

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Teresa Carolina Magalhães Moreira

**Valorização de *Calluna vulgaris* (L.) Hull como
potencial ingrediente cosmético**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao
Grau Mestre em Controlo da Qualidade

Especialidade em Água e Alimentos

Trabalho realizado sob a orientação de:

Doutora Francisca Rodrigues

Prof. Doutora M.^a Beatriz P.P. Oliveira

Novembro, 2016

Este trabalho contou com um apoio financeiro de acordo com o projeto Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011—denominada Qualidade e Segurança Alimentar—uma abordagem (nano)tecnológica. Para além disso, este trabalho foi também apoiado pelo projeto UID/QUI/50006/2013 – POCI/01/0145/FEDER/007265 suportado com um apoio financeiro da FCT/MEC através de fundos nacionais e cofinanciado pela FEDER.

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta Dissertação/Tese.

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser valorizados.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Beatriz Oliveira, a sua disponibilidade e sobretudo a oportunidade que me deu em desenvolver este projeto no seu grupo de investigação de elevada qualidade e exigência. O meu reconhecimento sincero pela transmissão de conhecimento e experiência profissional, que pessoalmente admiro.

À Doutora Francisca Rodrigues, a sua orientação, competência, simpatia, disponibilidade, profissionalismo e ambição que foram sempre fulcrais para o sucesso deste trabalho. Agradeço sinceramente o apoio, os incentivos, as críticas porque tudo isso fez com que este projeto me proporcionasse um enriquecimento não apenas teórico ou laboral, mas sobretudo pessoal. É uma pessoa que eu admiro e com quem tive o enorme prazer de trabalhar.

Um agradecimento muito especial à Professora Ana Oliveira pela oportunidade de poder realizar os ensaios de viabilidade celular no Laboratório de Farmácia da Escola Superior de Saúde do Porto. Foi uma pessoa que se mostrou sempre disponível em ajudar e sem a sua boa disposição, compreensão, amabilidade, exigência e encorajamento teria sido tudo muito mais complicado. Um profundo obrigado, foi uma honra trabalhar e aprender consigo. Expresso inclusive a minha gratidão a outros professores, colegas e funcionários desta instituição que sempre me acolheram da melhor forma e só posso sentir-me lisonjeada por ter tido a oportunidade de trabalhar ao lado de um grupo fantástico e bastante acolhedor.

Não poderia deixar de agradecer ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela disponibilidade dos meios e pelo contributo científico. Tenho muito a agradecer a este grupo porque sempre me ajudou desde o início e sempre se mostrou disponível em colaborar, em ensinar, em transmitir confiança e são pessoas como estas que fazem com que um projeto seja possível de se realizar.

À Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira, do Laboratório de Microbiologia da Universidade da Beira Interior, agradeço a disponibilidade na realização dos ensaios microbiológicos.

Na verdade, não é fácil elaborar uma Tese, é todo um processo complexo e que muitas das vezes o tempo é sempre escasso, mas o importante é que a vontade seja sempre muita. Assim, tenho muito a agradecer à D. Ana, à Diretora do Centro de Estudos em que trabalho, por acreditar em mim e pela oportunidade. Aos meus alunos, que foram uma peça chave, na verdade a aprendizagem que eu lhes transmiti foi inferior à que eles me puderam transmitir e a força que muita das vezes foi precisa, veio deles.

Os amigos são escolhidos por nós e são eles que se tornam das melhores escolhas que fazemos. Um muito obrigado por me apoiarem, por acreditarem, por se preocuparem e por estarem sempre presentes.

Por último, não podia deixar de agradecer à minha família. Aos meus pais e irmão que são o meu motivo de orgulho e que sei que vão estar sempre ao meu lado para me ajudarem em tudo. Aos meus avós, tios e primos por todo o apoio durante este percurso.

Resumo

A sustentabilidade dos ecossistemas é um desafio cada vez mais presente no contexto atual. Tendo em conta a crescente necessidade de recursos alimentares, a utilização de plantas medicinais para a formulação de novos produtos tem-se revelado uma mais-valia. Por outro lado, e tendo em consideração o uso racional de plantas, os seus extratos podem contribuir com novos efeitos terapêuticos. Um exemplo é a *C. vulgaris* (L.) Hull, planta nativa da flora portuguesa, vulgarmente conhecida como urze.

A caracterização química da *C. vulgaris* foi avaliada determinando a fibra dietética total que representou 38.96%, o teor de hidratos de carbono 36.21%, a humidade 12.03%, o conteúdo proteico total 6.80%, a gordura total 3.70% e as cinzas 2.31%. O perfil de vitamina E foi avaliado para as colheitas de maio e outubro. Os resultados revelaram que diferentes condições climáticas a que a planta é sujeita nestes meses influencia o perfil do teor de Vitamina E e seus vitâmeros. Sete ácidos gordos foram identificados, sendo o ácido linolénico (C18:3n3) o principal, seguido do ácido linoleico (C18:2n6c) e do ácido palmítico (C16:0). Para o estudo da atividade antioxidante, viabilidade celular e atividade antimicrobiana foram selecionados três extratos (aquoso, alcoólico e hidroalcoólico). O conteúdo fenólico total (CFT) e o teor de flavonoides total (TFT) também foram avaliados. O extrato hidroalcoólico apresentou a maior atividade antioxidante ($51.83 \pm 3.90 \mu\text{mol eq. Trolox/g}$ para o DPPH; $2138.30 \pm 15.46 \mu\text{mol/g}$ para o FRAP). O CFT e TFT variaram, respetivamente, entre 53.96 mg a 121.92 mg EAG/g e 14.80 mg a 118.26 ECA/g para os três extratos estudados.

Os resultados de viabilidade celular demonstraram que os extratos da *C. vulgaris* não apresentam possíveis efeitos adversos em concentrações inferiores a 1mg/mL em queratinócitos e fibroblastos. Para além disso, os resultados podem indicar um provável efeito protetor dos extratos sobre os fibroblastos. Por fim, o extrato hidroalcoólico de *C. vulgaris* apresentou uma possível atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. epidermis*.

Este estudo mostrou o elevado potencial de *C. vulgaris* como fonte de compostos bioativos, podendo estes resultados justificar parcialmente as suas possíveis utilizações em produtos de cuidados da pele.

Palavras-chave: Sustentabilidade, *C. vulgaris* (L.) Hull, composição nutricional, propriedades bioativas, cuidados da pele

Abstract

The ecosystems sustainability is an increasing challenge around the world. Bearing in mind the growing need of worldwide resources, the application of medicine plants in the development of new products has increased. Also, considering the rational use of plants, its extracts can equally contribute to discover new therapeutic effects. An example is a *Calluna vulgaris* (L.) Hull, native plant presents in portuguese flora, usually known as heather.

The aim of this work was to characterize *C. vulgaris* and its different extracts taking into account sustainability questions. *C. vulgaris* was chemical characterized by dietary fiber represents 38.96%, the carbohydrates 36.21%, the moisture 12.03 %, the protein content 6.80%, the total fat 3.70 % and the ash 2.31%. Vitamin E profile was evaluated in two different harvest periods, May and October. This study revealed that different climate conditions influence vitamin E profile. Seven fatty acids were identified in *C. vulgaris*. Linolenic acid (C18:3n3) was the main fatty acid followed by linoleic acid (C18:2n6c) and palmitic acid (C16:0).

Three extracts (aqueous, ethanolic and hydro-alcoholic) were screened for antioxidant activity, cell viability and antibacterial activity. The total flavonoids content (TFC) and total phenolic content (TPC) were also evaluated. Hydro-alcoholic extract displayed the highest antioxidant activity (51.83 ± 3.90 μmol Trolox equivalent per g for DPPH; 2138.30 ± 15.46 $\mu\text{mol/g}$ for FRAP). The TPC and TFC varied, respectively, from 53.96 mg to 121.92 mg GAE/g and 14.80 mg to 118.26 CEQ/ g dry basis for the three extract.

The cell viability results suggested that *C. vulgaris* extracts has no adverse effects on keratynocytes and fibroblasts at concentrations inferior to 1mg/mL. Furthermore, the results could indicate a probable protective effect of the extracts on fibroblasts. The hydro-alcoholic extract of *C. vulgaris* showed a potential antimicrobial activity against *S. aureus* and *S. epidermis*.

This study showed the high potential of *C. vulgaris* and these results can partially justify their possible uses in skin care products.

Keywords: Sustainability, *Calluna vulgaris* (L.) Hull, nutritional composition, bioactive proprieties, skin care.

Comunicações

1. Diana Pinto, Teresa Moreira, Ana Isabel Oliveira, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, *Castanea sativa* bur extract as active ingredient in topical formulations, 9º Encontro dos Jovens Investigadores da Universidade do Porto, February 2016, Porto, Portugal
2. Teresa Moreira, Diana Pinto, Filipa Pimentel, Joana Santos, Anabela Costa, Ana I. Oliveira, Francisca Rodrigues e M. Beatriz P.P. Oliveira, Valorization of calluna vulgaris (L.) Hull as a potential cosmetic ingredient: characterization, antioxidant activity and cell viability study, XIII Encontro de Química dos Alimentos, September 2016, Porto, Portugal.
3. Fábio Passos, Ana F. Vinha, Teresa Moreira, Ana Oliveira, Francisca Rodrigues, Anabela S.G. Costa, M. Beatriz P.P. Oliveira, *Adansonia digitata* fruit: A posible valuable enriched ingredient, XIII Encontro de Química dos Alimentos, September 2016, Porto, Portugal
4. Diana Pinto, Teresa Moreira, Ana I. Oliveira, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, Development of topical formulations with *Castanea sativa* bur extract as active ingredient, XIII Encontro de Química dos Alimentos, September 2016, Porto, Portugal

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Comunicações	viii
Índice	ix
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
1. Introdução	1
1.1 Sustentabilidade.....	2
1.1.1 Definição de Sustentabilidade.....	2
1.1.2 Sustentabilidade Ambiental, Económica e Social.....	3
1.2 Espécies Autóctones.....	4
1.2.1 Contextualização da Urze na Flora Autóctone Portuguesa	4
1.3 <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull	6
1.3.1 Uso Sustentável da <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull	9
1.3.2 Composição Química.....	10
1.3.3 Propriedades Biológicas	11
1.3.3.1 Atividade Antioxidante	11
1.3.3.2 Atividade Antimicrobiana	17
1.3.4 Aplicação em Produtos Cosméticos.....	18
2. Material e Métodos.....	21
2.1 Reagentes e Padrões.....	22
2.2 Recolha e Tratamento da Amostra	23
2.3 Análise Química	24
2.3.1 Determinação do Teor de Humidade	24
2.3.2 Determinação do Teor de Fibra Dietética.....	25

2.3.3	Determinação do Teor de Proteína	26
2.3.4	Determinação do Teor de Cinzas.....	27
2.3.5	Determinação de Gordura.....	27
2.3.6	Determinação de Hidratos de Carbono	27
2.3.7	Determinação do Teor de Vitamina E	28
2.3.7.1	Análise Cromatográfica	28
2.3.8	Avaliação do Perfil de Ácidos Gordos	29
2.3.8.1	Análise Cromatográfica	30
2.4	Determinação de Compostos Bioativos	31
2.4.1	Preparação dos Extratos.....	31
2.4.2	Determinação do Conteúdo Fenólico Total	32
2.4.3	Determinação do Teor de Flavonoides Total.....	32
2.4.4	Atividade Antioxidante	33
2.4.4.1	Capacidade de inibição do radical DPPH	33
2.4.4.2	Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP).....	34
2.5.	Viabilidade celular - Ensaio MTT	35
2.6	Atividade Antimicrobiana	37
2.6.1	Estirpes de Microrganismos.....	37
2.6.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	37
2.7	Análise Estatística	38
3.	Resultados e Discussão	39
3.1	Análise Química	40
3.1.1	Caracterização do Perfil Nutricional	40
3.1.2	Determinação da Vitamina E	42
3.1.3	Determinação do Perfil de Ácidos Gordos	44
3.2	Determinação de Compostos Bioativos	46
3.2.1	Método de Extração.....	46
3.2.2	Teor de Compostos Fenólicos Total	47
3.2.3	Teor de Flavonoides Total	48

3.3 Atividade Antioxidante	49
3.3.1 Capacidade de inibição do radical DPPH.....	49
3.3.2 Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)	50
3.3.3 Correlação de Atividades	51
3.4 Viabilidade Celular – Ensaio MTT.....	52
3.5 Atividade Antimicrobiana	54
4. Conclusão	56
5. Referências Bibliográficas	59

Lista de Figuras

Figura 1: Diferentes espécies de urzes presentes na flora autóctone portuguesa.	5
Figura 2: <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull.....	6
Figura 3: Mapa de distribuição geográfica da <i>C. vulgaris</i> (L.) Hull, a nível mundial.	7
Figura 4: Mapa de distribuição geográfica da <i>C. vulgaris</i> (L.) Hull em Portugal continental	8
Figura 5: Interligação esquemática das áreas envolvidas no desenvolvimento sustentável da <i>C. vulgaris</i>	9
Figura 6: Representação esquemática de antioxidantes naturais nas diferentes classes.	13
Figura 7: Representação esquemática da estrutura do tecido cutâneo.	14
Figura 8: Representação da incidência das diferentes radiações UV na pele.....	16
Figura 9: Recolha da amostra da flor da <i>C. vulgaris</i>	23
Figura 10: Balança de determinação de humidade.....	24
Figura 11: Sistema termostaticado onde ocorreu incubação.	25
Figura 12: Destilador automático.....	26
Figura 13: Diferentes fases da amostra para a obtenção dos três extratos	31
Figura 14: Placa de 96 poços referentes ao ensaio de MTT.....	36
Figura 15: Aspeto macroscópico dos diferentes extratos, respetivamente, aquoso, hidroalcoólico, alcoólico	46
Figura 16: Efeito da atividade metabólica de células HaCat após o seu contacto com diferentes extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) e concentrações da <i>C. vulgaris</i> , determinado pelo ensaio de MTT	52
Figura 17: Efeito da atividade metabólica de fibroblastos após o seu contacto com diferentes extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) e concentrações da <i>C. vulgaris</i> , determinado pelo ensaio de MTT	53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação científica da <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull.....	6
Tabela 2: Produtos cosméticos que utilizam o extrato da <i>C. vulgaris</i> , as suas propriedades e as empresas que os comercializam.	20
Tabela 3: Teores em percentagem (%) da humidade, fibra, cinzas, proteína, gordura e hidratos de carbono na flor da <i>C. vulgaris</i>	40
Tabela 4: Valor total de Vitamina E e dos diferentes vitâmeros da amostra da <i>C. vulgaris</i> em maio e setembro.....	42
Tabela 5: Composição em ácidos gordos (% área relativa) na amostra da flor da <i>C. vulgaris</i>	44
Tabela 6: Conteúdo fenólico total (mg eq. EAG /g extrato seco) da flor da <i>C. vulgaris</i> para os três tipos de extratos analisados: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico.....	47
Tabela 7: Teor de flavonoides totais (mg ECA/g extrato seco) da flor da <i>C. vulgaris</i> para os três tipos de extratos analisados: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico.....	48
Tabela 8: Atividade antioxidante dos diferentes extratos da flor da <i>C. vulgaris</i> , aquoso, hidroalcoólico e alcoólico baseados na capacidade de inibição do radical DPPH.	49
Tabela 9: Atividade antioxidante dos diferentes extratos: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico da flor da <i>C. vulgaris</i> baseado na sua capacidade de reduzir o íon férrico (Fe ³⁺) ao estado ferroso (Fe ²⁺).....	50
Tabela 10: Valores de Correlação de Pearson (R ²) obtidos para os ensaios.	51

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AG – Ácido Gordo

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

ATCC - American Type Culture Collection

C16:0 – Ácido Palmítico

C18:0 – Ácido Esteárico

C18:1n9c – Ácido Oleico

C18:3n3 – Ácido Linolénico

C22:0 – Ácido Beénico

CFT - Conteúdo Fenólico Total

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAG - Equivalentes em Ácido Gálgico

ECA - Equivalentes de Catequina

ECVAM - *The European Centre for the Validation of Alternative Methods*, Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos

ERA – Espécies Reativas de Azoto

ERO – Espécies Reativas de Oxigénio

ERE – Espécies Reativas de Enxofre

FAME - *Fatty Acids Methyl Esters*, Esteres Metílicos de Ácidos Gordos

FAO - *Food and Agriculture Organization*, Organização das Nações Unidas para a Alimentação

FDT - Fibra Dietética Total

FRAP - *Ferric Reducing Ability of Plasma*, Capacidade de Redução Férrica do Plasma

GC - FID – *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*, Cromatografia gasosa com Detetor por Ionização de Chama

GRAS - *Generally Recognized As Safe*, Geralmente Reconhecido Como Seguro

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência

HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana

IL – Interleucina

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

LPN – Liga para a Proteção da Natureza

MAO – Monoamina Oxidase

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

MUFA - *Monounsaturated Fatty Acids*, Ácidos Gordos Monoinsaturados

PCHC - Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal

PUFA - *Polyunsaturated Fatty Acids*, Ácidos Gordos Polinsaturados

ONU - Organização das Nações Unidas

REA - Relatório do Estado do Ambiente

SFA - *Saturated Fatty Acids*, Ácidos Gordos Saturados

SOER – *State of Environment Reporting*, Relatório sobre o Estado do Ambiente

TFT - Teor de Flavonoides Total

TNF - *Tumor Necrosis Factor*, Fator de Necrose Tumoral

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UE – União Europeia

UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sustentabilidade

1.1.1 Definição de Sustentabilidade

A sustentabilidade é um conceito que assenta no equilíbrio entre os ecossistemas e as necessidades humanas, não comprometendo as gerações futuras. Este conceito foi definido em 1987, no relatório de Brundtland. No entanto, a preocupação com o estado do ambiente do planeta, manifestou-se primeiramente, ao mais alto nível, em 1972 na Conferência das Nações Unidas, realizada em Estocolmo [1]. Desta conferência surgiu a Declaração do Ambiente, na qual o primeiro princípio reitera que o Homem tem o direito de permanecer num ambiente cuja qualidade de vida lhe permita viver com dignidade e bem-estar, cabendo-lhe o dever solene de proteger e melhorar o ambiente para as gerações atuais e vindouras [2].

É consensual que atualmente a sustentabilidade é um objetivo cada vez mais valorizado por diferentes organismos políticos, científicos e pela comunidade em geral. Quer a Organização das Nações Unidas (ONU) e a União Europeia (EU), quer outras entidades e instituições como Liga para a Proteção da Natureza (LPN) e Agência Portuguesa do Ambiente (APA), têm apelado à necessidade de tornar funcional este conceito, sendo crucial a formulação e implementação de estratégias que visem o desenvolvimento sustentável. Apesar desta constatação, o relatório de Avaliação dos Ecossistemas do Milénio das Nações Unidas, verificou que cerca de 60% dos ecossistemas estão em contínua degradação, estando o meio ambiente sobre clara ameaça [3]. As sociedades atuais procuram um permanente progresso, o que origina um aumento da complexidade cultural e das desigualdades e conflitos sociais. Na verdade, é importante consciencializar a comunidade, não apenas para questões ambientais, mas igualmente para questões sociais e culturais. No entanto, torna-se cada vez mais preocupante a falta de medidas que se sobreponham a aspetos económicos e que proporcionem uma atitude de mudança para o planeta.

O ano de 2015 ficará na história como o ano em que foram definidos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, fixados na cimeira da ONU em Nova Iorque. Trata-se de uma nova agenda de ação a implementar até 2030, que tem como objetivo criar um novo modelo global para acabar com a pobreza, promover a prosperidade e o bem-estar, protegendo desta forma o ambiente e combatendo as alterações climáticas.

1.1.2 Sustentabilidade Ambiental, Económica e Social

A União Europeia desenvolveu o “Modelo de Sustentabilidade de Três Pilares” que engloba um desenvolvimento ambiental, económico e social, numa relação de simbiose. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) em 2050 será impossível suprir as necessidades alimentares [4]. Na realidade, parte dos ecossistemas estão a ser destruídos em consequência de medidas para aumentar a quantidade de alimentos disponíveis no mercado. O aproveitamento das matérias-primas disponíveis revela-se assim como uma estratégia para o desenvolvimento sustentável. No entanto, não se tratando de uma fonte inesgotável, a preocupação com a sua contínua degradação tem alertado as autoridades mundiais para a questão fulcral do uso eficiente dos recursos materiais e energéticos. Segundo o Relatório do Estado do Ambiente Europeu de 2015 (*The European environment — state and Outlook*, SOER), o caminho é “longo e sinuoso” para uma gestão ambiental racional. O relatório constata que a Europa fez progressos na implementação de medidas ambientais cruciais, mas esses avanços ainda não se traduziram em melhorias na resiliência dos ecossistemas ou na redução de riscos para a saúde e bem-estar [5].

Em Portugal, o Relatório do Estado do Ambiente (REA) da Agência Portuguesa do Ambiente de 2015, à semelhança do seu congénere europeu, assume um carácter mais analítico, abordando as principais tendências ambientais e fazendo análises mais objetivas e concretas dos temas relevantes [6]. Segundo este relatório é importante estabelecer objetivos e metas onde se destacam:

- Adoção de padrões de produção e consumo mais sustentáveis;
- Obtenção de um crescimento económico menos assente no consumo de recursos naturais, garantindo que estes não ultrapassem a capacidade de regeneração do ambiente;
- Apoio de práticas agrícolas ou florestais que contribuam para a melhoria do ambiente e conservação dos recursos naturais (água, solo, ar);

Todas as medidas descritas nestes programas são sustentadas em análises de viabilidade económica e social, para além de viabilidade técnica e ambiental, proporcionando uma garantia de envolvimento sistemático de todas as vertentes.

1.2 Espécies Autóctones

As plantas autóctones da flora de uma região conferem uma beleza única à paisagem natural, servindo igualmente como recurso alimentar. Uma espécie autóctone caracteriza-se por existir num determinado ecossistema, sem intervenção direta ou indireta do Homem no seu habitat [7]. São igualmente espécies mais adaptadas às condições edafoclimáticas do ambiente, sendo mais resistentes a pragas, doenças, períodos longos de estio e chuvas intensas [8]. Desta forma, ajudam a manter a fertilidade do espaço rural, o equilíbrio biológico das paisagens e a diversidade de recursos genéticos.

Ao longo do tempo, muitas plantas autóctones foram usadas no tratamento de diversas doenças inflamatórias, particularmente urinárias e respiratórias, atuando como antissépticos, cicatrizantes, expetorantes ou diuréticos [9, 10].

1.2.1 Contextualização da Urze na Flora Autóctone Portuguesa

A urze é o nome comum associado a diversas plantas da família Ericaceae, particularmente dos géneros *Erica* e *Calluna*, incluídas na flora autóctone de diversas regiões. Em Portugal, estas espécies são muito comuns e encontram-se praticamente por todo o país, sobretudo em locais de degradação da floresta original.

As plantas do género *Calluna* e *Erica* apresentam uma característica toíça, que corresponde a um aumento na base do caule. Esta característica permite à planta regenerar mesmo após a destruição da parte aérea [11]. Ao nível da flora portuguesa, existe uma grande variedade de espécies de urze, algumas das quais se encontram representadas na Figura 1.



Erica australis



Erica erigena



Erica lusitânica



Erica tetralix



Calluna vulgaris



Erica umbellata

Figura 1: Diferentes espécies de urzes presentes na flora autóctone portuguesa [12].

1.3 *Calluna vulgaris* (L.) Hull

Calluna vulgaris (L.) Hull foi descrita pela primeira vez por Carl Linnaeus e posteriormente reclassificada por John Hull, em 1808. É vulgarmente conhecida como urze, sendo uma das espécies associadas a este tipo de planta [13]. A sua classificação científica encontra-se sistematizada na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação científica da *Calluna vulgaris* (L.) Hull.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	Magnoliophytina
Infradivisão	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Dilleniidae
Ordem	Ericales
Família	Ericaceae
Género	<i>Calluna</i> Salisb.
Espécie	<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull

Estruturalmente, a *C. vulgaris* é um arbusto ou subarbusto verde de pequenas dimensões com uma altura que varia entre os 20 e os 100 cm. Apresenta ramos ascendentes e de cor castanha-acinzentada. Possui folhas persistentes, curtas e diretamente inseridas na base do caule. As flores, com pedicelos reduzidos, dispõem-se em cachos terminais, unilateralmente, apresentando cor rosa ou lilás, tal como se pode visualizar na Figura 2.



Figura 2: *Calluna vulgaris* (L.) Hull.

A sua floração é estival ou outonal, florescendo assim regularmente entre os meses de fevereiro e novembro. O fruto, que amadurece no outono, não apresenta características ornamentais.

A *C. vulgaris* é uma planta autóctone que se desenvolve numa vasta zona geográfica e em diferentes condições climáticas, apresentando uma elevada capacidade reprodutiva. Contudo, a sua germinação é vulnerável a condições de luminosidade, pH, temperatura e humidade do solo [14]. Adicionalmente, possui tolerância ecológica, podendo, desta forma, crescer em ambientes de escassez de nutrientes, solos ácidos, pântanos, dunas ou florestas [15-17]. Como muitas espécies da família Ericaceae, as suas raízes associam-se em simbiose com fungos (micorriza) para assegurar o seu desenvolvimento. Desta forma, a absorção de azoto torna-se mais eficiente, permitindo o crescimento em solos contaminados com metais pesados [18].

No que diz respeito à sua distribuição geográfica, a *C. vulgaris* é uma espécie selvagem na Europa, sendo igualmente nativa no norte de África e da Ásia. Pode ser ainda encontrada em países como o Canadá, Estados Unidos da América, Austrália ou Nova Zelândia, onde foi sendo naturalizada [19]. A Figura 3 ilustra a sua distribuição a nível mundial, sendo notória a sua prevalência na Europa [20].



Figura 3: Mapa de distribuição geográfica da *C. vulgaris* (L.) Hull, a nível mundial [20].

Relativamente ao território nacional, está presente em praticamente todas as regiões, como pode ser observado na Figura 4. No interior de Portugal continental, onde as regiões são mais secas, o seu desenvolvimento não é, contudo, favorecido. Está igualmente incluída na flora autóctone do arquipélago dos Açores. Na ilha da Madeira foi introduzida mais tardiamente [21, 22].

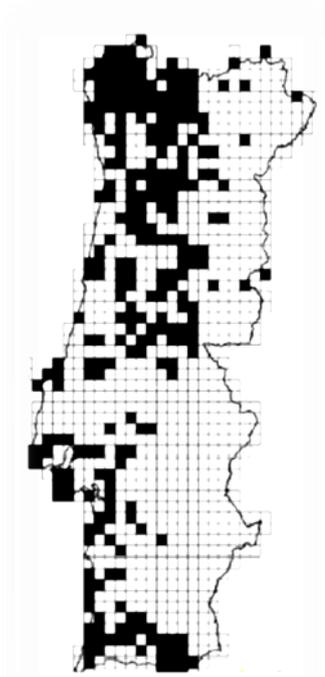


Figura 4: Mapa de distribuição geográfica da *C. vulgaris* (L.) Hull em Portugal continental [23].

1.3.1 Uso Sustentável da *Calluna vulgaris* (L.) Hull

De um modo geral, os consumidores preferem compostos naturais com propriedades funcionais, capazes de substituir compostos sintéticos, muitas vezes associados a efeitos tóxicos e cancerígenos. Por outro lado, a valorização da diversidade é de grande importância, não apenas para a preservação dos ecossistemas, mas também como fonte natural de produtos para uma exploração sustentada [24]. O aproveitamento sustentável de plantas com propriedades medicinais poderá assim, contribuir para a manutenção do ecossistema local, promovendo a valorização da flora regional e a sua preservação.

Deste modo, a *C. vulgaris* (L.) Hull, sendo uma planta medicinal nativa com uma vasta área geográfica e capacidade de reprodução em diferentes condições climáticas, pode ser uma fonte promissora para obtenção de novos produtos naturais. O seu crescimento espontâneo faz com que não sejam necessárias técnicas agrícolas especializadas para o seu crescimento, como a fertilização, as quais intervêm na dinâmica do ecossistema. A indústria poderá, assim, retirar partido das suas propriedades terapêuticas, aliando a isso uma melhor gestão ambiental e desempenho económico e social. A Figura 5 esquematiza as três vertentes num processo de interligação para o desenvolvimento sustentável.

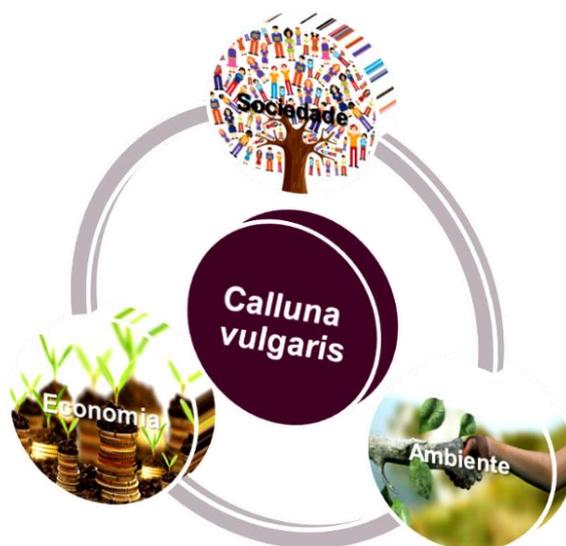


Figura 5: Interligação esquemática das áreas envolvidas no desenvolvimento sustentável da *C. vulgaris*.

1.3.2 Composição Química

Os organismos vivos sintetizam diversos compostos químicos necessários ao seu desenvolvimento e sobrevivência. Nas plantas existem duas vias metabólicas bem descritas:

- Metabolismo primário: associado a substâncias essenciais para a manutenção da vida celular (tais como proteínas, lípidos e hidratos de carbono).

- Metabolismo secundário: relacionado com o crescimento e desenvolvimento da planta, contribuindo para a sua proteção [25].

Alguns metabolitos secundários têm efeito sobre os sistemas biológicos e por isso são considerados bioativos. Estes compostos presentes nas plantas exercem proteção contra macro e microrganismos e dividem-se em diferentes grupos, entre os quais estão incluídos os alcaloides, os terpenos, os esteroides, bem como os compostos fenólicos [26-28].

Estima-se que cerca de 8000 dos compostos naturais identificados nas plantas são compostos fenólicos [29]. Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, formando-se em condições de stress, infeções, ferimentos ou exposição a radiações ultravioleta [30].

Inúmeros estudos descrevem as suas propriedades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante, anti-inflamatória ou antibacteriana [31-33]. Por outro lado, diversos estudos comprovaram que o teor fenólico da *C. vulgaris* é bastante elevado, fruto das diferentes subclasses de compostos presentes, nomeadamente compostos fenólicos como polifenóis, flavonoides bem como cromonas e terpenos [34-41].

1.3.3 Propriedades Biológicas

Uma panóplia de propriedades bioativas têm vindo a ser associadas à urze, estimulando a sua aplicação em diferentes indústrias como a cosmética, a alimentar ou a farmacêutica. Na medicina tradicional, a infusão da espécie em estudo tem sido utilizada com ação desinfetante e diurética, atuando igualmente ao nível do sistema nervoso, particularmente com efeito calmante devido à sua atividade inibitória da enzima monamina oxidase (MAO) [41]. De igual modo, a *C. vulgaris* é usada em homeopatia no tratamento do reumatismo, artrites e insónias [42]. Tem igualmente sido utilizada no tratamento de inúmeras doenças inflamatórias, havendo diversos estudos que sustentam esta ação [38, 39, 43, 44]. A sua atividade antioxidante, antiproliferativa, antiacetilcolinesterase, antiglicosidase e antibacteriana foi também demonstrada [9, 45, 46]. Com efeito, a *C. vulgaris* tendo vindo a ganhar relevo na comunidade científica como uma fonte promissora de compostos ativos para diversos tipos de patologias.

1.3.3.1 Atividade Antioxidante

As reações bioquímicas que ocorrem nas células e organelos no Homem são o motor essencial que sustenta a vida. Estas reações estão envolvidas em inúmeros processos metabólicos, podendo originar radicais livres. Por definição, os radicais livres são átomos, moléculas ou iões que possuem eletrões desemparelhados, sendo por isso, extremamente instáveis e reativos com outras moléculas. Formam-se a partir de três elementos, oxigénio, azoto e enxofre, originando respetivamente, espécies reativas de oxigénio (ERO), espécies reativas de azoto (ERA) e espécies reativas de enxofre (ERE).

ERO incluem radicais como o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo (OH^{\bullet}) e outras espécies não radicalares, nomeadamente o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) [47]. Os radicais livres são produzidos de forma natural no metabolismo das mitocôndrias sendo desta forma essenciais [47]. No entanto, a sua produção é aumentada devido a fatores externos como a poluição ou a radiação, atingindo desta forma um nível prejudicial sobre o Homem [48].

Quando o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO se encontra comprometido, devido à produção excessiva destas espécies reativas, estamos perante um situação de stress oxidativo para as células [49].

Estes radicais encontram-se assim na origem de diversas doenças, modificando moléculas biológicas cruciais e conduzindo muitas vezes a alterações funcionais ou mesmo à perda da sua função. Deste modo, os compostos antioxidantes desempenham um papel fulcral no controlo deste processo oxidativo do organismo, neutralizando as espécies reativas. Estes compostos têm sido descritos como substâncias que retardam, impedem ou eliminam efeitos oxidativos para uma determinada molécula alvo [50, 51].

A atividade antioxidante pode ser eficaz ao atuar na etapa de iniciação, como inibidores da produção de radicais livres (por ação com radicais lipídicos), bem como na etapa de propagação, como inibidores de enzimas pró-oxidativas (lipooxigenases) [47]. Os antioxidantes são compostos que podem atuar na prevenção de reações de oxidação em alimentos, medicamentos e cosméticos, bem como ao nível de doenças crónicas, cardiovasculares e neurodegenerativas [52].

O sistema antioxidante humano pode ser dividido em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos [47]. Nos antioxidantes enzimáticos estão envolvidas enzimas primárias (nomeadamente, a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase) e enzimas secundárias (como a glutathione redutase). Nos antioxidantes não enzimáticos estão incluídos diferentes compostos como cofatores, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides ou vitaminas e seus derivados. A Figura 6 ilustra detalhadamente os diferentes compostos antioxidantes subdivididos nas suas diferentes classes.

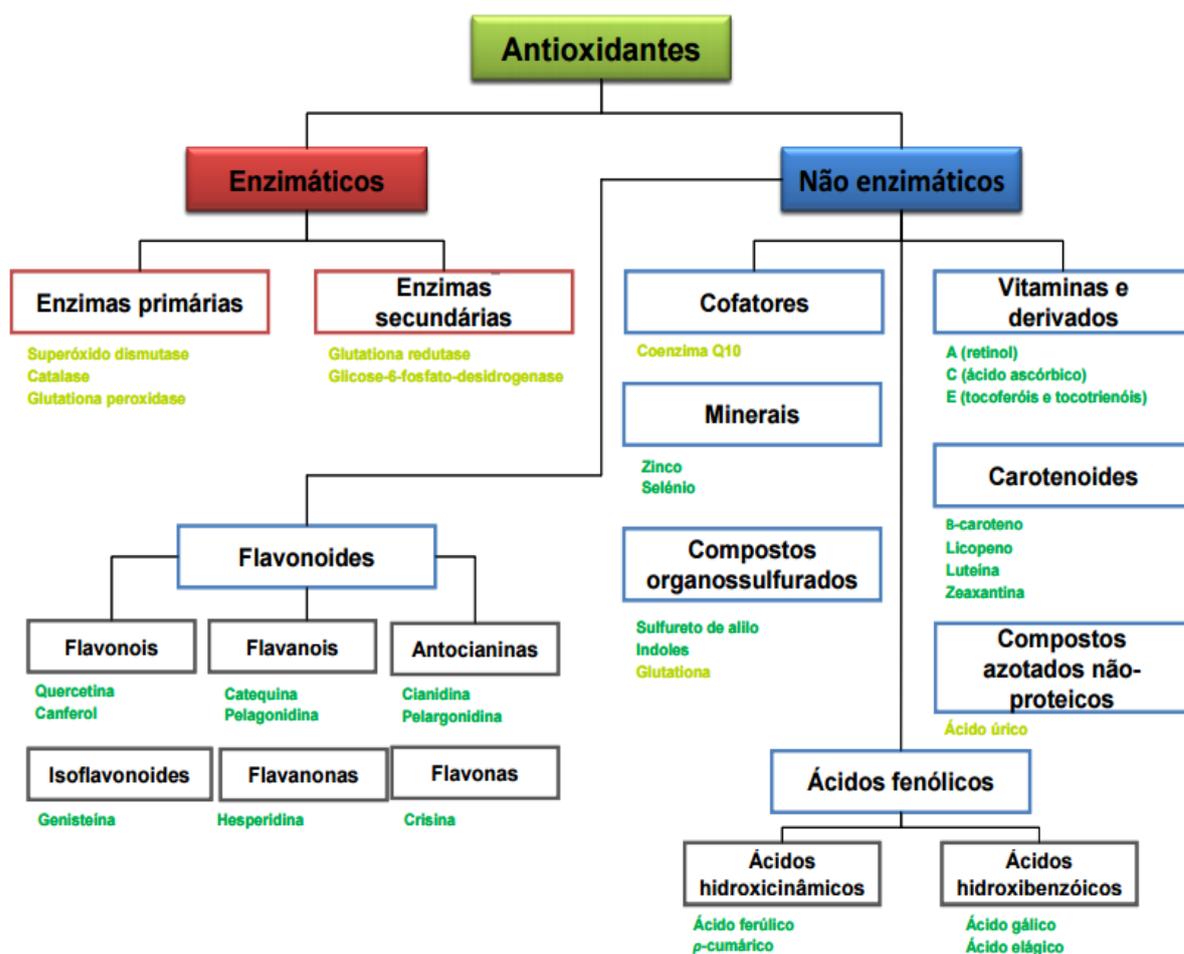


Figura 6: Representação esquemática de antioxidantes naturais nas diferentes classes. A cor verde representa antioxidantes exógenos enquanto que a cor amarela representa antioxidante endógenos (adaptado de [47]).

Devido aos possíveis efeitos secundários dos antioxidantes sintéticos, frequentemente utilizados em produtos alimentares, é necessário o conhecimento de novas substâncias antioxidantes naturais benéficas para o ser Humano [53]. Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais sintetizados pelas plantas, estando envolvidos na proteção do corpo humano contra radicais livres. Estão desta forma, associados à prevenção do stress oxidativo e doenças relacionadas [54].

1.3.3.1.1 Efeito Fotoprotetor e Quimiopreventivo

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo formado por três principais camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (ou tecido subcutâneo) [55, 56]. A sua estrutura encontra-se representada na Figura 7.

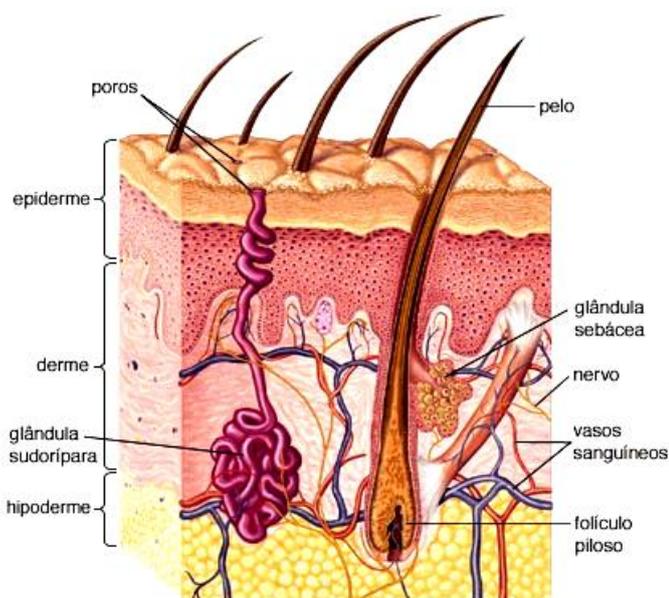


Figura 7: Representação esquemática da estrutura do tecido cutâneo (adaptado de [57]).

A epiderme é a camada superficial da pele, composta por células epiteliais estratificadas, que se encontram subdivididas em diferentes camadas: estrato córneo ou epiderme não viável, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo ou camada basal, constituindo a epiderme viável [58]. A epiderme é composta essencialmente por queratinócitos (80- 95%), que ao sofrerem um processo de diferenciação, marcado por alterações moleculares, estruturais e funcionais, tornam-se biologicamente inativos, formando deste modo o estrato córneo [56, 59].

Sob a epiderme encontra-se a derme. A derme é composta por tecido conjuntivo denso irregular, sendo caracterizada pela presença de fibroblastos e células imunes, como os mastócitos e os macrófagos. Os fibroblastos produzem e segregam para o espaço extracelular as proteínas da matriz extracelular, como o colagénio e fibras elásticas [55, 56, 58].

A hipoderme é composta por tecido conjuntivo especializado e as suas células características são os adipócitos, onde existe armazenamento de triglicéridos para consequente produção de energia. Esta camada funciona como isolamento térmico através da acumulação de energia, como protetor contra agressões físicas e como depósito nutritivo de reserva. [60].

A pele é constantemente exposta a diferentes tipos de radiação. As espécies reativas são produzidas após exposição à radiação ultravioleta (UV), conduzindo a um aumento do stress oxidativo [61]. Um progressivo aumento do stress oxidativo modifica as vias de expressão génica, podendo originar alterações fenotípicas e envelhecimento cutâneo [62, 63]. Para além disso, a radiação UV é o maior fator etiológico do cancro cutâneo, estando envolvida em outras doenças da pele como a psoríase, a acne, a dermatite de contato alérgica e a vasculite cutânea [63-66]. Uma estratégia importante para a proteção contra agentes solares consiste na utilização de produtos naturais, como extratos de plantas, que visem reduzir possíveis danos cutâneos. A quimioprevenção por estes compostos representa um novo conceito na tentativa de controlar processos carcinogénicos [67].

No clima mediterrâneo as plantas estão sujeitas a temperaturas elevadas e a intensa exposição solar. Nestas condições, os compostos fenólicos são essenciais, pois oferecem resistência à foto-oxidação pelas radiações solares, dada a grande capacidade de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-VIS) [68].

O espectro de radiação UV divide-se em UVA (320-400nm), UVB (290-320) e UVC (100-290). Os efeitos biológicos sobre a pele são dependentes dos tipos de radiação UV que nela incidem [69]. A radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozono. A radiação UVA atinge a derme e consequentemente é a radiação mais prejudicial para pele. Por sua vez, a UVB é absorvida pela epiderme, podendo afetar a derme mas numa menor proporção em comparação com a UVA, como pode ser observado na Figura 8.

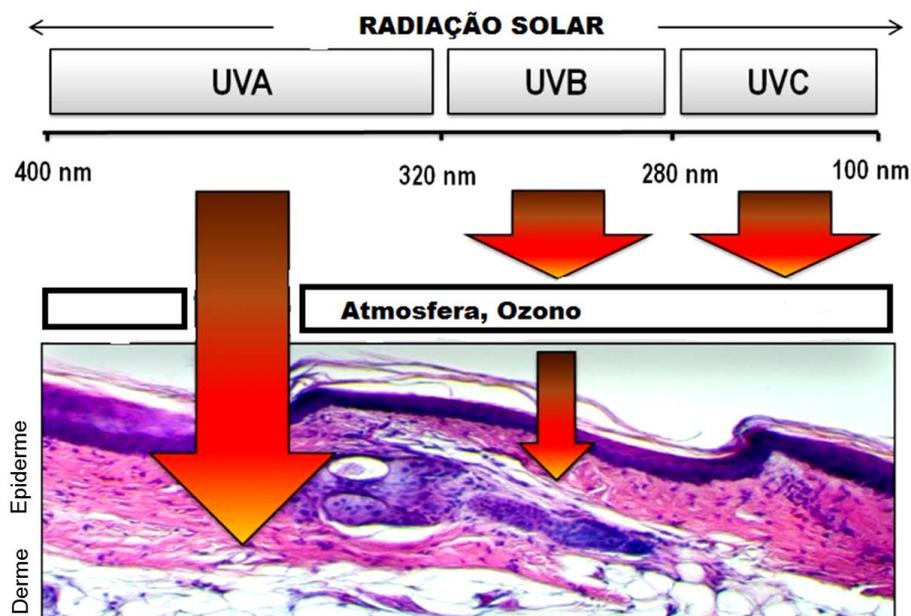


Figura 8: Representação da incidência das diferentes radiações UV na pele (adaptado de [69]).

De acordo com Perde-Schrepler *et al.*, a *C. vulgaris* tem revelado uma ação promissora como agente fotoquímico protetor contra efeitos da radiação UVB, tendo demonstrado em queratinócitos humanos (HaCat) a potencialidade do seu extrato, reduzindo o stress oxidativo e possíveis danos no ácido desoxirribonucleico (ADN), potenciando a sobrevivência celular [70]. De igual modo, ensaios *in vitro* em células endoteliais vasculares de veia umbilical humana (HUVEC) comprovou o efeito protetor contra a radiação UVB em função da concentração de extrato [71].

Por outro lado, estudos *in vivo* caracterizados pela aplicação tópica do extrato em ratos SKH-1 sem pelo, comprovaram a redução do stress oxidativo, bem como diminuição da apoptose e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α) na pele após indução por UVB [72].

1.3.3.2 Atividade Antimicrobiana

A pesquisa de extratos de plantas com atividade antimicrobiana é feita há milhares de anos. Nas diferentes partes da planta, como pétalas, folhas, ramos, raízes, frutos, sementes ou rizomas, há diferentes compostos com atividade antimicrobiana (como glicosídeos, taninos, saponinas, alcaloides e/ou ácidos orgânicos) que podem atuar como um sistema de defesa [73, 74]. Com efeito, têm sido desenvolvidos produtos naturais em diferentes áreas, como por exemplo na indústria cosmética, que têm por base propriedades antimicrobianas de diversas plantas [75, 76]. O conhecimento dos compostos químicos presentes nas plantas torna-se assim uma mais-valia para a compreensão dos seus efeitos [77]. Em particular, os compostos fenólicos surgem como resposta a infeções microbianas, podendo atuar como agentes antimicrobianos naturais [78].

A avaliação das propriedades antimicrobianas de extratos ou partes da *C. vulgaris* tem sido feita por diferentes técnicas, demonstrando uma associação entre a presença de compostos fenólicos e flavonoides, bem como a inibição do crescimento de determinadas estirpes bacterianas [79].

1.3.4 Aplicação em Produtos Cosméticos

Na atualidade, o setor cosmético está em crescente valorização, uma vez que a utilização de produtos cosméticos é cada vez mais frequente pela sociedade. A evolução da ciência e da tecnologia proporcionou uma melhor compreensão da fisiologia e ação dos mesmos. A ciência evoluiu no sentido de proporcionar um possível tratamento em pacientes com doenças dermatológicas, preocupando-se deste modo, com uma melhoria da sua qualidade de vida. Assim, os produtos cosméticos, podem atuar como adjuvantes na terapêutica de patologias cutâneas, não tendo com único objetivo a melhoria do aspeto exterior da pele [80, 81].

Estudos realizados recentemente baseiam-se na procura incessante de novos ingredientes cosméticos com características inovadoras, propriedades antioxidantes, efeitos anti-envelhecimento e branqueadores [82-84]. Um produto cosmético promissor, deve ser eficaz, seguro, inovador, com uma formulação estável, de fácil metabolismo na pele e de baixo custo [85]. Os ingredientes ativos são deste modo fulcrais nos produtos cosméticos. Estes compostos podem ser obtidos a partir de fontes sintéticas ou naturais, conforme descrito anteriormente.

Nos últimos anos tem-se verificado uma tendência mundial para a incorporação de extratos vegetais em formulações cosméticas, quer como fragâncias, quer devido a potenciais propriedades medicinais [85]. A fitocosmética é deste modo um setor em crescimento.

Os produtos cosméticos de extratos vegetais são muitas vezes associados pelo consumidor a produtos suaves e biodegradáveis, com reduzida toxicidade, quando comparados com produtos sintéticos. No entanto, esta aplicação é muito limitada uma vez que as plantas podem conter metabolitos tóxicos e provocar reações cutâneas. Assim, a valorização de plantas promoveu a pesquisa de informações que cientificamente comprovem a sua segurança e eficácia terapêutica. O uso seguro e eficaz envolve, entre outros, análises físico-químicas, microbiológicas e ensaios de viabilidade celular. Para determinar a segurança dos extratos vegetais, devem ser desenvolvidos estudos *in vitro* e *in vivo* que antecipem o desenvolvimento de novos ingredientes ativos [86].

A comercialização de produtos cosméticos no mercado português deve cumprir os requisitos estipulados pelo Regulamento (CE) Nº. 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos. A Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED) é a entidade responsável pela regulação e supervisionamento de Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal (PCHC), garantindo a sua qualidade e segurança, salvaguardando igualmente a saúde pública.

A indústria cosmética debate-se atualmente com dois grandes desafios: a eliminação de testes em animais e o desenvolvimento de produtos sem conservantes. Com efeito, este regulamento veio proibir por completo o uso de ingredientes testados em animais em PCHC, bem como o ensaio do produto final em animais. Para isso, há um conjunto de métodos *in vitro* alternativos à experimentação animal, devidamente validados pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (The European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM), que permitem avaliar a sua toxicidade. O conhecimento do perfil toxicológico de uma substância contida num produto cosmético é assim de extrema relevância. A utilização de linhagens celulares representa uma primeira abordagem no campo da toxicidade [87].

Por outro lado, o desenvolvimento de produtos sem conservantes é outro dos objetivos da indústria cosmética. Conservantes são substâncias químicas, cuja função é inibir ou eliminar o crescimento de microrganismos no produto final. Estas substâncias, ao serem tóxicas para o microrganismo, podem igualmente tornar-se tóxicas para o ser humano. Os extratos naturais possuem uma variedade de compostos fenólicos com propriedades antimicrobianas que desta forma podem vir a apresentar-se como uma alternativa ao uso de conservantes químicos [88].

O extrato da *C. vulgaris* tem sido incorporado em vários produtos cosméticos, com diversas patentes a sustentar o seu efeito antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano [89-92]. A Tabela 2 resume alguns produtos cosméticos que possuem na sua composição o extrato da planta em estudo. Contudo, a literatura é pouco vasta no que toca às evidências científicas que suportam o seu uso.

Tabela 2: Produtos cosméticos que utilizam o extrato da *C. vulgaris*, as suas propriedades e as empresas que os comercializam.

Empresa	Nome do produto	País	Propriedade
Tilth Beauty	Intense Restoration		
	Naked Body Butter		
Bliss	Lemon & sage body butter	E.U.A	Creme hidratante
	Blood Orange & White Pepper Body Butter		
	Super-Sized Body Butter, Lemon & Sage		
Arcona	Overnight Cellular Repair Complex		Hidratante facial
Jack Black	Double Duty Face Moisturizer, SPF 20 (2013 formulation)		Protetor solar
	Beard Lube Conditioning Shave		Creme de barbear
Borghese	Complesso Intensive Age Defying Complex	Itália	Antirrugas
	Time Freeze Firming Night Cream		Firmeza e antienvelhecimento
	Time Freeze Instant Lift Serum		
Lumene	Firming Night Cream	Finlândia	Loção corporal reafirmante
	Time Freeze Eye Perfecting Treatment		Um soro de olho revitalização
	Lift Touch Revitalizing Toner		Limpeza de pele
Lab Series	Skincare for Men Body - AB Rescue Body Sculpting Gel	França	Loção corporal reafirmante
Adina	Vegewhite	Inglaterra	Agente Branqueamento da pele

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e Padrões

Ao longo deste trabalho, nos procedimentos elaborados foram utilizados diferentes reagentes de grau analítico, que se apresentam na seguinte lista:

1,4-Dioxano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 α -Amilase termoestável, protease e amiloglucosidade (Sigma Aldrich, Sintra, Portugal)
Acetato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
Acetona (Merck, Darmstadt, Germany)
Ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Germany)
Ácido sulfúrico 96% (Panreac, Barcelona, España)
Ácido sulfúrico 0,1M (Merck, Darmstadt, Germany)
Ácido gálico (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Antibiótico (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Carbonato de sódio 7,5 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Catequina (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Cloreto férrico 20 Mm (Merck, Darmstadt, Germany)
Cloreto de alumínio 5% (Merck, Darmstadt, Germany)
Diclorometano (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Dimetilsulfoxido (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Etanol absoluto (Panreac, Barcelona, España)
Éter de petróleo (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Folin–Ciocalteau 2N (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Hidróxido de sódio 1M (Merck, Darmstadt, Germany)
Hidróxido de potássio (Merck, Darmstadt, Germany)
n-hexano (Merck, Darmstadt, Germany)
n-hexano HPLC (Fisher Scientific, Loughborough, UK)
Nitrito de sódio 1% (Merck, Darmstadt, Germany)
Metanol (VWR International, Leuven, Belgium)
MTT (Atom Scientific, Manchester, UK)
Mistura de padrões de ácido gordos (FAME 37, Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Sulfato de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Germany)

Sulfato ferroso 1mM (SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA)

Tampão acetato 0,3 M (Merck, Darmstadt, Germany)

Tocoferol (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

Tocol 2-metil-2-(4,8,12-trimetil tridecil)-cromano-6-ol (Matreya Inc, PA, USA)

Tocotrienol (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

Trifluoreto de boro (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Troxol (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)

TPTZ (Merck, Darmstadt, Germany)

2.2 Recolha e Tratamento da Amostra

A *C. vulgaris* foi recolhida no mês de outubro de 2015 e no mês de maio de 2016 em Moreira de Cónegos, Portugal. A flor foi separada do resto da planta, sendo armazenada em recipientes de plástico a 4°C até posterior utilização, conforme ilustrado na Figura 9.



Figura 9: Recolha da amostra da flor da *C. vulgaris*.

2.3 Análise Química

A análise química foi efetuada tendo por objetivo caracterizar o perfil nutricional da planta. De forma a complementar os diversos estudos e visando uma possível aplicação na indústria alimentar, vários parâmetros foram assim estudados.

2.3.1 Determinação do Teor de Humidade

A determinação de humidade por secagem é um método gravimétrico indireto e a percentagem de humidade relaciona-se com a quantidade de água e compostos voláteis presentes na amostra. O teor de humidade foi determinado com uma balança de determinação da humidade (Scaltec SMO01, Scaltec Instruments, Germany) (Figura 10). Neste método, 1g da amostra da flor foi submetido a um processo de secagem a uma temperatura de $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 min. Esta análise foi realizada em triplicado e o resultado expresso em percentagem (%) de humidade.



Figura 10: Balança de determinação de humidade.

2.3.2 Determinação do Teor de Fibra Dietética

A determinação do teor de Fibra Dietética Total (FDT) foi realizada tendo por base um método enzimático-gravimétrico [93]. Com efeito, 1g de amostra seca e moída, foi submetida a um processo de filtração (ensaio efetuado em duplicado). A amostra foi gelatinizada com uma incubação com a enzima α -amilase termoestável, ao qual se seguiram duas incubações com protease e com amiloglucosidade de modo a simular o sistema digestivo, num banho termostaticado (GDE, VELP® Scientifica, Italy) (Figura 11). A fibra solúvel foi precipitada com etanol 95%. O resíduo total foi filtrado e sucessivamente lavado com etanol 78%, etanol 95% e acetona. Após secagem, pesou-se o resíduo. Um dos duplicados foi usado para a determinação da proteína (Método Kjeldahl) e o outro para a determinação do teor em cinzas (incineração a 525°C).

A FDT corresponde à massa, em percentagem (%), do resíduo após a digestão menos o teor proteico e de cinzas do mesmo, corrigido também com a subtração do valor do ensaio do branco (controlo). Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ FDT} = \frac{[(\text{Resíduo da amostra} - \text{Teor proteico} - \text{Teor de cinzas} - \text{Branco}) / \text{Massa da amostra}] \times 100}{}$$


Figura 11: Sistema termostaticado onde ocorreu incubação.

2.3.3 Determinação do Teor de Proteína

O teor proteico foi determinado através do método de Kjeldahl, quantificando o azoto total presente nas amostras [94]. Num tubo de Kjeldahl, foram colocados 0,5g de amostra seca (a pesagem foi determinada em papel isento de azoto), duas pastilhas catalisadoras (isentas de selênio e mercúrio) e 20 mL de ácido sulfúrico a 96%. A digestão ácida foi realizada numa manta elétrica, sendo os vapores neutralizados por um sistema purificador de gases. O resultado da digestão foi destilado de forma automática (BUCHI KjelFlex K-360, Switzerland) (Figura 12) e titulado com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 M, para a quantificação de azoto presente na amostra. A determinação do teor de proteína total foi calculada por multiplicação do valor de azoto total pelo fator de conversão 6,25. A análise foi efetuada em triplicado e os resultados expressos em percentagem (%) de proteína.



Figura 12: Destilador automático

2.3.4 Determinação do Teor de Cinzas

A determinação do teor de cinzas total processou-se por via seca, com incineração de 1g de amostra moída a uma temperatura compreendida entre 450 - 500°C usando uma mufla (Thermolyne 48000, F48010-26, Electrothermal Engineering Ltd, United Kingdom), até à obtenção de cinzas brancas e posterior determinação da massa do resíduo. A análise foi efetuada em triplicado para cada amostra e os resultados foram expressos em percentagem (%) de cinza.

2.3.5 Determinação de Gordura

A análise do teor de gordura foi efetuada pelo método de Soxhlet [95]. Cerca de 5 g de amostra foram misturadas com sulfato de sódio anidro. A mistura foi transferida para cartuchos de celulose e colocada em ampolas de extração dos dispositivos de Soxhlet. Foi feita uma extração com éter de petróleo para balões previamente tarados. Efetuou-se a eliminação do solvente por evaporação e a secagem do resíduo em estufa a 100°C, por períodos de 30 min até obtenção de peso constante da amostra. A análise foi efetuada em triplicado para cada amostra e os resultados expressos percentagem (%) de gordura em peso seco.

2.3.6 Determinação de Hidratos de Carbono

O teor de hidratos de carbono foi calculado indiretamente, por diferença dos restantes parâmetros do perfil nutricional das amostras. A seguinte fórmula foi usada para a sua determinação:

$$\% \text{ Hidratos de Carbono} = 100\% - (\% \text{ Proteínas} + \% \text{ Gordura} + \% \text{ Humidade} + \% \text{ Cinzas} + \% \text{ Fibra})$$

2.3.7 Determinação do Teor de Vitamina E

A extração da vitamina E foi realizada com *n*-hexano por um método de extração a frio, previamente descrito [96], com pequenas alterações. Inicialmente foi pesado 0,150 g de amostra moída, procedeu-se à extração com a adição de 2,5 mL de etanol absoluto, 5 mL de *n*-hexano e 20 µL de padrão interno (1 mg/mL de solução Tocot). Depois da mistura ser colocada numa placa de agitação (MS-H-S10, DragonLab) durante 30 min, 2,5 mL da solução de cloreto de sódio (NaCl) a 1% foram adicionados.

A mistura foi centrifugada a 5000 rpm durante 2 min (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16, USA). O resíduo foi re-extraído três vezes com 5 mL de *n*-hexano. Após cada centrifugação o sobrenadante foi recolhido. Desta forma, juntaram-se as fases orgânicas das três extrações e adicionou-se sulfato de sódio (Na₂SO₄) de modo a eliminar a quantidade de água presente. Depois de uma nova centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e a amostra foi levada à secura numa corrente de azoto.

O resíduo obtido foi ressuspenso em 1 mL de *n*-hexano e filtrado para posterior injeção no sistema de HPLC. Todas as extrações foram realizadas em material de vidro amber de forma a estarem protegidas da luz.

2.3.7.1 Análise Cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada num sistema HPLC da Jasco (Japan), equipado com um injetor automático (AS-2057PLUS), uma bomba (PU-2089PLUS) e um detetor de fotodíodos (MD-2018PLUS) acoplado a um detetor de fluorescência (FP-2020PLUS). A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna de fase normal Supelcosil™ LC-SI (7,5 cm x 3mm x 3µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) com um sistema isocrático de uma mistura de *n*-hexano/ 1,4 dioxano (98:2) a um fluxo constante de 0,8 mL/ min.

A vitamina E foi identificada de acordo com o espectro de absorção UV e o tempo de retenção de padrões comerciais. A quantificação foi efetuada pelo método do padrão interno, obtida usando um detetor de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 290 e 330 nm, respectivamente [97]. Os dados foram analisados no Software Chromnav (versão 1.18.03, Jasco, Japan).

2.3.8 Avaliação do Perfil de Ácidos Gordos

Para a determinação de ácidos gordos utilizou-se o método de extração a frio acima descrito para a vitamina E, no entanto sem a adição do padrão interno (Tocol 1mg/mL) e com pequenas modificações [98]. Inicialmente pesou-se 0,75 g de amostra moída e adicionou-se 10 mL de n-hexano e 5 mL de etanol absoluto, procedendo-se de igual forma para a obtenção do resíduo para a determinação de vitamina E. Posteriormente foi realizada uma saponificação, dissolvendo a amostra em 1 mL de diclorometano, adicionando 750 µL de hidróxido de potássio (KOH) em metanol (0,5 M). A amostra foi colocada de seguida na estufa (Thermo Scientific Heraeus D-6450 Hanau, Germany) a 100°C durante 10 min. Decorrido esse tempo foi deixada a arrefecer em gelo. Procedeu-se à metilação, adicionando triflureto de boro (BF₃) a 14 % numa solução de metanol.

Durante este processo, a amostra foi novamente colocada na estufa (30 min) e deixada a arrefecer em gelo. Depois de a amostra estar à temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de H₂O e 5 mL de n-hexano, com posterior centrifugação durante 5 min a 3000 rpm. Cerca de 3 mL de sobrenadante foram recolhidos e adicionados a sulfato de sódio anidro para eliminar a água presente na amostra, voltando a centrifugar novamente. Por fim, foi retirado 1 mL de sobrenadante para um tubo de injeção para posterior análise cromatográfica. Tanto o processo de saponificação como o processo de metilação foram realizados na hotte.

2.3.8.1 Análise Cromatográfica

A separação dos esteres metílicos de ácidos gordos (Fatty Acids Methyl Esters - FAME) foi realizada recorrendo a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID). O cromatógrafo (Shimadzu GC-2010 *Plus*, Japan) foi acoplado com um auto - injetor (Shimadzu 20i, Japan) e um detetor de ionização em chama (FID) (Shimadzu, Japan). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (Varian, The Netherlands; 50 mmx 0,25 mm diâmetro interno e 0,20 µm de espessura de filme). O gás de arraste, hélio, foi mantido a um fluxo de 40 mL/min, tendo sido utilizado o seguinte programa de temperaturas: 120°C, durante 5 min e aumento até 220°C (3 °C/min), onde se manteve por 10 min. As temperaturas do injetor e detetor foram 250°C e 270 °C, respetivamente. A razão de "split" foi 1:25 e o volume injetado foi 1,0 µL. As injeções foram realizadas em duplicado.

Os FAMES foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de uma mistura de padrões (FAME 37) e por adição de padrão às amostras. Os resultados foram expressos em relação ao total de AG (% área relativa). Os dados obtidos foram analisados recorrendo ao software CP-Maitre (versão 2.30, Shimadzu GC solution, Japan).

2.4 Determinação de Compostos Bioativos

2.4.1 Preparação dos Extratos

A amostra (flor da *C. vulgaris*) foi triturada num moinho (Grindomix Retch GM200, Germany) até obtenção de um pó fino. 1g de amostra foi depois submetido a extração com 20 mL de solvente. Utilizaram-se três solventes diferentes: etanol; etanol: água (1:1) e água. A extração decorreu durante 30 min a 40°C numa placa de aquecimento (Mirak, Thermolyse, USA) sob agitação magnética constante. Os extratos foram depois filtrados com papel de filtro Whatman No.1. e liofilizados (Telstar, Cryodos, Spain) ou sujeitos a evaporação num evaporador rotativo.

Na Figura 13 pode ser observado as diferentes fases a que a amostra foi sujeita até à obtenção do extrato seco.



Figura 13: Diferentes fases da amostra para a obtenção dos três extratos. a) Recolha da flor da *C. vulgaris* b) Amostra após aquecimento a 40°C (30 min) sob agitação constante por diferentes solventes (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico, de cima para baixo) c) Amostra após filtração d) Amostra após o processo de liofilização.

2.4.2 Determinação do Conteúdo Fenólico Total

A determinação do Conteúdo Fenólico Total (CFT) foi feita por método espectrofotométrico, utilizando-se um reagente não específico, o reagente de Folin-Ciocalteu [99]. Na presença deste reagente, os polifenóis atuam como agentes redutores, ocorrendo reações de oxidação-redução das quais resulta a formação de um complexo de cor azul, com um máximo de absorção a 765 nm [100-103]. Com efeito, a 500 µL de extrato adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu a 2N (diluição de 10x). De seguida, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5%. Deixou-se reagir num banho de água, ao abrigo da luz, a uma temperatura de 45°C, durante 15 min. Arrefeceu-se a mistura durante 30 min à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da absorvência a 765 nm num leitor de Microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). O ensaio foi realizado em triplicado. Utilizou-se como padrão uma solução de ácido gálgico. A correlação entre a absorvência da amostra e a concentração do padrão (ácido gálgico) foi obtida através da curva de calibração (gama de linearidade: 5-100ppm, $R^2 = 0,997$). O CFT dos extratos, foi expresso em miligramas de equivalentes em ácido gálgico (EAG) por grama de extrato (mg Eq. EAG/ g de extrato).

2.4.3 Determinação do Teor de Flavonoides Total

O Teor de Flavonoides Total (TFT) foi determinado através da realização de um ensaio colorimétrico, baseado na formação de complexos flavonoide-alumínio (cor rosa), os quais apresentam um máximo de absorção a 510 nm [85]. Com efeito, a 30 µL de extrato adicionaram-se 75 µL de água destilada e 45 µL de solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a 1 %. Após 5 min de reação adicionaram-se 45 µL de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5% e aguardou-se 1 min. Por fim, adicionaram-se 60 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e 45 µL de água destilada. As leituras foram efetuadas a 510 nm, usando o leitor de microplacas Synergy HT Reader (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). Utilizou-se como padrão uma solução de catequina em diferentes concentrações, de modo a traçar a curva padrão (gama de linearidade: 5– 400 ppm, $R^2 = 0,999$). O TFT foi expresso em miligramas de equivalentes de catequina (ECA) por grama de extrato (mg ECA/ g de extrato).

2.4.4 Atividade Antioxidante

O estudo da formação e eliminação de radicais livres, bem como o dano causado por estes em sistemas biológicos, tem sido cada vez mais valorizado pela comunidade científica. Não existindo um método universal, a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* deve ser estudada por mais de uma metodologia, de forma a obterem-se resultados mais fiáveis [104]. No presente estudo, a atividade antioxidante foi determinada pela capacidade de neutralização do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•) e pelo método do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP).

2.4.4.1 Capacidade de inibição do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio do 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•). Na presença de compostos antioxidantes a redução na concentração de DPPH• é controlada por absorvência a um comprimento de onda específico. Na sua forma radicalar o DPPH•, absorve entre 514 a 517 nm, no entanto, após a redução por um agente antioxidante, ocorre descoloração, passando de violeta a amarelo [85, 105].

A mistura da reação foi feita numa placa de 96 poços, onde foram adicionados 30 µL de amostra e 270 µL de DPPH. Prepararam-se soluções com diferentes concentrações (2,5 – 100 ppm) deste composto, diluídas em etanol absoluto. Após um período de incubação de 40 min, à temperatura ambiente e no escuro, a absorvência foi medida a 517 nm, num leitor de microplacas Synergy HT Reader (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). A curva de calibração (gama de linearidade: 2,5 – 100 ppm, $R^2 = 0,997$) foi obtida a partir da solução mãe de Trolox (Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), utilizado como controlo positivo. A capacidade antioxidante foi expressa em micromoles de equivalentes de Trolox por grama de extrato (µmol eq. Trolox/g de extrato).

2.4.4.2 Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

Este método é caracterizado pela redução do complexo Fe (III) /ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{KFe}(\text{CN})_6]$ a Fe (II), forma ferrosa, pela presença de um composto antioxidante na solução, em meio ácido. Esta reação origina um aumento da absorvência, por formação de um complexo de cor azul intensa [52]. O poder antioxidante por redução do íon férrico foi determinado segundo uma metodologia previamente descrita [106].

Adicionam-se 90 μL de extrato a 270 μL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (10 mL de tampão acetato 0,3 M, 1 mL solução TPTZ 10 mM e 1 mL FeCl_3 20 mM). Homogeneizou-se a solução e colocou-se em banho-maria a 37°C durante 30 min. Após incubação, as absorvências foram lidas a 595 nm num leitor de microplacas Synergy HT Reader, (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). Utilizou-se sulfato ferroso a 1Mm como padrão, obtendo-se uma curva de calibração (gama de linearidade: 75 – 1500 μM , $R^2 = 0,999$). A atividade antioxidante foi expressa em micromoles de sulfato ferro por grama de extrato ($\mu\text{mol/g}$).

2.5. Viabilidade celular - Ensaio MTT

De forma a garantir a segurança dos extratos é importante o estudo da sua atividade biológica e do seu efeito a nível celular. O ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) permite estudar a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na monitorização da absorção e metabolismo de um corante mitocondrial vital o MTT, pelas células mitocondriais [107]. A redução de sais de tetrazólio por células vivas é considerada um meio fiável de avaliação da proliferação celular *in vitro*. As desidrogenases mitocondriais de células viáveis clivam o anel de tetrazólio do MTT, de cor amarela alaranjada, obtendo cristais de formazan, de cor púrpura. Estes cristais são insolúveis em soluções aquosas e solúveis num solvente adequado. A absorvência destes cristais é medida espectrofotometricamente.

A viabilidade celular foi estudada em diferentes células da pele nomeadamente em queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (PCS-201-012). As células HaCaT foram cultivadas em meio RPMI (Gibco, Invitrogen Corp., USA) enquanto que a linhagem de fibroblastos foi cultivada em meio DMEM (Biowhittake, Belgium). Estes meios foram suplementados com 1% de antibiótico e soro bovino fetal inativado a 10% para as células HaCat e 15% para os fibroblastos. As células foram mantidas numa incubadora (Thermo Scientific, Forma Series II Water Jacket CO2 incubator, USA), com ambiente de 5% de CO₂ a 37°C. Quando as células apresentavam uma confluência de 90 a 95%, foram tripsinizadas com recurso a uma solução salina tamponada com fosfato (PBS, a pH 7,4) e tripsina (Invitrogen, Waltham, MA).

As células foram cultivadas numa microplaca de 96 poços, com uma densidade de 5×10^3 por mL, durante 24h. Após o período de multiplicação e adesão celular, incubaram-se as duas linhas celulares com diferentes concentrações de extrato seco (0,1 µg/mL – 1 mg/mL) dissolvidos nos respetivos meios, durante 24h a 37°C. De seguida procedeu-se à remoção dos extratos e posterior lavagem com solução salina de tampão fosfato (PBS, pH 7.4). A viabilidade celular foi avaliada adicionando 20 µL do reagente de MTT a cada poço, com um período de incubação de 4h a 37°C.

Por fim, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) diluído em 50% de etanol para a solubilização dos cristais de MTT. Na Figura 14 pode ser observado a placa após as 4h de incubação e a solubilização dos cristais.

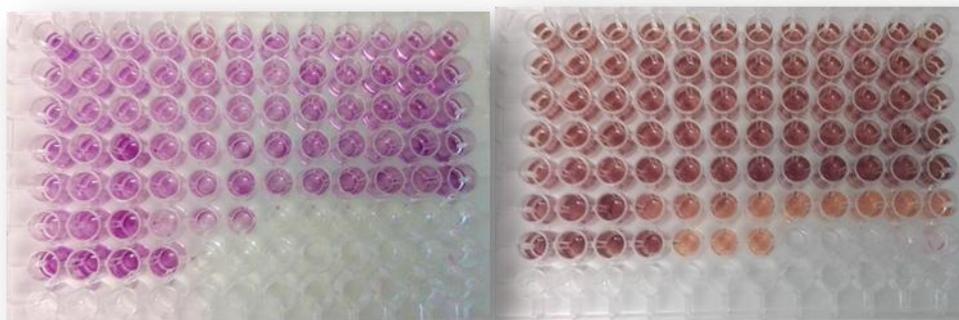


Figura 14: Placa de 96 poços referentes ao ensaio de MTT, depois 4h de incubação e após a solubilização dos cristais (da esquerda para a direita).

O controle foi obtido incubando as células apenas com o meio de cultura. A absorvência foi lida num espectrofotômetro (Dynex Technologies MRx TC II, USA) a 570 nm. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo (Faster BHA 48, Germany) e os reagentes utilizados previamente aquecidos em banho-maria a 37°C. Cada concentração foi analisada em triplicado, em três experiências independentes, de modo a determinar o número de células viáveis [85, 100, 108].

2.6 Atividade Antimicrobiana

2.6.1 Estirpes de Microrganismos

No estudo da atividade antimicrobiana foram incluídos sete microrganismos (sete bactérias e um fungo), representados quer por estirpes da Coleção de Cultura Americana (American Type Culture Collection, ATCC) quer por isolados clínicos. As espécies selecionadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e isolado clínico), *S. epidermidis* (isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os isolados clínicos foram identificados recorrendo ao kit Vitek-2 (Biomérieux, France). Todas as espécies foram congeladas numa infusão de Brain Heart (Difco Laboratories, USA) com 20% de glicerol (Sigma) a - 70°C até análise. Em cada ensaio antimicrobiano foi previamente verificada a viabilidade celular recorrendo à cultura dos microrganismos em Nutrient agar (Difco Laboratories, USA), no caso das bactérias, e Sabouraud dextrose agar (SDA; Difco Laboratories, USA), no caso *C. albicans*.

2.6.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A concentração mínima inibitória é definida como a concentração mais baixa de extrato capaz de inibir completamente o crescimento de microrganismos. A atividade antibacteriana e antifúngica foram avaliadas de acordo com o micrométodo CLSI M7-A6 e com o micrométodo CLSI M27-A3, respetivamente, após 48 horas de incubação a 37°C [109, 110]. Foram preparadas diluições dos extratos em meio de Mueller Hinton (Difco Laboratories, USA) para as bactérias e em RPMI (Biochrom, Germany) no caso dos fungos. As concentrações avaliadas variaram entre 0,1 µg/mL e 1 mg/mL.

O crescimento microbiano foi visualmente comparado para cada concentração com o controlo (sem extrato). Todas as determinações foram realizadas em duplicado para cada ensaio, sendo realizados um total de três experiências independentes com resultados concordantes para cada extrato.

2.7 Análise Estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi realizada recorrendo ao *software* estatístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, USA). Para verificar as diferenças entre extratos foi realizado um teste ANOVA. As comparações *post hoc* das médias foram realizadas de acordo com o teste HSD de Tukey. A significância foi definida para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Química

3.1.1 Caracterização do Perfil Nutricional

A caracterização nutricional é essencial para o conhecimento do perfil de macronutrientes de espécies que visem uma possível aplicação na indústria alimentar. Os valores nutricionais determinados para a *C. vulgaris* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Teores em percentagem (%) da humidade, fibra, cinzas, proteína, gordura e hidratos de carbono na flor da *C. vulgaris*.

<i>C. vulgaris</i>	
% Fibra	38,96 ± 1,64
% Hidratos de Carbono	36,21 ± 0,20
% Humidade	12,03 ± 0,15
% Proteína	6,80 ± 0,27
%Gordura	3,70 ± 0,10
% Cinzas	2,31 ± 0,09

(média ± desvio padrão)

A análise nutricional permitiu constatar que a flor da urze é constituída por um elevado conteúdo em fibra e hidratos de carbono (~75%), seguido de um teor de humidade de aproximadamente 12% e um reduzido teor de proteína (~7%) e gordura (~4%). As cinzas representam cerca de 2% da massa seca.

O perfil nutricional da *C. vulgaris* não se encontra descrito na literatura. Desta forma, não é possível relacionar diretamente estes resultados com outras análises realizadas. Este estudo inovador permite assim um conhecimento mais detalhado desta espécie.

Por seu lado, o perfil nutricional de outras plantas nativas da região tem sido descrito na literatura. O fruto da planta nativa medronheiro (*Arbutus unedo* L) pertence à mesma família da *C. vulgaris*, Ericaceae, sendo igualmente predominante em Portugal [111]. Rodriguez *et al.* determinaram que a percentagem de hidratos de carbono do medronheiro representava cerca de 20% do teor nutricional, apresentando cerca de 18% de fibra total [112]. Estes macronutrientes são igualmente maioritários em *C. vulgaris*.

No grupo de investigação onde decorreu esta dissertação foram realizados estudos nutricionais para outras espécies, tendo por base os métodos acima descritos. A análise realizada em diferentes ervas aromáticas, como cebolinho (*Allium schoenoprasum* L.), coentros (*Coriandrum sativum* L.), hortelã (*Mentha spicata* L.) e salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym), evidenciaram teores em fibra total e proteína entre 2 e 5 %, respetivamente, e hidratos de carbono entre 1 e 4% [113]. No caso do castanheiro a análise nutricional revelou que tanto a casca como o ouriço são constituídos por uma elevada quantidade de água (15-40%), um teor proteico na ordem dos 3 % e um elevado teor em fibra e hidratos de carbono [114].

No que diz respeito aos dados obtidos para a *C. vulgaris* é notório os seus elevados valores em fibra e hidratos de carbono. Na verdade, plantas nativas contêm uma maior percentagem de nutrientes e compostos bioativos em comparação com muitas espécies que são cultivadas [115]. Este facto está relacionado com as condições de stress com que este tipo de plantas se depara, desenvolvendo deste modo um mecanismo de proteção mais eficaz, proporcionando uma maior produção de macronutrientes que permite o seu desenvolvimento.

A incorporação de plantas naturais em géneros alimentícios é uma nova aposta da indústria alimentar, na elaboração de um novo conceito de alimentos, intitulados alimentos funcionais, alimentos comuns, integrados na dieta, capazes de produzir benefícios para saúde. *C. vulgaris* perante a composição química que apresenta poderá ser melhor explorada numa nova área no setor alimentar e assim criar um novo género alimentar, com propriedades químicas e benefícios reconhecidos.

3.1.2 Determinação da Vitamina E

A vitamina E encontra-se entre os antioxidantes mais importantes no combate ao stresse oxidativo [116, 117]. Os seus diferentes constituintes apresentam propriedades antioxidantes que resultam na manutenção da integridade das membranas celulares devido à ação protetora contra a peroxidação dos ácidos gordos [118]. No ser humano, a vitamina E atua como parte integral do sistema de defesa primário intracelular e tem vindo a ser relacionada com a prevenção de várias doenças, nomeadamente, cancro, cataratas, doença de Parkinson, aterosclerose, doenças coronárias e algumas doenças imunológicas [119, 120]. Nas plantas, os tocoferóis e os tocotrienóis protegem as membranas dos cloroplastos da foto-oxidação, proporcionando um ambiente ideal para o processo fotossintético [121].

A vitamina E é constituída por um conjunto de oito compostos relacionados entre si, quatro tocoferóis (α -, β -, γ -, δ - tocoferol) e quatro tocotrienóis (α -, β -, γ -, δ - tocotrienol), os quais diferem no número e posição dos grupos metilo no anel aromático. Estes compostos lipofílicos são sintetizados pelas plantas e variam de acordo com o tipo de planta de onde o óleo é extraído [120].

A determinação do perfil de vitamina E da amostra foi avaliada em dois períodos diferentes do ano, nomeadamente em maio e outubro. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos de cada um dos vitâmeros determinados, para os meses de maio e outubro, respetivamente.

Tabela 4: Valor total de Vitamina E e dos diferentes vitâmeros da amostra da *C. vulgaris* em maio e outubro.

Vitâmeros	Maio	Outubro
α -tocoferol	23.06 \pm 0.85 ^a	32.5 \pm 0.48 ^b
β -tocoferol	0.91 \pm 0.08 ^a	0.39 \pm 0.01 ^b
γ -tocoferol	2.71 \pm 0.23 ^a	1.19 \pm 0.06 ^b
δ -tocoferol	4.03 \pm 0.54 ^a	0.36 \pm 0.01 ^b
β -tocotrienol	4.47 \pm 0.07	Nd
γ -tocotrienol	23.05 \pm 1.16 ^a	0.54 \pm 0.03 ^b
Total	58.23 \pm 2.94 ^a	34.99 \pm 0.59 ^b

Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes para cada coluna significam diferenças significativas ($p < 0,05$). Valores expressos em mg/100g de amostra. Nd - não determinado.

A amostra recolhida nos dois meses é essencialmente composta por α -tocoferol. O α -tocoferol é a forma mais comum encontrada nos tecidos fotossintéticos [122]. Na flora nativa de Portugal o perfil de vitamina E para a flor de outras plantas foi já avaliado. O composto maioritário determinado foi igualmente o α -tocoferol para a carqueja (*Pterospartum tridentatum*) (~ 9 mg/100g), bem como diferentes espécies de giesta, nomeadamente, *Cytisus multiflorus* (0,75 mg/100g), *Cytisus scoparius* (~11 mg/100g) e *Cytisus striatus* (~20 mg/100g) [123].

Diferentes estudos descrevem as propriedades antioxidantes dos tocotrienóis como sendo mais significativas do que as dos tocoferóis [124, 125]. Os tocotrienóis, sobretudo o γ -tocotrienol, protegem a pele contra o stress oxidativo provocado pelas radiações UV [126]. O γ -tocotrienol apresenta uma diferença bastante significativa entre os dois meses em estudo, enquanto o β -tocotrienol apenas foi detetado na amostra do mês de maio.

No global o perfil nutricional da *C. vulgaris* em maio exhibe valores consideravelmente superiores aos observados no mês de outubro. Esta variação deve-se, provavelmente, às diferentes condições climáticas a que a amostra foi sujeita nos diferentes períodos do ano. Os vitâmeros atuam como compostos antioxidantes sendo afetados pelas condições de temperatura e humidade, fazendo com que a planta responda de forma diferente perante o stress ambiental a que está sujeita [114].

Além da sua utilização a nível alimentar, a vitamina E tem tido novas aplicações na indústria cosmética, sendo utilizada para a produção de nanoemulsões benéficas para a prevenção do envelhecimento da pele [126]. Com efeito, a vitamina E apresenta uma forte atividade anticolinérgica, podendo ser utilizada como ingrediente na cosmetologia baseado nas suas propriedades de hidratação da pele [127-129].

O poder antioxidante dos seus vitâmeros atua na prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo [130, 131]. Os benefícios para a saúde atribuídos à vitamina E fazem com que *C. vulgaris* possa ser uma alternativa viável para possíveis aplicações na área cosmética.

3.1.3 Determinação do Perfil de Ácidos Gordos

Os ácidos gordos obtidos através da dieta são a principal fonte de energia. A importância dos ácidos gordos como compostos bioativos pode ser demonstrada pela sua atividade fisiológica, como por exemplo, a mediação na produção lipídica e o envolvimento na expressão dos genes [132, 133]. Os ácidos gordos são a forma mais abundante de cadeias de carbono reduzidas disponíveis na natureza. As plantas representam uma fonte renovável significativa destes compostos, uma vez que muitas espécies acumulam-nos como principais componentes de armazenamento em sementes [134].

O tipo de gordura consumido depende das fontes da dieta, que tipicamente inclui gorduras saturadas de fonte animal e óleos vegetais tropicais e gorduras insaturadas de óleos vegetais. Existem vários tipos de ácidos gordos, que se classificam consoante o seu grau de saturação. Assim, temos ácidos gordos saturados (Saturated Fatty Acids, SFAs), monoinsaturados (Monounsaturated Fatty Acids, MUFAs) e polinsaturados (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs). Os ácidos gordos saturados têm vindo a ser relacionados com efeitos adversos na saúde, enquanto os AG insaturados são considerados benéficos para a saúde humana.

Na Tabela 5 é apresentado a percentagem relativa da composição em ácidos gordos na amostra da flor da *C. vulgaris*.

Tabela 5: Composição em ácidos gordos (% área relativa) na amostra da flor da *C. vulgaris*.

Ácido gordo	Percentagem relativa (%)
C16:0	20,79 ± 2,12
C18:0	4,55 ± 0,56
C18:1n9c	7,78 ± 1,13
C18:2n6c	27,28 ± 1,19
C20:0	1,99 ± 0,26
C18:3n3	34,71 ± 2,11
C22:0	2,90 ± 0,40

(média ± desvio padrão)

Ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoleico); ácido araquídico (C20:0); ácido linolénico (C18:3n3); ácido beénico (C22:0).

Consoante é possível observar, foram identificados sete ácidos gordos na amostra. O ácido linolénico (C18:3n3, PUFA) foi o ácido gordo presente em maior quantidade, seguido pelo ácido linoleico (C18:2n6c, PUFA). Estes dois ácidos gordos polinsaturados estão descritos na literatura como ingredientes anti-inflamatórios, importantes para formulações do cuidado da pele [135, 136]. O ácido palmítico (C16:0, SFA) foi o ácido gordo saturado presente em maior quantidade. Estes três tipos de ácidos gordos identificados representam cerca de 80% da percentagem relativa e foram reconhecidos previamente em *C. vulgaris* [137]. Todos os ácidos gordos presentes na amostra foram igualmente identificados em outros tipos de plantas nativas [138].

3.2 Determinação de Compostos Bioativos

3.2.1 Método de Extração

A definição de “extração verde” de produtos naturais baseia-se em processos de extração que visam reduzir o consumo de energia, permitindo a utilização de solventes alternativos e considerados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), garantindo igualmente a segurança dos produtos bem como a sua qualidade [139]. A eficácia da extração dos compostos bioativos é influenciada por muitos fatores como o tempo, a temperatura, a pressão e, particularmente, a composição do solvente [140, 141].

A extração de compostos bioativos, nomeadamente polifenóis, depende da dissolução de cada composto na matriz da planta, bem como da sua difusão para o solvente externo. Desta forma, a sua solubilidade é influenciada pela natureza da amostra da planta e pela polaridade dos solventes utilizados [142].

Vários solventes têm sido utilizados para a extração de compostos fenólicos em *C. vulgaris*, nomeadamente metanol e acetona [36, 143]. No entanto, a sua utilização não é considerada segura. Por sua vez, o etanol é reconhecido como um composto GRAS. A sua fácil recuperação e reutilização torna este solvente uma boa opção para um processo que se quer eficaz e, simultaneamente, sustentável. Os extratos obtidos poderão ser utilizados para vários fins, sem colocar em risco a saúde humana.

Nesta pesquisa foram estudados três tipos solventes: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico. O tempo e a temperatura de extração foram estabelecidos tendo por base estudos anteriores de eficácia da extração realizados no grupo de investigação [144, 145]. Na Figura 15 estão representados os extratos obtidos, sendo notório o diferente aspeto macroscópico, resultante dos diferentes compostos extraídos.



Figura 15: Aspeto macroscópico dos diferentes extratos, respetivamente, aquoso, hidroalcoólico, alcoólico, da esquerda para a direita.

3.2.2 Teor de Compostos Fenólicos Total

O CFT dos diferentes extratos da planta foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu. Sendo um método não específico, o reagente de Folin-Ciocalteu é usado para obter apenas uma estimativa dos compostos fenólicos presentes nos extratos [146, 147]. Trata-se de um método simples, muito utilizado, mas que apresenta algumas limitações, nomeadamente, a interferência de substâncias como açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre e ácido ascórbico [148]. Os resultados encontram-se representados na Tabela 6.

Tabela 6: Conteúdo fenólico total (mg eq. EAG /g extrato seco) da flor da *C. vulgaris* para os três tipos de extratos analisados: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico.

Extrato	CFT (mg EAG/g)
Aquoso	75,43 ± 7,345 ^a
Hidroalcoólico	121,92 ± 0,815 ^b
Alcoólico	53,96 ± 5,389 ^c

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Letras diferentes significam diferenças significativas (p <0,05).

O CFT nos diferentes extratos variou entre 53,96 e 121,92 mg EAG por grama de extrato. O valor mais elevado de CFT foi obtido no extrato hidroalcoólico e o conteúdo mais baixo para o extrato alcoólico. A análise dos resultados revelou uma diferença significativa entre os diferentes solventes utilizados. Este facto é influenciado sobretudo por uma maior ou menor polaridade do solvente utilizado, podendo extrair diferentes compostos consoante a sua estrutura química.

Estudos anteriores têm comparado o CFT em diferentes tipos de extratos de *C. vulgaris* particularmente nas partes aéreas da planta [79, 149]. Segundo Orhan *et al.*, o teor é mais elevado utilizando acetato de etilo como solvente (29,7 ± 0,1 mg EAG/g), comparativamente a uma fração de *n*-butanol, clorofórmio e água [149]. Outro estudo revela que o extrato aquoso (142,46 ± 0,50 mg EAG/g) apresenta um valor superior em relação ao extrato alcoólico (81,86 ± 0,95 mg EAG/g) e ao extrato de acetato de etilo (67,55 ± 0,38 mg EAG/g) [79].

Estes estudos apresentam uma gama de valores particularmente diferente dos resultados obtidos. Na verdade, vários métodos são utilizados para a extração de compostos fenólicos e desta forma a estimativa do seu teor é muitas vezes variável.

A concentração de compostos fenólicos totais em *C. vulgaris* está intrinsecamente relacionada com a sazonalidade, como foi previamente estudado [35].

Como retratado anteriormente, a composição química é condicionada por parâmetros como o clima, a radiação solar e a nutrição mineral, a qual pode interferir com o teor de metabolitos secundários [150].

3.2.3 Teor de Flavonoides Total

Os flavonoides são um grande grupo de metabolitos secundários da classe dos polifenóis distribuídos em vegetais, plantas medicinais, sumos de fruta e uma grande variedade de bebidas (chá, café, vinho) [151-154]. Os compostos fenólicos, particularmente os flavonoides, são responsáveis por efeitos antioxidantes através da eliminação a larga escala de ROS e da peroxidação lipídica [155]. Estudos experimentais demonstraram os inúmeros efeitos benéficos destes compostos na saúde humana, incluindo proteção cardiovascular, atividade anticancerígena, antialérgica, antiviral e propriedades anti-inflamatórias [156, 157]. O TFT dos extratos foi determinado usando a catequina como padrão. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 7: Teor de flavonoides totais (mg ECA/g extrato seco) da flor da *C. vulgaris* para os três tipos de extratos analisados: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico.

Extrato	TFT (mg ECA/g)
Aquoso	88,72 ± 1,945 ^a
Hidroalcoólico	118,26 ± 3,598 ^b
Alcoólico	14,80 ± 1,136 ^c

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

O TFT presente na flor da *C. vulgaris* foi maior para o extrato hidroalcoólico (118,26 mg eq. CAT/g), seguindo-se o extrato aquoso (88,72 mg eq. CAT/g) e o extrato alcoólico (14,80 mg eq. CAT/g). Como descrito anteriormente, o extrato hidroalcoólico é igualmente mais eficaz na extração de compostos fenólicos, apresentando um maior conteúdo relativamente aos outros extratos.

Segundo Vucic *et al.*, existe uma variação do valor de TFT nas partes aéreas da planta, dependendo do tipo de extrato (aquoso, acetato de etilo e alcoólico) [79]. O teor mais elevado foi determinado com o extrato de acetato de etilo, correspondente a uma concentração total de 63,68 mg eq. rutina/ g [79]. O maior flavonoide identificado em *C. vulgaris* foi o caempferol-3-O- β -D-galactosídeo, associado a uma elevada atividade antioxidante [149]. Estes tipos de ensaios são muito influenciados por uma série de fatores descritos anteriormente.

3.3 Atividade Antioxidante

3.3.1 Capacidade de inibição do radical DPPH

O radical DPPH é frequentemente utilizado para a determinação da atividade antioxidante primária. A atividade de eliminação deste radical livre tem sido estudada em compostos antioxidantes puros, nomeadamente em extratos de plantas e frutos, bem como em produtos alimentares [158]. Neste estudo a atividade antioxidante foi expressa em equivalentes de Trolox por grama de extrato para os diferentes tipos de extratos, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8: Atividade antioxidante dos diferentes extratos da flor da *C. vulgaris*, aquoso, hidroalcoólico e alcoólico baseados na capacidade de inibição do radical DPPH.

Extrato	DPPH ($\mu\text{mol eq. Trolox/g}$)
Aquoso	23,66 \pm 0,649 ^a
Hidroalcoólico	51,83 \pm 3,903 ^b
Alcoólico	15,02 \pm 1,574 ^c

Letras diferentes significam diferenças significativas (p < 0,05).

Como é possível constatar o extrato hidroalcoólico apresenta uma atividade antioxidante superior (51,83 $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$), sendo o extrato alcoólico o que possui uma capacidade de inibição do radical mais baixa (15,02 $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$). Estudos anteriores têm demonstrado a significativa atividade antioxidante da *C. vulgaris* face ao radical DPPH [70, 72, 159, 160]. Em comparação com outras espécies da mesma família, como *Erica arborea* L. e *Erica carnea* L., o seu poder antioxidante revelou-se superior [159]. O elevado conteúdo fenólico presente em *C. vulgaris* está diretamente relacionado com uma maior atividade antioxidante, particularmente no extrato hidroalcoólico.

3.3.2 Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

A capacidade dos extratos da *C. vulgaris* para reduzir os íons de ferro foi determinada usando o ensaio de FRAP. Este ensaio mede a redução do íon férrico (Fe^{3+}) ao ferro ferroso (Fe^{2+}) na presença de antioxidantes. Os valores obtidos estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9: Atividade antioxidante dos diferentes extratos: aquoso, hidroalcoólico e alcoólico da flor da *C. vulgaris* baseado na sua capacidade de reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) ao estado ferroso (Fe^{2+}).

Extrato	FRAP ($\mu\text{mol/g}$)
Aquoso	1354,5 \pm 102,14 ^a
Hidroalcoólico	2138,3 \pm 15,46 ^b
Alcoólico	634,8 \pm 99,00 ^c

Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os valores variaram entre 634,8 e 2138,3 $\mu\text{mol/g}$ para o extrato alcoólico e hidroalcoólico, respetivamente. Como foi anteriormente evidenciado, o extrato hidroalcoólico apresenta os valores mais elevados, exibindo um perfil antioxidante superior aos restantes extratos. Este ensaio foi anteriormente realizado num extrato hidroalcoólico (70% em etanol) da *C. vulgaris*, tendo-se verificado atividade antioxidante face a este método [159]. A significativa capacidade antioxidante desta espécie pode ser explicada pela presença de dois compostos fenólicos, o caempferol-3-O- β -D-galactosídeo (seu principal flavonoide glicosídeo) e a quercetina. [149, 161].

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através de métodos espectrofotométricos. As diferenças observadas entre os dois ensaios são expectáveis, uma vez que possuem diferentes mecanismos de ação e diferentes condições reacionais.

3.3.3 Correlação de Atividades

De modo a interligar os resultados obtidos efetuou-se uma correlação de atividades. A Tabela 10 apresenta os valores da correlação de Pearson (R^2) obtidos para os vários ensaios efetuados, relacionando o conteúdo de compostos bioativos com a atividade antioxidante nos diferentes extratos da *C. vulgaris*.

Tabela 10: Valores de Correlação de Pearson (R^2) obtidos para os ensaios.

Ensaio	DPPH	CTF	Flavonoides
CTF	0,996	1	0,899
Flavonoides	0,858	0,899	1
FRAP	0,963	0,983	0,964

A análise da Tabela 10 permite verificar uma correlação muito forte entre os vários tipos ensaios. Os polifenóis têm sido descritos como responsáveis pela atividade antioxidante de extratos vegetais. Os dois métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante, DPPH e FRAP, apresentam uma correlação positiva entre o CFT e o TFT. Geralmente o elevado CFT está relacionado com uma elevada atividade antioxidante dos extratos [158].

O elevado teor em compostos fenólicos, associado à elevada atividade antioxidante, constitui uma boa evidência dos benefícios do extrato hidroalcoólico da *C. vulgaris*. Este facto está relacionando sobretudo com a possibilidade de extração de um maior número de compostos (polares e apolares).

3.3 Viabilidade Celular – Ensaio MTT

Os diferentes extratos da *C. vulgaris* foram avaliados em duas linhas celulares, queratinocitos e fibroblastos, de modo a verificar os seus efeitos na viabilidade celular. Os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de extrato: 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 µg/mL.

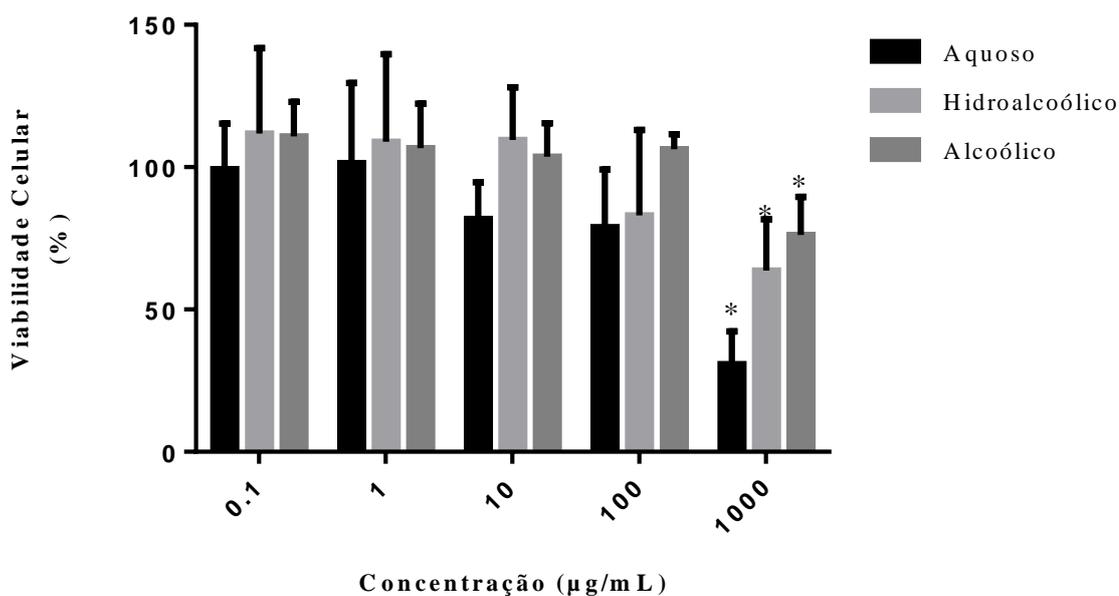


Figura 16: Efeito da atividade metabólica de células HaCat após o seu contacto com diferentes extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) e concentrações da *C. vulgaris*, determinado pelo ensaio de MTT. Valores são expressados com as médias \pm desvio padrão (n=4). * $p < 0,05$ comparado com as diferentes concentrações

Consoante é possível observar na Figura 16, os extratos não conduziram a uma diminuição da viabilidade celular em queratinócitos até uma concentração de 100 µg/mL. Para estas concentrações, a viabilidade celular manteve-se superior a 80%. Quando os queratinócitos são expostos a uma concentração de extrato de 1000µg/mL ocorre uma diminuição da viabilidade celular, em particular após exposição ao extrato aquoso.

A Figura 17 apresenta os resultados do ensaio de viabilidade celular em fibroblastos.

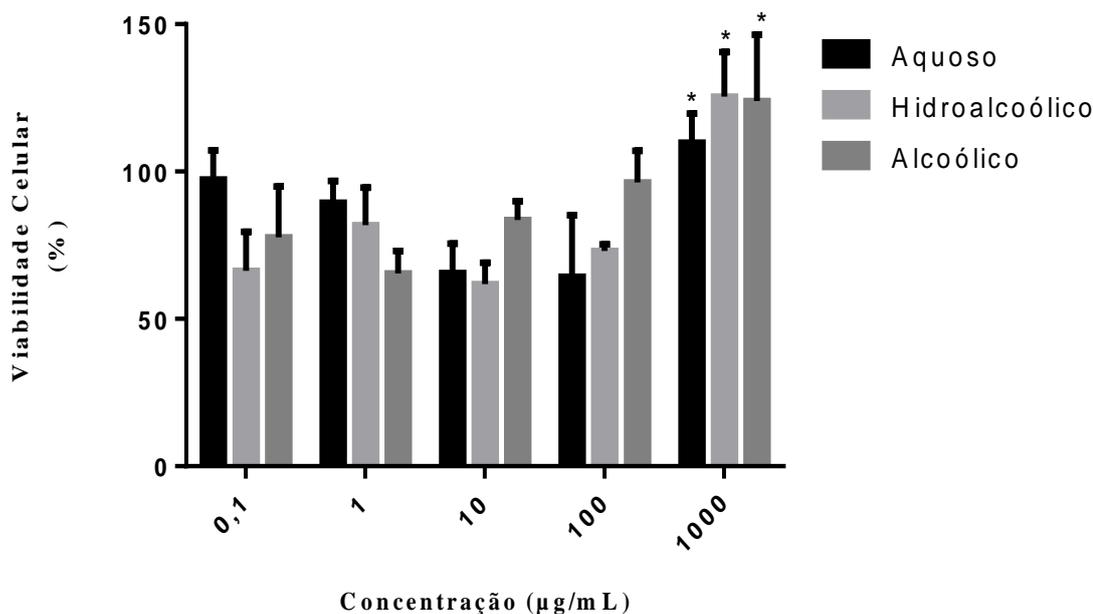


Figura 17: Efeito da atividade metabólica de fibroblastos após o seu contacto com diferentes extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) e concentrações da *C. vulgaris*, determinado pelo ensaio de MTT. Valores são expressados com as médias \pm desvio padrão (n=4). * $p < 0,05$ comparado com as diferentes concentrações

A percentagem de viabilidade celular em fibroblastos apresenta uma gama de valores semelhante para concentrações até 100 $\mu\text{g/mL}$. No geral, estes valores são inferiores aos obtidos para os queratinócitos nas mesmas concentrações. Estes resultados são concordantes com outros autores que observaram que os queratinócitos são mais resistentes do que os fibroblastos, quando em contacto com diferentes substâncias [162-165].

A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou os valores mais elevados de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferentes quando comparados com outras concentrações. Este facto pode estar associado a um efeito protetor do extrato que a elevadas concentrações pode estimular a atividade mitocondrial, o que pode justificar a elevada percentagem de viabilidade celular verificada. São, contudo, necessários mais ensaios que comprovem este efeito protetor.

3.5 Atividade Antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana foram selecionadas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) e fungos (*C. albicans*). De acordo com diferentes autores, os microrganismos presentes na flora “normal” da pele incluem diferentes bactérias como *S. epidermis*, *S. aureus* ou até mesmo *P. aeruginosa* [166, 167]. *Staphylococcus* é gênero de bactéria mais representativo na pele humana, dentro do qual *S. epidermidis* é a espécie mais prevalente [166-168]. Por outro lado, *S. aureus* é uma espécie que tem sido frequentemente encontrada a colonizar locais húmidos da pele de pessoas saudáveis, sendo em alguns casos considerada um agente patogénico resistente à metilina, [167].

Na pele, a *P. aeruginosa* pode causar dermatite ou infeções em tecidos moles mais profundos [169]. *E. coli* e *K. pneumonia* são também duas espécies importantes em infeções nosocomiais [170, 171]. Por fim, *Candida* é um gênero de fungos patogénicos mais comumente encontrado em humanos, sendo agentes causadores da candidíase. Dentro deste gênero, *C. albicans* é considerada a espécie mais patogénica [172].

Com efeito, a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos nestas espécies pode ser considerada de grande relevância na área cosmética. Além disso, os microrganismos como fungos e bactérias são importantes fatores causadores do processo de oxidação durante o armazenamento de produtos cosméticos, provocando por consequência a sua deterioração. A Tabela 11 resume os valores de CMI para cada um dos microrganismos.

Tabela 11: Atividade antimicrobiana dos diferentes extratos da *C. vulgaris* expressos com a concentração mínima inibitória (CMI).

Estirpes bacterianas	CMI (mg/mL)		
	Aquoso	Hidroalcoólico	Alcoólico
<i>S. epidermidis</i> DSM28764	8.8	2.0	10.8
<i>S. aureus</i> ATCC6538	17.5	2.0	21.6
<i>S. aureus</i> MRSA	35.0	2.0	43.2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	>35.0	>8.5	>43.2
<i>E. coli</i> ATCC8739	>35.0	>8.5	>43.2
<i>K. pneumoniae</i> ATCC4352	>35.0	>8.5	>43.2
<i>C. albicans</i> ATCC10231	>35.0	>8.5	>43.2

Os dados são representados com a média das repetições (n=3).

A análise da Tabela 11 permite constatar que o extrato hidroalcoólico apresentou valores de CMI's que variam entre 2 e 8.5 mg/mL. O extrato aquoso e alcoólico, pelo contrário, apresentaram valores superiores para todas as espécies avaliadas. O valor de CMI mais baixo foi obtido com o extrato hidroalcoólico em ambas as estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Pelo contrário, os valores de CMI mais elevados foram verificados nas espécies *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*, quando utilizado o extrato alcoólico.

De acordo com Fabry *et al.* para que os extratos de plantas possam ser considerados como potencialmente ativos terapeuticamente, os valores de CMI devem ser inferiores a 8 mg / mL [173]. Pelo contrário, Gibbons sugere que os fitoquímicos isolados devem ter valores de CMI inferiores a 1 mg / ml para que possam ter atividade antimicrobiana [174]. Os valores de CMI determinados para os extratos avaliados foram apenas inferiores a 8 mg/mL no caso do extrato hidroalcoólico nas estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, indicando assim um eventual efeito antimicrobiano. Pelo contrário, se for tida em conta a definição de Gibbons, nenhum dos extratos apresenta atividade antimicrobiana.

A potencial atividade antimicrobiana de extratos de *C. vulgaris* tem sido estudada por diferentes autores. De acordo com Kumarasamy *et al.*, o extrato metanólico de *C. vulgaris* possui atividade antimicrobiana contra as estirpes *S. aureus* e *S. hominis*, com um valor de CMI de 0,1 µg/ml [9]. Pavlović *et al.*, demonstraram uma leve atividade do extrato etanólico de *C. vulgaris* contra *S. aureus* e *Bacillus subtilis* [175]. Por sua vez, Gharreb *et al.* estudaram este efeito em *C. vulgaris* e em mais duas espécies presentes na medicina tradicional, *Ferula* sp. e *Tribulus* sp. Estes autores mostraram que o extrato etanólico de *C. vulgaris* apresenta atividade antimicrobiana contra um maior número de bactérias patogénicas (*Agrobacterium Tumefaciens*, *Erwinia* sp., *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) em comparação com as outras duas espécies estudadas [45].

A potencialidade do extrato de *C. vulgaris* contra determinadas bactérias patogénicas encontra-se desta forma brevemente descrita na literatura, sendo relacionado o seu efeito com a presença de compostos fenólicos e flavonoides na sua composição. O presente estudo reforça os resultados obtidos anteriormente por diferentes autores, comprovando o seu potencial uso como antimicrobiano. Com efeito, de modo a identificar os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana verificada neste estudo preliminar, ensaios mais detalhados serão realizados no grupo de investigação nos próximos tempos.

4. CONCLUSÃO

O trabalho realizado pretendeu valorizar a planta *C. vulgaris*, visando uma possível aplicação na indústria cosmética e eventualmente nutracêutica. A análise nutricional permitiu um conhecimento inovador do perfil de macronutrientes, demonstrando uma elevada quantidade em fibras e hidratos de carbono na planta. A flor da *C. vulgaris* foi recolhida em dois meses distintos (maio e outubro) revelando ser essencialmente constituída por α -tocoferol, o principal tocoferol que atua na prevenção e tratamento do envelhecimento cutâneo. Para além disso, a análise do perfil de vitamina E permitiu demonstrar que as diferentes condições climáticas a que a planta está sujeita nos diferentes meses influenciam consideravelmente o seu conteúdo químico. Relativamente à composição em ácidos gordos, o ácido linolénico foi o composto maioritário presente, seguido pelo ácido linoleico. Ambos os ácidos gordos estão descritos na literatura como ingredientes anti-inflamatórios importantes para formulações do cuidado da pele.

A avaliação global deste trabalho permitiu concluir que para além da sua composição química, rica em compostos potencialmente benéficos para pele, a *C. vulgaris* é constituída por um elevado teor de compostos bioativos. O elevado conteúdo fenólico presente na planta encontra-se diretamente relacionado com uma maior atividade antioxidante, conferindo uma importante ação antioxidante contra os radicais livres decorrentes do stresse oxidativo. Apesar dos três extratos (aquoso, hidroalcoólico e alcoólico) terem demonstrado potencial antioxidante, o extrato hidroalcoólico revelou uma melhor evidência desta propriedade.

O objetivo do trabalho passou também pela avaliação dos diferentes extratos da *C. vulgaris* em duas linhagens celulares da pele, onde foi verificado que estes não interferem consideravelmente na viabilidade celular até uma determinada concentração. Uma possível atividade antimicrobiana destes extratos foi demonstrada, o que certamente irá constituir um ponto de partida para a avaliação das vantagens de novas aplicações da planta no futuro.

O estudo e o desenvolvimento de novos produtos usando extratos desta planta pode assim tornar-se uma garantia de sucesso, aliado à sustentabilidade ambiental. Perante os resultados obtidos é demonstrada a potencialidade da planta como ingrediente ativo na formulação de produtos cosméticos.

As investigações devem assim aprofundar-se no sentido de compreender a eficácia terapêutica do extrato, o seu perfil, a sua estabilidade e a sua rentabilidade, relativamente à sua produção à escala industrial.

Numa perspetiva futura e de continuidade deste trabalho, a determinação e identificação individual dos compostos bioactivos por HPLC, bem como a avaliação dos extratos em modelos 3D de pele e olho (nomeadamente modelos validados como o EpiSkin® ou o EpiOcular® que permitam a avaliação do potencial irritante dérmico e ocular) deverão ser tidos em conta. Dentro do campo das perspetivas futuras estão igualmente incluídos ensaios da avaliação de eficácia *in vivo*, através de *patch* testes durante 48 horas. De forma a avaliar a segurança do extrato, seria também interessante desenvolver estudos de sensibilização e tolerância cutânea em condições normais de uso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Declaração da conferência das Nações Unidas sobre o ambiente. Disponível em <http://www.unep.org/documents.multilingual/default.asp?documentid=97&articleid=150> [acedido em 05/02/2016].
2. Declaração sobre o estado do ambiente. Disponível em <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=140> [acedido em 12/03/2016].
3. UNEP. Millennium ecosystem assessment, synthesis report: ecosystems and human well-being: general synthesis. Island Press, Washington DC, 2005.
4. Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, et al. A Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 2010. **327**(5967): p. 812-818.
5. Relatório do Estado do Ambiente Europeu. Disponível em <http://www.eea.europa.eu/soer> [acedido em 12/03/2016]
6. Fernandes AC, Guerra MD, Ribeiro P, Rodrigues S. Relatório do Estado do Ambiente 2015, Agência Portuguesa do Ambiente, 2015.
7. Richards RT, Chambers JC, Ross C. Use of native plants on federal lands: policy and practice. *Journal of Range Management*, 1998: p. 625-632.
8. Floresta Autóctone. Disponível em <http://www.quercus.pt/artigos-floresta/2470-o-que-e-uma-floresta-autoctone> [acedido em 14/03/2016].
9. Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002. **83**(1–2): p. 73-77.
10. Kraus L, Gehrmann B, Seitz R. *Calluna*, in Hagers Enzyklopaedie der Arzneistoffe und Drogen, E.S. Blaschek W, Hackenthal E, Holzgrabe U, and R.J. Keller K, Schulz V (Eds.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2007: p. 586-592.
11. *Calluna Vulgaris*. Disponível em <http://www.biodiversity4all.org/index.cfm?p=CA9254FE-D6FA-9BB823D3D7A2A17FA8FC> [acedido em 22/03/2016].
12. Diferentes espécies de Urze. Disponível em <http://www.flora-on.pt/#/1urze> [acedido em 22/03/2016].
13. Brako L, Rossman AY, Farr DF. Scientific and common names of 7,000 vascular plants in the United States. American Phytopathological Society (APS Press), 1995.
14. Loidi J, Biurrun I, Campos JA, García-Mijangos I, Herrera M. A biogeographical analysis of the European Atlantic lowland heathlands. *Journal of Vegetation*, 2010. **21**(5): p. 832-842.

15. Pons T. Dormancy and germination of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and *Erica tetralix* L. seeds. *Acta oecologica. Oecologia plantarum*, 1989. **10**(1): p. 35-43.
16. Hullu E, Gimingham C. Germination and establishment of seedlings in different phases of the *Calluna* life cycle in a Scottish heathland. *Vegetatio*, 1984. **58**(2): p. 115-121.
17. Legg C, Maltby E, Proctor M, The ecology of severe moorland fire on the North York Moors: seed distribution and seedling establishment of *Calluna vulgaris*. *Journal of Ecology*, 1992: p. 737-752.
18. Bradley R, Burt A, Read D. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. 1981: p.335-337.
19. Arabuli GJ, Connor SE, Kvavadze EV. *Calluna vulgaris* and *Spiranthes amoena* in the Colchis mire flora: weeds or relicts? *Acta Palaeobotanica*, 2007. **47**(2): p. 469-478.
20. Mapa de distribuição mundial da *C. vulgaris*. Disponível em <http://www.discoverlife.org/mp/20m?map=Calluna+vulgaris> [acedido em 15/03/2016].
21. Franco AJ. Nova flora de Portugal (Continente e Acores). Volume 2: Clethraceae: Compositae. Sociedade Astoria Lda, Lisboa, 1984: p.234-237.
22. Borges PA, Abreu C, Aguiar A, Carvalho P, Jardim R, Melo I et al. A list of the terrestrial fungi, flora and fauna of Madeira and Selvagens archipelagos. Funchal e Angra do Heroísmo: Direcção Regional do Ambiente da Madeira e Universidade de Açores, 2008.
23. Araújo AC, Lourenço L, Porto M, Almeida JD, Holyoak DT, Clamote F, et al. *Calluna vulgaris* (L.) Hull - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica, 2016.
24. Odalia-Rímoli A, Arruda ED, Rímoli J, Bueno NR, Costa RB. Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, 2000. **1**(1): p. 21-30.
25. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 1998. **56**(11): p. 317-333.
26. Patil BS, Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Vikram A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. **57**(18): p. 8142-8160.
27. Azad MA, Wright GD, Determining the mode of action of bioactive compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012. **20**(6): p. 1929-1939.
28. Sarkar D, Shetty K. Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2014. **5**: p. 395-413.

29. Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P, Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural Product Communications*, 2013. **8**(12): p. 1821-1829.
30. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1054**(1): p. 95-111.
31. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(11): p. 5165-5170.
32. Miles EA, Zoubouli P, Calder PC, Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 2005. **21**(3): p. 389-394.
33. Rauha JP, Remes S, Heinonen , Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2000. **56**(1): p. 3-12.
34. Monschein M, Neira JI, Kunert O, Bucar F. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochemistry Reviews*, 2010. **9**(2): p. 205-215.
35. Jalal MAF, Read DJ, Haslam E, Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 1982. **21**(6): p. 1397-1401.
36. Allais DP, Simon A, Bennini B, Chulia AJ, Kaouadji M, Christiane D. Flavone and flavonol glycosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 1991. **30**(9): p. 3099-3101.
37. Simon A, Chulia AJ, Kaouadji M, Allais DP, Delage C. Further flavonoid glycosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 1993. **32**(4): p. 1045-1049.
38. Orhan I, Küpeli E, Terzioğlu S, Yesilada E. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **114**(1): p. 32-37.
39. Simon A, Najid A, Chulia AJ, Delage C, Rigaud M. Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1992. **1125**(1): p. 68-72.
40. Simon A, Chulia AJ, Kaouadji M, Delage C. Quercetin 3-[triacetyl-arabinosyl (1 \rightarrow 6) galactoside] and chromones from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 1994. **36**(4): p. 1043-1045.
41. Saaby L, Rasmussen HB, Jäger AK. MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009. **121**(1): p. 178-81.

42. El Bouzidi L, Abbad A, Hassani L, Fattarsi K, Leach D, Markouk M, et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of wild and cultivated Moroccan *Achillea ageratum* L.: a rare and threatened medicinal species. *Chemistry & Biodiversity*, 2012. **9**(3): p. 598-605.
43. Tunon H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 1995. **48**(2): p. 61-76.
44. García-Risco MR, Vázquez E, Sheldon J, Steinmann E, Riebesehl N, Fornari T, et al. Supercritical fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris*) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts. *Virus research*, 2015. **198**: p. 9-14.
45. Ghareeb DA, ElAhwany AM, El-mallawany SM, Saif AA. In vitro screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014. **28**(6): p. 1155-1164.
46. Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux, JL. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(7): p. 3321-3327.
47. Caroch M, Ferreira IC, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. **51**: p. 15-25.
48. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 2010. **4**(8): p. 118.
49. Wiernsperger N, Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes & metabolism*, 2003. **29**(6): p. 579-585.
50. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 2004. **52**(794804): p. 4.
51. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 2007. **35**(5): p. 1147-1150.
52. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **613**(1): p. 1-19.
53. Deliorman-Orhan D, Şenol S, Kartal M, Orhan I. Assessment of antiradical potential of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and its major flavonoid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009. **89**(5): p. 809-814.

54. Ferreira IC, Barros L, Abreu R. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 2009. **16**(12): p. 1543-1560.
55. Hwang KA, Yi BR, Choi KC, Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations. *Laboratory animal research*, 2011. **27**(1): p. 1-8.
56. Marionnet C, Tricaud C, Bernerd F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *International journal of molecular sciences*, 2014. **16**(1): p. 68-90.
57. Representação do tecido cutâneo. Disponível em <http://www.britannica.com/science/sebaceous-gland> [acedido em 10/06/2016].
58. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 2012. **30**(3): p. 257-262.
59. Lorencini M, Brohem CA, Dieamant GC, Zanchin NI, Maibach HI. Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews*, 2014. **15**: p. 100-115.
60. Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH, Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. **68**(3): p. 453-466.
61. Matsumura Y, Ananthaswamy HN, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004. **195**(3): p. 298-308.
62. Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, et al. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997. **41**(5): p. 992-998.
63. Ayala F, Palla M, Di Trollo R, Mozzillo N, Ascierio PA. The role of optical radiations in skin cancer. *ISRN Dermatology*, 2013: p.323-345.
64. Kulms D, Schwarz T, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 2000. **16**(5): p. 195-201.
65. Mehrotra P, Mishra KP, Raman G, Banerjee G. Differential regulation of free radicals (reactive oxygen and nitrogen species) by contact allergens and irritants in human keratinocyte cell line. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2005. **15**(5): p. 343-350.
66. Okayama Y, Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 2005. **4**(4): p. 517-519.
67. Kundoor V, Zhang X, Bommareddy A, Khalifa S, Fahmy H, Dwivedi C. Chemopreventive effects of sarcotriol on ultraviolet B-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Marine Drugs*, 2007. **5**(4): p. 197-207.

68. Cockell CS, Knowland J. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 1999. **74**(03): p. 311-345.
69. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(6): p. 12222-12248.
70. Perde-Schrepler M, Chereches G, Virag P, Barbos O, Soritau O, Tatomir C, et al. Photoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract against UVB-induced phototoxicity in human immortalized keratinocytes. *Journal of Environmental Pathology Toxicology Oncology*, 2011. **30**(4): p. 323-31.
71. Olteanu D, Baldea I, Clichici S, Bolfa P, Cenariu M, Schrepler-Perde M, et al. In vitro studies on the mechanisms involved in chemoprevention using *Calluna vulgaris* on vascular endothelial cells exposed to UVB. *Journal of Photochemistry Photobiology B*, 2014. **136**: p. 54-61.
72. Filip A, Clichici S, Daicoviciu D, Catoi C, Bolfa P, Postescu ID et al. Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera* extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2011. **62**(3): p. 385-92.
73. Periago PM, Conesa R, Delgado B, Fernández PS, Palop A. *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology*, 2006. **44**(1): p. 17-23.
74. Tajkarimi M, Ibrahim S, Cliver D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 2010. **21**(9): p. 1199-1218.
75. Yorgancioglu A, Bayramoglu EE, Production of cosmetic purpose collagen containing antimicrobial emulsion with certain essential oils. *Industrial Crops and Products*, 2013. **44**: p. 378-382.
76. Genta M, Villa C, Mariani E, Loupy A, Petit A, Rizzetto R, et al. Microwave-assisted preparation of cyclic ketals from a cineole ketone as potential cosmetic ingredients: solvent-free synthesis, odour evaluation, in vitro cytotoxicity and antimicrobial assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **231**(1): p. 11-20.
77. Phillipson J. Assays for antimalarial and amoebicidal activities. *Methods in Plant Biochemistry*, 1991. **6**: p. 135-152.
78. Silver L, Bostian K. Screening of natural products for antimicrobial agents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1990. **9**(7): p. 455-461.

79. Vucic DM, Petković MR, Rodić-Grabovac BB, Stefanović OD, Vasić SM, Čomić, LR. In vitro activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens. *Bosnia Journal of Basic Medical Science*, 2014. **14**(4): p. 234-8.
80. Lodén M. Interactions between the stratum corneum and topically applied products: regulatory, instrumental and formulation issues with focus on moisturizers. *British Journal of Dermatology*, 2014. **171**(s3): p. 38-44.
81. Newburger, A.E, Cosmeceuticals: myths and misconceptions. *Clinics in Dermatology*, 2009. **27**(5): p. 446-452.
82. Park DH, Jung DH, Kim SJ, Kim SH, Park KM. Galloyl-RGD as a new cosmetic ingredient. *BMC Biochemistry*, 2014. **15**(1): p. 18.
83. Kim HJ, Lee JH, Shin MK, Hyun LK, Kim YJ, Lee MH. Inhibitory effect of *Gastrodia elata* extract on melanogenesis in HM3KO melanoma cells. *Journal of Cosmetic Science*, 2012. **64**(2): p. 89-98.
84. Binic I, Lazarevic V, Ljubenovic M, Mojsa J, Sokolovic D. Skin ageing: natural weapons and strategies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: p1-10.
85. Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, das Neves J, Sarmiento B, Amaral MH, Oliveira MB. *Medicago* spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Industrial Crops and Products*, 2013. **49**: p. 634-644.
86. Ajaiyeoba EO, Ajaiyeoba, Abiodun OO, Falade MO, Ogbale NO, Ashidi JS, et al. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine*, 2006. **13**(4): p. 295-298.
87. Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes P A. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2005. **31**(8): p. 757-768.
88. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. **46**(6): p. 2103-2111.
89. Desanto K. High purity rhamnolipid cosmetic application. 2015, Google Patents.
90. Morse T. A method of organic and all natural treatment, prevention and relief of diaper dermatitis and other related skin irritations. 2004, Google Patents.
91. Ragot P, Pons E, Mompon B, Rousseau C. Product Comprising a Plant for Medicinal, Cosmetic, Coloring or Dermatologic Use. 2015, Google Patents.
92. Znaiden AP, Crotty BA, Gural PD. Moistened cosmetic eye treatment pads. 2004, Google Patents.

93. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 991.36 International (17th ed.) 2000.
94. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 920.153 International (17th ed.)2000.
95. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC 928.08 International (17th ed.)2000.
96. Araújo M, Alves RC, Pimentel FB, Costa AS, Fernandes TJ, Valente LM, et al. New approach for vitamin E extraction in rainbow trout flesh: Application in fish fed commercial and red seaweed-supplemented diets. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015. **117**(9): p. 1398-1405.
97. Alves R, Casal S, Oliveira MBP, Determination of vitamin E in coffee beans by HPLC using a micro-extraction method. *Food Science and Technology International*, 2009. **15**(1): p. 57-63.
98. Fernandes TJ, Alves RC, Souza T, Silva JMG, Castro-Cunha M, Valente LM, et al. Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein sources. *Food Chemistry*, 2012. **134**(3): p. 1337-1342.
99. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L, Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 2011. **44**(1): p. 217-224.
100. Rodrigues F, Gaspar C, Palmeira-de-Oliveira A, Sarmiento B, Helena Amaral M, Oliveira MBP. Application of Coffee Silverskin in cosmetic formulations: physical/antioxidant stability studies and cytotoxicity effects. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2015: p. 1-8.
101. Vargas PN, Hoelzel SC, Rosa C. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 2008. **19**(1): p. 11-15.
102. Sousa CDM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CD, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 2007. **30**(2): p. 351-355.
103. Oliveira ACD, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA., Bechara EJH, Trevisan MTS. Vegetals as natural sources of antioxidants. *Química Nova*, 2009. **32**(3): p. 689-702.
104. Moon JK, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. **57**(5): p. 1655-1666.
105. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002. **127**(1): p. 183-198.

106. Guimarães R, Barros L, Barreira JC, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira IC. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 2010. **48**(1): p. 99-106.
107. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, 1989. **119**(2): p. 203-210.
108. Talorete TP, Bouaziz M, Sayadi S, Isoda H. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*, 2006. **52**(3): p. 189-198.
109. Clinical Laboratory and Standard Institute, C.L.S.I., Approved Standard M7-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 2003.
110. Clinical Laboratory Standards Institute, C.L.S.I., Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS. 2008.
111. Pedro J. Carta da distribuição de figueira e medronheiro—Notícia Explicativa. Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, Direcção Geral do Ambiente. Lisboa, 1994.
112. Ruiz-Rodríguez BM, Morales P, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata, MC, Cámara M., Díez-Marqués C, et al. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 2011. **44**(5): p. 1244-1253.
113. Santos J, Herrero M, Mendiola JA, Oliva-Teles MT, Ibáñez E, Delerue-Matos C, et al. Fresh-cut aromatic herbs: Nutritional quality stability during shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 2014. **59**(1): p. 101-107.
114. Rodrigues F, Santos J, Pimentel FB, Braga N, Palmeira-de-Oliveira A, Oliveira MB P et al. Promising new applications of *Castanea sativa* shell: nutritional composition, antioxidant activity, amino acids and vitamin E profile. *Food & Function*, 2015. **6**(8): p. 2854-2860.
115. Vinceti B, Eyzaguirre P, Johns T, The nutritional role of forest plant foods for rural communities. *Human health and forests: a global overview of issues, practice and policy*, 2008: p. 63-96.
116. Fang YZ, Yang S, Wu G, Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002. **18**(10): p. 872-879.
117. Kim TS, Decker EA, Lee J, Antioxidant capacities of α -tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 2012. **133**(1): p. 68-75.

118. Nelis H, D'Haese E, Vermis K, Chapter 3: Vitamin E. 2000, New York: Marcel Dekker. p. 143-228.
119. Bramley PM. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000. **80**(7): p. 913-938.
120. Gama P, Casal S, Oliveira B, Ferreira MA. Development of an HPLC/diode-array/fluorimetric detector method for monitoring tocopherols and tocotrienols in edible oils. 2000.
121. Munné-Bosch S, Alegre L, The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002. **21**(1): p. 31-57.
122. Ahmad P, Rasool S. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Volume 1-Biological Techniques*. Vol. 1. 2014: Academic Press.
123. Pinela J, Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 2011. **49**(11): p. 2983-2989.
124. Yoshida Y, Niki E, Noguchi N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2003. **123**(1): p. 63-75.
125. Serbinova E, Kagan V, Han D, Packer L. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991. **10**(5): p. 263-275.
126. Yamada Y, Obayashi M, Ishikawa T, Kiso Y, Ono Y, Yamashita K. Dietary tocotrienol reduces UVB-induced skin damage and sesamin enhances tocotrienol effects in hairless mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2008. **54**(2): p. 117-123.
127. Tamburic S, Abamba G, Ryan J, Moisturizing potential of d- α -tocopherol. *Cosmetics and Toiletries*, 1999. **114**(5): p. 73-82.
128. Gehring, W, Fluhr J, Gloor M. Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. *Arzneimittel-Forschung*, 1998. **48**(7): p. 772-775.
129. Rona C, Vailati F, Berardesca E. The cosmetic treatment of wrinkles. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2004. **3**(1): p. 26-34.
130. Ikeda S, Niwa T, Yamashita K. Selective uptake of dietary tocotrienols into rat skin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2000. **46**(3): p. 141-143.
131. McIntyre BS, Briski KP, Tirmenstein MA, Fariss MW, Gapor A, Sylvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids*, 2000. **35**(2): p. 171-180.

132. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*, 2011. **155**(2): p. 117-130.
133. Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomedical Papers*, 2011. **155**(3): p. 195-218.
134. Thelen JJ, Ohlrogge JB, Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engineering*, 2002. **4**(1): p. 12-21.
135. Boelsma E, Hendriks HF, Roza L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001. **73**(5): p. 853-864.
136. Müller R, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. **59**(6): p. 522-530.
137. Olechnowicz-Stepien WH, Rzadkowska-Dodalska, Grimshaw J. Investigation on lipid fraction compounds of heather flowers (*Calluna vulgaris* L.). *Polish Journal of Chemistry*, 1982. **56**: p. 153-157.
138. Malainey ME, Przybylski R, Sherriff BL. The fatty acid composition of native food plants and animals of western Canada. *Journal of Archaeological Science*, 1999. **26**(1): p. 83-94.
139. Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012. **13**(7): p. 8615-8627.
140. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(5): p. 1801-1812.
141. Cacace J, Mazza G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**(21): p. 5939-5946.
142. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, W., PA; 2008

143. Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Ferreira IC, Santos-Buelga C. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 2012. **50**(5): p. 1576-1582.
144. Costa AS, Alves RC, Vinha AF, Barreira SV, Nunes MA, Cunha M, et al., Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 2014. **53**: p. 350-357.
145. Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, das Neves J, Sarmento B, Amaral MH, Oliveira MBP. Coffee silverskin: a possible valuable cosmetic ingredient. *Pharmaceutical Biology*, 2015. **53**(3): p. 386-394.
146. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999. **299**: p. 152-178.
147. Escarpa A, González M. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **427**(1): p. 119-127.
148. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(10): p. 4290-4302.
149. Deliorman-Orhan D, Şenol S, Kartal M, Orhan I. Assessment of antiradical potential of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and its major flavonoid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009. **89**(5): p. 809-814.
150. Bezerra AS, Nörnberg JL, Lima FO, Rosa MBD, Carvalho LMD. Climatic parameters and variation of phenolic compounds in barley. *Ciência Rural*, 2013. **43**(9): p. 1546-1552.
151. Biglari F, AlKarkhi AF, Easa AM. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 2008. **107**(4): p. 1636-1641.
152. Celli GB, Pereira-Netto AB, Beta T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International*, 2011. **44**(8): p. 2442-2451.
153. Costa ASG, Nunes MA, Almeida IMC, Carvalho MR, Barroso MF, Alves RC et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: a comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 2012. **49**(2): p. 324-328.

154. Niseteo T, Komes D, Belščak-Cvitanović A, Horžić D, Budeč M. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, 2012. **134**(4): p. 1870-1877.
155. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 2007. **104**(2): p. 466-479.
156. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 2013. **138**(4): p. 2099-2107.
157. Shaghghi M, Manzoori JL, Jouyban A, Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 2008. **108**(2): p. 695-701.
158. Wong SP, Leong LP, Koh JHW. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 2006. **99**(4): p. 775-783.
159. Pavlović RD, Lakušić B, Došlov-Kokoruš Z, & Kovačević N. Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009. **64**(10): p. 656-659.
160. Filip GA, Postescu D, Tatomir C, Muresan A, Clichici S. *Calluna vulgaris* extract modulates NF-κB/ERK signaling pathway and matrix metalloproteinase expression in SKH-1 hairless mice skin exposed to ultraviolet B irradiation. *Journal of Physiology Pharmacology*, 2012. **63**(4): p. 423-432.
161. Ghareeb DA, ElAhwany AM, El-mallawany SM, Saif AA. In vitro screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014. **28**(6): p. 1155-1164.
162. Kempf M, Kimble RM, Cuttle L. Cytotoxicity testing of burn wound dressings, ointments and creams: a method using polycarbonate cell culture inserts on a cell culture system. *Burns*, 2011. **37**(6): p. 994-1000.
163. Neamnark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, Rujiravanit R, Supaphol P. In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. *European Polymer Journal*, 2008. **44**(7): p. 2060-2067.
164. Rehders M, Grosshäuser BB, Smarandache A, Sadhukhan A, Mirastschijski U, Kempf J, et al., Effects of lunar and mars dust simulants on HaCaT keratinocytes and CHO-K1 fibroblasts. *Advances in Space Research*, 2011. **47**(7): p. 1200-1213.

165. Zanatta CF, Ugartondo V, Mitjans M, Rocha-Filho PA, Vinardell MP. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. **46**(8): p. 2776-2781.
166. Kong HH. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends in molecular medicine*, 2011. **17**(6): p. 320-328.
167. Scharschmidt TC, Fischbach MA. What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2013. **10**(3): p. e83-e89.
168. Gao Z, Perez-Perez GI, Chen Y, Blaser MJ. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010. **48**(10): p. 3575-3581.
169. Cogen A, Nizet V, Gallo R. Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 2008. **158**(3): p. 442-455.
170. Drews MB, Ludwig AC, Leititis JU, Daschner FD. Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 1995. **30**(1): p. 65-72.
171. Mylotte JM, Graham R, Kahler L, Young L, Goodnough S. Epidemiology of nosocomial infection and resistant organisms in patients admitted for the first time to an acute rehabilitation unit. *Clinical Infectious Diseases*, 2000. **30**(3): p.425-432.
172. Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection*, 2011. **13**(12): p. 963-976.
173. Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998. **60** (1): p. 79–84.
174. Gibbons S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry Reviews*, 2005. **4** (1): p. 63-78.
175. Pavlović D, Lakušić B, Kitić D, Milutinović M, Kostić M, Miladinović B, et al. Antimicrobial activity of selected plant species of Genera *arbutus* L., *Bruckenthalia* rchb., *Calluna salisb.* and *Erica* L.(Ericaceae). *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 2014.**31**(1)p:81-85.

