidores. 1-5 pp.
- [2] Pereira, C., Barreira, L., Bijtebier, S., Pieters, L., Marques, C., Santos, T., Rodrigues, M., Valera, J. & Custódio, L. (2018). Health promoting potential of herbal teas and tinctures from *Artemisia campestris subsp. maritima*: from traditional remedies to prospective products. *Scientific Reports*, 8(1), 4689.
- [3] Goldansaz, S. M., Mahboubi, A., Yazdi-nejad, A., Jahanbakhshi, M., & Mojab, F. (2018). Investigation on total phenolic content, antibacterial, and antioxidant activity of ethanolic extract of *Helichrysum leucocephalum* Boiss. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 6(1), 20-24.
- [4] Pierre Fabre (2016). Naturactive: Nearly 14 metric tons of *Helichrysum italicum* harvested in the Tarn; <https://www.pierre-fabre.com/en/news/naturactive-nearly-14-metric-tons-helichrysum-harvested-tarn>. (acedido: Jun 21, 2018).
- [5] Dzamić, A. M., Matejić, J. S., & Marin, P. D. (2016). Trends in biological activity research of wild-growing aromatic plants from Central Balkans. *Biologica Nyssana*, 7(2), 61-73
- [6] Gao, T., Yao, H., Song, J., Zhu, Y., Liu, C., & Chen, S. (2010). Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large *Asteraceae* family. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 324.
- [7] Melito, S., Petretto, G. L., Podani, J., Foddai, M., Maldini, M., Chessa, M., & Pintore, G. (2016). Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 80, 242-250.
- [8] Viegas, D. A., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 54-65.
- [9] Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B. & Munoz, E. (2007). Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol α -

pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 70(4), 608-612.

[10] Galbany-Casals, M., Blanco-Moreno, J. M., Garcia-Jacas, N., Breitwieser, I., & Smissen, R. D. (2011). Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin? *Plant Biology*, 13(4), 678-687.

[11] Romano, A. & Gonçalves, S. (2015) Plantas silvestres comestíveis do Algarve. Universidade do Algarve, Ed., 2015. pp 60-61.

[12] Rigano, D., Formisano, C., Senatore, F., Piacente, S., Pagano, E., Capasso, R., Borrelli, F. & Izzo, A. A. (2013). Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 901-906.

[13] Nedelcheva, A. M., Dogan, Y., & Guarrera, P. M. (2007). Plants traditionally used to make brooms in several European countries. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(1), 20.

[14] Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Maria, A. E., & Mihoub, Z. M. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(5), 780-787.

[15] Yang, S. K., Low, L. Y., Yap, P. S. X., Yusoff, K., Mai, C. W., Lai, K. S., & Lim, S. H. E. (2018). Plant-Derived Antimicrobials: Insights into Mitigation of Antimicrobial Resistance. *Records of Natural Products*, 12(4), 295-396.

[16] Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431-441.

[17] Pereira, C. G., Barreira, L., Bijttebier, S., Pieters, L., Neves, V., Rodrigues, M. J., Rivas, R., Varela, J. & Custódio, L. (2017). Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and roibos tisane (*Aspalathus linearis*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 593-603.

[18] Ashley, A., Thiede, B. & Zidenberg-Cherr, S. (2016). Nutrition and health info sheet: Phytochemicals. *Center for Nutrition in Schools Department of Nutrition University of California*.

[19] Maksimovic, S., Tadic, V., Skala, D., & Zizovic, I. (2017). Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry*, 138, 9-28.

- [20] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1794427, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427> (accedido Jun 21, 2018).
- [21] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=689043, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/689043> (accedido Jun 21, 2018).
- [22] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6508, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6508> (accedido Jun 21, 2018).
- [23] Guinoiseau, E., Lorenzi, V., Luciani, A., Muselli, A., Costa, J., Casanova, J., & Berti, L. (2013). Biological properties and resistance reversal effect of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Microbial pathogens and strategies for combating them: *Science, Technology and Education*, 2, 1073-1080.
- [24] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=22311, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22311> (accedido Jun 21, 2018).
- [25] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=643820, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/643820> (accedido Jun 21, 2018).
- [27] Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., & Jain, R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 405-412.
- [26] Chizzola, R. (2012). Metallic mineral elements and heavy metals in medicinal plants. *Medicinal and Aromatic Plant Science Biotechnology* 6, 39-53.
- [21] Sala, A., Recio, M. D. C., Giner, R. M., Máñez, S., Tournier, H., Schinella, G., & Ríos, J. L. (2002). Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(3), 365-371.
- [28] Drapeau, J., Fröhler, C., Touraud, D., Kröckel, U., Geier, M., Rose, A., & Kunz, W. (2009). Repellent studies with *Aedes aegypti* mosquitoes and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(4), 160-169.
- [29] Nostro, A., Bisignano, G., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Germano, M. P., & Alonzo, V. (2001). Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6), 517-520.
- [30] Nostro, A., Cannatelli, M. A., Musolino, A. D., Procopio, F., & Alonzo, V. (2002). *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(3), 181-184.

- [31] Horrigan, L., Lawrence, R. S., & Walker, P. (2002). How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 110(5), 445.
- [32] World Resources Institute, IUCN--The World Conservation Union, & International Union for Conservation of Nature. (1992). Global biodiversity strategy: guidelines for action to save, study, and use earth's biotic wealth sustainably and equitably. World Resources Inst.
- [33] Jovović, Z., Salkić, B., Velimirović, A., Vukićević, P. & Salkić, A. (2018). Production of Immortelle Seedlings According to the Principles of Organic Production. vol. 21, no. 6, pp. 1–5.
- [34] Association of Official Analytical Chemists (1990) Official Methods of Analysis. *Washington, D.C.*, vol. 15th, no. Volume 1, pp. 136–138.
- [35] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- [36] Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 607-616.
- [37] Rockenbach, I. I., da Silva, G. L., Rodrigues, E., Kuskoski, E. M., & Fett, R. (2008). Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28(Supl.), 238-244.
- [38] Gião, M. S., González-Sanjosé, M. L., Rivero-Pérez, M. D., Pereira, C. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2638-2647.
- [39] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [41] Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F. Z., & Benmansour, A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. rupestre and *Phagnalon saxatile* subsp. saxatile. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 415-422.
- [42] Kilani, S., Sghaier, M. B., Limem, I., Bouhlel, I., Boubaker, J., Bhourri, W., Skandrani, I., Neffati, A., Ben, R., Dijoux-Franca, M., & Ghedira, K. (2008). In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. *Bioresource Technology*, 99(18), 9004-9008.

- [43] Talib, W. H., & Mahasneh, A. M. (2010). Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*, 15(3), 1811-1824.
- [44] Sigma-Aldrich (2012). Cell Proliferation Kit I (MTT). Colorimetric assay (MTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability. *Protocols*, vol. 1000, no. 1465, pp. 6–9.
- [45] Chen, P. X., Zhang, H., Marcone, M. F., Pauls, K. P., Liu, R., Tang, Y., Zhang, B., Renaud, J. & Tsao, R. (2017). Anti-inflammatory effects of phenolic-rich cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 38, 675-685.
- [46] Pay, E. (2009). The market for organic and fair-trade cocoa. *FAO, Rom. Elektronische Version unter: www. fao. org/fileadmin/templates/organicexports/docs/Market_Organic_FT_Cocoa.pdf, Abrufdatum, 10, 2010.*
- [47] Wichchukit, S., & O'Mahony, M. (2014). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2167-2178.
- [48] Pellizzaro, G., Duce, P., Ventura, A., & Zara, P. (2007). Seasonal variations of live moisture content and ignitability in shrubs of the Mediterranean Basin. *International Journal of Wildland Fire*, 16(5), 633-641.
- [49] Siatka, T., & Kašparová, M. (2010). Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. *Molecules*, 15(12), 9450-9461.
- [50] Ammar, I., Ennouri, M., Khemakhem, B., Yangui, T., & Attia, H. (2012). Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 34-40.
- [51] Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- [52] Staver, M. M., Gobin, I., Ratkaj, I., Petrovic, M., Vulinovic, A., Dinarina-Sablic, M., & Broznic, D. (2018). In vitro antiproliferative and antimicrobial activity of the essential oil from the flowers and leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don growing in Central Dalmatia (Croatia). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1), 77-91.

- [53] Viegas, D. A., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 54-65.
- [54] Bianchini, A., Santoni, F., Paolini, J., Bernardini, A. F., Mouillot, D., & Costa, J. (2009). Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. essential oil. *Chemistry & Biodiversity*, 6(7), 1014-1033.
- [55] García-Herrera, P., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Díez-Marqués, C., Molina, M., & Tardío, J. (2014). Nutrient composition of six wild edible Mediterranean Asteraceae plants of dietary interest. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(2), 163-170.
- [56] Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E. (2005) *Biology of Plants*, 7th edit, W.H. Freeman and Company Publishers (New York), 686 pp.
- [57] Alimentaço Saudável (2018). Ferro; <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/nutriente/ferro/>. (accessed: Set 23, 2018).
- [58] Kabata-Pendias, A. (2011) *Trace elements in soils and plants*, 4th edit., Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- [59] Khuder, A., Sawan, M. K., Karjou, J., & Razouk, A. K. (2009). Determination of trace elements in Syrian medicinal plants and their infusions by energy dispersive X-ray fluorescence and total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64(7), 721-725.
- [60] Kim, B-E., Nevitt, T. & Thiele, D.J. (2008) Mechanisms of copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* 4, 176-185.
- [61] Gimeno-García, E., Andreu, V. & Boluda, R. (1996) Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental Pollution* 92(1), 19-25.
- [62] Roba, C., Rosu, C., Pisteu, I., Ozunu, A. & Baciuc, C. (2016) Heavy metal content in vegetables and fruits cultivated in Baia Mare mining area (Romania) and health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 6062–6073.
- [63] Fergusson J.E & Stewart C (1992) The transport of airborne trace elements, copper, lead, cadmium, zinc and manganese from a city into rural areas. *Science of the Total Environment* 121, 247-269.

- [64] Betha, R., Pradani, M., Lestari, P., Joshi U.M., Reid, J.S. & Balasubramanian R. (2013) Chemical speciation of trace metals emitted from Indonesian peat fires for health risk assessment. *Atmospheric Research* 122, 571-578.
- [65] Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J. & Figueroa, M.E. (2008). Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research* 66, 459-465.
- [66] Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. & Sreekanth, T.V.M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental and Chemical Letters* 8, 199–216.
- [67] Reboredo, F. & Henriques, F. (1991) Some observations on the leaf ultrastructure of *Halimione portulacoides* (L.) Aellen grown in a medium containing copper. *Journal of Plant Physiology* 137, 717-722.
- [68] Brunetti G., Ruta C., Traversa A., D'Ambruoso G., Tarraf W., De Mastro F., De Mastro G. & Cocozza, C. (2018) Remediation of a heavy metals contaminated soil using mycorrhized and non-mycorrhized *Helichrysum italicum* (Roth) Don. *Land Degradation & Development*, 29: 91-104.
- [69] Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review –. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1424-1435.
- [70] Franzen, F., Fernando, H., Silvia, M. & Oliveira, R. (2018) Edible flower considerations as ingredients in food, medicine and cosmetics. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* 7(3), 271–273.
- [71] Karača, S., Trifković, K., Bušić, A., Đorđević, V., Belščak-Cvitanović, A., Cebin, A. V., Bugarski B. & Komes, D. (2018). The functional potential of immortelle (*Helichrysum italicum*) based edible films reinforced with proteins and hydrogel particles. *LWT – Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.039>
- [72] Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies—. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 243S-255S.