



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

**Avaliação do potencial biotecnológico da planta halófito funcho-
do-mar (*Crithmum maritimum*): Análise da bioatividade e perfil
nutricional**

Iris Barreto da Silva Correia

2024

**Avaliação do potencial biotecnológico da planta halófito funcho-
do-mar (*Crithmum maritimum*): Análise da bioatividade e perfil
nutricional**

Iris Barreto da Silva Correia

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, da Professora Doutora Marta Maria de Melo Lopes Neves e da Professora Doutora Maria Jorge Geraldes Campos

Título: Avaliação do potencial biotecnológico da planta halófito funcho-do-mar (*Crithmum maritimum*): Análise da bioatividade e perfil nutricional

Copyright © Iris Barreto da Silva Correia

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2024

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos meus pais, que nunca duvidaram de mim, por me terem proporcionado a oportunidade de prosseguir com os meus estudos, por me incentivarem a “voar” e pelo apoio incondicional, mesmo que isso implicasse estarem comigo, no máximo, dois dias por mês nos últimos anos. À minha avó, que todas as vezes que me ligava perguntava como é que ia a tese, o trabalho e quando é que voltava a casa para marcarmos um almoço. A toda a minha família, pela coragem e apoio. E a todos os que estiveram a ver “lá de cima”.

Aos meus amigos do Cetemares, por partilharmos (quase) todos a mesma dor e desespero. Aos amigos que seguiram caminhos diferentes, mas mesmo longe, se interessavam pelo que andava a fazer, ouviram os problemas e apoiaram sempre. Ao Leo, por todas as vezes que me ficou a fazer companhia no laboratório enquanto trocávamos informações sobre a vida alheia e por me ajudar a manter a sanidade mental naqueles dias que pareciam que não tinham fim.

Aos meus pais de Peniche, que em todos os jantares que fazíamos perguntavam como estavam a correr os ensaios e a escrita e sempre me incentivaram a acabar. À minha irmã e colega de casa, Luz, que aturava os meus desabafos sempre que nos cruzávamos em casa ou no Cetemares. Ao meu namorado, que tinha sempre um abraço de conforto para me dar, por ter festejado comigo as minhas vitórias e pelo apoio nos momentos menos bons.

À Madalena, que me acompanhou e ajudou em laboratório, por todos os serões e fins-de-semana no Cetemares, em que não faltaram pausas para o café com fofocas. Mesmo tendo as coisas dela para fazer, era incansável e arranjava sempre um tempinho para me orientar.

Às minhas orientadoras, Doutora Carla Tecelão, Doutora Marta Neves e Doutora Maria Jorge Geraldes Campos, pela oportunidade, pela confiança em mim e no meu trabalho, e por todo o apoio ao longo destes anos.

Um grande obrigada a todos.

Trabalho desenvolvido no âmbito do mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos, na Unidade Curricular de Dissertação, que levou aos seguintes elementos de produção científica:

Comunicações:

- Correia, I., Caracterização físico-química e avaliação do perfil nutricional da planta halófito funcho-do-mar (*Crithmum maritimum*), da zona costeira de Peniche. 1.º Info Day de Ciência Azul, ESTM – Politécnico de Leiria, Portugal, 02 junho de 2022.
- Correia, I., Antunes, M., Tecelão, C., Campos, M. J., Neves, M. An insight into the nutritional profile and antioxidant activity of the sea fennel halophyte plant (*Crithmum maritimum*). Biosystems in Toxicology and Pharmacology – Current challenges, Online meeting, 8–9 september 2022.

Publicações:

- Correia, I., Antunes, M., Tecelão, C., Neves, M., Pires, C. L., Cruz, P. F., Rodrigues, M., Peralta, C. C., Pereira, C. D., Reboredo, F., Moreno, M. J., Brito, R. M. M., Ribeiro, V. S., Vaz, D. C., & Campos, M. J. (2024). Nutritive Value and Bioactivities of a Halophyte Edible Plant: *Crithmum maritimum* L. (Sea Fennel). *Plants*, *13*(3), 427. <https://doi.org/10.3390/plants13030427>

Resumo

As halófitas são plantas tolerantes ao sal, que representam 1% das espécies globais. Apesar de subvalorizadas, têm potencial nutricional e medicinal, e contribuem para a preservação da água doce. *Crithmum maritimum* L. ou funcho-do-mar, é uma planta halófitas perene que possui características suculentas e um forte aroma proveniente dos óleos essenciais, sendo amplamente utilizada nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética.

De forma a avaliar o potencial biotecnológico do funcho-do-mar, foram determinados os teores de humidade, matéria inorgânica, proteína, lípidos e hidratos de carbono, assim como o perfil de ácidos gordos, e o conteúdo em pigmentos, das folhas, flores e frutos desta halófitas. Para a análise do teor de compostos fenólicos e avaliação da bioatividade, prepararam-se extratos de éter de petróleo, acetona, etanol, etanol:água (1:1) e água das várias partes da planta. O teor de fenóis totais e a atividade antioxidante foram determinados pelos métodos do conteúdo fenólico total (TPC), capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder de redução do Fe (III) (FRAP) e capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS). Os extratos foram analisados por cromatografia em camada fina. A atividade antimicrobiana foi também avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória (MIC), concentração mínima bactericida (MBC) e concentração mínima fungicida (MFC).

Relativamente à composição nutricional, as folhas demonstraram maior conteúdo de humidade (88,4% PF) e matéria inorgânica (24,9% PS), as flores apresentaram maior teor de proteína (8,3% PS) e hidratos de carbono (71,7% PS) e os frutos demonstraram maior quantidade de lípidos (6,5% PS). No que diz respeito ao perfil de ácidos gordos, enquanto os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são a classe mais abundante nas folhas e flores, sendo o ácido linoleico (C18:2 n-6) o principal constituinte, nos frutos destacam-se os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), em especial o ácido oleico (C18:1 n-9). Em termos de pigmentos, as folhas possuíram maior concentração de clorofilas (1092,3 µg/g PS) e carotenoides (258,0 µg/g PS), destacando-se a clorofila a (855,8 µg/g PS) como o pigmento mais abundante em todas as partes da planta.

Os extratos de flores, principalmente o etanólico e o hidroetanólico, foram os que revelaram um teor de fenóis totais mais elevado e maior atividade antioxidante. A extração sequencial originou extratos com composições químicas variadas, influenciadas pela polaridade dos solventes, revelando diferenças e semelhanças entre extratos da mesma parte. Foram ainda

identificadas propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) e *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados obtidos confirmam o potencial biotecnológico e contribuem para a caracterização das folhas, flores e frutos da halófito *C. maritimum*, principalmente em relação à sua composição nutricional e bioatividade, destacando a sua aplicação na indústria alimentar, através da adição de nutrientes na gastronomia e possível conservação da frescura de produtos alimentares.

Palavras-Chave: Halófito; *Crithmum maritimum*; Perfil Nutricional; Perfil de Ácidos Gordos; Capacidade Antioxidante; Capacidade Antimicrobiana.

Abstract

Halophytes are salt-tolerant plants that represent 1% of global species. Although undervalued, they have nutritional and medicinal potential, and contribute to the preservation of fresh water. *Crithmum maritimum* L., or sea fennel, is a perennial halophytic plant with succulent characteristics and a strong fragrance due to its essential oils, being widely used in the food, pharmaceutical and cosmetics industries.

In order to assess the biotechnological potential of sea fennel, the moisture, inorganic matter, protein, lipid and carbohydrate contents, as well as the fatty acid profile and pigment content of the leaves, flowers and fruits of this halophyte were determined. To analyze the content of phenolic compounds and assess bioactivity, petroleum ether, acetone, ethanol, ethanol:water (1:1) and water extracts were prepared from the various parts of the plant. The total phenolic content and antioxidant activity were determined using the total phenolic content (TPC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical reducing capacity (DPPH), Fe (III) reducing power (FRAP) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical reducing capacity (ABTS) methods. Extracts were analyzed by thin layer chromatography. The antimicrobial activity was also assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC).

In terms of nutritional composition, the leaves showed a higher content of moisture (88,4% FW) and inorganic matter (24,9% DW), the flowers had a higher protein (8,3% DW) and carbohydrate content (71,7% DW) and the fruit showed a higher amount of lipids (6,5% DW). Regarding the fatty acid profile, while polyunsaturated fatty acids (PUFA) are the most abundant class in the leaves and flowers, with linoleic acid (C18:2 n-6) being the main constituent, monounsaturated fatty acids (MUFA) stand out in the fruits, especially oleic acid (C18:1 n-9). In terms of pigments, the leaves had a higher concentration of chlorophylls (1092,3 µg/g DW) and carotenoids (258,0 µg/g DW), with chlorophyll a being the most abundant pigment (855,8 µg/g DW) in all parts of the plant.

The flower extracts, especially the ethanolic and hydroethanolic extracts, showed the highest total phenolic content and the greatest antioxidant activity. Sequential extraction resulted in extracts with varying chemical compositions, influenced by the polarity of the solvents, revealing differences and similarities between extracts of the same part. Antimicrobial

properties were also identified against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *K. phaffii* (*Pichia pastoris*) and *S. cerevisiae*.

The results obtained confirm the biotechnological potential and contribute to the characterization of the leaves, flowers and fruits of the halophyte *C. maritimum*, mainly in relation to its nutritional composition and bioactivities, highlighting its application in the food industry, through the addition of nutrients in gastronomy and possible freshness preservation of food products.

Keywords: Halophyte; *Crithmum maritimum*; Nutritional Profile; Fatty Acid Profile; Antioxidant Capacity; Antimicrobial Capacity.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1 <i>Crithmum maritimum</i>	4
1.1.1 Propriedades e utilizações.....	7
1.2 Objetivos.....	12
2. Materiais e Métodos.....	13
2.1 Preparação das amostras	13
2.2 Composição nutricional.....	13
2.2.1 Quantificação de humidade.....	13
2.2.2 Quantificação de matéria inorgânica	14
2.2.3 Determinação do conteúdo total de proteína	14
2.2.4 Determinação do conteúdo total de lípidos.....	15
2.2.5 Determinação do conteúdo total de hidratos de carbono	16
2.3 Perfil de ácidos gordos	16
2.4 Quantificação de clorofilas e carotenoides	18
2.5 Obtenção de extratos das folhas, flores e frutos de <i>C. maritimum</i>	19
2.6 Conteúdo fenólico total e avaliação da atividade antioxidante	20
2.6.1 Conteúdo fenólico total (TPC).....	20
2.6.2 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)	20
2.6.3 Poder de redução do Fe (III) (FRAP)	21
2.6.4 Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).....	22

2.7	Análise dos extratos de <i>Crithmum maritimum</i> por cromatografia em camada fina (TLC)	23
2.8	Avaliação da atividade antimicrobiana	24
2.8.1	Concentração mínima inibitória (MIC) do dimetilsulfóxido (DMSO)	24
2.8.2	Screening preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos	25
2.8.3	Concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos	26
2.8.4	Concentração mínima bactericida (MBC) e fungicida (MFC)	27
2.9	Análise estatística	28
3.	Resultados e Discussão	29
3.1	Composição nutricional	29
3.2	Perfil de ácidos gordos	33
3.3	Quantificação de clorofila e carotenoides	40
3.4	Extração sequencial da biomassa	42
3.5	Conteúdo fenólico total (TPC)	44
3.6	Avaliação da atividade antioxidante	46
3.7	Análise por cromatografia em camada fina (TLC)	51
3.8	Avaliação da atividade antimicrobiana	55
3.8.1	Concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos	55
3.8.2	Concentração mínima bactericida (MBC) e fungicida (MFC)	59
3.8.3	Capacidade microbiostática e microbicida	62
4.	Conclusão e Perspetivas futuras	65
5.	Referências bibliográficas	66
6.	Anexos	81

Índice de Figuras

Figura 1.1 - <i>Crithmum maritimum</i> L. A) Folhas; B) Flores; C) Frutos.....	5
Figura 3.1 - Perfis cromatográficos dos extratos de folhas, flores e frutos, obtidos por cromatografia de camada fina. A) Extratos de éter de petróleo, eluídos com hexano:acetato de etilo (7:3 v/v), após revelação; B) Extratos de acetona, eluídos com hexano:acetato de etilo (5:5 v/v), visualizados a 365 nm; C) Extratos etanólicos, eluídos com acetato de etilo (100% v/v), visualizados a 365 nm; D) Extratos de etanol:água (1:1 v/v), eluídos com diclorometano:metanol (1:1 v/v), após revelação; E) Extratos aquosos, eluídos com metanol (100% v/v), após revelação.	53
Figura 3.2 - Perfis cromatográficos dos extratos de éter de petróleo (EP), acetona (Ace), etanol (EtOH), etanol:água (1:1) (EtOH:H ₂ O) e água (H ₂ O), obtidos por cromatografia de camada fina, utilizando acetato de etilo (100% v/v) como eluente, após revelação. A) Extratos de folhas; B) Extratos de flores; C) Extratos de frutos.	54
Figura A6.1 - Representação da preparação das placas de sílica para TLC.....	81
Figura A6.2 - Representação da preparação das microplacas de 96 poços para o ensaio de determinação da MIC dos extratos.....	81

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Lista de bioatividades dos extratos de diferentes partes de <i>Crithmum maritimum</i> L.	8
Tabela 3.1 - Composição nutricional das folhas, flores e frutos do funcho-do-mar, expressa em percentagem de peso fresco (% PF) ou peso seco (% PS). Os dados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de quatro ensaios independentes. Letras diferentes na mesma linha, representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	29
Tabela 3.2 - Perfil de ácidos gordos das folhas, flores e frutos de <i>Crithmum maritimum</i> L, expresso em percentagem de área total (% Total AG) e micrograma por miligrama de peso seco ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes.	34
Tabela 3.3 - Concentração de clorofila e carotenoides das folhas, flores e frutos do funcho marinho, expressa em micrograma por grama de peso seco ($\mu\text{g}/\text{g}$ PS). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes. Para cada pigmento, letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	41
Tabela 3.4 - Rendimento da extração sequencial de folhas, flores e frutos de <i>Crithmum maritimum</i> L com os diferentes solventes, expresso em percentagem (%).	43
Tabela 3.5 - Conteúdo fenólico total (TPC) dos vários extratos (éter de petróleo, acetona, etanol, etanol:água e água) de folhas, flores e frutos de <i>Crithmum maritimum</i> L., expresso em micrograma de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato (μg EAG/mg). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de 3 amostras independentes. Para cada solvente, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias partes da planta. Para cada parte da planta, números diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre extratos obtidos com solventes diferentes	44
Tabela 3.6 - Capacidade de redução do radical DPPH, poder de redução do Fe (III) (FRAP) e capacidade de redução do radical ABTS dos vários extratos (éter de petróleo, acetona, etanol, etanol:água e água) de folhas, flores e frutos de <i>Crithmum maritimum</i> L, expresso em micrograma de equivalentes de Trolox por miligrama de extrato (μg Eq Trolox/mg). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de triplicados de 3 amostras independentes. Para cada solvente, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias partes da planta. Para cada parte da planta, números diferentes representam	

diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre extratos obtidos com solventes diferentes	48
Tabela 3.7 - Concentração mínima inibitória dos extratos (éter de petróleo, acetona e etanol) de folhas, flores e frutos de funcho marinho, expressa em micrograma por mililitro de extrato ($\mu\text{g/mL}$).	56
Tabela 3.8 - Concentração mínima bactericida e concentração mínima fungicida dos extratos (éter de petróleo, acetona e etanol) de folhas, flores e frutos de funcho marinho, expressa em micrograma por mililitro de extrato ($\mu\text{g/mL}$).	60
Tabela 3.9 - Relação entre a concentração mínima bactericida e concentração mínima inibitória e relação entre a concentração mínima fungicida e concentração mínima inibitória dos extratos (éter de petróleo, acetona e etanol) de folhas, flores e frutos de <i>Crithmum maritimum</i> L.....	63

Lista de Abreviaturas

% – Percentagem

Abs – Absorvância

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); $C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2$

AG – Ácidos gordos

AI – Índice aterogénico (Atherogenicity index)

ANOVA – Analysis of variance

ATCC – American Type Culture Collection

C12:0 – Ácido láurico

C14:0 – Ácido mirístico

C15:0 – Ácido pentadecanóico

C15:1 – Ácido ginkgólico

C16:0 – Ácido palmítico

C16:1 – Ácido palmitoleico

C16:3 n-4 – Ácido hexadecatrienóico

C17:0 – Ácido heptadecanóico

C17:1 – Ácido margaroleico

C18:0 – Ácido esteárico

C18:1 n-7 – Ácido vacénico

C18:1 n-9 – Ácido oleico

C18:2 n-6 (LA) – Ácido linoleico

C18:3 n-3 (ALA) – Ácido α -linolénico

C20:0 – Ácido araquídico

C20:5 n-3 (EPA) – Ácido eicosapentaenóico

C22:1 n-9 – Ácido erúcico

C22:6 n-3 (DHA) – Ácido docosahexaenóico

C24:0 – Ácido lignocérico

C24:1 n-9 – Ácido nervónico

DMSO – Dimetilsulfóxido (Dimethyl sulfoxide)

DO – Densidade ótica

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

EAG – Equivalentes de ácido gálico

Eq Trolox – Equivalentes de Trolox

EUA: Estados Unidos da América

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAME – Ésteres metílicos de ácidos gordos (Fatty acid methyl ester)

FID – Detetor de ionização de chama (Flame ionization detector)

FRAP – Poder de redução do ião férrico (Ferric reducing antioxidant power)

g – Grama

g – Força centrífuga relativa

GPY – Glucose-Yeast-Peptone

h/H – Razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ hipercolesterolémicos

H₂ – Hidrogénio

H₃BO₃ – Ácido bórico

HCl – Ácido clorídrico

He – Hélio

K₂S₂O₈ – Persulfato de potássio

kg - Quilograma

L – Litro

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (Low-density lipoprotein)

MBC - Concentração mínima bactericida (Minimum Bactericidal Concentration)

MFC – Concentração mínima fungicida (Minimum Fungicidal Concentration)

mg – Miligrama

MHA – Mueller-Hinton Agar

MHB – Mueller-Hinton Broth

MIC - Concentração mínima inibitória (Minimal Inhibitory Concentration)

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados (Monounsaturated fatty acids)

n-3 – Ácidos gordos ómega-3

n-6 – Ácidos gordos ómega-6

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanómetro

PDA – Potato Dextrose Agar

PF – Peso fresco

PS – Peso seco

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados (Polyunsaturated fatty acids)

RP-18 – C18 Reversed Phase (Fase Reversa C18)

RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute

SFA – Ácidos gordos saturados (Saturated fatty acids)

TI – Índice trombogénico (Thrombogenicity index)

TLC – Cromatografia em camada fina (Thin layer chromatography)

TPC – Conteúdo fenólico total (Total phenolic content)

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina (2,4,6-Tripyridyl-S-triazine)

Trolox – 6-Hidro-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

Trolox – 6-Hidro-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

UFC – Unidades Formadoras de Colónia (Colony forming units)

UV – Ultravioleta

v – Volume

µg – Micrograma

µL – Microlitro

1. Introdução

As mudanças ambientais, principalmente as variações nos padrões climáticos, exercem um impacto substancial nos solos, que se reflete diretamente na biodiversidade, saúde do solo e produtividade agrícola (Khondoker et al., 2023; Litalien & Zeeb, 2020). Um dos efeitos notórios é o aumento da salinização do solo, uma consequência do aumento da temperatura média aliado a precipitação forte e degelo de glaciares, que se está a expandir de forma global. Com cerca de 1.060 milhões de hectares já afetados pelo sal em todo o mundo, esta área continua a crescer em função destas variações (Khondoker et al., 2023). Este aumento, por sua vez, representa uma ameaça para a agricultura e os ecossistemas, já que a maior parte das plantas não consegue tolerar concentrações elevadas de sais nos seus ambientes de crescimento (Litalien & Zeeb, 2020).

No entanto, apesar da maioria das plantas ser glicófitas, ou seja, sensíveis ao stress salino, há um grupo de plantas que consegue prosperar em ambientes com elevada concentração de cloreto de sódio (NaCl) no solo. Essas plantas são reconhecidas como tolerantes ao sal, sendo denominadas halófitas (Meng et al., 2018). Compreendendo cerca de 1% das plantas existentes globalmente (Caparrós et al., 2022), as halófitas desenvolveram mecanismos de adaptação, especialmente processos metabólicos, de forma a garantir a sua sobrevivência e crescimento nestes ambientes hostis. As principais adaptações incluem a acumulação e exclusão seletiva de iões para a regulação osmótica interna, compartimentalização de iões tóxicos para as células no vacúolo, possibilitando a homeostase iónica intracelular, e produção de enzimas antioxidantes e fitohormonas (Balasubramaniam et al., 2023; Sanadhya et al., 2015).

Estas plantas crescem em diversas regiões salinas, desde praias e costas rochosas até pântanos salgados, estuários, lagoas, entre outros (Caparrós et al., 2022; Patel et al., 2019). Em Portugal, crescem ao longo da costa, sendo que algumas variedades já são cultivadas, em áreas afetadas pelo sal, para consumo alimentar (Oliveira-Alves et al., 2023). A sua alta resistência ao sal, permite que completem o seu ciclo de vida em solos com uma concentração de NaCl superior a 200 mM (Lopes et al., 2023; Meng et al., 2018).

Em termos de características morfológicas, algumas halófitas possuem células glandulares para remover o excesso de sal, enquanto outras contêm uma reserva de água interna para reduzir a toxicidade causada pelo mesmo (Aslam et al., 2011), apresentando por

isso folhas ou caules suculentos (Meng et al., 2018). Consoante a necessidade de sal para o seu desenvolvimento, podem ainda ser classificadas como obrigatórias ou facultativas, que crescem tanto em condições salinas, quanto não salinas (Aslam et al., 2011; Lopes et al., 2023).

Atualmente, apesar de representarem um recurso natural abundante, as halófitas são ainda subvalorizadas. Estas plantas têm sido utilizadas pelas suas propriedades nutricionais, como suplemento à dieta alimentar (Lopes et al., 2023), uma vez que apresentam uma composição apropriada para o consumo humano, sendo ricas em minerais, proteínas, fibras e ácidos gordos polinsaturados, e pobres em gordura (Hamed & Custódio, 2019; Oliveira-Alves et al., 2023). Tendo em conta a sua capacidade em reter minerais, estas plantas apresentam uma maior quantidade de cinza em comparação com outras plantas comestíveis (Barreira et al., 2017; Oliveira-Alves et al., 2023). Contudo, os seus níveis elevados de sódio, superiores aos das algas, podem promover hipertensão e doenças cardiovasculares quando incluídas em excesso na alimentação (Barreira et al., 2017). Além disso, o óleo comestível proveniente das sementes de halófitas possui uma qualidade comparável à de óleos comestíveis tradicionais, como o azeite (Nikalje et al., 2019).

Tendo em consideração as condições adversas em que crescem, as halófitas demonstram uma produção eficiente de metabolitos secundários, constituindo um sistema antioxidante que incorpora compostos enzimáticos e não enzimáticos. Esta capacidade desempenha um papel crucial na proteção das estruturas celulares da planta contra os danos do stress oxidativo. O stress oxidativo pode ser induzido pela variação nos fatores abióticos, como a salinidade, seca, temperatura e radiação, entre outros. Esse stress, por sua vez, tem o potencial de desencadear a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), provocando alterações metabólicas (Ksouri et al., 2008). Os antioxidantes surgem como moléculas que interrompem as reações em cadeia dos radicais livres, através da sua capacidade de doar ou captar um eletrão aos mesmos, impedindo-os de danificar moléculas fundamentais. Devido à sua estabilidade, quando reagem com os radicais livres, os antioxidantes conseguem neutralizá-los, diminuindo o seu potencial para causar danos oxidativos (Lobo et al., 2010). Atualmente, as restrições impostas aos antioxidantes sintéticos disponíveis no mercado devido ao seu possível efeito carcinogénico, levaram a um aumento do interesse em antioxidantes derivados de fontes naturais (Houta et al., 2011). Alguns dos compostos com atividade antioxidante presentes nas plantas halófitas são os compostos fenólicos,

carotenoides e vitaminas (Ksouri et al., 2008). A avaliação da atividade antioxidante por um único método não abrange a atividade total, sendo aconselhável utilizar métodos que tenham por base diferentes mecanismos de reação (Mekinić et al., 2016), como é o caso do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazi), FRAP (poder de redução do ião férrico) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

As halófitas são ricas em compostos bioativos com capacidade antimicrobiana, constituindo uma fonte promissora e alternativa de compostos antibacterianos com potencial interesse para a indústria farmacêutica (Ferreira et al., 2022). Com efeito, ao longo dos anos, o crescente uso de antibióticos de forma inadequada tem originado o desenvolvimento de resistência antimicrobiana a uma ampla variedade de medicamentos. Esta resistência continua a evoluir, seja através de mutações cromossômicas ou pela incorporação de genes de resistência (Salam et al., 2023). *Escherichia coli* e *S. aureus* são microrganismos patogênicos de origem alimentar (Campana et al., 2022). *E. coli* é uma bactéria gram-negativa da microbiota intestinal, que causa diarreia e infecções do trato urinário (Pokharel et al., 2023). *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva presente na microflora da pele e no nariz, sendo responsável pelo desenvolvimento de abscessos e em casos mais graves pode causar bacteremia, endocardite e osteomielite (Todd, 2014). *S. epidermidis* é também uma bactéria gram-positiva da pele, que devido à sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, principalmente cateteres, favorece o desenvolvimento de infecções nosocomiais (Carcione et al., 2022). O mesmo tipo de contaminação ocorre com *Klebsiella pneumoniae*, outra bactéria gram-negativa do microbioma gastrointestinal, resultando normalmente em infecções do trato respiratório ou urinário (Gille et al., 2022). As espécies do género *Candida* são fungos comensais da cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina, sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* exemplos das principais estirpes responsáveis por mais de 90% das infecções fúngicas invasivas (Sardi et al., 2013). *C. albicans* é o fungo patogênico desencadeador da maior parte das infecções sistêmicas e a principal causa de candidíase, cuja patogenicidade está associada maioritariamente à formação de biofilmes (Talapko et al., 2021). *C. parapsilosis*, a segunda espécie de *Candida* mais frequentemente identificada na Europa, constitui uma ameaça significativa, especialmente para recém-nascidos prematuros e indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos (Branco et al., 2023). *K. phaffii*, anteriormente designada como *Pichia pastoris*, é uma levedura reconhecida como segura, frequentemente utilizada como vetor de expressão para a produção de proteínas

recombinantes (Mastropietro et al., 2021). *S. cerevisiae*, uma levedura crucial na indústria alimentar, tem sido relacionada ao aumento de infecções, como pneumonia e peritonite, em pessoas em condições graves de saúde e saudáveis (Raghavan et al., 2019). O aumento global de bactérias resistentes aos antimicrobianos atingiu níveis alarmantes, representando uma séria ameaça à saúde pública em todo o mundo. Nesse sentido, torna-se essencial explorar alternativas promissoras aos antibióticos, procurando recursos naturais (Salam et al., 2023), como é o caso das halófitas.

As halófitas estão incluídas em diversas famílias, entre elas a Apiaceae (Stanković & Jakovljević, 2021). A família Apiaceae (anteriormente denominada Umbelliferae), uma das mais estudadas entre as angiospérmicas, engloba uma impressionante diversidade botânica, compreendendo aproximadamente 3780 espécies distribuídas em 434 géneros (Thiviya et al., 2021; Z. Xu & Chang, 2017). Algumas das plantas mais conhecidas são a cenoura, o aipo e a salsa. Esta família é das maiores do mundo e está presente em todo o planeta, desde regiões temperadas até aos trópicos (Amiri & Joharchi, 2016; Machado et al., 2023). Caracterizada por plantas herbáceas aromáticas, a maioria das Apiaceae apresenta folhas alternadas, caules ocos, flores pequenas e frutos indeiscentes (Sayed-Ahmad et al., 2017; Z. Xu & Chang, 2017). O seu baixo teor calórico e conteúdo em óleo, proteínas e fibras faz com que algumas espécies sejam consideradas excelentes suplementos dietéticos (Sayed-Ahmad et al., 2017). Estas plantas têm sido tradicionalmente utilizadas na alimentação, medicina e em diversas indústrias, destacando-se nas áreas alimentar, farmacêutica e cosmética. O seu potencial farmacológico tem sido destacado, evidenciando várias propriedades, como antitumoral, anti-obesidade e anti-inflamatória (Thiviya et al., 2021). A presença de metabolitos secundários, desde terpenóides, flavonoides, cumarinas e poliacetilenos, entre outros, destaca esta família como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos fármacos (Sayed-Ahmad et al., 2017). Dentro da família Apiaceae, *Crithmum maritimum* faz parte das halófitas mais estudadas (Stanković & Jakovljević, 2021).

1.1 *Crithmum maritimum*

Crithmum maritimum Linnaeus, uma planta halófito pertencente à família Apiaceae, destaca-se como a única espécie do género *Crithmum* (Politeo et al., 2023). Popularmente conhecida como funcho-do-mar, funcho marinho ou safira das rochas (Martins-Noguerol et al., 2023), esta planta adquiriu o seu nome científico derivado do termo grego “Krithe”, que

significa cevada. Esta denominação é referente à semente, possivelmente devido à semelhança entre os frutos e os grãos de cevada. Já o termo *maritimum* é alusivo à região onde cresce, perto do mar (Kraouia et al., 2023). Abrangendo uma vasta extensão geográfica, é possível encontrá-la nas costas Atlântica Europeia, Mediterrânea e do mar Negro, bem como nas ilhas dos Açores, Madeira e Canárias, noroeste de África e oeste da Ásia, prosperando em ambientes distintos como zonas rochosas, cais e praias arenosas (Atia et al., 2011; Pateira et al., 1999). A sua presença nestes locais específicos é fortemente influenciada pela maresia característica destas regiões costeiras. Assim, *C. maritimum* demonstra uma afinidade particular por áreas sujeitas à ação direta do oceano, destacando-se como uma espécie que floresce sob as condições desafiadoras e muitas vezes adversas destes ambientes costeiros. Esta espécie é considerada uma halófita facultativa, ou seja, tolerante ao sal, sendo capaz de preservar a hidratação dos tecidos e prevenir o stress oxidativo (Martins-Noguerol et al., 2023; Renna, 2018). Curiosamente, as sementes requerem um ambiente com baixas concentrações de NaCl para germinar (Hamed et al., 2004).

O *C. maritimum* (Figura 1.1) é uma planta espermatófita perene (Pedreiro et al., 2023), que possui uma ramificação abundante, folhas carnudas e suculentas, e caules lenhosos na base, atingindo uma altura de 30 a 60 cm (Atia et al., 2011; Knees, 2003). A raiz desta planta é caracterizada pela sua robustez, espessura e natureza nodosa (Atia et al., 2011). A fase de floração desta espécie ocorre entre junho e setembro, exibindo flores branco-esverdeadas ou amarelas e o amadurecimento dos frutos ocorre entre novembro e dezembro, adquirindo estes uma tonalidade roxa (Atia et al., 2011; Knees, 2003; Nguir et al., 2011).

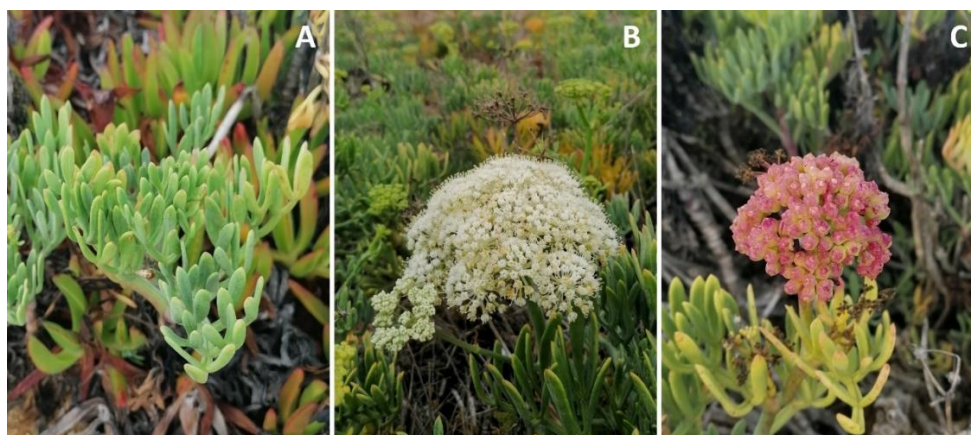


Figura 1.1 - *Crithmum maritimum* L. A) Folhas; B) Flores; C) Frutos.

Todas as partes da planta mencionadas, desde a raiz até os frutos, possuem um aroma forte (Marongiu et al., 2007), identificado com uma fragrância distinta a aipo, funcho e casca de citrinos verdes e é resultado dos óleos essenciais presentes na planta. Além disso, é uma planta comestível que apresenta um sabor ligeiramente salgado (Giungato et al., 2019; Politeo et al., 2023).

Esta halófita tem sido extensivamente utilizada em diversas áreas, principalmente alimentar, farmacêutica e cosmética, devido à sua abundância em compostos bioativos (Atia et al., 2011; Buhmann & Papenbrock, 2013; Martins-Noguerol et al., 2023; Pereira et al., 2017). Dentro dos componentes predominantes desta planta, destacam-se os óleos essenciais, compostos lipídicos, antioxidantes (vitamina C ou ácido ascórbico e carotenoides), compostos fenólicos, minerais, entre diversas outras substâncias (Atia et al., 2011; Pateira et al., 1999; Pereira et al., 2017; Renna, 2018).

Mesmo com a presença de uma diversidade significativa de compostos em concentrações consideráveis, vários estudos indicam que a composição do perfil químico pode ser variável conforme o local de origem, o órgão e o estado de desenvolvimento da planta, as condições de crescimento, época do ano, salinidade, propriedades físico-químicas do solo e ainda consoante o método de extração usado (Buhmann & Papenbrock, 2013; Martins-Noguerol et al., 2023; Pateira et al., 1999; Renna, 2018).

Os óleos essenciais extraídos de diversas partes da planta desempenham um papel significativo em várias indústrias, dado o abundante conjunto de compostos voláteis que caracterizam esta espécie. Entre esses compostos destacam-se os hidrocarbonetos monoterpênicos, como o γ -terpineno, limoneno, sabineno e β -felandreno (Pavela et al., 2017; Pedreiro et al., 2023; Polatoğlu et al., 2016; Politeo et al., 2023), monoterpênicos oxigenados, como o éter metílico de timol (Marongiu et al., 2007; Pavela et al., 2017) e fenilpropanóides, como o dilapiol e miristicina (Marongiu et al., 2007; Mustapha et al., 2020; Pavela et al., 2017).

No entanto, a composição química desses óleos pode variar sazonalmente e de acordo com a região geográfica de cultivo (Marongiu et al., 2007; Mekinić et al., 2016; Ngwir et al., 2011). O estudo realizado por Pateira et al. (1999) demonstrou a existência de dois possíveis quimiotipos de *C. maritimum* em Portugal. Os principais constituintes do óleo essencial (dilapiol, sabineno, γ -terpineno e éter metílico de timol) foram consistentes em ambos os

quimiotipos, sendo que a variação mais significativa foi observada no dilapiol, que variou de 15 a 47% num quimiotipo, enquanto no outro essa variação foi de 0 a 6%, evidenciando uma diferença substancial na contribuição relativa para a composição geral do óleo essencial.

Os compostos fenólicos presentes nos extratos de *C. maritimum* são majoritariamente ácidos fenólicos, destacando-se por conter a concentração mais elevada de ácido clorogénico, em comparação com outras plantas da família Apiaceae (Meot-Duros & Magné, 2009). Diversos estudos comprovam a predominância do ácido clorogénico como o composto fenólico principal nos extratos de funcho marinho (Alemán et al., 2019; Meot-Duros & Magné, 2009; Nabet et al., 2017; Pereira et al., 2017; Souid et al., 2020, 2021). Este ácido fenólico é especialmente abundante nas folhas da planta, com uma maior acumulação durante a fase de crescimento e floração (Meot-Duros & Magné, 2009). Além de ácidos fenólicos, alguns estudos também mencionam a presença, embora com menor frequência, de outros flavonoides, como a rutina, epicatequina e epigallocatequina, e fenóis simples nos extratos da planta (Jallali et al., 2012; Martins-Noguerol et al., 2022; Pereira et al., 2017).

1.1.1 Propriedades e utilizações

A relevância desta planta em diversas indústrias é fundamentada por uma série de estudos que avaliam os mecanismos biológicos associados ao seu uso. Nesse sentido, pesquisas científicas têm destacado atividades interessantes em extratos desta espécie, incluindo propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas, entre outras (Tabela 1.1).

A capacidade antioxidante de *C. maritimum* tem sido associada aos compostos fenólicos presentes nos seus extratos. Estes compostos são reconhecidos pela sua eficácia na eliminação de radicais livres e na promoção da saúde humana através da prevenção do stress oxidativo (Martins-Noguerol et al., 2022). Dentro desses compostos, o ácido clorogénico destaca-se como um antioxidante robusto, associado à habilidade de neutralizar radicais livres (Souid et al., 2021). A presença de outros metabolitos secundários, como terpenóides e vitamina C, também pode contribuir significativamente para essa atividade antioxidante (Jallali et al., 2014). Por outro lado, estudos com óleos essenciais desta planta indicam uma atividade bastante reduzida, atribuída não só à ausência de compostos fenólicos, como também à fraca capacidade dos hidrocarbonetos monoterpénicos para eliminar radicais livres (Mekinić et al., 2016).

Tabela 1.1 - Lista de bioatividades dos extratos de diferentes partes de *Crithmum maritimum* L.

Parte da planta	Local de colheita	Extrato	Bioatividade	Referência
Todos os órgãos da parte aérea	Bari (Itália) Korbous, Kelibia e Monastir (Tunísia) Dalmácia (Croácia) Bretanha (França) Tighzert (Argélia) Figueira da Foz e Peniche (Portugal)	Infusão Decocção Metanólicos Metanol/Água Etanol/Água Acetona/Água Acetato de etilo	Antioxidante Antibacteriana Antitumoral Vasodilatadora Inibitória das enzimas Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase	Gnocchi et al., 2020; Jallali et al., 2012, 2014; Mekinić et al., 2016; Meot-Duros & Magné, 2009; Nabet et al., 2017; Pedreiro et al., 2023; Sousa et al., 2022
Folhas	Cultivada em Medenine (Tunísia) Bretanha, França Faro, Portugal	Etanol/Água Metanol/Água Infusão Decocção Metanólicos Clorofórmio	Antioxidante Antibacteriana Antifúngica Hepatoprotetora	Houta et al., 2011; Meot-Duros et al., 2008; Pereira et al., 2017; Souid et al., 2020, 2021
Folhas e caules	Fornecida por Porto-Muiños S.L. (Espanha) Cultivada em Kilkis (Grécia)	Metanol/Água Etanol/Água Aquosos	Antioxidante	Alemán et al., 2019; Kadoglidou et al., 2022
Caules	Cultivada em Medenine (Tunísia) Faro, Portugal	Infusão Decocção Metanólicos	Antioxidante Antifúngica	Houta et al., 2011; Pereira et al., 2017
Flores	Cultivada em Medenine (Tunísia) Faro, Portugal	Infusão Decocção Metanólicos	Antioxidante Antifúngica	Houta et al., 2011; Pereira et al., 2017
Sementes	Cultivada em Medenine (Tunísia) Cultivada em Aberdeen (Escócia)	Metanólicos n-hexano, diclorometano e metanol	Antioxidante Antibacteriana Antifúngica	Houta et al., 2011; Kumarasamy et al., 2002

A aplicação de *C. maritimum* na área alimentar remonta a tempos antigos, sendo uma prática com uma longa tradição. Antigamente, os marinheiros consumiam folhas frescas de funcho-do-mar de modo a prevenir o escorbuto (Atia et al., 2011). Hoje em dia, devido às características sensoriais que lhe são conferidas pela grande quantidade de óleo essencial que possui, é muito utilizada na culinária como alimento fresco (Renna et al., 2017). As folhas

frescas são adequadas na preparação de saladas, sopas e molhos, podendo também ser preservadas em vinagre, assemelhando-se a um tipo de conserva (Pereira et al., 2020). Enquanto que nas ilhas britânicas se destaca a tradição do "Picado de funcho-do-mar", uma receita clássica que combina caules e folhas de *C. maritimum* juntamente com pepino e alcaparras em vinagre (Renna, 2018), em Itália, são encontrados registros históricos que indicam o uso da decocção desta planta para tratar condições como cistites, prostatites e cólicas, sendo a infusão reconhecida pelo seu papel no alívio de distúrbios do sistema digestivo (Atia et al., 2011). Além disso, esta halófita destaca-se como um excelente suplemento alimentar, indicada para o tratamento da obesidade, uma vez que apresenta elevadas concentrações de compostos bioativos como ácidos gordos ómega-3 e ómega-6, carotenoides e ácidos fenólicos (Mekinić et al., 2016).

Estudos recentes (Maoloni et al., 2022a; Maoloni et al., 2022b) revelaram que as propriedades bioativas do funcho marinho foram transferidas com êxito para molhos verdes e probióticos não lácteos elaborados à base de frutos desta planta. É ainda referido que a eficácia antimicrobiana dos seus óleos essenciais foi melhorada quando incorporados em microemulsões, proporcionando assim uma valiosa aplicação como conservante natural para melhorar a estabilidade de armazenamento de produtos alimentares, conforme destacado por Campana et al. (2022).

A área alimentar tem testemunhado o desenvolvimento de um mercado abrangente de plantas aromáticas desidratadas. Estas plantas não só têm a capacidade de atuar como ingredientes individuais, como também são essenciais na criação de misturas de especiarias e temperos (Renna et al., 2017). Nessa perspetiva, a natureza aromática do funcho-do-mar e o facto de ser uma planta comestível indicam que pode ser usado na sua forma fresca e após ser seco (Renna, 2018).

Nesse contexto, no estudo de Renna & Gonnella (2012), os autores aplicaram diferentes técnicas de secagem (liofilização e secagem a quente) com o propósito de desenvolver um novo corante e especiaria a partir das folhas frescas. Os dois produtos obtidos apresentaram características visuais e organolépticas distintas, sendo importante a consideração de ambas quando aplicados em confeções alimentares, porém não foi analisado o impacto da desidratação na composição desta planta (Renna & Gonnella, 2012), destacando a necessidade de compreender como as suas propriedades se modificam após os processos. Além disso, Sousa et al. (2022) demonstraram que a adição de *C. maritimum*

liofilizado ao óleo de girassol permitiu, não só aumentar o seu valor nutricional, como também a estabilidade oxidativa do mesmo.

Na cosmética, *C. maritimum* destaca-se essencialmente devido ao aroma associado aos compostos voláteis presentes nos seus óleos essenciais, assim como por vários outros componentes (Nguir et al., 2011). Os óleos essenciais têm desempenhado um papel importante na formulação de cosméticos antienvhecimento e antirrugas (Grigoriadou & Maloupa, 2008; Nguir et al., 2011), estendendo-se ainda para a indústria de perfumes (Marongiu et al., 2007).

Segundo Kim et al. (2008), o extrato de funcho marinho contém compostos bioativos, nomeadamente minerais, óleos essenciais, polifenóis, flavonoides e vitamina C, que protegem a pele através da estimulação da produção de proteínas nos tecidos cognitivos, promovendo assim a melhoria do tónus e elasticidade da mesma. Para além das suas bioatividades, tendo em consideração a capacidade antioxidante, antibacteriana e antifúngica dos extratos (polares e apolares), ao serem incorporados em cosméticos, também contribuem para a preservação dos mesmos (Meot-Duros et al., 2008).

Na indústria farmacêutica, é utilizada no tratamento de uma variedade de patologias associadas aos sistemas gastrointestinal, urinário, genital e respiratório, sendo normalmente consumida através da infusão dos seus frutos, decocção das folhas ou do sumo extraído das mesmas (Renna, 2018). No passado, esta planta era muito usada na medicina popular devido aos seus efeitos estimulantes, diuréticos e como vermífugo. A elevada concentração de ácidos gordos presentes nos óleos extraídos das folhas, essencialmente ómega-3 e ómega-6, faz com que o seu consumo seja vantajoso para prevenir doenças cardíacas coronárias (Atia et al., 2011).

De acordo com Nguir et al. (2011), os óleos essenciais das partes aéreas e raízes de *C. maritimum* apresentam atividade moderada de inibição da acetilcolinesterase (AChE), sendo que o primeiro, rico em γ -terpineno, foi mais ativo. Ainda assim, Polatoğlu et al. (2016) referem uma inibição considerável das enzimas AChE e butirilcolinesterase (BChE) pelo óleo essencial extraído das folhas desta planta. Apesar deste óleo ser dominado por γ -terpineno e β -felandreno, os autores sugerem que a atividade observada não é atribuída apenas a esses compostos, uma vez que quando isolados, demonstraram ter um efeito inibitório fraco, indicando que a eficácia resulta da interação entre todos os componentes

presentes. É também importante mencionar que essa inibição da AChE, embora significativa, foi inferior à registada por Mekinić et al. (2016) em óleos essenciais extraídos da parte aérea, composta por flores, caules e folhas.

Relativamente aos extratos de *C. maritimum*, Meot-Duros et al. (2008) comprovaram que o extrato apolar das folhas desta planta é mais eficaz em comparação com o polar. Este extrato apolar, obtido através da extração com clorofórmio, é ativo contra *Salmonella arizonae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas marginalis*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *C. albicans*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. A inibição do crescimento destes dois últimos microrganismos parece estar associada à presença do falcarindiol, que exibiu a mesma atividade que o extrato do qual foi isolado (Meot-Duros et al., 2010). Enquanto este poliacetileno demonstra citotoxicidade contra células epiteliais intestinais de rato (Meot-Duros et al., 2010), o extrato de acetato de etilo desta espécie revela efeito antitumoral no hepatocarcinoma (Gnocchi et al., 2020). Por outro lado, o extrato etanólico das partes aéreas exibiu uma forte atividade vasodilatadora (Mekinić et al., 2016).

A nível agrícola, são também associadas a esta espécie propriedades biológicas que a caracterizam como repelente e inseticida. De acordo com Mustapha et al. (2020), o óleo essencial demonstrou ser eficaz contra *Tribolium castaneum*, provavelmente devido à sua concentração de fenilpropanóides, principalmente de dilapiol. Resultados idênticos foram observados por Tsoukatou et al. (2001) contra formigas *Pheidole pallidula*, sendo a atividade atribuída ao mesmo composto. Já no estudo realizado por Pavela et al. (2017), em que foram avaliados óleos essenciais de *C. maritimum* provenientes de diferentes regiões, a maior atividade larvicida contra *Culex quinquefasciatus* e *Spodoptera littoralis* foi associada não só à presença de dilapiol, mas também de miristicina e, em menor concentração, de γ -terpineno. Por outro lado, um óleo essencial mais concentrado neste hidrocarboneto monoterpénico e β -felandreno, parece ser responsável pelo efeito letal sobre *Sitophilus oryzae* e *Oryzaephilus surinamensis* (Polatoğlu et al., 2016). Além disso, esta espécie é ainda reconhecida como uma cultura emergente de grande valor para práticas agrícolas sustentáveis em regiões com condições climáticas desafiadoras, devido à sua capacidade de se ajustar a diferentes fatores de stress abiótico, como a salinização do solo (Kraouia et al., 2023; Martins-Noguerol et al., 2023).

1.2 Objetivos

Considerando a disponibilidade da halófita *Crithmum maritimum* ao longo da costa portuguesa, o objetivo deste trabalho foi explorar o seu potencial biotecnológico através da avaliação da composição nutricional e bioatividade das diferentes partes da planta, nomeadamente das suas folhas, flores e frutos, colhidos na zona oeste de Portugal. Nesse sentido, realizou-se a:

1. Caracterização do perfil nutricional em termos de humidade, matéria inorgânica, proteína total, lípidos totais e hidratos de carbono;
2. Determinação do perfil de ácidos gordos;
3. Quantificação de pigmentos (clorofila a, clorofila b e carotenoides totais);
4. Obtenção de extratos de éter de petróleo, acetona, etanol, etanol:água e de água das diferentes partes aéreas da planta e respetiva caracterização do perfil cromatográfico por TLC;
5. Avaliação das capacidades antioxidante e antimicrobiana dos seus extratos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Preparação das amostras

A recolha das amostras de funcho-do-mar foi realizada dia 1 de setembro de 2021 na área costeira de Peniche, 39°21'52.34"N - 9°24'15.257"W, Leiria, Portugal.

As amostras seguiram para laboratório no edifício Cetemares, onde foi efetuada a triagem em folhas, flores e frutos. De seguida, as três partes da planta foram lavadas com água destilada para remoção de pó, organismos epífitos, insetos presentes e outros materiais não desejados. Após a lavagem, parte da biomassa foi seca com papel absorvente para remover o excesso de água e a restante foi congelada (DW-86L728J, Haier Biomedical) a -80 °C para liofilização (LyoQuest-85, Telstar). Posteriormente, a biomassa liofilizada foi moída em pó com o auxílio de uma picadora e armazenada em sacos plásticos estanques, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

2.2 Composição nutricional

2.2.1 Quantificação de humidade

A humidade foi determinada de acordo com o método 930.04 da AOAC (2016) com algumas modificações. Os cadinhos de vitrosil foram identificados com grafite e colocados na mufla (B170, Nabertherm, Alemanha) a 500 °C, durante a noite, para remover alguns vestígios de gordura e água eventualmente presentes, de modo a não interferirem com a sua massa. De seguida, os cadinhos foram colocados a arrefecer no exsiccador, até à temperatura ambiente, e registaram-se as suas massas. Posteriormente, foram pesadas 5 g de amostra fresca para cada cadinho e colocaram-se os mesmos em estufa (FD115, Binder, Alemanha) a 105 °C, durante 24 h. De seguida, os cadinhos foram pesados periodicamente, depois de arrefecimento em exsiccador até temperatura ambiente, até que a sua massa fosse constante. Todo o processo foi realizado em quadruplicado. Os resultados foram expressos em percentagem de peso fresco (PF), de acordo com a equação 1:

$$\text{Humidade (\% PF)} = 100 - \left(\frac{m_{ce} - m_c}{m_a} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: m_{ce} – massa do cadinho com a amostra após secagem na estufa; m_c – massa do cadinho; m_a – massa inicial da amostra.

2.2.2 Quantificação de matéria inorgânica

A quantificação da matéria inorgânica foi realizada de acordo com o método 930.05 da AOAC (2016) com algumas modificações. Após o arrefecimento e pesagem dos cadinhos com a amostra seca, estes foram colocados na mufla, programada para uma rampa de aquecimento durante 4 h, seguida de um patamar com duração de 10 h a 500 °C. Posteriormente, colocaram-se os cadinhos a arrefecer no exsiccador, até à temperatura ambiente, e foram registadas as suas massas com as cinzas. Todo o processo foi realizado em quadruplicado. Os resultados foram expressos em percentagem de peso seco (PS), de acordo com a equação 2:

$$\text{Cinza (\% PS)} = \frac{(m_{cm} - m_c)}{(m_{ce} - m_c)} \times 100 \quad (2)$$

Em que: m_{cm} – massa do cadinho com a amostra após secagem na mufla; m_c – massa do cadinho; m_{ce} – massa do cadinho com a amostra após secagem na estufa.

2.2.3 Determinação do conteúdo total de proteína

Previamente à determinação do conteúdo total de proteína, foi feita a padronização da solução de HCl. Resumidamente, pesaram-se 0,2500 g de carbonato de sódio anidro (Labkem, Barcelona, Espanha), previamente seco em estufa (UF110, Memmert, Alemanha) a 200 °C durante 1 h, dissolveu-se em água destilada, e transferiu-se para um balão volumétrico (de 100 mL), perfazendo-se o volume com água destilada. A 20 mL desta solução, adicionaram-se 3 gotas de vermelho de metilo e a mistura foi titulada com uma solução de HCl 0,1 mol/L (Fluka, Seelze, Alemanha) a padronizar, registando-se o volume gasto. A titulação foi realizada em triplicado. A concentração da solução de HCl foi calculada com base na equação 3:

$$[\text{HCl}] = \frac{[\text{Na}_2\text{CO}_3] \times V_{\text{titulado}} \times 2}{V_{\text{HCl}}} \quad (3)$$

Em que: $[\text{HCl}]$ – concentração da solução de HCl (mol/L); $[\text{Na}_2\text{CO}_3]$ – concentração da solução de carbonato de sódio (mol/L); V_{titulado} – volume da solução de Na_2CO_3 titulado (mL); V_{HCl} – volume da solução de HCl gasto na titulação (mL).

O conteúdo total de proteína das folhas, flores e frutos de *C. maritimum* foi avaliado a partir da quantificação de azoto total, calculado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2016) com algumas modificações, tendo em conta um fator de conversão de 6,25. Em suma, as amostras liofilizadas (0,750 g) foram submetidas a digestão no digestor (Tecator Digestor, Foss, Suíça) com uma pastilha catalisadora *KjelTabs* (VWR, Pensilvânia, EUA) e 25 mL de H₂SO₄ a 97%, a 220 °C durante 30 minutos e depois a 400 °C durante 90 minutos. O branco foi preparado nas mesmas condições, sem adição de amostra. Após o arrefecimento, adicionaram-se 70 mL de água destilada para posterior destilação com 100 mL de solução de NaOH a 40% (Labkem, Barcelona, Espanha) no destilador (2100 Kjeltec Distillation Unit, Foss, Suíça) durante 6 minutos. A solução destilada foi recolhida em 30 mL de solução de H₃BO₃ (Fluka, Seelze, Alemanha) a 4% (m/v em água destilada), contendo como indicadores de pH o vermelho de metilo (7 mL/L de solução 0,1% m/v em etanol) e o verde de bromocresol (10 mL/L de solução 0,1% m/v em etanol). A mistura foi posteriormente titulada com a solução de HCl previamente padronizada, até mudança de cor (de verde para cinzento), registando-se o volume de titulante usado. Todo o processo foi realizado em quadruplicado. O conteúdo total de proteína foi expresso em percentagem de peso seco (PS), de acordo com a equação 4:

$$\text{Proteína total (\% PS)} = \frac{(\text{HCl a} - \text{HCl b}) \times \text{FC} \times 0,014 \times [\text{HCl}]}{\text{ma}} \times 100 \quad (4)$$

Em que: HCl a – volume da solução de HCl usado na titulação da amostra (mL); HCl b – volume da solução de HCl usado na titulação do branco (mL); FC – fator de conversão (6,25); [HCl] – concentração da solução de HCl (M); ma – massa de amostra liofilizada (g).

2.2.4 Determinação do conteúdo total de lípidos

O conteúdo total de lípidos foi determinado segundo o método de Folch et al. (1957) com algumas modificações. As amostras liofilizadas de *C. maritimum* (1 g) foram pesadas rigorosamente para tubos de Falcon, aos quais se adicionaram 1 mL de água destilada e 10 mL de reagente de Folch (metanol:clorofórmio, 1:2) (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha). As misturas foram levadas ao *vortex* durante 5 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 1,2 mL de solução de NaCl 0,8% (Fluka, Seelze, Alemanha) a cada amostra, e repetiu-se a homogeneização no *vortex* durante 2 minutos. A seguir, procedeu-se à centrifugação (5810R, Eppendorf, Alemanha) das amostras, a 4959 g durante 10 minutos para a separação das fases. A fase orgânica inferior, contendo os lípidos da amostra dissolvidos em

clorofórmio, foi recolhida e filtrada através de uma coluna de sulfato de sódio anidro (LabChem, Loures, Portugal) para um balão de fundo redondo (25 mL) previamente pesado. Repetiu-se o processo de extração das amostras, por adição de 2 mL de clorofórmio ao conteúdo dos tubos de Falcon, seguida de homogeneização em *vortex* durante 2 minutos e centrifugação nas condições referidas anteriormente, de modo a recuperar toda a fração lipídica. Após recolha da fase inferior para o respetivo balão de fundo redondo, fez-se a remoção do solvente em evaporador rotativo (Laborota 4000, Heidolph, Alemanha). O extrato lipídico que ficou nos balões foi seco em estufa (UF450, Memmert, Alemanha) a 60 °C, durante a noite e a seguir foi arrefecido em exsiccador e pesado (até valor constante). Todo o processo foi realizado em quadruplicado. O conteúdo total de lípidos foi expresso em percentagem de peso seco (PS) de acordo com a equação 5:

$$\text{Lípidos totais (\% PS)} = \frac{(\text{mbg}-\text{mb})}{\text{ma}} \times 100 \quad (5)$$

Em que: mbg - massa do balão de fundo redondo com gordura (g); mb - massa do balão de fundo redondo (g); ma - massa da amostra liofilizada (g).

2.2.5 Determinação do conteúdo total de hidratos de carbono

O conteúdo total de hidratos de carbono foi calculado por diferença, considerando os valores de proteína total, lípidos totais e matéria inorgânica (cinza). Os resultados foram expressos em percentagem de peso seco (PS), segundo a equação 6:

$$\text{Hidratos de carbono totais (\% PS)} = 100 - \text{PT} - \text{LT} - \text{MI} \quad (6)$$

Em que: PT – proteína total (%); LT – lípidos totais (%); MI – matéria inorgânica (%).

2.3 Perfil de ácidos gordos

De modo a determinar o perfil de ácidos gordos das diferentes partes da planta, fez-se a transmetilação direta das amostras liofilizadas, sob catálise ácida, conforme o descrito por Fernández et al. (2015), com algumas modificações, e analisaram-se os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) por cromatografia gasosa.

Em tubos de ensaio com tampa de rosca, colocaram-se 50 mg de amostra liofilizada, aos quais se adicionaram 2 mL de H₂SO₄ (2% v/v em metanol) (Emsure, Darmstadt,

Alemanha). A mistura foi colocada em banho-maria (6000386, JP Selecta, Espanha) a 80 °C durante 2 horas. Após o arrefecimento das amostras ao abrigo da luz, foram adicionados a cada tubo 1 mL de água ultrapura (Milli-Q, Darmestádio, Alemanha) e 2 mL de *n*-hexano. De seguida, as amostras foram homogeneizadas em *vortex* durante 1 minuto e centrifugadas a 275 g por 5 minutos para separação de fases. A seguir, transferiram-se 475 µL da fase superior de cada amostra, contendo os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) em hexano, para um *vial* de cromatografia gasosa e adicionaram-se 25 µL de solução de padrão interno (FAME C17:0 a 500 µg/mL em hexano). Por fim, analisou-se o perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa.

As análises foram efetuadas injetando 1 µL de amostra no cromatógrafo gasoso (Finnigan-trace GC Ultra, Thermo Scientific) equipado com uma coluna capilar (Thermo Tr-FAME) com 60 m de comprimento, um diâmetro de 0,25 mm e 0,25 µm de espessura de filme, um amostrador automático (AS 3000, Thermo Electron Corporation) e um detetor de ionização de chama (FID). As temperaturas do detetor e do injetor (modo *splitless*) foram 280 °C e 250 °C, respetivamente. A temperatura da coluna foi programada para 100 °C durante 0,1 minutos, seguida de um aumento de 10 °C por minuto, até atingir 150 °C, mantendo-se durante 1 minuto. De seguida, efetuou-se um segundo aumento de temperatura a 5 °C/min, até 200 °C, mantendo-se durante 9 minutos, e depois um terceiro aumento a 2 °C/min, até 235 °C, durante 5 minutos. Usou-se hélio (He) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,5 mL/min e a chama do detetor foi mantida com ar e hidrogénio (H₂) a fluxos de 350 mL/min e 35 mL/min, respetivamente.

Os ácidos gordos foram identificados por comparação com os tempos de retenção obtidos nas misturas padrão de Supelco 37, PUFA 1 e PUFA 3 (Sigma-Aldrich, EUA) e quantificados pelo método do padrão interno. Todo o processo foi realizado em triplicado e os resultados foram expressos em percentagem de área total (% Total AG) e em concentração absoluta (µg/mg PS) por aplicação da equação 7:

$$AG (\mu\text{g}/\text{mg}) = \frac{A_{AG} \times [PI] \times V_{PI} \times V_{\text{Hexano}}}{A_{PI} \times V_{\text{Extrato}} \times m_{\text{amostra}}} \quad (7)$$

Em que: A_{AG} – Valor da área do pico do ácido gordo a dosear; $[PI]$ – Concentração (500 µg/mL) da solução de padrão interno; A_{PI} – Valor da área do pico do padrão interno (FAME C17:0); V_{PI} – Volume de padrão interno adicionado no *vial* (25 µL); V_{Hexano} – Volume de

hexano usado para extrair os FAME (2 mL); V_{Extrato} – Volume do extrato dos FAME que foi adicionado ao *vial* (475 μL); ma – massa de amostra liofilizada (mg).

Foram também calculados a razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos (h/H) e os índices aterogénico (AI) e trombogénico (TI), de acordo com as equações 8, 9 e 10, respetivamente:

$$\frac{h}{H} = \frac{C18:1n9+C18:2n6+C18:3n3+C20:4n6+C20:5n3+C22:5n3+C22:6n3}{C14:0+C16:0} \quad (8)$$

$$AI = \frac{C12:0+4 \times C14:0+C16:0}{\Sigma MUFA + \Sigma n3 + \Sigma n6} \quad (9)$$

$$TI = \frac{C14:0+C16:0+C18:0}{0.5 \times \Sigma MUFA + 3 \times \Sigma n3 + 0.5 \times \Sigma n6 + \frac{\Sigma n3}{\Sigma n6}} \quad (10)$$

2.4 Quantificação de clorofilas e carotenoides

A quantificação de pigmentos das folhas, flores e frutos de *C. maritimum* foi realizada segundo Lichtenthaler & Buschmann (2001), com algumas modificações. Resumidamente, foram realizadas duas extrações, por maceração, com 3 mL de acetona 99,8% (Fisher Chemical, Loughborough, Reino Unido) às amostras liofilizadas (0,25 g no caso das folhas e 0,50 g no caso das flores e frutos). De seguida, adicionaram-se mais 13 mL de acetona e a mistura foi levada ao *vortex* por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 2204 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado com algodão para um balão volumétrico (25 mL), perfazendo o volume com acetona. Por fim, as soluções foram filtradas para cuvetes de quartzo, com um filtro de seringa 0,45 μm (Filterlab) e a absorvância foi lida a 470, 644,8 e 661,6 nm (Epoch2, BioTek Instruments, EUA). Todo o processo foi realizado em triplicado. As concentrações de clorofilas e carotenoides totais (soma de xantofilas e carotenos), expressas em micrograma por grama de peso seco ($\mu\text{g/g}$ PS), foram calculadas com base nas seguintes equações:

$$c_a (\mu\text{g/mL}) = 11,24 \text{ Abs}_{661,6} - 2,04 \text{ Abs}_{644,8} \quad (11)$$

$$c_b (\mu\text{g/mL}) = 20,13 \text{ Abs}_{644,8} - 4,19 \text{ Abs}_{661,6} \quad (12)$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/mL}) = \frac{1000 \text{ Abs}_{470} - 1,90 c_a - 63,14 c_b}{214} \quad (13)$$

$$\text{Pigmento } (\mu\text{g/g}) = \frac{C(\mu\text{g/mL}) \times V_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}}} \quad (14)$$

Em que: c_a – concentração de clorofila a no extrato; c_b – concentração de clorofila b no extrato; $c_{(x+c)}$ – concentração de carotenoides totais (soma de xantofilas e carotenos) no extrato; $\text{Abs}_{661,6}$ – absorvância a 661,6 nm; $\text{Abs}_{644,8}$ – absorvância a 644,8 nm; Abs_{470} – absorvância a 470 nm; V_{extrato} – Volume total do extrato de acetona (25 mL); m_{amostra} – massa de amostra (g).

2.5 Obtenção de extratos das folhas, flores e frutos de *C. maritimum*

A biomassa das folhas, flores e frutos liofilizados de *C. maritimum* foi extraída sequencialmente com cinco solventes de diferentes polaridades, partindo do mais apolar (éter de petróleo (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha)), seguido de acetona (Fisher Chemical, Loughborough, Reino Unido), etanol (Aga, Loures, Lisboa), etanol:água (1:1), até ao mais polar (água).

As amostras (100 g) foram misturadas com 1 L de solvente, sob agitação à temperatura ambiente, durante 3 horas. De seguida, realizou-se a filtração dos extratos com papel de filtro e os solventes foram removidos por evaporação no evaporador rotativo enquanto a biomassa foi sujeita à extração seguinte, nas mesmas condições. Por fim, os extratos orgânicos foram secos em estufa a 30 °C, e os extratos aquosos foram liofilizados (LyoQuest-85, Telstar). O resíduo seco obtido para cada um dos 15 extratos, foi pesado a fim de calcular o rendimento da extração.

2.6 Conteúdo fenólico total e avaliação da atividade antioxidante

2.6.1 Conteúdo fenólico total (TPC)

A quantificação de fenóis totais dos extratos das folhas, flores e frutos de *C. maritimum* foi realizada espectrofotometricamente, pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu adaptado a micro-escala segundo descrito por (Neves et al., 2020), com algumas modificações.

Para a reação de cor, num tubo de Eppendorf, adicionaram-se 840 μL de água ultrapura obtida no sistema Milli-Q, 10 μL de extrato diluído a 1 mg/mL (exceto o extrato etanólico das flores, que foi diluído a 500 $\mu\text{g/mL}$) e 50 μL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Buchs SG, Suíça). A mistura foi homogeneizada no *vortex* e, após 5 minutos no escuro, adicionaram-se 150 μL de solução de carbonato de sódio a 20% (Labkem, Barcelona, Espanha). O mesmo processo foi repetido para os brancos, que continham o respetivo solvente ao invés do extrato. Após nova agitação no *vortex*, todas as amostras foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, durante 1 h.

Para a construção de uma curva de calibração, prepararam-se soluções de ácido gálico (de 0; 25; 50; 75; 100; 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$ em água destilada) (Merck, Hanchou, China) que foram submetidas à mesma reação de cor descrita para os extratos. Posteriormente, leu-se a absorvância a 755 nm no leitor de microplacas, em quadruplicado. O conteúdo fenólico total foi expresso em micrograma de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato ($\mu\text{g EAG/mg}$).

2.6.2 Capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

A capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) dos extratos das folhas, flores e frutos de *C. maritimum* foi analisada como descrito por Brand-Williams et al., (1995) e adaptado por Neves et al. (2020), com algumas modificações. Resumidamente, adicionaram-se 950 μL de solução de DPPH (40 $\mu\text{g/mL}$ etanol) (TCI, Tóquio, Japão) a um Eppendorf contendo 50 μL de solução de extrato a 1 mg/mL preparado com o respetivo solvente de extração. A mistura foi levada ao *vortex* e mantida na ausência de luz, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após agitação, foram transferidos 200 μL da solução para 4 poços de uma microplaca de 96 poços e mediu-se a absorvância a 517 nm, usando-se etanol como branco. Repetiu-se o mesmo processo, substituindo os 50 μL de

extrato pelo mesmo volume do respectivo solvente. A percentagem de inibição obtida para cada extrato foi determinada por aplicação da equação 15:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{Solvente}} - \text{Abs}_{\text{Extrato}}}{\text{Abs}_{\text{Solvente}}} \times 100 \quad (15)$$

Em que: $\text{Abs}_{\text{Extrato}}$ – absorvância da reação da mistura de DPPH com extrato; $\text{Abs}_{\text{Solvente}}$ – absorvância da mistura de DPPH com o solvente de extração.

Soluções padrão do antioxidante sintético Trolox (0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 mg/mL em etanol) (TCI, Tóquio, Japão) foram tratadas pelo mesmo processo descrito para os extratos, e a partir das absorvâncias obtidas, calculou-se a percentagem de inibição do radical DPPH e construiu-se uma curva de calibração. Os resultados da atividade antioxidante dos extratos, foram expressos em micrograma de equivalentes de Trolox por miligrama de extrato ($\mu\text{g Eq Trolox/mg}$).

2.6.3 Poder de redução do Fe (III) (FRAP)

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *C. maritimum* com base na capacidade de redução do ião férrico (FRAP), foi efetuada segundo o método descrito por Rufino et al. (2007), com algumas modificações. Para a reação de cor, foram misturados 30 μL de solução de extrato a 1 mg/mL (o extrato aquoso das folhas, extratos hidroetanólicos das três partes da planta e os extratos etanólicos das folhas e frutos, foram diluídos a 500 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o extrato etanólico das flores foi diluído a 0,333 $\mu\text{g/mL}$) com 900 μL de reagente FRAP, preparado através da mistura de tampão acetato (VWR, Lovaina, Bélgica) 0,3 mol/L em ácido acético glacial (Carlo Erba, Val-de-Reuil, França), solução de cloreto de ferro (Labkem, Barcelona, Espanha) 20 mmol/L em água e 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China) 10 mmol/L em HCl (Fluka, Seelze, Alemanha) 40 mM, numa proporção de 10:1:1. A mistura foi colocada 15 minutos em banho-maria (OB14, Memmert, Alemanha) a 30 °C, ao abrigo da luz. Após esse período, as misturas foram mantidas no escuro à temperatura ambiente durante 5 minutos. Por fim, alíquotas de 200 μL foram transferidas em quadruplicado para uma microplaca de 96 poços e foi medida a absorvância a 593 nm.

Em paralelo, prepararam-se brancos dos extratos (nos quais o TPTZ foi substituído por igual volume de água) e brancos dos solventes (que continham, em vez do extrato, 30 µL do respetivo solvente) que foram tratados tal como descrito para as amostras. A elaboração das curvas de calibração foi feita com soluções padrão de Trolox (0,01; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg/mL em etanol). A atividade antioxidante foi expressa como microgramas de equivalentes de Trolox por miligrama de extrato (µg Eq Trolox/mg).

2.6.4 Capacidade de redução do radical ácido 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

A capacidade de redução do radical ABTS dos extratos de *C. maritimum* foi avaliada segundo o descrito por Konan et al. (2016) com algumas alterações. Para a realização deste ensaio foi necessário preparar previamente o reagente ABTS, que consiste numa mistura de ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ($C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2$) (VWR, Solon, EUA) 7 mM e persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (VWR, Lovaina, Bélgica) 12,25 mM em água ultrapura, numa proporção de 4:1. A mistura foi armazenada no escuro durante cerca de 16 h. Após esse tempo, realizou-se a leitura da absorvância no espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific, China) a 734 nm e diluiu-se a solução com água ultrapura até uma absorvância igual a $0,700 \pm 0,02$.

A reação foi preparada em Eppendorfs através da adição de 50 µL dos vários extratos, nas concentrações descritas para o ensaio do FRAP, e 950 µL de reagente ABTS. As amostras foram agitadas durante 1 minuto e transferidas para uma cuvete de plástico de 1,5 mL, procedendo-se posteriormente à leitura da absorvância a 734 nm no espectrofotómetro. Todo o processo foi realizado em triplicado.

O mesmo procedimento foi realizado para os brancos dos solventes e para os padrões de Trolox (0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,08 e 0,1 mg/mL em etanol), com as quais se preparou a curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos em microgramas de equivalentes de Trolox por miligrama de extrato (µg Eq Trolox/mg).

2.7 Análise dos extratos de *Crithmum maritimum* por cromatografia em camada fina (TLC)

O perfil cromatográfico dos extratos de *C. maritimum* foi analisado segundo o descrito por Santiago & Strobel (2013). Para a realização deste ensaio, foram preparadas soluções (10 mg/mL) dos extratos de todas as partes da planta, dissolvidos no respetivo solvente de extração. Prepararam-se também as câmaras cromatográficas com os eluentes necessários, uma vez que para a sua utilização, a atmosfera deve estar totalmente saturada com o solvente volátil. O volume de fase móvel colocado foi o suficiente para proporcionar a subida, sem alcançar o ponto de aplicação das amostras, o que teria levado à sua dissolução para fora da placa de cromatografia. Os eluentes usados para cada placa foram escolhidos tendo em consideração a polaridade dos diferentes extratos:

- Extratos de éter de petróleo – Hexano:Acetato de etilo (7:3 v/v);
- Extratos de acetona – Hexano:Acetato de etilo (5:5 v/v);
- Extratos de etanol – Acetato de etilo (100% v/v);
- Extratos de etanol:água (1:1 v/v) – Diclorometano:Metanol (1:1 v/v);
- Extratos aquosos – Metanol (100% v/v);
- Todos os extratos de folhas, flores e frutos – Acetato de etilo (100% v/v).

Utilizaram-se placas de cromatografia em camada fina (TLC) de sílica gel (TLC aluminum sheets, Silica gel 60 F₂₅₄, Merk, Germany) que foram preparadas como apresentado na Figura A6.1. Para comparar a composição dos extratos das diferentes partes da planta, prepararam-se 5 placas (uma para cada solvente de extração) com o mesmo extrato de folhas, flores e frutos. Além disso, foram também preparadas 3 placas adicionais para comparar os 5 extratos de cada parte da planta. As identificações nas placas efetuaram-se com recurso a um lápis, dado que a tinta da caneta poderia interferir com o ensaio.

As amostras de cada extrato (5 µL) foram colocadas nas placas de TLC, com o auxílio de capilares de vidro graduados (CAMAG, VWR) tal como é apresentado na Figura A6.1. De seguida, as placas foram colocadas no centro das câmaras previamente saturadas com o eluente, com a parte superior da placa encostada à parede.

Concluída a eluição, retiraram-se as placas da câmara cromatográfica e secaram-se à temperatura ambiente. Com o intuito de observar a separação dos compostos, estas foram

visualizadas em câmara escura com lâmpadas a 254 e 365 nm, sendo possível observar os compostos que absorvem radiação a 254 nm ou que emitem fluorescência. Posteriormente, foi feita a revelação das placas por pulverização com ácido sulfúrico (10% v/v em etanol), seguida de aquecimento, possibilitando a visualização de outros compostos incolores.

2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos das folhas, flores e frutos de *C. maritimum* foi analisada contra quatro estirpes de bactérias (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 27799, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228) e quatro leveduras (*C. albicans* ATCC 10259, *C. parapsilosis* ATCC 22019, uma estirpe selvagem de *K. phaffii* e *S. cerevisiae* ATCC 18824).

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura Mueller-Hinton Agar (MHA) (Biolife, Milão, Itália) a 37 °C em estufa (BD115, Binder, Alemanha) durante 24 h. Já as leveduras patogênicas e não patogênicas, foram cultivadas em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) (VWR, Comunidade Europeia) e meio GPY constituído por 2% glicose (Biochem, Cosne-sur-Loire, França), 2% peptona (VWR, Comunidade Europeia), 1% extrato de levedura (VWR, Comunidade Europeia) e 2% agar (Liofilchem, Téramo, Itália), respetivamente, a 30 °C em estufa durante 48 h.

Todos os processos necessários para a avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados na câmara de fluxo laminar (Bio II Advance 4, Telstar, Espanha) e com recurso a material previamente esterilizado, possibilitando que o trabalho fosse efetuado em condições de assepsia.

2.8.1 Concentração mínima inibitória (MIC) do dimetilsulfóxido (DMSO)

O crescimento das bactérias foi realizado inoculando duas a três colónias em 5 mL de meio de cultura Mueller-Hinton Broth (MHB) (Scharlau, Sentmenat, Espanha). O meio inoculado foi incubado a 37 °C durante aproximadamente 3 h, até atingir o Padrão de McFarland 0,5 (correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFCs/mL) ou superior, através da medição num densitómetro (DEN-1B, Grant-bio, Reino Unido). Quando a densidade da suspensão foi superior à desejada, ajustou-se a mesma ao Padrão de McFarland 0,5 adicionando meio

MHB. Antes da inoculação, esta suspensão padronizada foi diluída 100 vezes em meio fresco. No caso das leveduras, o crescimento foi feito em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) com 2% de glicose (Biochem, Cosnesur-Loire, França), a 37 °C (espécies patogénicas) ou a 30 °C (espécies não patogénicas), durante cerca de 16 h, e foi seguido o procedimento referido anteriormente para as bactérias, tendo em consideração que para estas o Padrão de McFarland 0,5 corresponde a 5×10^6 UFCs/mL.

De modo a minimizar a ação inibitória por parte dos solventes de extração, todos os extratos foram dissolvidos em DMSO (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha) numa concentração de 10 mg/mL. Assim, previamente à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, determinou-se a concentração mínima inibitória do DMSO.

A inoculação na microplaca de 96 poços foi efetuada para um volume final de 300 µL por poço, sendo as concentrações de DMSO testado de 1 a 20%, tendo sido utilizadas duas microplacas. O processo foi feito em duplicado, usando-se duas linhas da microplaca para cada microrganismo a testar. Após inoculação, as microplacas contendo bactérias e leveduras patogénicas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h e 48 h, respetivamente. As microplacas com leveduras não patogénicas, foram incubadas a 30 °C por 48 h. Todas as placas continham um controlo de esterilidade (meio de cultura não inoculado) na décima segunda coluna e um controlo de crescimento (meio de cultura inoculado sem adição de DMSO) na décima primeira coluna da microplaca.

O crescimento dos microrganismos foi avaliado visualmente e pela medição da densidade ótica (DO) no leitor de microplacas, a 595 e 625 nm para as bactérias e a 530, 595 e 625 nm para as leveduras. Os resultados obtidos demonstraram que 2% de DMSO não inibia o crescimento dos microrganismos em estudo e, portanto, em todos os ensaios posteriores, utilizou-se um máximo de 2% de DMSO em cada poço.

2.8.2 Screening preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos

Com o intuito de selecionar os extratos com maior potencial antimicrobiano, realizaram-se ensaios em microplacas de 96 poços estéreis, para todos os 15 extratos numa concentração de 200 µg/mL por poço, para um volume final de 300 µL, sendo o restante volume preenchido por meio inoculado. Isto significa que, em cada poço foram colocados

294 μL de suspensão celular inoculada como indicado anteriormente e 6 μL de extrato a 10 mg/mL dissolvidos em DMSO. Para as leveduras, foram ainda realizados ensaios com uma concentração de extrato de 100 $\mu\text{g/mL}$ por poço, nas mesmas condições.

O crescimento dos microrganismos, as condições de inoculação e os controles de esterilidade e crescimento, foram iguais aos referidos no ensaio anterior. Adicionaram-se ainda um controlo com DMSO e meio não inoculado, e um controlo com DMSO e meio inoculado, na mesma concentração do extrato. Todo o procedimento foi realizado em quadruplicado.

Verificou-se que os extratos de éter de petróleo, acetona e etanol das flores e frutos, bem como o extrato de acetona das folhas, apresentavam uma inibição superior a 30%, procedendo-se aos ensaios seguintes apenas com estes extratos.

2.8.3 Concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos

Para a determinação da MIC dos extratos em estudo, prepararam-se soluções de concentração 30 mg/mL em DMSO. De modo a proceder ao ensaio, foram ainda preparados e autoclavados os meios de cultura MHB e RPMI-1640 com 2% de glicose. Os ensaios foram realizados em triplicado de forma independente, partindo de diferentes inóculos da mesma estirpe.

Como descrito previamente, o crescimento dos microrganismos foi realizado inoculando duas a três colónias em 5 mL do meio de cultura MHB ou RPMI-1640 com 2% de glicose, para as bactérias e leveduras, respetivamente, e o inóculo foi incubado à temperatura indicada até atingir uma densidade correspondente ao Padrão de McFarland 0,5. Este valor foi atingido aproximadamente após 3 ou 16 h para bactérias e leveduras, respetivamente. De modo a proceder às análises, este inóculo foi diluído 100 vezes.

A MIC do crescimento celular, dos extratos, foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, através de diluições em série duplas, em microplacas de 96 poços com um volume total de 300 μL por poço, conforme o descrito por Rodríguez-Tudela et al. (2003), com algumas modificações. Os extratos foram testados a diversas concentrações (2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 e 600 $\mu\text{g/mL}$). As microplacas foram preparadas como apresentado na Figura A6.2. Na primeira coluna da microplaca de 96 poços, foram

pipetados 6 µL dos extratos a analisar e 294 µL do inóculo preparado anteriormente. Nas 9 colunas seguintes, foram colocados 150 µL de meio inoculado em cada poço. Para as diluições, retiraram-se 150 µL da primeira coluna para a segunda, o inóculo foi homogeneizado, retirou-se o mesmo volume da segunda para a terceira coluna, e assim sucessivamente até à última coluna, onde foi descartado o volume em excesso. As três colunas restantes foram utilizadas para o controlo de crescimento (meio de cultura inoculado), controlo de crescimento com DMSO e controlo de esterilidade (meio de cultura não inoculado).

Prepararam-se também placas com controlos de qualidade com o antibiótico cefotaxima (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha), de modo a determinar a MIC desta contra as estirpes de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213, segundo o descrito por EUCAST (2003). Nestas, na primeira coluna foram colocados 7,5 µL do antibiótico (a 2560 µg/mL) e 292,5 µL de inóculo, e as diluições foram realizadas da mesma forma. Estas placas continham também controlo de crescimento e esterilidade. No caso das leveduras, utilizou-se o antifúngico fluconazol (Sigma-Aldrich, Alemanha), segundo descrito por Arendrup et al. (2020), a 5120 µg/mL em etanol 50% contra a *C. parapsilosis* DSM 578 e o procedimento foi efetuado como indicado anteriormente.

As microplacas foram incubadas à temperatura indicada para cada microrganismo (30 °C para leveduras não patogénicas e 37 °C para bactérias e leveduras patogénicas), por 24 h e 48 h, para bactérias e leveduras, respetivamente. Findo o período de incubação, o crescimento foi analisado visualmente e por leitura da absorvância (a 595 e 625 nm) das amostras face ao controlo positivo, com o auxílio do leitor de microplacas. A MIC foi determinada como a menor concentração de extrato com capacidade para inibir o crescimento da estirpe.

2.8.4 Concentração mínima bactericida (MBC) e fungicida (MFC)

A concentração mínima bactericida foi determinada através do plaqueamento de 10 µL do inóculo contido nos poços sem crescimento, em meio de cultura MHA. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C e a MBC foi definida como a menor concentração de extrato que não permitiu o desenvolvimento da cultura. O mesmo procedimento foi realizado para a determinação da concentração mínima fungicida, tendo sido utilizado o meio PDA e

incubações de 48 h a 30 °C para as leveduras não patogénicas ou 37 °C no caso das leveduras patogénicas.

2.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicado. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Após a confirmação da normalidade dos dados, a análise estatística foi realizada por testes ANOVA de um fator, com o auxílio do software IBM SPSS Statistics 27.0 (IBM Corporation, New York, USA). Caso os requisitos não fossem cumpridos, efetuava-se o teste paramétrico de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Composição nutricional

A biomassa de folhas, flores e frutos de *Crithmum maritimum* foi analisada quanto ao teor de humidade, matéria inorgânica, proteína, lípidos totais e hidratos de carbono. Os valores obtidos para a composição nutricional, expressos em percentagem de peso fresco (% PF) ou peso seco (% PS), são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição nutricional das folhas, flores e frutos do funcho-do-mar, expressa em percentagem de peso fresco (% PF) ou peso seco (% PS). Os dados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de quatro ensaios independentes. Letras diferentes na mesma linha, representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

	Folhas	Flores	Frutos
Humidade (% PF)	88,4 ± 0,7 ^a	85,0 ± 0,1 ^b	86,8 ± 0,3 ^c
Matéria inorgânica (% PS)	24,9 ± 0,8 ^a	15,9 ± 0,3 ^b	19,6 ± 0,5 ^c
Proteína (% PS)	4,6 ± 0,1 ^a	8,3 ± 0,2 ^b	7,1 ± 0,3 ^c
Lípidos totais (% PS)	4,0 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,1 ^a	6,5 ± 0,5 ^b
Hidratos de carbono (% PS)	66,5 ± 0,7 ^a	71,7 ± 0,4 ^b	66,7 ± 0,4 ^a

Os resultados evidenciam semelhanças entre as três partes da planta, sendo que todas são compostas maioritariamente por água, seguida de hidratos de carbono, matéria inorgânica, proteína e lípidos, estando de acordo com dados já registados (Sánchez-Faure et al., 2020). As folhas demonstraram ser a parte da planta com maior teor de humidade (88,4 ± 0,7% PF) com diferenças estatisticamente significativas das flores (85,0 ± 0,1% PF) e dos frutos (86,8 ± 0,3% PF), o que seria de esperar devido ao ambiente hostil em que a planta cresce, que leva a que as partes comestíveis contenham uma quantidade significativa de água (Ciccarelli et al., 2016).

Em comparação com dados já publicados, pode-se verificar que os valores obtidos para a humidade das folhas são semelhantes aos 87% PF registados nos caules de *C. maritimum* (Sánchez-Faure et al., 2020) e 87,60% PF registados na planta como um todo (Renna, 2018). Além disso, outro trabalho avaliou a variação da humidade desta planta ao longo do ano em locais distintos, demonstrando valores entre 86,0 e 92,0% PF (Coiffard et al., 1992), semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Os valores obtidos são também idênticos aos descritos para as partes aéreas de *Carpobrotus edulis* (85,2 a 94,3% PF), uma halófito suculenta (Pereira et al., 2023), e para as folhas de outras halófitas, variando entre 81,2 e 85,8% PF (Barreira et al., 2017). Além disso, são semelhantes ao teor de humidade registado em vegetais folhosos, que varia de 84,3 a 94,7% PF (Slavin & Lloyd, 2012).

Relativamente à percentagem de matéria inorgânica, as folhas apresentaram os valores mais elevados, com $24,9 \pm 0,8\%$ PS, seguidas dos frutos com $19,6 \pm 0,5\%$ PS e por último as flores com apenas $15,9 \pm 0,3\%$ PS.

O conteúdo de cinzas em halófitas é notavelmente elevado, quando comparado com outras plantas comestíveis (Barreira et al., 2017). Isto deve-se em grande parte ao ambiente salino em que crescem e à sua capacidade de reter minerais, refletindo uma concentração mineral total significativa (Barreira et al., 2017; Pereira et al., 2023; Sánchez-Faure et al., 2020). O teor de matéria inorgânica obtido para as folhas, flores e frutos desta halófito foi mais elevado que o descrito por Sánchez-Faure et al. (2020) em caules da mesma espécie (11,6% PS). Contudo, são semelhantes aos valores descritos para a planta no geral (16,0 a 25,8% PS) e respetivas partes aéreas (23,6% PS) (Coiffard et al., 1992; Pedreiro et al., 2023), estando também o conteúdo de cinza das folhas dentro dos valores publicados por Barreira et al. (2017) para folhas de halófitas usadas na cozinha gourmet (23,3 a 31,6% PS). Resultados semelhantes (entre 18,6 e 32,0% PS) são também descritos para o chorão da praia *C. edulis* (Pereira et al., 2023; Neves et al., 2021). Outro estudo, refere uma gama mais alargada (entre 6,11 e 52,7% PS) de valores de cinza em halófitas (Díaz et al., 2013).

As flores, apresentaram o maior teor de hidratos de carbono ($71,7 \pm 0,4\%$ PS), sendo notória a diferença para os frutos ($66,7 \pm 0,4\%$ PS) e folhas ($66,5 \pm 0,7\%$ PS), que não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Além disso, as flores possuem também um teor de proteína de $8,3 \pm 0,2\%$ PS, significativamente superior ao dos frutos ($7,1 \pm 0,3\%$ PS) e das folhas ($4,6 \pm 0,1\%$ PS).

O armazenamento de hidratos de carbono em halófitas desempenha um papel crucial na regulação osmótica, funcionando como uma estratégia adaptativa, especialmente em ambientes sujeitos a altos níveis de salinidade, com temperaturas elevadas e menor quantidade de água (Pereira et al., 2023). Analisando os resultados já publicados, verifica-se que nas determinações do perfil nutricional realizadas por outros autores, o teor de

hidratos de carbono não foi avaliado, focando-se apenas nas restantes classes de biomoléculas (Barreira et al., 2017; Pedreiro et al., 2023). Os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com os descritos para os caules desta espécie (69,5% PS) (Sánchez-Faure et al., 2020) e para as partes aéreas de *C. edulis* (61,4 a 78,5% PS) colhido no Algarve (Pereira et al., 2023) e na zona Oeste de Portugal (Neves et al., 2021).

Relativamente ao teor de proteína, os valores obtidos neste estudo são considerados baixos, já que as halófitas são conhecidas por serem fontes ricas deste macronutriente (Attia-Ismail, 2015; Pedreiro et al., 2023). Na verdade, o teor de proteína nas flores, folhas e frutos de *C. maritimum* foi inferior ao descrito anteriormente por Sánchez-Faure et al. (2020), que registaram 11,6% PS para os caules de funcho-do-mar. No entanto, Martins-Noguerol et al. (2022) referem teores de proteína em folhas de *C. maritimum*, recolhidas em 4 locais distintos, entre 3,8 a 6,2% PS, em linha com os valores obtidos neste trabalho. Estes autores avaliaram também o conteúdo de proteína das folhas desta planta sob condições ótimas de crescimento, tendo obtido um valor notavelmente maior (10,2% PS), próximo do registado para outras halófitas (Attia-Ismail, 2015). Além disso, outros estudos referem também valores próximos dos obtidos (8,0% PS) para as partes aéreas de *C. maritimum* (Pedreiro et al., 2023).

Quando comparado com dados publicados para outras halófitas, observa-se alguma discrepância entre os estudos. O teor de proteína descrito para as partes aéreas de *C. edulis* variou entre 1.6 e 6.2% PS (Pereira et al., 2023; Neves et al., 2021), enquanto em halófitas usadas na cozinha gourmet, os valores são ligeiramente superiores, entre 5,20 e 13,2% PS (Barreira et al., 2017). Da mesma forma, outros estudos referem conteúdos proteicos em diferentes espécies de halófitas entre 6,6% PS (*Zygophyllum album*) e 20,7% PS (*Atriplex repanda*), acima dos registados neste trabalho (Attia-Ismail, 2015; Díaz et al., 2013).

Como se pode observar na Tabela 3.1, o conteúdo de lípidos foi significativamente mais elevado nos frutos ($6,5 \pm 0,5\%$ PS), em comparação com as folhas e flores que apresentam valores próximos entre si ($4,0 \pm 0,1\%$ PS e $4,2 \pm 0,1\%$ PS, respetivamente). Esta diferença era expectável, visto que os frutos de *C. maritimum* são constituídos essencialmente pela semente e por uma pequena quantidade de polpa. As sementes, geralmente são a parte da planta onde os lípidos, como óleos e gorduras, estão armazenados para auxiliar na germinação e no crescimento inicial da planta (Kim, 2020).

Estes resultados são coerentes com o descrito na literatura. Por exemplo, Pedreiro et al. (2023) referem um teor de lípidos de 5,8% PS nas partes aéreas de *C. maritimum*, enquanto Sánchez-Faure et al. (2020) apontam para valores de 3,0% PS nos caules desta planta. Outros autores registaram teores de lípidos mais baixos noutras espécies de halófitas, nomeadamente entre 0,6 e 1,9% PS nas partes aéreas de *C. edulis* (Pereira et al., 2023; Neves et al., 2021) e entre 1,20 e 2,85% PS em plantas usadas na cozinha gourmet (Barreira et al., 2017). Mais uma vez, o teor de lípidos é também relativamente baixo, uma vez que as halófitas tendem a acumular minerais, para lidar com as condições salinas.

A composição nutricional é influenciada pela conjugação de uma série de fatores, como o nível de salinidade do ambiente em que a planta cresce, uma vez que a salinidade pode afetar a absorção de nutrientes, levando à acumulação de sais e modificando a concentração de nutrientes essenciais na planta (Barreira et al., 2017; Díaz et al., 2013; Pereira et al., 2023; Sánchez-Faure et al., 2020). Além disso, a disponibilidade de água, que pode ser escassa em ambientes costeiros, influencia a capacidade da planta de absorver estes nutrientes (Díaz et al., 2013). Alguns estudos comprovam também que a fase de crescimento da planta, bem como a parte da planta analisada, são fatores cruciais, podendo apresentar variações significativas em termos de perfil nutricional (Attia-Ismail, 2015; Díaz et al., 2013; Neves et al., 2021; Pereira et al., 2023). Outros autores destacam o impacto de fatores sazonais, como variações na luz solar e temperatura, comprovando a variação dos vários macronutrientes ao longo do ano (Attia-Ismail, 2015; Díaz et al., 2013; Pereira et al., 2023). Outros aspetos que têm influência são as condições de crescimento (habitat natural ou condições controladas) (Martins-Noguerol et al., 2022) e o tipo de solo, que condiciona a disponibilidade de nutrientes (Coiffard et al., 1992; Martins-Noguerol et al., 2022; Pereira et al., 2023). Para além destes, também a metodologia selecionada para a quantificação destes macronutrientes pode influenciar os resultados finais, destacando a importância de abordagens consistentes.

No geral, os dados obtidos na análise da composição nutricional das folhas, flores e frutos de *C. maritimum*, são consistentes com os valores publicados na literatura. No caso das flores e frutos, estes resultados assumem uma relevância significativa, dada a escassez de estudos que investigam minuciosamente os seus perfis nutricionais. Ainda assim, é importante notar que, em quase todos os parâmetros analisados, há uma notável disparidade

de resultados na literatura científica, destacando a necessidade de pesquisas adicionais para esclarecer e padronizar os valores nutricionais associados a esta halófito.

3.2 Perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos (AG) de folhas, flores e frutos de *C. maritimum*, determinado por cromatografia gasosa, está presente na Tabela 3.2. Quando se compara a concentração absoluta de ácidos gordos nas várias partes da planta, verifica-se que os frutos apresentaram o valor mais alto (59,3 µg/mg PS, correspondente a 5,93% de PS), o que é coerente com os resultados do teor lipídico dos frutos, que foi maior do que o das folhas e flores. Nos frutos, os lípidos são constituídos principalmente por triacilgliceróis (Lu et al., 2020), sendo o valor total de ácidos gordos (µg/mg) muito semelhante ao da percentagem de lípidos totais. Já nas folhas e flores, a disparidade entre estes valores pode dever-se à maior concentração de pigmentos apolares, como clorofilas e carotenoides, que também são extraídos na quantificação dos lípidos totais (Mortensen, 2006).

Quando se avalia a percentagem relativa dos vários ácidos gordos identificados, verifica-se que todas as partes da planta são constituídas maioritariamente por ácidos gordos insaturados (MUFA e PUFA), que em conjunto, representam 88,90% do total de ácidos gordos nos frutos, acima do registado para as flores (74,52%) e para as folhas (66,55%). As flores e as folhas são particularmente ricas em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), que constituem mais de 50% do total de ácidos gordos. Contrariamente, os frutos contêm essencialmente ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) com $60,95 \pm 0,76\%$ do total de ácidos gordos. Os ácidos gordos saturados (SFA) estão presentes maioritariamente nas folhas ($33,45 \pm 0,44\%$ do total de AG).

Numa perspetiva geral, apesar de serem constatadas algumas similaridades entre as três partes da planta, quando observado mais pormenorizadamente, são visíveis diferenças nítidas entre ambas as partes, nomeadamente nos ácidos gordos mais abundantes e respetivas concentrações.

Tabela 3.2 - Perfil de ácidos gordos das folhas, flores e frutos de *Crithmum maritimum* L, expresso em percentagem de área total (% Total AG) e micrograma por miligrama de peso seco ($\mu\text{g}/\text{mg}$ PS). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três amostras independentes.

	Folhas		Flores		Frutos	
	% Total AG	$\mu\text{g}/\text{mg}$ PS	% Total AG	$\mu\text{g}/\text{mg}$ PS	% Total AG	$\mu\text{g}/\text{mg}$ PS
SFA						
C12:0	0,45 \pm 0,29	0,077 \pm 0,064	0,066 \pm 0,03	0,011 \pm 0,005	0,02 \pm 0,01	0,013 \pm 0,008
C14:0	2,49 \pm 0,09	0,429 \pm 0,019	0,547 \pm 0,003	0,142 \pm 0,008	0,27 \pm 0,01	0,131 \pm 0,042
C15:0	0,22 \pm 0,06	0,030 \pm 0,004	0,18 \pm 0,01	0,048 \pm 0,005	0,11 \pm 0,00	0,055 \pm 0,019
C16:0	18,53 \pm 0,18	3,21 \pm 0,13	17,57 \pm 0,10	4,57 \pm 0,27	8,89 \pm 0,12	4,359 \pm 1,44
C17:0	0,25 \pm 0,01	0,043 \pm 0,001	0,225 \pm 0,003	0,059 \pm 0,004	0,12 \pm 0,00	0,058 \pm 0,020
C18:0	7,97 \pm 0,08	1,377 \pm 0,062	3,54 \pm 0,02	0,918 \pm 0,051	0,42 \pm 0,03	0,200 \pm 0,080
C20:0	1,43 \pm 0,02	0,246 \pm 0,011	0,72 \pm 0,01	0,186 \pm 0,014	0,28 \pm 0,01	0,134 \pm 0,044
C24:0	2,12 \pm 0,07	0,364 \pm 0,006	2,64 \pm 0,02	0,684 \pm 0,038	1,00 \pm 0,02	0,49 \pm 0,16
MUFA						
C15:1	0,32 \pm 0,05	0,059 \pm 0,006	0,17 \pm 0,02	0,043 \pm 0,008	0,07 \pm 0,01	0,035 \pm 0,016
C16:1	1,43 \pm 0,26	0,220 \pm 0,018	0,27 \pm 0,01	0,067 \pm 0,004	0,16 \pm 0,01	0,076 \pm 0,026
C17:1	0,22 \pm 0,01	0,039 \pm 0,002	0,53 \pm 0,01	0,138 \pm 0,010	0,07 \pm 0,02	0,040 \pm 0,012
C18:1 n-9	2,03 \pm 0,07	0,355 \pm 0,013	3,43 \pm 0,03	0,889 \pm 0,043	50,1 \pm 1,0	29,7 \pm 2,0
C18:1 n-7	0,44 \pm 0,05	0,072 \pm 0,008	0,52 \pm 0,01	0,134 \pm 0,007	0,48 \pm 0,06	0,24 \pm 0,06
C22:1 n-9	6,62 \pm 0,07	1,139 \pm 0,052	10,04 \pm 0,17	2,61 \pm 0,16	7,05 \pm 0,30	3,43 \pm 1,05
C24:1 n-9	2,63 \pm 0,07	0,456 \pm 0,015	4,12 \pm 0,06	1,074 \pm 0,076	3,07 \pm 0,03	1,51 \pm 0,51
PUFA						
C16:3 n-4	0,33 \pm 0,01	0,057 \pm 0,002	0,07 \pm 0,01	0,015 \pm 0,003	0,07 \pm 0,00	0,033 \pm 0,009
C18:2 n-6	29,47 \pm 0,39	5,11 \pm 0,33	45,25 \pm 0,24	11,77 \pm 0,64	23,70 \pm 0,50	11,6 \pm 3,8
C18:3 n-3 (ALA)	22,50 \pm 0,36	3,90 \pm 0,24	8,54 \pm 0,04	2,22 \pm 0,12	2,67 \pm 0,10	1,30 \pm 0,41
C20:5 n-3 (EPA)	0,56 \pm 0,04	0,091 \pm 0,001	1,58 \pm 0,02	0,406 \pm 0,025	1,51 \pm 0,02	0,74 \pm 0,25
Total		17,3 \pm 0,9		26,0 \pm 1,5		59,3 \pm 3,3
SFA	33,45 \pm 0,44		25,48 \pm 0,11		11,10 \pm 0,14	
MUFA	13,69 \pm 0,30		19,08 \pm 0,20		60,95 \pm 0,76	
PUFA	52,86 \pm 0,63		55,44 \pm 0,27		27,95 \pm 0,62	

n-3	23,07 ± 0,35	10,12 ± 0,04	4,18 ± 0,12
n-6	29,47 ± 0,39	45,25 ± 0,24	23,70 ± 0,50
n-3/n-6	0,78 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,176 ± 0,001
h/H	2,57 ± 0,06	3,16 ± 0,03	8,35 ± 0,16
AI	1,247 ± 0,020	0,992 ± 0,007	0,405 ± 0,006
TI	0,317 ± 0,005	0,345 ± 0,002	0,174 ± 0,002

Nota. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; n-3 – ácidos gordos ómega 3; n-6 – ácidos gordos ómega 6; n-3/n-6 – razão de ácidos gordos ómega 3/ómega 6; h/H - razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos; AI - índice aterogénico; TI - índice trombogénico.

Assim, nas folhas, os principais ácidos gordos encontrados foram os ácidos linoleico (C18:2 n-6) e α -linolénico (C18:3 n-3 (ALA)), dois AG polinsaturados, com valores de 29,47 ± 0,39% e 22,50 ± 0,36% do total de AG, respetivamente, seguidos dos ácidos gordos saturados C16:0 (ácido palmítico) com valor de 18,53 ± 0,18% e C18:0 (ácido esteárico) com 7,97 ± 0,08%. Os ácidos gordos monoinsaturados presentes em maior quantidade foram os ácidos erúcido (C22:1 n-9) e nervónico (C24:1 n-9), com valores de 6,62 ± 0,07% e 2,63 ± 0,07% do total de AG, respetivamente. Seguem-se os ácidos mirístico (C14:0), lignocérico (C24:0) e oleico (C18:1 n-9) com quantidades na ordem dos 2% do total de AG e 0,4 µg/mg PS. Os ácidos araquídico (C20:0) e palmitoleico (C16:1) apresentaram valores muito próximos entre si (1,43% do total de AG). Os restantes AG são constituintes minoritários, com percentagens inferiores a 1%.

O foco de muitas pesquisas tem sido nas folhas, sendo o órgão mais investigado em estudos sobre compostos lipídicos. Martins-Noguerol et al. (2022) avaliaram o perfil de ácidos gordos das folhas de funcho marinho colhidas em cinco locais distintos e obtiveram resultados em conformidade com os do presente trabalho. No entanto, estes autores observaram uma variação nos dois principais ácidos gordos predominantes (linoleico e o α -linolénico) consoante o local de recolha. Essas variações sugerem a influência de fatores ambientais na composição lipídica, destacando a importância de considerar a localização geográfica ao avaliar o perfil de ácidos gordos. O mesmo resultado, relativamente aos três

principais ácidos gordos, foi relatado em Sánchez-Faure et al. (2020) para os caules desta halófito, e em Oliveira-Alves et al. (2023) e Maoloni et al. (2021) para a planta toda.

À semelhança das folhas, nas flores o ácido gordo mais abundante é o linoleico (C18:2 n-6), no entanto, a sua concentração nesta parte da planta ($45,25 \pm 0,24\%$ do total de AG) foi quase o dobro da registada nas folhas. Dentro dos cinco ácidos gordos detetados em maior quantidade, estão também os ácidos palmítico (C16:0), erúcido (C22:1 n-9), ALA (C18:3 n-3) e nervónico (C24:1 n-9) com concentrações de $17,57 \pm 0,10\%$ ($4,57 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mg PS}$), $10,04 \pm 0,17\%$ ($2,61 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{mg PS}$), $8,54 \pm 0,04\%$ ($2,22 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) e $4,12 \pm 0,06\%$ ($1,074 \pm 0,076 \mu\text{g}/\text{mg PS}$), respetivamente. Outros ácidos gordos como o esteárico (C18:0), o oleico (C18:1 n-9), o lignocérico (C24:0) e o EPA (C20:5 n-3), foram detetados com valores entre os 4 e 2%. Além destes, estão presentes outros AG em quantidades vestigiais (abaixo de 1%). O mesmo resultado, em termos dos dois principais ácidos gordos (linoleico e palmítico), foi relatado por Primitivo et al. (2022) para flores de *Helichrysum italicum*, ainda que em quantidades notoriamente menores.

Por último, contrariamente às folhas e flores, onde o MUFA mais abundante é o ácido erúcido (C22:1 n-9), os frutos possuem uma elevada concentração ($50,1 \pm 1,0\%$ do total de AG) de ácido oleico (C18:1 n-9), bastante superior aos valores registados nas outras partes da planta. O ácido linoleico (C18:2 n-6) é o PUFA mais abundante nos frutos ($23,70 \pm 0,50\%$), que apesar de, em termos percentuais corresponder a metade do valor encontrado nas flores, tem uma concentração absoluta similar ($11,6 \pm 3,8 \mu\text{g}/\text{mg PS}$). Tal como acontece nas folhas e flores, o ácido palmítico (C16:0) é o AG saturado ($8,89 \pm 0,12\%$, $4,359 \pm 1,44 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) mais abundante nos frutos. Outros AG presentes em quantidades consideráveis foram os ácidos erúcido (C22:1 n-9) e nervónico (C24:1 n-9). No que se refere aos AG essenciais ómega 3, verificou-se que o teor de ALA registado nos frutos ($2,67 \pm 0,10\%$, $1,30 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{mg PS}$) foi claramente inferior aos valores das folhas e flores. No entanto, os frutos foram a parte da planta com maior concentração de EPA (C20:5 n-3), ainda que corresponda apenas a $1,51 \pm 0,02\%$ do total de AG ($0,74 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{mg PS}$). Detetaram-se ainda outros AG minoritários nos frutos dos quais se destaca o ácido lignocérico (C24:0) com valores de $0,49 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{mg PS}$ ($1,00 \pm 0,02\%$ do total de AG).

Na bibliografia consultada, não há registos disponíveis sobre a composição de ácidos gordos presentes nas flores e frutos de *C. maritimum*. O presente trabalho, preenche essa lacuna ao detalhar pela primeira vez essa informação. Porém, no estudo de Araus et al.

(2021), onde avaliaram o efeito de diferentes níveis de salinidade no perfil de ácidos gordos de sementes de *Salicornia europaea*, foi verificado que independentemente desse fator, os três principais ácidos gordos são os ácidos linoleico, oleico e palmítico. Contudo, é visível uma discrepância significativa no que diz respeito à proporção entre os ácidos linoleico e oleico, uma vez que estes autores revelam uma predominância do ácido linoleico sobre o oleico, contrariamente ao obtido neste trabalho. Esta diferença pode ser explicada pela variação entre as espécies, a parte da planta analisada e as condições de crescimento.

Neste trabalho, o funcho marinho revelou-se uma fonte promissora de ácidos gordos benéficos para a nutrição, destacando-se pela presença de PUFA. Estes são reconhecidos como compostos bioativos com propriedades antifúngicas, capazes de inibir a progressão de condições como a aterosclerose e a formação de células cancerígenas (Martins-Noguerol et al., 2022). Nesses ácidos gordos, componentes essenciais na dieta humana (Araus et al., 2021), estão incluídos os ácidos gordos linoleico (LA) e α -linolénico (ALA). Estes AG desempenham papéis fundamentais no organismo, intervindo em diversas funções fisiológicas, contudo, o corpo humano não possui a capacidade de os sintetizar (Martins-Noguerol et al., 2022). Isto destaca a importância de incorporar fontes alimentares ricas nesses ácidos gordos na dieta, uma vez que desempenham funções vitais para a saúde.

O ácido gordo α -linolénico (ALA), não só demonstra atividades antiinflamatórias e antitrombóticas (Martins-Noguerol et al., 2022), como também sobressai por ser um precursor fundamental de outros ácidos gordos ómega 3, nomeadamente dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (Sánchez-Faure et al., 2020), que são pouco frequentes em plantas terrestres (Barreira et al., 2017). Isto ocorre porque, embora o corpo humano seja incapaz de sintetizar o ácido gordo ALA, possui enzimas (como as elongases e as desaturases) que catalisam a conversão desse ácido gordo de 18 carbonos para variantes de 20, 22 e 24 carbonos (Dyall, 2015). O consumo de alimentos ricos em ALA é associado a diversos benefícios para a saúde (Sánchez-Faure et al., 2020), destacando a importância de escolhas alimentares equilibradas e ricas em ácidos gordos essenciais. Neste contexto, quando comparadas com as restantes partes da planta, as folhas de *C. maritimum* revelaram teores mais elevados de ácido α -linolénico, fortalecendo a perspectiva promissora dessa halófito como uma fonte alimentar benéfica para a saúde.

O ácido linoleico é um ácido gordo essencial, pertencente à família dos ácidos gordos ómega 6, que desempenha um papel crucial no organismo humano, sendo essencial para o

bom desempenho de várias funções fisiológicas, nomeadamente na regulação do sistema imunológico e na resposta inflamatória (Guil et al., 1996; Oliveira-Alves et al., 2023). Além disso, é precursor de outros ácidos gordos importantes, como o ácido araquidónico (C20:4 n-6) (Guil et al., 1996). Já o ácido oleico, é um ácido gordo monoinsaturado que desempenha um papel significativo na saúde humana. Este ácido gordo é comumente encontrado em fontes alimentares como óleos de plantas (Guil-Guerrero & Rodríguez-García, 1999), conferindo ao funcho marinho uma riqueza nutricional devido à sua presença.

A qualidade nutricional do perfil lipídico do *C. maritimum*, foi avaliada em termos de quantidade total de ácidos gordos n-3 (ómega 3) e n-6 (ómega 6), relação entre estes (n-3/n-6), razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos (h/H) e dos índices AI (Índice aterogénico) e TI (Índice trombogénico), cujos resultados estão também apresentados na Tabela 3.2.

Todas as partes da planta demonstraram ser maioritariamente ricas em ácidos gordos n-6 (tendo razões n-3/n-6 inferiores a 1), com especial destaque para as flores que apresentaram uma quantidade de $45,25 \pm 0,24\%$ do total de AG. Por outro lado, as folhas apresentaram maior concentração de n-3 que as restantes partes, atingindo um valor de $23,07 \pm 0,35\%$ do total de AG, mais do dobro do obtido nas flores. Os frutos revelaram ser os mais pobres, tanto em ácidos gordos n-6 como em ácidos gordos n-3. Na relação entre n-3/n-6, o maior valor foi registado nas folhas ($0,78 \pm 0,01$) e o menor nos frutos ($0,176 \pm 0,001$). Em termos de razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos foram obtidas altas proporções, sendo que os frutos apresentaram a maior ($8,35 \pm 0,16$) e a mais pequena foi alcançada nas folhas ($2,57 \pm 0,06$). Os índices aterogénico e trombogénico revelaram valores baixos, variando desde $0,405 \pm 0,006$ nos frutos a $1,247 \pm 0,020$ nas folhas e $0,174 \pm 0,002$ nos frutos a $0,345 \pm 0,002$ nas flores, respetivamente.

Os ácidos gordos n-3 são reconhecidos pelo seu impacto positivo na saúde humana, contribuindo para a prevenção de diversas doenças cardiovasculares, como a trombose e a arteriosclerose (Guil et al., 1996). Em termos nutricionais, geralmente são mais favoráveis perfis de AG que contenham uma quantidade significativa de ácidos gordos n-3, devido às suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Barreira et al., 2017). A avaliação da qualidade dos ácidos gordos nos alimentos baseia-se na relação entre os ómega 3 e ómega 6, onde um valor mais elevado nessa proporção indica maior qualidade nutricional (Guil et al., 1996). A relação h/H, que avalia a influência de ácidos gordos

específicos no colesterol, é útil na compreensão dos efeitos dos mesmos na saúde cardiovascular. Ácidos gordos hipocolesterolêmicos têm a capacidade de reduzir os níveis de colesterol-LDL, frequentemente referido como mau colesterol (Patarra, 2008). Essa redução é benéfica, pois altos níveis deste colesterol estão associados a um maior risco de doenças cardiovasculares. Por outro lado, ácidos gordos hipercolesterolêmicos têm o potencial de elevar os níveis de colesterol-LDL (Patarra, 2008), o que é considerado desfavorável para a saúde cardiovascular. Deste modo, é recomendável um valor mais elevado neste parâmetro.

Dado o impacto dos PUFA nas condições cardíacas, a avaliação da qualidade lipídica em relação aos benefícios para a saúde envolve o uso de índices. O AI revela a relação entre os SFA (associados à aterosclerose) e os insaturados (protetores), sendo benéfico um valor mais reduzido. Já o TI é determinado pela relação entre os ácidos gordos considerados pró-trombogênicos, ou seja, aqueles que têm maior propensão para desencadear a coagulação sanguínea, e os ácidos gordos antitrombogênicos, que têm um papel mais preventivo nesse processo. Essa relação indica a tendência à coagulação sanguínea, sendo valores baixos desejáveis para prevenir doenças cardiovasculares (Barreira et al., 2017; Sánchez-Faure et al., 2020).

De um modo geral, a análise do perfil lipídico das folhas apresentada neste trabalho está de acordo com as descrições fornecidas por outros autores para a mesma parte da planta (Kraouia et al., 2023; Martins-Noguerol et al., 2022). Martins-Noguerol et al. (2022) analisaram a composição das frações lipídicas de folhas liofilizadas, recolhidas em cinco locais distintos e indicaram que o perfil de ácidos gordos era PUFA (46,4 a 64,0%) > SFA (24,0 a 31,7%) > MUFA (4,3 a 25,4%). O mesmo resultado foi relatado por Kraouia et al. (2023) em relação à predominância de PUFA, seguido por SFA e MUFA. Adicionalmente, o estudo realizado por estes autores destaca uma variação significativa na relação n-3/n-6, variando de 0,1 a 1,6% nas folhas desta planta. Esses resultados coincidem com o observado por outros autores, que registraram uma razão n-3/n-6 de 1,10% nos caules desta mesma halófito (Sánchez-Faure et al., 2020). No entanto, no que diz respeito aos índices AI e TI, Sánchez-Faure et al. (2020) referiram valores mais baixos (0,29 e 0,17, respetivamente). Já Barreira et al. (2017) descrevem valores mais altos de n-3/n-6 e índices AI e TI ligeiramente menores nas folhas de outras halófitas, possivelmente resultado de uma maior presença de ALA.

Ao comparar os teores de ácidos gordos de flores de diferentes espécies, pode-se verificar que as flores de *C. maritimum* são uma fonte de ácidos gordos nutricionalmente importantes. O estudo realizado por Primitivo et al. (2022) analisou o perfil de ácidos gordos de flores de *H. italicum*. Os resultados mostraram que, em comparação com as flores de *C. maritimum*, as flores de *H. italicum* tinham níveis mais baixos de PUFA e MUFA e níveis mais elevados de SFA, bem como maiores valores de h/H, e índices AI e TI mais baixos.

Apesar da ausência de estudos sobre a composição de AG dos frutos de funcho marinho, Kraouia et al. (2023) referiram que as sementes desta planta apresentavam uma quantidade consideravelmente superior de MUFA, comparativamente com PUFA e SFA. Considerando os parâmetros nutricionais avaliados neste trabalho, os frutos destacaram-se das outras partes da planta por apresentarem valores de h/H, AI e TI mais promissores. Isto sugere que a inclusão dos frutos de *C. maritimum* na alimentação pode ser especialmente benéfica para a prevenção de doenças cardiovasculares, oferecendo uma alternativa nutritiva e equilibrada em termos de composição de ácidos gordos.

3.3 Quantificação de clorofila e carotenoides

Os pigmentos fotossintéticos naturais, como as clorofilas e carotenoides, desempenham um papel crucial na coloração das plantas, conferindo tonalidades verde e laranja/amarela, respetivamente. Além disso, exercem também funções fundamentais em termos fisiológicos, atuando como pró-oxidantes no caso das clorofilas e como antioxidantes no caso dos carotenoides (Barreira et al., 2017; Sousa et al., 2022).

Os resultados da quantificação de clorofilas (a e b) e carotenoides (xantofilas e carotenos) das folhas, flores e frutos de funcho marinho, são apresentados na Tabela 3.3.

A análise dos resultados revela que, no geral, as folhas apresentam os valores mais elevados de todos os pigmentos em estudo, com concentrações de $855,8 \pm 6,0 \mu\text{g/g PS}$, $236,5 \pm 2,1 \mu\text{g/g PS}$ e $258,0 \pm 2,0 \mu\text{g/g PS}$, para clorofila a, clorofila b e carotenoides, respetivamente. Por outro lado, os frutos apresentam os menores teores, com valores de $132,0 \pm 1,6 \mu\text{g/g PS}$, $43,1 \pm 1,0 \mu\text{g/g PS}$ e $63,6 \pm 0,7 \mu\text{g/g PS}$, respetivamente, sendo confirmada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as três partes da planta analisadas. Além disso, é possível verificar que, em todas as partes da planta, a

clorofila a é o pigmento mais abundante (com cerca de três vezes mais quantidade que a clorofila b), seguida dos carotenoides e por último a clorofila b. Em termos de percentagem relativa, a quantidade de carotenoides nas flores e frutos (aproximadamente 25% do total de pigmentos) é mais elevada que a observada nas folhas (inferior a 20%).

Tabela 3.3 - Concentração de clorofila e carotenoides das folhas, flores e frutos do funcho marinho, expressa em micrograma por grama de peso seco ($\mu\text{g/g PS}$). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três amostras independentes. Para cada pigmento, letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

	Folhas	Flores	Frutos
Clorofila a ($\mu\text{g/g PS}$)	855,8 \pm 6,0 ^a	197,5 \pm 4,6 ^b	132,0 \pm 1,6 ^c
Clorofila b ($\mu\text{g/g PS}$)	236,5 \pm 2,1 ^a	56,8 \pm 2,4 ^b	43,1 \pm 1,0 ^c
Xantofilas e Carotenos ($\mu\text{g/g PS}$)	258,0 \pm 2,0 ^a	86,1 \pm 1,1 ^b	63,6 \pm 0,7 ^c

Analisando estudos previamente publicados, observa-se que a proporção de clorofila a e clorofila b determinada é semelhante à descrita na literatura para a parte comestível da planta, através de uma extração idêntica (Renna et al., 2017). Estes autores avaliaram ainda o efeito do processo de liofilização da biomassa no teor de clorofila, que resultou numa diminuição (superior a 40%) da sua concentração.

Em folhas de halófitas usadas na cozinha gourmet, Barreira et al. (2017) referem quantidades relativas destes pigmentos muito distintas das obtidas no presente trabalho, sendo os pigmentos mais abundantes os carotenoides. Esta diferença nas percentagens relativas destaca a influência de diferentes fatores, entre eles a espécie da planta.

É ainda importante notar que, ao considerar-se a soma dos valores obtidos neste trabalho na quantificação das clorofilas e carotenoides para as três partes da planta (aproximadamente 1521,7 e 407,7 $\mu\text{g/g PS}$, respetivamente), estes resultados estão notavelmente próximos dos valores obtidos por Sousa et al. (2022), que determinaram concentrações de 1092 mg/kg PS de clorofila e 470 mg/kg PS de carotenoides na planta como um todo. Esta concordância de resultados sugere que, apesar das diferenças nas partes da planta analisadas, os dados deste trabalho são consistentes com a concentração destes pigmentos na halófito, indicando que cada parte da planta contribui de forma significativa para a concentração geral destes na planta inteira. Além disso, a similaridade entre o valor

obtido por Sousa et al. (2022) para a clorofila total da planta e o registado para as folhas no presente trabalho sugere que a concentração de clorofila nas folhas de *C. maritimum* contribui de maneira substancial para a sua concentração geral na planta inteira, destacando a importância das folhas na acumulação deste pigmento. Contudo, não se conhecem dados publicados referentes à quantidade de clorofila a, clorofila b e carotenoides presentes nas flores e frutos desta espécie.

Os resultados alcançados na análise destes três pigmentos, especialmente no contexto das flores e frutos desta halófita, assumem uma importância substancial devido à ausência de bibliografia. A maioria dos estudos já publicados sobre estes tópicos demonstram uma variação considerável nos resultados obtidos, tendo em conta que a quantificação de pigmentos pode ser influenciada por diversos fatores. Primeiramente, os diferentes métodos de extração, incluindo a escolha do solvente, o tempo e a intensidade do processo de extração, que podem afetar a eficiência da extração dos pigmentos, resultando em valores divergentes. Também os métodos de análise, podem oferecer resultados ligeiramente diferentes devido à sensibilidade e especificidade de cada técnica. Além disso, a utilização de biomassa proveniente de diferentes locais e colhida em épocas do ano distintas pode desempenhar um papel importante, devido aos fatores ambientais, como a salinidade do solo, a quantidade de luz solar, a temperatura e a disponibilidade de água, que influenciam a concentração de pigmentos na planta. Outro fator significativo é a forma como é armazenada a biomassa, visto que a exposição prolongada à luz, ao oxigénio e ao calor pode causar a degradação dos pigmentos, influenciando os resultados da análise. Por último, a parte da planta que é utilizada para a análise também é relevante, pois podem apresentar perfis de pigmentos distintos, devido às diferentes funções que desempenham.

A quantificação de pigmentos apresenta alguns desafios consideráveis. Um dos principais obstáculos reside no manuseamento necessário para obtenção da biomassa seca e o seu armazenamento, que levam a que os pigmentos sejam expostos a luz e a temperaturas que afetam a sua estabilidade, podendo levar à degradação dos mesmos.

3.4 Extração sequencial da biomassa

Tendo em vista a pesquisa de compostos bioativos presentes nas diferentes partes do *C. maritimum*, realizaram-se extrações sequenciais da respetiva biomassa. Começou-se com

o éter de petróleo, obtendo-se um extrato constituído essencialmente por compostos muito apolares. Depois a biomassa remanescente foi extraída com acetona, depois com etanol, mistura etanol-água e por fim com água (muito polar). Desta forma obtiveram-se cinco extratos de cada parte da planta. Na Tabela 3.4 estão indicados os rendimentos de extração obtidos (% PS).

Tabela 3.4 - Rendimento da extração sequencial de folhas, flores e frutos de *Crithmum maritimum* L com os diferentes solventes, expresso em percentagem (%).

Rendimento da extração (% PS)	Folhas	Flores	Frutos
Éter de petróleo	1,50	1,63	3,33
Acetona	1,27	1,60	2,97
Etanol	4,61	4,43	4,77
Etanol:Água (1:1)	19,46	14,86	15,76
Água	13,32	11,80	9,28

Os resultados revelam claramente um aumento no rendimento quando usados solventes mais polares (etanol:água e água), atingindo valores superiores nas folhas. Contudo, nas extrações com solventes mais apolares, como o éter de petróleo e a acetona, o rendimento foi superior nos frutos.

Estes resultados são coerentes com a bibliografia. O estudo de Pereira et al. (2017) compara o rendimento de extratos aquosos de diferentes partes da planta, revelando que o rendimento das folhas foi superior ao das flores. De notar também que, outros autores observaram um aumento no rendimento com o aumento da polaridade do solvente, sugerindo uma maior presença de compostos polares na biomassa de *C. maritimum* (Alemán et al., 2019; Hulkko et al., 2023).

O éter de petróleo, como solvente apolar, é particularmente eficaz na extração de compostos lipofílicos, como ceras, óleos, carotenoides e outros componentes não polares. A acetona e o etanol, solventes moderadamente polares, são mais eficientes na extração de compostos orgânicos parcialmente polares, incluindo alcaloides, pigmentos, flavonoides e outros compostos fenólicos. A mistura etanol:água é adequada para extrair compostos mais hidrofílicos, como compostos glicosilados e polissacarídeos. Por fim, a água é utilizada para extrair componentes altamente hidrossolúveis, como sais minerais, alguns aminoácidos e

açúcares (Roopashree & Naik, 2019; Wanyo et al., 2016; Q. Xu et al., 2021). Esta sequência de solventes permite a obtenção de uma gama abrangente de compostos, refletindo a diversidade química presente na biomassa desta halófito.

3.5 Conteúdo fenólico total (TPC)

O método de Folin-Ciocalteu quantifica todos os compostos fenólicos presentes na amostra e é amplamente utilizado devido à sua simplicidade. Os resultados obtidos para o conteúdo fenólico total das folhas, flores e frutos de *C. maritimum*, determinado por este método, estão apresentados na Tabela 3.5. Ao analisar os resultados, é possível verificar que os compostos fenólicos foram extraídos em maior quantidade com solventes de polaridade média-alta (etanol e etanol:água), capazes de solubilizar compostos mais polares. Os valores mais altos foram registados nos extratos etanólicos das flores ($254 \pm 15 \mu\text{g EAG/mg}$) e das folhas ($164 \pm 15 \mu\text{g EAG/mg}$). Em oposição, os extratos de éter de petróleo foram os que apresentaram menor teor de compostos fenólicos, variando de $11,7 \pm 2,3 \mu\text{g EAG/mg}$ nos frutos a $16,2 \pm 2,6 \mu\text{g EAG/mg}$ nas folhas. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os extratos da mesma parte da planta. No entanto, quando se comparam extratos obtidos com o mesmo solvente, verifica-se que não há diferenças significativas entre os extratos de éter das folhas e frutos, entre os extratos de folhas e frutos obtidos com acetona, nem entre os extratos hidroetanólicos de folhas e flores.

Tabela 3.5 - Conteúdo fenólico total (TPC) dos vários extratos (éter de petróleo, acetona, etanol, etanol:água e água) de folhas, flores e frutos de Crithmum maritimum L., expresso em micrograma de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato ($\mu\text{g EAG/mg}$). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de 3 amostras independentes. Para cada solvente, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias partes da planta. Para cada parte da planta, números diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre extratos obtidos com solventes diferentes

TPC ($\mu\text{g EAG /mg}$)	Éter de petróleo	Acetona	Etanol	Etanol:Água	Água
Folhas	$13,6 \pm 2,3$ ^{a1}	$44,0 \pm 4,3$ ^{a2}	164 ± 15 ^{a3}	119 ± 15 ^{a4}	$83,2 \pm 5,3$ ^{a5}
Flores	$16,2 \pm 2,6$ ^{b1}	$88,4 \pm 6,1$ ^{b2}	254 ± 15 ^{b3}	$118,4 \pm 8,2$ ^{a4}	$64,2 \pm 3,8$ ^{b5}
Frutos	$11,7 \pm 2,3$ ^{a1}	$44,2 \pm 3,4$ ^{a2}	111 ± 15 ^{c3}	84 ± 16 ^{b4}	$44,3 \pm 5,3$ ^{c2}

Estudos anteriores reportaram uma gama considerável de valores, refletindo a influência da parte da planta e da escolha do solvente. Em comparação com dados já

publicados, verifica-se que os valores obtidos para os extratos de acetona foram superiores aos registados por outros autores para extratos da planta inteira, que variaram entre 3,68 e 8,27 $\mu\text{g EAG/mg}$ (Jallali et al., 2012, 2014). Da mesma forma, os extratos etanólicos e aquosos obtidos noutros estudos mostraram valores significativamente mais baixos, variando de 31,70 a 109,00 $\mu\text{g EAG/mg}$ (Alemán et al., 2019; Hulkko et al., 2023; Mekinić et al., 2016; Souid et al., 2021) e 33,53 a 75,95 $\mu\text{g EAG/mg}$ (Alemán et al., 2019; Hulkko et al., 2023), respetivamente. Estas variações podem ser atribuídas às diferentes fontes de biomassa e aos solventes utilizados, ressaltando a importância de considerar essas variáveis na interpretação dos resultados. Ainda assim, à semelhança do que acontece neste trabalho, estes estudos comprovaram também que os solventes mais hidrofílicos possuem uma capacidade mais eficaz de extrair compostos fenólicos em comparação com a acetona. É ainda importante notar que, no presente trabalho, foram realizadas extrações sequenciais da mesma biomassa utilizando diferentes solventes, o que permitiu uma abordagem mais abrangente, capturando uma maior gama de compostos fenólicos presentes na biomassa, com diferentes polaridades e características químicas.

Além disso, verifica-se que, de forma geral, as flores apresentam um maior conteúdo fenólico (em particular nos extratos de acetona e etanol), enquanto que os extratos dos frutos foram os que apresentaram menor quantidade de compostos fenólicos. Contrariamente ao observado neste trabalho, vários autores referem maior teor de compostos fenólicos nas folhas do que nas flores de *C. maritimum*, nomeadamente em extratos etanólicos (Mekinić et al., 2016), metanólicos (Houta et al., 2011) e em extratos aquosos (Pereira et al., 2017).

Por outro lado, comparando os vários solventes, os resultados obtidos neste trabalho são coerentes com o estudo de Alemán et al. (2019), que refere que o etanol é mais eficiente que a água na extração de compostos fenólicos. E ainda que se encontrem discrepâncias nos valores de fenóis totais referidos na literatura para extratos desta planta, os dados disponíveis sugerem também uma maior eficiência do etanol em comparação com o metanol (Houta et al., 2011; Kadoglidou et al., 2022; Martins-Noguerol et al., 2022; Mekinić et al., 2016; Meot-Duros et al., 2008; Souid et al., 2020, 2021). No entanto, é importante destacar que se tratam de estudos distintos e independentes, havendo uma série de fatores que podem influenciar os resultados e dificultar a generalização dos efeitos do solvente na extração de polifenóis.

O conteúdo fenólico total foi extensivamente avaliado em diversos tipos de extratos, como aquosos, metanólicos, etanólicos e de acetona, provenientes de várias partes da planta,

incluindo folhas, flores e a planta toda. No entanto, é notável que extratos de éter de petróleo desta planta nunca foram objeto de estudo. Além disso, ainda não existem estudos que determinem o conteúdo fenólico total em extratos de frutos da mesma espécie, sugerindo uma lacuna importante na pesquisa sobre os compostos fenólicos presentes na planta e nas suas diferentes partes. Deste modo, esta abordagem pode fornecer informações úteis para trabalhos futuros, bem como para aplicações práticas, como a otimização de processos de extração para obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos para diversas finalidades, como na indústria alimentar e farmacêutica.

As diferenças nos resultados entre o presente trabalho e estudos anteriores podem ser explicadas pela abordagem de extração sequencial adotada. Outros fatores como a concentração de extrato e o método de extração também desempenham um papel importante. A parte da planta analisada, juntamente com a fase de desenvolvimento, o local de amostragem, as variações sazonais e as condições ambientais, são variáveis adicionais que influenciam a concentração de compostos fenólicos nos extratos, tornando a sua quantificação um processo altamente dependente destes fatores complexos. Assim, é crucial abordar a análise com atenção a estas variáveis, reconhecendo a complexidade da interação entre elas.

3.6 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos é uma etapa essencial em muitos estudos, uma vez que os antioxidantes desempenham um papel fundamental na proteção contra os danos oxidativos. Entre os métodos mais comuns para avaliar essa atividade, destacam-se os ensaios DPPH, FRAP e ABTS, que se baseiam na capacidade dos antioxidantes de reduzir radicais específicos, o que permite obter resultados mais robustos, compreensíveis e confiáveis, além de proporcionar uma visão mais completa das propriedades antioxidantes dos extratos.

Os ensaios DPPH e ABTS incidem na redução dos radicais DPPH e ABTS, respetivamente. Nesses ensaios, os antioxidantes doam elétrões para neutralizar o radical catiónico ABTS e o radical DPPH (Kadoglidou et al., 2022), resultando na mudança de cor dos reagentes e permitindo a quantificação da atividade antioxidante. O radical DPPH, por ser menos solúvel em soluções aquosas, é particularmente adequado para detetar compostos

lipofílicos, tornando-o um método útil para a avaliação de antioxidantes que possuem essa característica. Por outro lado, o ensaio ABTS é mais sensível à detecção de ácidos fenólicos e outros antioxidantes solúveis em água (Primitivo et al., 2022), sendo uma escolha apropriada quando se deseja avaliar compostos com essa solubilidade. Além desses métodos, o ensaio FRAP é uma abordagem comum baseada na transferência de um único elétron. Nesse ensaio, a redução do íon férrico do complexo $\text{Fe}^{3+}\text{-(TPTZ)}_2^{3+}$ para o complexo $\text{Fe}^{2+}\text{-(TPTZ)}_2^{3+}$ de cor azul intensa ocorre por meio da ação dos antioxidantes em meio ácido (Kadoglidou et al., 2022).

A capacidade de redução do radical DPPH, o poder de redução do Fe (III) (FRAP) e a capacidade de redução do radical ABTS dos extratos, são apresentados na Tabela 3.6. No geral, da análise dos resultados obtidos pelos três métodos, é possível verificar que todos indicam que, independentemente da parte da planta analisada, os extratos etanólicos são os que possuem maior atividade antioxidante, seguidos dos extratos hidroetanólicos. Já os extratos de éter de petróleo, demonstraram a atividade antioxidante mais fraca, com valores semelhantes entre os métodos, sendo o que o valor mais elevado foi obtido pelo método DPPH com o extrato das folhas ($22,1 \pm 6,4 \mu\text{g Eq Trolox/mg}$). Ainda que a acetona tenha extraído mais compostos antioxidantes que o éter de petróleo, é visível que os solventes mais hidrofílicos (etanol, etanol:água e água) foram os que extraíram a maior quantidade destes compostos. À semelhança do TPC, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os extratos da mesma parte da planta obtidos com os diferentes solventes.

Além disso, quando se comparam os extratos etanólicos e de acetona, verifica-se que as flores foram a parte da planta com maior atividade antioxidante (atingindo $359,8 \pm 7,7$ e $114,3 \pm 6,1 \mu\text{g Eq Trolox/mg}$ no ensaio FRAP, respectivamente), enquanto nos extratos de éter de petróleo e água, foram as folhas que apresentaram maior atividade (com $22,1 \pm 6,4$ e $147,2 \pm 7,4 \mu\text{g Eq Trolox/mg}$ no ensaio DPPH e FRAP, respectivamente). No entanto, os extratos hidroetanólicos das folhas e flores tiveram valores muito semelhantes entre si, independentemente do método de análise. Por outro lado, os extratos dos frutos obtiveram os valores mais baixos em todos os métodos, com exceção do extrato de acetona, que superou a atividade do das folhas nos três métodos.

Assim, pode-se afirmar que as flores são a parte da planta que apresenta maior presença de compostos com elevada atividade antioxidante, com polaridade intermédia, uma vez que estes possuem afinidade pelo etanol. Em contrapartida, tendo por base os valores

obtidos com os extratos de éter de petróleo (um solvente orgânico mais apolar, com baixa afinidade pela água), as folhas aparentam ter uma maior quantidade de compostos antioxidantes mais hidrofóbicos, quando comparadas com as restantes partes da planta.

Como seria de esperar, estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente para o conteúdo fenólico total, uma vez que os compostos fenólicos possuem na sua constituição grupos funcionais que lhes conferem propriedades antioxidantes.

Tabela 3.6 - Capacidade de redução do radical DPPH, poder de redução do Fe (III) (FRAP) e capacidade de redução do radical ABTS dos vários extratos (éter de petróleo, acetona, etanol, etanol:água e água) de folhas, flores e frutos de Crithmum maritimum L, expresso em micrograma de equivalentes de Trolox por miligrama de extrato ($\mu\text{g Eq Trolox/mg}$). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de triplicados de 3 amostras independentes. Para cada solvente, letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias partes da planta. Para cada parte da planta, números diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre extratos obtidos com solventes diferentes

Atividade antioxidante ($\mu\text{g Eq Trolox/mg}$)	Éter de petróleo	Acetona	Etanol	Etanol:Água	Água
DPPH					
Folhas	22,1 \pm 6,4 ^{a1}	24,4 \pm 9,1 ^{a1}	195 \pm 12 ^{a2}	132 \pm 11 ^{a3}	80,9 \pm 9,3 ^{a4}
Flores	7,5 \pm 4,6 ^{b1}	69,3 \pm 7,5 ^{b2}	254,5 \pm 9,9 ^{b3}	127,7 \pm 4,2 ^{a4}	59,8 \pm 9,2 ^{b2}
Frutos	5,9 \pm 4,7 ^{b1}	29,9 \pm 7,5 ^{a2}	106 \pm 22 ^{c3}	86 \pm 10 ^{b3}	38,4 \pm 7,8 ^{c2}
FRAP					
Folhas	12,6 \pm 2,8 ^{a1}	36,2 \pm 4,9 ^{a2}	307,4 \pm 8,2 ^{a3}	230,8 \pm 5,2 ^{a4}	147,2 \pm 7,4 ^{a5}
Flores	7,4 \pm 2,7 ^{b1}	114,3 \pm 6,1 ^{b2}	359,8 \pm 7,7 ^{b3}	232 \pm 21 ^{a4}	121,7 \pm 7,6 ^{b2}
Frutos	5,2 \pm 1,6 ^{b1}	55,9 \pm 4,3 ^{c2}	204 \pm 27 ^{c3}	165 \pm 13 ^{b4}	83,1 \pm 4,0 ^{c5}
ABTS					
Folhas	16,0 \pm 10,3 ^{a1}	23,2 \pm 2,9 ^{a1}	164,4 \pm 6,6 ^{a2}	119,2 \pm 7,0 ^{a3}	78,6 \pm 4,4 ^{a4}
Flores	2,5 \pm 4,6 ^{b1}	69,7 \pm 3,9 ^{b2}	184 \pm 11 ^{b3}	121,2 \pm 6,1 ^{a4}	62,7 \pm 3,8 ^{b2}
Frutos	1,0 \pm 2,7 ^{c1}	32,8 \pm 3,2 ^{c2}	109 \pm 17 ^{c3}	87,8 \pm 7,8 ^{b4}	44,7 \pm 2,8 ^{c5}

O potencial antioxidante de *C. maritimum* tem sido foco de numerosos estudos ao longo do tempo. A maioria dessas pesquisas usa extratos orgânicos (metanol, etanol e acetona) para avaliar a sua capacidade antioxidante. No entanto, a diversidade de unidades utilizadas para apresentar os resultados torna desafiadora a comparação entre esses estudos (Alemán et al., 2019; Houta et al., 2011; Jallali et al., 2014; Mekinić et al., 2016; Meot-

Duros et al., 2008; Meot-Duros & Magné, 2009; Nabet et al., 2017; Pedreiro et al., 2023; Souid et al., 2020, 2021).

Assim, pelo método do DPPH, foram encontrados somente dois estudos que apresentavam os resultados em unidades comparáveis às do presente trabalho. Neste contexto, é notável que o potencial antioxidante dos extratos hidroetanólicos analisados neste ensaio é consideravelmente superior quando comparado aos valores obtidos por Sousa et al. (2022) e Kadoglidou et al. (2022), que alcançaram atividades de 7,32 e 8,0 μg Eq Trolox/mg, respetivamente, com extratos metanólicos.

Apesar da diferença nas unidades, em alguns casos é possível realizar comparações diretas entre os extratos de folhas e flores desta halófitas, ainda que os resultados sejam discordantes face aos obtidos no presente trabalho. Enquanto alguns autores afirmam que os extratos aquosos e metanólicos de flores demonstram atividade superior em relação aos das folhas (Houta et al., 2011; Pereira et al., 2017), outros sustentam que os extratos etanólicos de folhas superam os das flores em termos de atividade antioxidante (Mekinić et al., 2016). Já no caso de outras halófitas, Primitivo et al. (2022) reportaram que extratos de acetona de flores de *H. italicum* possuem um potencial antioxidante maior do que os extratos aquosos, o que reforça a presença de fenóis mais lipofílicos, indo de encontro aos resultados obtidos para os extratos de flores da planta em estudo neste trabalho. É importante salientar que até ao momento não foram encontrados estudos que avaliassem o potencial antioxidante tendo em consideração os extratos de frutos de *C. maritimum*.

No contexto do FRAP, apenas foi possível identificar um estudo que apresentava resultados expressos nas mesmas unidades que os obtidos neste trabalho. Sousa et al. (2022) descrevem que o extrato metanólico desta planta apresentou uma atividade antioxidante de 20,997 μg Eq Trolox/mg, um valor cerca de 10 vezes menor do que os resultados obtidos neste trabalho para os extratos hidroetanólicos.

Embora as unidades sejam distintas, em certos estudos podem efetuar-se comparações diretas entre os extratos das folhas e das flores desta planta. Mekinić et al. (2016) demonstraram que extratos etanólicos de folhas exibem uma atividade antioxidante superior em relação aos das flores. Já outros autores constataram que os extratos etanólicos de folhas apresentam um potencial antioxidante maior em comparação com extratos aquosos (Alemán et al., 2019), o que corrobora os resultados deste estudo. Além disso, não há registos

de estudos que investiguem a capacidade antioxidante de extratos de frutos desta halófita, usando o método do FRAP.

Pelo método do ABTS, somente um estudo apresentava resultados expressos nas mesmas unidades que este trabalho. De acordo com esse estudo, os extratos hidroetanólicos analisados no presente trabalho revelaram uma atividade antioxidante significativamente superior, em contraste com o intervalo de 4,32 a 20,88 μg Eq Trolox/mg de atividade obtido com um extrato metanólico (Kadoglidou et al., 2022). Já Nabet et al. (2017) reportaram uma atividade de 0,43 mg Eq Trolox/mL com um extrato metanólico das partes aéreas, a uma concentração 10 vezes superior à utilizada neste trabalho. Ao converter o valor publicado por esses autores para as unidades deste trabalho, obtém-se um valor de 43 μg Eq Trolox/mg, que está mais próximo dos valores obtidos neste trabalho para extratos aquosos, embora ainda permaneça ligeiramente inferior.

No entanto, em conformidade com os resultados obtidos neste trabalho, Alemán et al. (2019) reportaram que o extrato etanólico de folhas e caules demonstra maior atividade do que o extrato aquoso, pelo método ABTS. Por outro lado, na halófita *H. italicum*, o extrato aquoso de flores apresenta uma atividade antioxidante mais elevada que o extrato de acetona (Primitivo et al., 2022), o que contrasta com os resultados observados nesta planta. Como era expectável, da mesma forma que nos métodos anteriores, não foram encontrados estudos que avaliam o potencial antioxidante dos extratos de frutos de *C. maritimum* utilizando o método do ABTS, o que ressalta a necessidade de investigação adicional nesta área.

A determinação da capacidade antioxidante dos extratos por meio dos métodos DPPH, FRAP e ABTS pode ser afetada por diversos elementos. Entre esses elementos, a escolha do solvente desempenha um papel crucial, uma vez que diferentes solventes podem extrair diferentes compostos antioxidantes da planta, levando a variações nos resultados dos extratos. Além disso, a parte da planta utilizada na preparação dos extratos também pode influenciar a atividade antioxidante, uma vez que diferentes partes podem conter diferentes concentrações de compostos antioxidantes.

Outro fator importante é o método de extração, incluindo fatores como o tempo, a temperatura e a técnica de extração, já que afeta a eficiência da extração dos antioxidantes. As condições do ensaio, como a concentração do extrato testada e o tempo de reação, são determinantes nos resultados obtidos. Adicionalmente, as condições ambientais durante o

ensaio, como temperatura e luz, podem desempenhar um papel significativo na avaliação da atividade antioxidante. A qualidade e a fonte dos reagentes químicos utilizados nos ensaios, bem como a pureza desses reagentes, também são relevantes, pois podem variar e afetar os resultados. Por fim, é fundamental considerar as variações na planta, como a espécie, a origem geográfica e as condições de crescimento, uma vez que esses fatores podem influenciar a composição química dos extratos e, conseqüentemente, afetar a atividade antioxidante.

Além dos fatores mencionados, é importante destacar que, embora existam numerosos estudos publicados sobre a avaliação da atividade antioxidante de extratos desta halófita, uma questão recorrente é a diversidade de unidades em que os resultados são expressos. A falta de padronização nas unidades utilizadas nestes estudos representa um obstáculo significativo na interpretação dos resultados e na compreensão do potencial antioxidante da planta. Portanto, a necessidade de estabelecer uma maior uniformidade nas unidades torna-se evidente para possibilitar uma comparação mais precisa e abrangente dos estudos realizados.

3.7 Análise por cromatografia em camada fina (TLC)

De forma a separar os compostos presentes nos vários extratos, foram efetuadas análises por cromatografia em camada fina. Esta técnica é baseada na diferença de afinidades dos componentes dos extratos pela fase estacionária e pela fase móvel (eluente), havendo uma competição entre os compostos e a fase móvel pelos locais de ligação na fase estacionária. Assim, à medida que a fase móvel se move ao longo da placa, os componentes da mistura interagem de maneira diferente com a fase estacionária, resultando na separação dos componentes ao longo da placa. Os compostos com maior afinidade pela fase estacionária ligam-se mais facilmente à mesma (removendo a fase móvel dos locais de ligação) e migram menos, enquanto que aqueles com menor afinidade permanecem mais tempo no eluente, migrando mais, o que leva à formação de bandas após a migração completa da fase móvel (Tiwari & Talreja, 2022). Para visualizar a separação dos compostos, a placa é primeiro colocada numa câmara escura com luz UV, que permite observar os compostos que absorvem radiação e depois tratada com reagentes específicos que reagem com os compostos e produzem manchas com cor (Santiago & Strobel, 2013).

Neste trabalho, a fase estacionária que havia à disposição para a separação dos compostos dos extratos em estudo era a sílica gel, que é polar, ou seja, é específica para a separação de compostos apolares. Isto significa que os compostos mais apolares vão migrar mais, enquanto que os compostos mais polares ficam retidos na fase estacionária e migram menos, permanecendo por vezes na linha de aplicação. Assim, inicia-se com um eluente mais apolar e, quando não ocorre a migração dos compostos, é utilizada uma fase móvel mais polar, para competir com a sílica gel. No entanto, quanto mais polar for o eluente, maior é a afinidade deste para a sílica gel e conseqüentemente mais lenta é a sua subida e os compostos ficam mais perto da origem (linha base).

A visualização das bandas através de detecção por ultravioleta (UV) é um método não destrutivo, permitindo a recuperação dos compostos da fase estacionária (Gibbons, 2012). Como a fase estacionária usada possui um indicador de fluorescência, quando a luz UV de comprimento de onda curto (254 nm) é aplicada, os compostos que absorvem a radiação são visíveis como bandas escuras, uma vez que impedem a emissão de fluorescência do indicador (Bele & Khale, 2011). Por outro lado, sob luz UV de comprimento de onda longo (365 nm), compostos com fluorescência emitem luz (Buhian et al., 2017), proporcionando uma visualização eficaz. Contudo, tendo em conta que compostos que não apresentam absorção de luz UV não são detetados por este método, foi necessária uma abordagem de revelação, na qual os compostos entram em contacto com o reagente de pulverização, originando um produto visível e conseqüentemente tornando impossível a recuperação dos compostos. Nesse sentido, o método de revelação utilizado foi a revelação com ácido sulfúrico (10% v/v em etanol), um reagente universal, que torna visíveis todos os compostos presentes nos extratos (Gibbons, 2012).

Os resultados obtidos para os perfis cromatográficos dos extratos analisados são apresentados nas Figuras 3.1 e 3.2. Ao analisar os resultados verificou-se que diferentes partes da planta podem conter compostos distintos ou compartilhar a presença de certos compostos, embora em concentrações variáveis. Notavelmente, os frutos destacam-se como a parte da planta com menos abundância em termos de diversidade de compostos.

No cromatograma dos extratos de éter de petróleo (Figura 3.1A), após a revelação com ácido sulfúrico (10% v/v em etanol), foram observadas bandas correspondentes a sete compostos. Ao comparar a intensidade das bandas entre as três partes da planta, é possível verificar que o composto 6 está mais concentrado nos frutos, enquanto o composto 7

apresenta uma concentração mais elevada nas folhas. Outra observação perceptível é que as folhas apresentam uma concentração inferior do composto 1 em comparação com as restantes regiões da planta. A solubilidade dos carotenoides em solventes orgânicos torna o éter de petróleo uma escolha adequada para a extração destes compostos apolares (Roopashree & Naik, 2019), pelo que as bandas visíveis nestes extratos podem sugerir a presença destes pigmentos.

Ao examinar-se o perfil cromatográfico dos extratos de acetona (Figura 3.1B), observados sob luz UV de 365 nm, pode-se identificar a presença de seis compostos distintos. Tendo em conta que os extratos foram obtidos por extração sequencial, é possível que parte dos compostos presentes neste extrato tenham sido previamente identificados nos extratos de éter de petróleo. Os compostos 3, 4, 5 e 6 indicam a presença de clorofilas, uma vez que quando submetidas à radiação UV de 365 nm, estas emitem fluorescência de coloração rosa (Buhian et al., 2017; Filipe, 2020). Assim, de acordo com os resultados obtidos na quantificação de pigmentos realizada no presente trabalho, seria expectável que estes compostos estivessem mais concentrados nas folhas, como observado pela intensidade das bandas. Isto justifica também a visualização de uma menor quantidade e concentração de compostos nos frutos. Por outro lado, as bandas de cor azul, apresentadas pelos compostos 1 e 2, podem revelar a presença de alguns compostos fenólicos (Filipe, 2020), com uma concentração mais elevada nos frutos.

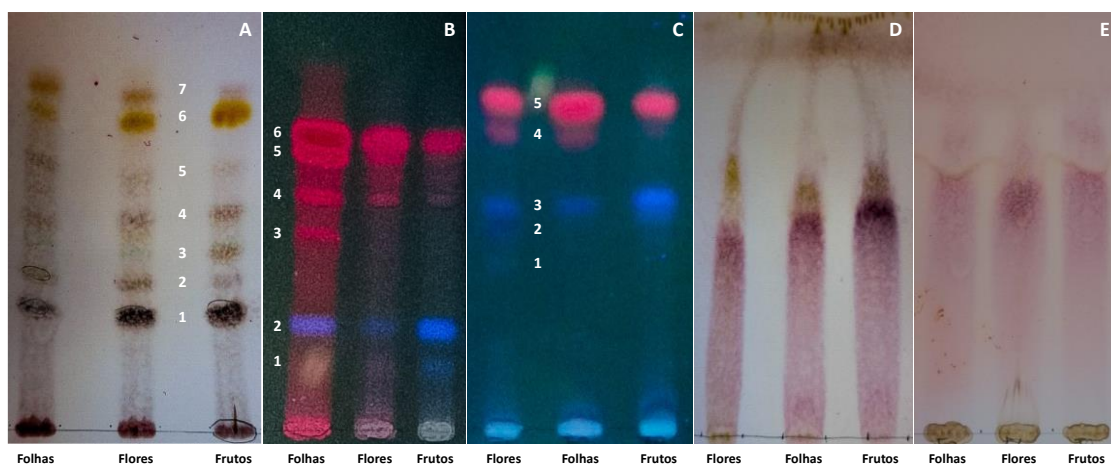


Figura 3.1 - Perfis cromatográficos dos extratos de folhas, flores e frutos, obtidos por cromatografia de camada fina. A) Extratos de éter de petróleo, eluídos com hexano:acetato de etilo (7:3 v/v), após revelação; B) Extratos de acetona, eluídos com hexano:acetato de etilo (5:5 v/v), visualizados a 365 nm; C) Extratos etanólicos, eluídos com acetato de etilo (100% v/v), visualizados a 365 nm; D) Extratos de etanol:água (1:1 v/v), eluídos com diclorometano:metanol (1:1 v/v), após revelação; E) Extratos aquosos, eluídos com metanol (100% v/v), após revelação.

Observando o cromatograma dos extratos etanólicos sob a luz UV de 365 nm (Figura 3.1C), é evidente a presença de cinco compostos. Da mesma forma que nos extratos anteriores, é provável que alguns dos compostos encontrados neste extrato já tenham sido identificados nos extratos de acetona, como é o caso das clorofilas, correspondentes aos compostos 4 e 5, em maior concentração nas folhas. A visualização de bandas azuis exibidas pelos compostos 1, 2 e 3 a este comprimento de onda, sugere claramente a presença de compostos fenólicos (Filipe, 2020). As flores destacam-se por conterem uma maior quantidade destes compostos, tal como seria de esperar após a determinação do conteúdo fenólico total (TPC) realizada neste trabalho, ainda que os compostos 2 e 3 estejam mais concentrados nos frutos. Estes compostos, que possuem grupos aromáticos, são também facilmente detetáveis quando expostos a luz UV de 254 nm (Buhian et al., 2017). No entanto, nestes extratos já se verifica a presença de alguns compostos arrastados próximos da linha de aplicação da amostra.

No caso dos extratos mais polares (etanólico, hidroetanólico e aquoso), como os compostos extraídos são também mais polares, têm muita afinidade para a fase estacionária, não permitindo uma separação tão eficaz, pelo que o ideal teria sido utilizar placas de cromatografia em camada fina de fase reversa (RP-18). Estas placas possuem uma fase estacionária apolar, normalmente de sílica gel modificada com cadeias de 18 carbonos (Gibbons, 2012), comportando-se de forma contrária às placas de sílica gel. Contudo, esta análise não foi possível de realizar devido à indisponibilidade dessas placas no laboratório.

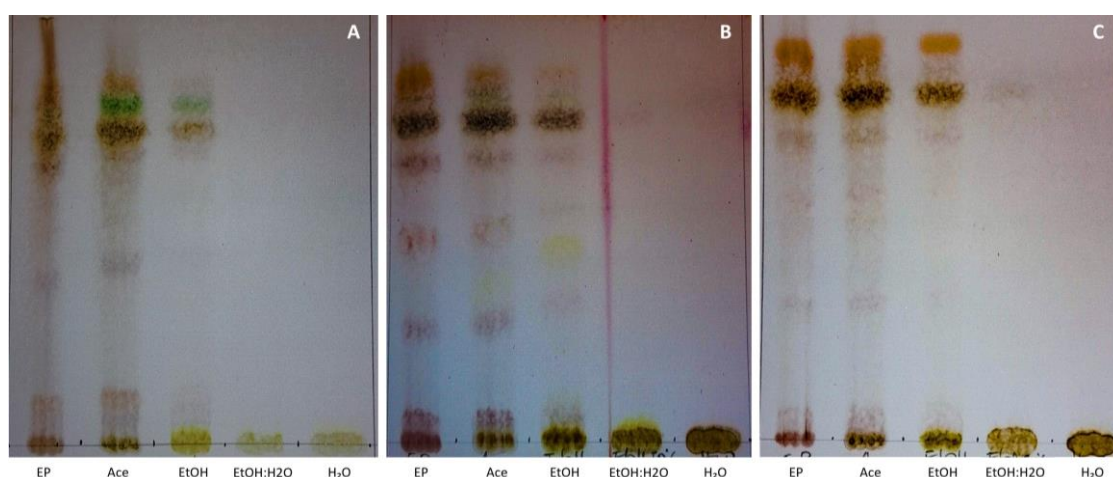


Figura 3.2 - Perfis cromatográficos dos extratos de éter de petróleo (EP), acetona (Ace), etanol (EtOH), etanol:água (1:1) (EtOH:H₂O) e água (H₂O), obtidos por cromatografia de camada fina, utilizando acetato de etilo (100% v/v) como eluente, após revelação. A) Extratos de folhas; B) Extratos de flores; C) Extratos de frutos.

De entre as três regiões da planta, as flores destacaram-se como a região mais diversificada em termos de compostos. Quando comparando os vários extratos da mesma parte da planta (Figura 3.2), verifica-se que através da extração sequencial foi possível retirar o máximo de compostos, sendo que à medida que a polaridade dos extratos aumenta, foram extraídos compostos cada vez mais polares. Porém, devido à especificidade da fase estacionária utilizada e ao eluente escolhido, nos extratos mais polares a maioria dos compostos não migraram na placa e ficaram na zona de aplicação. Além disso, verificou-se que extratos diferentes provenientes da mesma região da planta podem apresentar composições químicas diferentes ou compartilhar a presença de determinados compostos em diferentes concentrações.

3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

Previamente à avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado um ensaio de seleção dos extratos. Este ensaio serve como uma etapa inicial no processo de triagem de extratos, tendo como objetivo reduzir o número de extratos a serem avaliados em ensaios posteriores, concentrando-se nos mais promissores. Foram testadas concentrações finais de extrato a 200 µg/mL para os dois grupos de microrganismos (bactérias e fungos) e ainda a 100 µg/mL para as leveduras. Os extratos de éter de petróleo, acetona e etanol das flores e frutos e o extrato de acetona das folhas originaram uma percentagem de inibição do crescimento microbiano superior ou igual a 30% e foram selecionados para realização de ensaios mais específicos.

3.8.1 Concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas, flores e frutos de *C. maritimum* foi efetuada pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC). Este método envolve a exposição dos microrganismos alvo a diferentes concentrações do extrato em questão, sendo possível determinar a menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados. A seleção dos microrganismos alvo teve em consideração a realização de testes abrangentes, sendo escolhidas quatro bactérias, duas Gram negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e duas Gram positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*),

e quatro fungos, duas leveduras patogénicas (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) e duas leveduras não patogénicas (*K. phaffii* e *S. cerevisiae*).

Analisando os resultados obtidos para a determinação da MIC dos extratos (Tabela 3.7), verifica-se que, embora tenham sido avaliadas várias concentrações de extratos provenientes de diferentes partes da planta, não foi observada nenhuma inibição no crescimento tanto da *E. coli* quanto da *K. pneumoniae*. Dada a impossibilidade de estabelecer a MIC dos extratos para a concentração máxima de extrato testada para estes dois microrganismos, apenas é possível afirmar que a MIC é > 600 µg/mL e que os extratos demonstraram maior eficácia na supressão do crescimento das bactérias Gram-positivas em comparação com as bactérias Gram-negativas avaliadas.

Tabela 3.7 - Concentração mínima inibitória dos extratos (éter de petróleo, acetona e etanol) de folhas, flores e frutos de funcho marinho, expressa em micrograma por mililitro de extrato (µg/mL).

	MIC (µg/mL)						
	Folhas		Flores		Frutos		
	Acetona	Éter de petróleo	Acetona	Etanol	Éter de petróleo	Acetona	Etanol
Bactérias							
<i>E. coli</i>	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600
<i>K. pneumoniae</i>	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600
<i>S. aureus</i>	> 600	75	75	300	75	75	300
<i>S. epidermidis</i>	> 600	150	> 600	300	150	> 600	600
Fungos							
<i>C. albicans</i>	300	150	75	> 600	75	75	600
<i>C. parapsilosis</i>	> 600	300	300	> 600	150	300	> 600
<i>K. phaffii</i>	> 600	600	> 600	> 600	300	300	> 600
<i>S. cerevisiae</i>	> 600	> 600	> 600	> 600	300	600	> 600

A bibliografia já publicada no que diz respeito à planta em estudo, mostra que os extratos aquosos das partes aéreas e os extratos metanólicos das folhas não apresentam atividade contra a *E. coli* (Meot-Duros et al., 2008; Pedreiro et al., 2023), o que sugere que certas frações dos extratos podem não conter componentes antimicrobianos ativos. No entanto, outros autores reportaram uma eficácia notável dos extratos de clorofórmio de folhas, bem como dos extratos obtidos por extração sequencial de biomassa de sementes com n-hexano, diclorometano e metanol, que apresentaram ambos uma MIC de 100 µg/mL contra esta bactéria (Kumarasamy et al., 2002; Meot-Duros et al., 2008). Neste contexto, é interessante observar que o falcarindiol presente no extrato clorofórmico das folhas não foi

responsável pelo potencial antimicrobiano descrito, uma vez que o composto isolado não exibiu inibição do crescimento bacteriano (Meot-Duros et al., 2010). Isto significa que a atividade dos extratos de clorofórmio pode ser atribuída a outros componentes que atuam em conjunto ou que o falcarindiol, isoladamente, não é suficiente para induzir a inibição do crescimento. A divergência na atividade antimicrobiana entre os extratos polares e apolares ressalta a importância de explorar diferentes solventes e técnicas de extração para otimizar a obtenção de compostos ativos. Além disso, Souid et al. (2021) demonstraram que os extratos hidroetanólicos das folhas possuem capacidade de inibir o crescimento da *E. coli*, não tendo sido calculada a MIC. De acordo com os mesmos autores, este extrato pode conter compostos fenólicos, como os ácidos clorogénico e neoclorogénico, que exibem atividade antimicrobiana, o que requer uma investigação mais detalhada e a determinação da MIC para avaliar com precisão a sua eficácia.

A ausência de resultados publicados referentes à avaliação do potencial antibacteriano dos extratos contra *K. pneumoniae* destaca uma lacuna no conhecimento existente e reforça a necessidade de pesquisas futuras.

Relativamente à inibição do crescimento de *S. aureus*, os resultados obtidos quando em contacto com os extratos das flores e dos frutos foram semelhantes. Assim, pode-se observar que para os extratos de éter de petróleo e acetona destas duas partes da planta, uma concentração de extrato de 75 µg/mL é suficiente para inibir o crescimento da bactéria, enquanto para os extratos de etanol das mesmas, é necessária uma concentração quatro vezes superior à anterior (300 µg/mL). Por outro lado, o extrato de acetona das folhas apresentou o pior desempenho, não sendo capaz de inibir o crescimento do microrganismo em nenhuma das concentrações testadas.

Os resultados já publicados demonstram que, à semelhança do verificado para a *E. coli*, extratos mais polares não demonstram atividade inibitória significativa contra a *S. aureus* (Meot-Duros et al., 2008; Pedreiro et al., 2023). Contudo, de acordo com outros autores, os extratos mais apolares também não exibem atividade contra esta bactéria (Kumarasamy et al., 2002; Meot-Duros et al., 2008), o que demonstra que os extratos contêm componentes que afetam de forma diferente os microrganismos, ressaltando a complexidade da ação antimicrobiana. Já os extratos hidroetanólicos das folhas, assim como contra a *E. coli*, também apresentaram a capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* devido à presença dos mesmos compostos (Souid et al., 2021).

Em estudos realizados por outros autores, tanto os extratos de acetona como os extratos de etanol demonstraram maior eficácia contra *S. aureus* do que contra *E. coli* (Jallali et al., 2014; Ozçelik et al., 2004), o que está de acordo com o presente trabalho. No entanto, é importante destacar uma discrepância notável em relação aos extratos de folhas. Enquanto neste trabalho, apenas um extrato apolar das folhas apresentou resultados promissores nos ensaios de seleção, Houta et al. (2011) indicaram que extratos metanólicos de folhas e flores demonstraram atividades semelhantes contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* por meio do método da difusão em discos.

No caso da inibição do crescimento de *S. epidermidis*, os extratos de éter de petróleo das flores e frutos mantêm o mesmo comportamento, com uma MIC de 150 µg/mL. No entanto, enquanto com o extrato etanólico das flores a uma concentração de 300 µg/mL é possível obter a inibição do crescimento da bactéria, com o mesmo extrato dos frutos essa inibição só é conseguida com o dobro da concentração. Os restantes extratos testados não inibiram o crescimento deste microrganismo em qualquer das concentrações avaliadas. Comparando com estudos já publicados, de acordo com Kumarasamy et al. (2002), por meio do método da difusão em discos, o extrato metanólico das folhas demonstrou uma atividade antimicrobiana ligeiramente superior à dos extratos de flores contra *S. epidermidis*. Isto demonstra que a atividade antimicrobiana pode variar dependendo do método de avaliação e das concentrações de extrato utilizadas. Outros autores reportaram ainda que extratos de sementes não demonstraram a capacidade de inibir o crescimento desta bactéria (Houta et al., 2011).

Quanto à inibição do crescimento dos fungos, no geral, verifica-se que os extratos obtidos dos frutos possuem melhor capacidade antifúngica, seguidos dos extratos das flores e por último das folhas. O extrato das folhas, apenas conseguiu inibir o crescimento de *C. albicans*, com uma MIC de 300 µg/mL, superior à obtida com o extrato etanólico dos frutos (600 µg/mL). No entanto, para este microrganismo, os extratos que tiveram maior atividade antimicrobiana foram os de acetona (das flores e dos frutos) e o de éter de petróleo (dos frutos), ambos com uma MIC de 75 µg/mL. Em contrapartida, apenas os extratos de éter de petróleo e acetona das flores e frutos, foram capazes de inibir o crescimento de *C. parapsilosis*, sendo que a MIC mais baixa foi conseguida com o extrato de éter de petróleo dos frutos (150 µg/mL) e os restantes obtiveram o dobro desse valor.

Quando comparando com a bibliografia existente, observa-se uma escassez de trabalhos publicados que se concentram na avaliação da atividade antifúngica de extratos desta planta. Todos os estudos identificados até ao momento tiveram como foco a *C. albicans*, destacando a necessidade de expandir as investigações para outros fungos, a fim de obter uma compreensão abrangente das propriedades antimicrobianas destes extratos. Assim, enquanto alguns autores apontam para atividades semelhantes entre os extratos metanólicos de folhas e flores, quando avaliados pelo método da difusão em discos, a uma concentração de 100 mg/mL (Houta et al., 2011), Meot-Duros et al. (2008) mostraram que extratos metanólicos de folhas, a uma concentração 1000 vezes inferior, não conseguiram inibir o crescimento deste fungo. Isto ressalta a importância da concentração do extrato e do método na determinação da atividade antimicrobiana. No mesmo estudo, os extratos de clorofórmio de folhas apresentaram uma MIC de 10 µg/mL contra *C. albicans*, contudo o faltarindiol presente nesse extrato não foi responsável pelo potencial antimicrobiano descrito, uma vez que o composto isolado não exibiu a capacidade de inibir o crescimento deste fungo (Meot-Duros et al., 2010).

Na inibição dos fungos não patogénicos, a atividade antimicrobiana dos extratos foi bastante menor. Os extratos que apresentaram maior atividade contra *K. phaffii* foram os obtidos dos frutos em éter de petróleo e acetona (com MIC de 300 µg/mL), tendo sido também obtida alguma inibição com o extrato de éter de petróleo das flores (MIC de 600 µg/mL). Porém, apenas os extratos de éter de petróleo e acetona dos frutos conseguiram inibir o crescimento de *S. cerevisiae*, com MIC de 300 e 600 µg/mL, respetivamente.

3.8.2 Concentração mínima bactericida (MBC) e fungicida (MFC)

De forma a completar os resultados obtidos na determinação da concentração mínima inibitória, foi avaliada a eficácia dos extratos na eliminação dos microrganismos. Através da determinação da concentração mínima bactericida (MBC) e da concentração mínima fungicida (MFC), é possível estabelecer qual a menor concentração de extrato que mata 99,9% dos inóculos de bactérias e fungos, respetivamente (Gasu et al., 2018). Isto é importante porque representa não só a capacidade dos extratos em questão de inibir o crescimento, mas também de eliminar completamente os microrganismos.

Os valores obtidos para as MBC e MFC, expressos em micrograma por mililitro de extrato ($\mu\text{g/mL}$), são apresentados na Tabela 3.8. Como seria de esperar, todos os extratos apresentaram MBC superior a $600 \mu\text{g/mL}$ contra *E. coli* e *K. pneumoniae*. Além disso, os extratos etanólicos de flores e frutos também não tiveram atividade contra nenhuma bactéria. Enquanto uma concentração de $150 \mu\text{g/mL}$ dos extratos de éter de petróleo de frutos e acetónico de flores e frutos foi suficiente para levar à eliminação de *S. aureus*, com os extratos acetónico de folhas e éter de petróleo de flores foi necessário o dobro da concentração. Quanto à capacidade de eliminação de *S. epidermidis*, os extratos de éter de petróleo e acetona de flores e frutos tiveram atividades semelhantes, ambos com MBC de $300 \mu\text{g/mL}$. Já o extrato acetónico de folhas demonstrou uma MBC de $600 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 3.8 - Concentração mínima bactericida e concentração mínima fungicida dos extratos (éter de petróleo, acetona e etanol) de folhas, flores e frutos de funcho marinho, expressa em micrograma por mililitro de extrato ($\mu\text{g/mL}$).

	MBC e MFC ($\mu\text{g/mL}$)						
	Folhas		Flores		Frutos		
	Acetona	Éter de petróleo	Acetona	Etanol	Éter de petróleo	Acetona	Etanol
Bactérias							
<i>E. coli</i>	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600
<i>K. pneumoniae</i>	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600	> 600
<i>S. aureus</i>	300	300	150	> 600	150	150	> 600
<i>S. epidermidis</i>	600	300	300	> 600	300	300	> 600
Fungos							
<i>C. albicans</i>	> 600	300	150	> 600	150	150	> 600
<i>C. parapsilosis</i>	> 600	300	300	> 600	300	300	> 600
<i>K. phaffii</i>	600	150	150	> 600	150	150	600
<i>S. cerevisiae</i>	> 600	600	600	> 600	600	300	> 600

Na ausência de estudos que determinassem a concentração mínima bactericida ou fungicida de extratos de *C. maritimum*, quando comparando com outras halófitas (Chekroun-Bechlaghem et al., 2021; Manikandan et al., 2009; Rugaie et al., 2023; Zaier et al., 2022), os resultados obtidos neste trabalho revelaram valores notavelmente inferiores. Esta discrepância sugere uma potencial maior eficácia dos extratos de *C. maritimum*. No entanto, é de notar que os valores obtidos nesses estudos foram principalmente derivados de extratos hidrometanólicos, havendo também alguns que se focaram na concentração mínima bactericida de extratos aquosos e etanólicos, em contraste com o presente trabalho, que se concentrou em extratos mais polares. Além disso, estes autores utilizaram extratos

provenientes de folhas, caules ou da planta como um todo. Estas diferenças nas metodologias de extração, na espécie e na parte da planta analisadas podem contribuir para as disparidades nos resultados observados.

Em relação à determinação da concentração mínima bactericida contra *E. coli*, Zaier et al. (2022) referiram uma MBC superior a 20 mg/mL para extratos hidrometanólicos de *Suaeda fruticosa*. Já Manikandan et al. (2009) investigaram extratos hidrometanólicos de folhas de *Salicornia brachiata*, obtendo uma MBC de 15,4 mg/mL contra o mesmo microrganismo. Estes autores também observaram que os extratos aquosos apresentaram uma MBC ainda menor, indicando uma maior eficácia do extrato aquoso contra esta bactéria em específico. Valores iguais foram reportados pelos mesmos autores contra *K. pneumoniae* (Manikandan et al., 2009; Zaier et al., 2022). Isto destaca a variabilidade nas respostas antimicrobianas dependendo da espécie e solvente de extração utilizados.

No estudo realizado por Rugaie et al. (2023), em que foram avaliadas as concentrações mínima bactericida de extratos etanólicos de três halófitas (*Euphorbia chamaesyce*, *Bassia arábica* e *Haloxylon salicornicum*), os autores determinaram uma variação na MBC de 3,13 a 50 mg/mL contra *S. aureus*, demonstrando o impacto da espécie da planta nos resultados. Curiosamente, outros estudos apontam para valores de MBC mais baixos em extratos hidrometanólicos de *S. fruticosa*, *Tamarix africana* e *S. brachiata*, variando entre 1,25 e > 5 mg/mL (Chekroun-Bechlaghem et al., 2021; Manikandan et al., 2009). Já em extratos aquosos de folhas de *S. brachiata*, Manikandan et al. (2009) reportaram novamente um valor de MBC maior, de 16,7 mg/mL.

À semelhança do que aconteceu nas bactérias, o extrato etanólico de flores não demonstrou capacidade de eliminar nenhum dos fungos avaliados. Já os extratos etanólico de frutos e acetônico de folhas a uma concentração de 600 µg/mL conseguiram eliminar o fungo não patogénico *K. phaffii*. No caso de *C. albicans*, o extrato de éter de petróleo das flores possuiu uma MFC de 300 µg/mL, enquanto os restantes extratos estudados apresentaram uma MFC de 150 µg/mL contra este microrganismo. Mais uma vez, os extratos de éter de petróleo e acetônicos de flores e frutos exibiram eficácias similares contra *C. parapsilosis* e *K. phaffii*, sendo que as MFC contra este último fungo foram metade das obtidas para *C. parapsilosis* (MFC de 300 µg/mL). Por último, os extratos de éter de petróleo e acetona das flores e o extrato de éter de petróleo dos frutos apresentaram uma MFC de 600 µg/mL contra *S. cerevisiae*. Em contrapartida, o extrato de acetona dos frutos demonstrou

uma MFC mais baixa, de 300 µg/mL, indicando uma maior eficácia na eliminação de *S. cerevisiae* em comparação com os outros extratos testados.

O estudo de Chekroun-Bechlaghem et al. (2021) avaliou a concentração mínima fungicida de extratos hidrometanólicos de folhas e caules de duas halófitas (*S. fruticosa* e *T. africana*). Os resultados mostraram que, comparativamente com os extratos de *C. maritimum* analisados no presente trabalho, os dois extratos hidrometanólicos destas plantas possuíram maiores MFC (de 1,25 a > 5,00 mg/mL) contra *C. albicans*. Isto seria de esperar uma vez que os extratos mais polares estudados neste trabalho não passaram na fase dos ensaios de seleção, logo teriam também uma atividade mais fraca.

Os resultados obtidos nestes parâmetros para a espécie em estudo desempenham um papel crucial ao preencher uma lacuna no conhecimento já existente. Esta avaliação revela-se particularmente significativa, considerando a escassez de informações específicas para *C. maritimum*. Vale ressaltar que a heterogeneidade nos resultados encontrados em estudos publicados sobre estes temas é atribuível não apenas à diversidade de métodos utilizados, mas também à variação nas espécies estudadas e nas partes específicas das plantas utilizadas. Além disso, é importante destacar que a maioria dos estudos existentes se foca num conjunto limitado de bactérias e fungos, indicando a necessidade de mais pesquisas abrangentes que abordem uma gama mais ampla de microrganismos.

3.8.3 Capacidade microbiostática e microbicida

As relações MBC/MIC e MFC/MIC são parâmetros importantes na caracterização da atividade antimicrobiana dos extratos. Uma relação MBC/MIC com um valor inferior ou igual a 2 geralmente sugere um efeito bactericida, indicando que o extrato não apenas inibe o crescimento, mas também mata eficientemente as bactérias. Por outro lado, uma razão MBC/MIC superior ou igual a 4 sugere um efeito bacteriostático, indicando que o extrato inibe o crescimento e multiplicação do microrganismo, mas não leva à morte das bactérias (Gasu et al., 2018). O mesmo se aplica aos fungos, sendo que uma razão MFC/MIC inferior ou igual a 2 indica um efeito fungicida e uma razão MFC/MIC superior ou igual a 4 está relacionada com um efeito fungistático.

As razões MBC/MIC e MFC/MIC, estão presentes na Tabela 3.9. A partir da relação MBC/MIC, não foi possível determinar o tipo de efeito dos extratos contra *E. coli* e *K.*

pneumoniae, assim como o efeito dos extratos etanólicos contra as restantes bactérias. Por outro lado, verificou-se que os demais extratos de folhas, flores e frutos têm um efeito bactericida contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, com exceção do extrato de éter de petróleo de flores, que demonstrou um efeito bacteriostático.

Tabela 3.9 - Relação entre a concentração mínima bactericida e concentração mínima inibitória e relação entre a concentração mínima fungicida e concentração mínima inibitória dos extratos (éter de petróleo, acetona e etanol) de folhas, flores e frutos de *Crithmum maritimum* L.

	MBC/MIC e MFC/MIC						
	Folhas		Flores			Frutos	
	Acetona	Éter de petróleo	Acetona	Etanol	Éter de petróleo	Acetona	Etanol
Bactérias							
<i>E. coli</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>K. pneumoniae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i>	≤ 2	≥ 4	≤ 2	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.
<i>S. epidermidis</i>	≤ 2	≤ 2	≤ 2	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.
Fungos							
<i>C. albicans</i>	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.
<i>C. parapsilosis</i>	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.
<i>K. phaffii</i>	≤ 2	≤ 2	≤ 2	n.d.	≤ 2	≤ 2	≤ 2
<i>S. cerevisiae</i>	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.	≤ 2	≤ 2	n.d.

Nota. n.d. – não determinado.

Em relação aos dados referentes à capacidade microbiostática e microbicida de *C. maritimum*, é importante destacar a falta de resultados disponíveis na literatura até ao momento. A ausência de informações sobre este parâmetro para esta halófito não surpreende, considerando que a determinação dos efeitos dos extratos tem por base as concentrações mínimas bactericida ou fungicida, para as quais já se verificou uma ausência de bibliografia. Contudo, tendo em consideração os estudos que determinaram a concentração mínima bactericida e fungicida de extratos de outras halófitas, é possível estabelecer uma comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

Nos estudos realizados por Zaier et al. (2022) e Manikandan et al. (2009), não foi possível identificar os efeitos de extratos hidrometanólicos de *S. fruticosa* e de extratos hidrometanólicos e aquosos de *S. brachiata* contra *E. coli* e *K. pneumoniae*, tal como no presente trabalho. Já Chekroun-Bechlaghem et al. (2021), reportaram o efeito bactericida de extratos hidrometanólicos de folhas de *S. fruticosa* e *T. africana* contra *S. aureus*, no entanto, não foi possível determinar o efeito dos extratos de caules dessas plantas nesta bactéria. Também no trabalho realizado por Manikandan et al. (2009), a determinação do efeito de

extratos hidrometanólicos e aquosos de *S. brachiata* contra *S. aureus* não foi alcançada. Por outro lado, em Rugaie et al. (2023), os autores demonstraram o efeito bactericida de extratos etanólicos de três halófitas contra *S. aureus*.

Com base na relação MFC/MIC, foi possível verificar que os extratos de éter de petróleo e acetona de flores e frutos foram fungicidas contra todos os fungos testados. O mesmo foi observado para os extratos acetónico das folhas e etanólico dos frutos contra *K. phaffii*. Já os efeitos dos extratos etanólicos e do extrato de acetona das folhas nos restantes microrganismos não foram determinados. Chekroun-Bechlaghem et al. (2021) evidenciaram a capacidade fungicida de extratos mais polares (hidrometanólicos) obtidos das folhas e caules de *S. fruticosa*, bem como das folhas de *T. africana*, contra *C. albicans*.

Considerando o potencial antimicrobiano obtido no presente trabalho, esta halófitas apresenta características promissoras para investigações mais aprofundadas nesta área, seja através de outros métodos de análise que possam complementar e enriquecer os resultados obtidos, ou explorando a eficácia contra outros microrganismos que não foram abordados neste estudo. Contudo, os resultados obtidos revelaram propriedades antimicrobianas significativas, indicando a capacidade do funcho-do-mar em inibir o crescimento de microrganismos e eliminar os mesmos. Esta competência assume grande relevância na preservação da qualidade e segurança de produtos alimentares e cosméticos, sugerindo a sua possível utilização como agente conservante natural, bem como na medicina tradicional, conforme destacado pelo seu uso na formulação de produtos alimentares (Alemán et al., 2019; Sousa et al., 2022) e na promoção da regeneração da pele (Caucanas et al., 2011).

4. Conclusão e Perspetivas futuras

Os resultados alcançados no presente trabalho evidenciam o notável potencial biotecnológico de *Crithmum maritimum*. Este estudo desempenhou um papel fundamental ao abordar uma lacuna no conhecimento existente sobre esta espécie, utilizando biomassa proveniente de diversas partes da planta. A análise da composição nutricional revela diferenças relevantes entre as três partes da planta. Enquanto as folhas demonstram elevado teor de humidade e matéria inorgânica, as flores destacam-se pela sua quantidade de proteína e hidratos de carbono, e os frutos exibem maior concentração de lípidos. Além disso, a análise do perfil de ácidos gordos evidencia também variações entre as partes. As folhas e flores apresentam teores mais elevados de ácidos gordos polinsaturados, especialmente ácido linoleico, já os frutos destacam-se pelo teor de ácidos gordos monoinsaturados, principalmente ácido oleico. Ambas as composições da biomassa destas partes da planta confirmam o seu potencial para aplicações na indústria alimentar.

No que concerne à quantificação de pigmentos, as folhas revelam uma concentração superior tanto de clorofilas, como de carotenoides. Além disso, todas as partes da planta exibiram potencial antioxidante, sendo os extratos etanólicos e hidroetanólicos os mais destacados, sobretudo das flores. Essa tendência foi confirmada ao avaliar o conteúdo fenólico total, evidenciando a relação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. A extração sequencial de diferentes partes da planta permitiu obter extratos com composições químicas variadas, influenciadas pela polaridade dos solventes. Extratos da mesma parte da planta apresentaram diferenças e semelhanças na presença e concentração de compostos. Entre as três partes analisadas, as flores sobressaem pela sua notável diversidade de compostos.

Neste estudo, as diversas partes da planta, especialmente as flores e os frutos, revelaram um potencial antimicrobiano considerável contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *K. phaffii* e *S. cerevisiae*. No entanto, não foi observado qualquer efeito inibitório sobre *E. coli* e *K. pneumoniae*. Estes resultados sublinham a potencial aplicação desta halófita nas indústrias alimentar e cosmética, sugerindo o seu uso como conservante natural.

Este trabalho revelou informações valiosas sobre as folhas, flores e frutos da halófita *C. maritimum*, preenchendo algumas lacunas existentes no seu conhecimento. Nesse sentido,

torna-se evidente que a biomassa desta halófito não está a ser totalmente valorizada. Considerando a capacidade de *C. maritimum* de crescer em ambientes salinos, o seu cultivo e exploração poderiam trazer benefícios tanto para a indústria, na procura por novas aplicações, quanto para o meio ambiente, contribuindo para a recuperação de terras degradadas pela salinidade. Apesar disso, há ainda uma considerável quantidade de pesquisa a ser realizada para caracterizar adequadamente estas partes da planta.

No futuro, seria importante proceder a uma análise nutricional mais específica, abordando a quantificação da fibra, assim como o teor de hidratos de carbono que neste trabalho foi determinado por diferença. Outro passo importante a ser considerado, seria a exploração de novas técnicas de extração da biomassa, otimizando o processo em termos de rendimento. Ressalta-se ainda a importância de realizar testes antimicrobianos adicionais, ampliando a variedade de espécies testadas e aplicando outras técnicas de análise, para uma avaliação mais abrangente. Além disso, identificar e isolar compostos de interesse presentes nos extratos mais promissores também seria de grande relevância para explorar todo o potencial das propriedades desta planta.

5. Referências bibliográficas

- Alemán, A., Marín, D., Taladrid, D., Montero, P., & Carmen Gómez-Guillén, M. (2019). Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes. *Food Research International*, 119, 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.044>
- Amiri, M. S., & Joharchi, M. R. (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(6), 621–635. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078243>
- Araus, J. L., Rezzouk, F. Z., Thushar, S., Shahid, M., Elouafi, I. A., Bort, J., & Serret, M. D. (2021). Effect of irrigation salinity and ecotype on the growth, physiological indicators and seed yield and quality of *Salicornia europaea*. *Plant Science*, 304(January), 110819. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110819>
- Arendrup, M. C., Meletiadis, J., Mouton, J. W., Lagrou, K., Hamal, P., & Guinea, J. (2020). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. In *Czech Republic*, *H Järv* (Vol. 12, Issue 3). Scientific Data

Coordinator. <https://pt.scribd.com/document/565816073/EUCAST-E-Def-7-3-2-Yeast-Testing-Definitive-Revised-2020>

- Aslam, R., Bostan, N., Nabgha-e-Amen, Maria, M., & Safdar, W. (2011). A critical review on halophytes: Salt tolerant plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), 7108–7118. <https://doi.org/10.5897/JMPRX11.009>
- Atia, A., Barhoumi, Z., Mokded, R., Abdelly, C., & Smaoui, A. (2011). Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3564–3571. <https://doi.org/https://doi.org/10.5897/JMPR.9000569>
- Attia-Ismail, S. A. (2015). Nutritional and Feed Value of Halophytes and Salt Tolerant Plants. Em H. M. El Shaer & V. R. Squires (Eds.), *Halophytic and Salt-Tolerant Feedstuffs, Impacts on Nutrition, Physiology and Reproduction of Livestock* (1.^a ed., pp. 106–126). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19862>
- Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmaceli, N., & Zhang, H. (2023). Plants' Response Mechanisms to Salinity Stress. *Plants*, 12(12), 2253. <https://doi.org/10.3390/plants12122253>
- Barreira, L., Resek, E., Rodrigues, M. J., Rocha, M. I., Pereira, H., Bandarra, N., da Silva, M. M., Varela, J., & Custódio, L. (2017). Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits? *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.003>
- Bele, A. A., & Khale, A. (2011). An overview on thin layer chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 256–267. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(2\).256-67](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(2).256-67)
- Hamed, K. Ben, & Custódio, L. (2019). How Could Halophytes Provide a Sustainable Alternative to Achieve Food Security in Marginal Lands? Em *Ecophysiology, Abiotic Stress Responses and Utilization of Halophytes* (pp. 259–270). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3762-8_12
- Branco, J., Miranda, I. M., & Rodrigues, A. G. (2023). Candida parapsilosis Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. *Journal of Fungi*, 9(1), 80. <https://doi.org/10.3390/jof9010080>

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Buhian, W. P. C., Rubio, R. O., & Martin-Puzon, J. J. (2017). Chromatographic fingerprinting and free-radical scavenging activity of ethanol extracts of *Muntingia calabura* L. leaves and stems. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.016>
- Buhmann, A., & Papenbrock, J. (2013). An economic point of view of secondary compounds in halophytes. *Functional Plant Biology*, 40(9), 952. <https://doi.org/10.1071/FP12342>
- Campana, R., Tiboni, M., Maggi, F., Cappellacci, L., Cianfaglione, K., Morshedloo, M. R., Frangipani, E., & Casettari, L. (2022). Comparative Analysis of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Formulated Microemulsions against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria. *Antibiotics*, 11(4), 447. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040447>
- Caparrós, P. G., Ozturk, M., Gul, A., Batool, T. S., Pirasteh-Anosheh, H., Unal, B. T., Altay, V., & Toderich, K. N. (2022). Halophytes have potential as heavy metal phytoremediators: A comprehensive review. *Environmental and Experimental Botany*, 193, 104666. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104666>
- Carcione, D., Leccese, G., Conte, G., Rossi, E., Intra, J., Bonomi, A., Sabella, S., Moreo, M., Landini, P., Brilli, M., & Paroni, M. (2022). Lack of Direct Correlation between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Clinical *Staphylococcus epidermidis* Isolates from an Italian Hospital. *Microorganisms*, 10(6), 1163. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061163>
- Caucanas, M., Montastier, C., Piérard, G. E., & Quatresooz, P. (2011). Dynamics of skin barrier repair following preconditioning by a biotechnology-driven extract from samphire (*Crithmum maritimum*) stem cells. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 10(4), 288–293. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2011.00584.x>
- Chekroun-Bechlaghem, N., Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Mansour, S., Djebli, N., Bouakline, H., Gismondi, A., Nanni, V., Di Marco, G., Canuti, L., Canini, A., & Atik-Bekkara, F. (2021). Antimicrobial and anti-inflammatory activities of three halophyte plants from Algeria and detection of some biomolecules by HPLC-DAD. *Natural Product Research*, 35(12), 2107–2111. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1655413>

- Ciccarelli, D., Picciarelli, P., Bedini, G., & Sorce, C. (2016). Mediterranean sea cliff plants: morphological and physiological responses to environmental conditions. *Journal of Plant Ecology*, 9(2), 153–164. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtv042>
- Coiffard, L., Alliot, A., & Piron-Frenet, M. (1992). Seasonal and geographical adaptation of *Crithmum maritimum* L.: Variations in inorganic content. *Ecology of Food and Nutrition*, 28(4), 261–269. <https://doi.org/10.1080/03670244.1992.9991279>
- Díaz, F. J., Benes, S. E., & Grattan, S. R. (2013). Field performance of halophytic species under irrigation with saline drainage water in the San Joaquin Valley of California. *Agricultural Water Management*, 118, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.11.017>
- Dyall, S. C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00052>
- EUCAST. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), ix–xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., & Tasdemir, D. (2015). Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food Chemistry*, 177, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.062>
- Ferreira, M. J., Pinto, D. C. G. A., Cunha, Â., & Silva, H. (2022). Halophytes as Medicinal Plants against Human Infectious Diseases. *Applied Sciences*, 12(15), 7493. <https://doi.org/10.3390/app12157493>
- Filipe, M. A. dos S. (2020). Isolamento e atividade biológica de espécies do género *Plectranthus* [Dissertação de Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias]. <http://hdl.handle.net/10437/11850>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Gasu, E. N., Ahor, H. S., & Borquaye, L. S. (2018). Peptide extract from *Olivancillaria hiatula* exhibits broad-spectrum antibacterial activity. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6010572>

- Gibbons, S. (2012). An Introduction to Planar Chromatography and Its Application to Natural Products Isolation. Em *Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, pp. 117–153). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_6
- Gille, E., Macovei, I., & Miron, A. (2022). Essential oils and their components as sensitizers of multidrug resistant bacteria. Em P. K. Mukherjee (Ed.), *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (2nd ed., pp. 797–810). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85542-6.00030-5>
- Giungato, P., Renna, M., Rana, R., Licen, S., & Barbieri, P. (2019). Characterization of dried and freeze-dried sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) samples with headspace gas-chromatography/mass spectrometry and evaluation of an electronic nose discrimination potential. *Food Research International*, 115, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.067>
- Gnocchi, D., Cesari, G., Calabrese, G. J., Capone, R., Sabbà, C., & Mazzocca, A. (2020). Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Growth by Ethyl Acetate Extracts of Apulian *Brassica oleracea* L. and *Crithmum maritimum* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(1), 33–40. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00781-3>
- Grigoriadou, K., & Maloupa, E. (2008). Micropropagation and salt tolerance of in vitro grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(2), 209–217. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9406-9>
- Guil, J. L., Torija, M. E., Giménez, J. J., & Rodríguez, I. (1996). Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 719(1), 229–235. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00414-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00414-9)
- Guil-Guerrero, J. L., & Rodríguez-García, I. (1999). Lipids classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants. *European Food Research and Technology*, 209(5), 313–316. <https://doi.org/10.1007/s002170050501>
- Hamed, K. Ben, Debez, A., Chibani, F., & Abdelly, C. (2004). Salt response of *Crithmum maritimum*, an oleagineous halophyte. *Tropical Ecology*, 45(1), 151–159. <https://www.researchgate.net/publication/237305590>
- Houta, O., Akrou, A., Neffati, M., & Amri, H. (2011). Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia Arid Zones. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1(2), 138–143. <https://doi.org/10.1080/22311866.2011.10719081>

- Hulkko, L. S. S., Chaturvedi, T., Custódio, L., & Thomsen, M. H. (2023). Harnessing the Value of *Tripolium pannonicum* and *Crithmum maritimum* Halophyte Biomass through Integrated Green Biorefinery. *Marine Drugs*, 21(7), 380. <https://doi.org/10.3390/md21070380>
- Jallali, I., Megdiche, W., M'Hamdi, B., Oueslati, S., Smaoui, A., Abdelly, C., & Ksouri, R. (2012). Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4), 1451–1459. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0943-9>
- Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdelly, C., & Ksouri, R. (2014). Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry*, 145, 1031–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.034>
- Kadoglidou, K., Irakli, M., Boutsika, A., Mellidou, I., Maninis, N., Sarrou, E., Georgiadou, V., Tourvas, N., Krigas, N., Moysiadis, T., Grigoriadou, K., Maloupa, E., Xanthopoulou, A., & Ganopoulos, I. (2022). Metabolomic Fingerprinting and Molecular Characterization of the Rock Sapphire Germplasm Collection from the Balkan Botanic Garden of Kroussia, Northern Greece. *Plants*, 11(4), 573. <https://doi.org/10.3390/plants11040573>
- Khondoker, M., Mandal, S., Gurav, R., & Hwang, S. (2023). Freshwater Shortage, Salinity Increase, and Global Food Production: A Need for Sustainable Irrigation Water Desalination—A Scoping Review. *Earth*, 4(2), 223–240. <https://doi.org/10.3390/earth4020012>
- Kim, H. U. (2020). Lipid Metabolism in Plants. *Plants*, 9(7), 871. <https://doi.org/10.3390/plants9070871>
- Kim, S.-K., Ravichandran, Y. D., Khan, S. B., & Kim, Y. T. (2008). Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0113-5>
- Knees, S. G. (2003). *Crithmum*. Em G. N. Feliner, S. L. Jury, & A. Herrero (Eds.), *Flora iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares: Vol. X* (pp. 195–197). Real Jardín Botánico.
- Konan, K. V., Le Tien, C., & Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Analytical Methods*, 8(28), 5638–5644. <https://doi.org/10.1039/C6AY01088A>

- Kraouia, M., Nartea, A., Maoloni, A., Osimani, A., Garofalo, C., Fanesi, B., Ismaiel, L., Aquilanti, L., & Pacetti, D. (2023). Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as an Emerging Crop for the Manufacturing of Innovative Foods and Nutraceuticals. *Molecules*, 28(12), 4741. <https://doi.org/10.3390/molecules28124741>
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., & Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(11), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.024>
- Kumarasamy, Y., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2002). Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1–2), 73–77. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00214-3)
- Latimer, G. W. , Jr. (Ed.). (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th ed.). AOAC International.
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Litalien, A., & Zeeb, B. (2020). Curing the earth: A review of anthropogenic soil salinization and plant-based strategies for sustainable mitigation. *Science of The Total Environment*, 698, 134235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134235>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lopes, M., Sanches-Silva, A., Castilho, M., Cavaleiro, C., & Ramos, F. (2023). Halophytes as source of bioactive phenolic compounds and their potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(8), 1078–1101. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1959295>
- Lu, J., Xu, Y., Wang, J., Singer, S. D., & Chen, G. (2020). The Role of Triacylglycerol in Plant Stress Response. *Plants*, 9(4), 472. <https://doi.org/10.3390/plants9040472>
- Machado, A. M., Lopes, V., Barata, A. M., Póvoa, O., Farinha, N., & Figueiredo, A. C. (2023). Chemical Variability of the Essential Oils from Two Portuguese Apiaceae: *Coriandrum*

- sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Mill. *Plants*, 12(14), 2749. <https://doi.org/10.3390/plants12142749>
- Manikandan, T., Neelakandan, T., & Usha Rani, G. (2009). Antibacterial Activity of *Salicornia brachiata*, A Halophyte. *Journal of Phytology*, 1(6), 441–443. www.journal-phytology.com
- Maoloni, A., Cardinali, F., Milanović, V., Garofalo, C., Osimani, A., Mozzon, M., & Aquilanti, L. (2022). Microbiological safety and stability of novel green sauces made with sea fennel (*Crithmum maritimum* L.). *Food Research International*, 157, 111463. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111463>
- Maoloni, A., Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Verdenelli, M. C., Coman, M. M., & Aquilanti, L. (2022). Exploratory Study for Probiotic Enrichment of a Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) Preserve in Brine. *Foods*, 11(15), 2219. <https://doi.org/10.3390/foods11152219>
- Maoloni, A., Milanović, V., Osimani, A., Cardinali, F., Garofalo, C., Belleggia, L., Foligni, R., Mannozi, C., Mozzon, M., Cirlini, M., Spaggiari, M., Reale, A., Boscaino, F., Di Renzo, T., Haouet, M. N., Staccini, B., Di Bella, S., & Aquilanti, L. (2021). Exploitation of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) for manufacturing of novel high-value fermented preserves. *Food and Bioprocess Processing*, 127, 174–197. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.03.001>
- Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2007). Isolation of *Crithmum maritimum* L. volatile oil by supercritical carbon dioxide extraction and biological assays. *Natural Product Research*, 21(13), 1145–1150. <https://doi.org/10.1080/14786410600911616>
- Martins-Noguerol, R., Matías, L., Pérez-Ramos, I. M., Moreira, X., Francisco, M., Pedroche, J., DeAndrés-Gil, C., Gutiérrez, E., Salas, J. J., Moreno-Pérez, A. J., Davy, A. J., Muñoz-Vallés, S., Figueroa, M. E., & Cambrollé, J. (2023). Soil physicochemical properties associated with the yield and phytochemical composition of the edible halophyte *Crithmum maritimum*. *Science of The Total Environment*, 869, 161806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161806>
- Martins-Noguerol, R., Matías, L., Pérez-Ramos, I. M., Moreira, X., Muñoz-Vallés, S., Mancilla-Leytón, J. M., Francisco, M., García-González, A., DeAndrés-Gil, C., Martínez-Force, E., Millán-Linares, M. del C., Pedroche, J., Figueroa, M. E., Moreno-Pérez, A. J.,

- & Cambrollé, J. (2022). Differences in nutrient composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) grown in different habitats and optimally controlled growing conditions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106(July 2021), 104266. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104266>
- Mastropietro, G., Aw, R., & Polizzi, K. M. (2021). Expression of proteins in *Pichia pastoris*. Em W. B. O'Dell & Z. Kelman (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 660, pp. 53–80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.07.004>
- Mekinić, I. G., Blažević, I., Mudnić, I., Burčul, F., Grga, M., Skroza, D., Jerčić, I., Ljubenković, I., Boban, M., Miloš, M., & Katalinić, V. (2016). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7), 3104–3112. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2283-z>
- Meng, X., Zhou, J., & Sui, N. (2018). Mechanisms of salt tolerance in halophytes: current understanding and recent advances. *Open Life Sciences*, 13(1), 149–154. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0020>
- Meot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Le Meur, C., Le Floch, G., & Magné, C. (2010). New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.031>
- Meot-Duros, L., Le Floch, G., & Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.024>
- Meot-Duros, L., & Magné, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.006>
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, 78(8), 1477–1491. <https://doi.org/10.1351/pac200678081477>
- Mustapha, M. Ben, Zardi-Bergaoui, A., Chaieb, I., Flamini, G., Ascrizzi, R., & Jannet, H. Ben. (2020). Chemical Composition and Insecticidal Activity of *Crithmum maritimum* L. Essential Oil against Stored-Product Beetle *Tribolium castaneum*. *Chemistry & Biodiversity*, 17(3). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900552>

- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burló, F., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á. A., Madani, K., & Larbat, R. (2017). Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1843–1855. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1222541>
- Neves, M., Antunes, M., Fernandes, W., Campos, M. J., Azevedo, Z. M., Freitas, V., Rocha, J. M., & Tecelão, C. (2021). Physicochemical and nutritional profile of leaves, flowers, and fruits of the edible halophyte chorão-da-praia (*Carpobrotus edulis*) on Portuguese west shores. *Food Bioscience*, 43, 101288. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101288>
- Neves, M., Miranda, A., Lemos, M. F. L., Silva, S., & Tecelão, C. (2020). Enhancing oxidative stability of sunflower oil by supplementation with prickled broom (*Pterospartum tridentatum*) ethanolic extract. *Journal of Food Science*, 85(9), 2812–2821. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15378>
- Nguir, A., Besbes, M., Ben Jannet, H., Flamini, G., Harzallah-Skhiri, F., & Hamza, M. A. (2011). Chemical Composition, Antioxidant and Anti-acetylcholinesterase activities of Tunisian *Crithmum maritimum* L. Essential oils. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 1(4), 173–179. <https://doi.org/10.13171/mjc.1.4.2011.03.12.23>
- Nikalje, G. C., Bhaskar, S. D., Yadav, K., & Penna, S. (2019). Halophytes: Prospective Plants for Future. Em *Ecophysiology, Abiotic Stress Responses and Utilization of Halophytes* (pp. 221–234). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3762-8_10
- Oliveira-Alves, S. C., Andrade, F., Sousa, J., Bento-Silva, A., Duarte, B., Caçador, I., Salazar, M., Mecha, E., Serra, A. T., & Bronze, M. R. (2023). Soilless Cultivated Halophyte Plants: Volatile, Nutritional, Phytochemical, and Biological Differences. *Antioxidants*, 12(6), 1161. <https://doi.org/10.3390/antiox12061161>
- Ozçelik, B., Kusmenoglu, Ş., Turkoz, S., & Abbasoglu, U. (2004). Antimicrobial Activities of Plants from the Apicaceae. *Pharmaceutical Biology*, 42(7), 526–528. <https://doi.org/10.3109/13880200490893311>
- Patarra, A. R. F. (2008). *Pesquisa de Ácidos Gordos em Macroalgas Marinhas do litoral dos Açores*. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos, especialidade em Biologia Marinha. Porto.

- Pateira, L., Nogueira, T., Antunes, A., Venâncio, F., Tavares, R., & Capelo, J. (1999). Two chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, *14*(5), 333–343. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<333::AID-FFJ839>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<333::AID-FFJ839>3.0.CO;2-V)
- Patel, M. K., Pandey, S., Brahmhatt, H. R., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Lipid content and fatty acid profile of selected halophytic plants reveal a promising source of renewable energy. *Biomass and Bioenergy*, *124*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.03.007>
- Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Cianfaglione, K., Dauvergne, X., Bruno, M., & Benelli, G. (2017). Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Industrial Crops and Products*, *109*, 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.013>
- Pedreiro, S., Figueirinha, A., Cavaleiro, C., Cardoso, O., Donato, M. M., Salgueiro, L., & Ramos, F. (2023). Exploiting the *Crithmum maritimum* L. Aqueous Extracts and Essential Oil as Potential Preservatives in Food, Feed, Pharmaceutical and Cosmetic Industries. *Antioxidants*, *12*(2), 252. <https://doi.org/10.3390/antiox12020252>
- Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Jimenez-Lopez, C., Lourenço-Lopes, C., Carpena, M., Otero, P., Gullón, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Culinary and nutritional value of edible wild plants from northern Spain rich in phenolic compounds with potential health benefits. *Food & Function*, *11*(10), 8493–8515. <https://doi.org/10.1039/D0FO02147D>
- Pereira, C. G., Barreira, L., da Rosa Neng, N., Nogueira, J. M. F., Marques, C., Santos, T. F., Varela, J., & Custódio, L. (2017). Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food and Chemical Toxicology*, *107*, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.018>
- Pereira, C. G., Neng, N. R., & Custódio, L. (2023). From Threat to Opportunity: Harnessing the Invasive *Carpobrotus edulis* (L.) N.E.Br for Nutritional and Phytotherapeutic Valorization Amid Seasonal and Spatial Variability. *Marine Drugs*, *21*(8), 436. <https://doi.org/10.3390/md21080436>

- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*, *11*(2), 344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Polatoğlu, K., Karakoç, Ö. C., Yücel Yücel, Y., Gücel, S., Demirci, B., Başer, K. H. C., & Demirci, F. (2016). Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against Coleopteran and Lepidopteran insects. *Industrial Crops and Products*, *89*, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.032>
- Politeo, O., Popović, M., Veršić Bratinčević, M., Kovačević, K., Urlić, B., & Generalić Mekinić, I. (2023). Chemical Profiling of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) Essential Oils and Their Isolation Residual Waste-Waters. *Plants*, *12*(1), 214. <https://doi.org/10.3390/plants12010214>
- Primitivo, M. J., Neves, M., Pires, C. L., Cruz, P. F., Brito, C., Rodrigues, A. C., de Carvalho, C. C. C. R., Mortimer, M. M., Moreno, M. J., Brito, R. M. M., Taylor, E. J., Millson, S. H., Reboredo, F., Jorge Campos, M., Vaz, D. C., & Ribeiro, V. S. (2022). Edible flowers of *Helichrysum italicum*: Composition, nutritive value, and bioactivities. *Food Research International*, *157*(February), 111399. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111399>
- Raghavan, V., Aquadro, C. F., & Alani, E. (2019). Baker's Yeast Clinical Isolates Provide a Model for How Pathogenic Yeasts Adapt to Stress. *Trends in Genetics*, *35*(11), 804–817. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.08.002>
- Renna, M. (2018). Reviewing the Prospects of Sea Fennel (*Crithmum maritimum* L.) as Emerging Vegetable Crop. *Plants*, *7*(4), 92. <https://doi.org/10.3390/plants7040092>
- Renna, M., & Gonnella, M. (2012). The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *1*(2), 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2013.06.004>
- Renna, M., Gonnella, M., Caretto, S., Mita, G., & Serio, F. (2017). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): from underutilized crop to new dried product for food use. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*(1), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0472-2>
- Rodríguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., Donnelly, J. P., Dupont, B., Fegeler, W., Moore, C., Richardson, M., & Verweij, P. E. (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration

- (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), i–viii. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00789.x>
- Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 1829–1842.
- Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., Sousa De Brito, E., Maia De Morais, S., de Goes Sampaio, C., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Embrapa Agroindústria Tropical. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf
- Rugaie, O. Al, Mohammed, H. A., Alsamani, S., Messaoudi, S., Aroua, L. M., Khan, R. A., Almahmoud, S. A., Altaieb, A. D., Alsharidah, M., Aldubaib, M., Al-Regaiey, K. A., & Qureshi, K. A. (2023). Antimicrobial, Antibiofilm, and Antioxidant Potentials of Four Halophytic Plants, *Euphorbia chamaesyce*, *Bassia arabica*, *Fagonia mollis*, and *Haloxylon salicornicum*, Growing in Qassim Region of Saudi Arabia: Phytochemical Profile and In Vitro and In Silico Bioactivity Investigations. *Antibiotics*, 12(3), 501. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030501>
- Salam, Md. A., Al-Amin, Md. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*, 11(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
- Sanadhya, P., Agarwal, P., & Agarwal, P. K. (2015). Ion homeostasis in a salt-secreting halophytic grass. *AoB Plants*, 7(1), plv055. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv055>
- Sánchez-Faure, A., Calvo, M. M., Pérez-Jiménez, J., Martín-Diana, A. B., Rico, D., Montero, M. P., Gómez-Guillén, M. del C., López-Caballero, M. E., & Martínez-Alvarez, O. (2020). Exploring the potential of common iceplant, seaside arrowgrass and sea fennel as edible halophytic plants. *Food Research International*, 137(April), 109613. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109613>
- Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin Layer Chromatography. Em *Methods in Enzymology* (Vol. 533, pp. 303–324). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural

- antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 109, 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.027>
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506–516. <https://doi.org/10.3945/an.112.002154>
- Soud, A., Croce, C. M. Della, Pozzo, L., Ciardi, M., Giorgetti, L., Gervasi, P. G., Abdelly, C., Magné, C., Hamed, K. Ben, & Longo, V. (2020). Antioxidant properties and hepatoprotective effect of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *European Food Research and Technology*, 246(7), 1393–1403. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03498-9>
- Soud, A., Della Croce, C. M., Frassinetti, S., Gabriele, M., Pozzo, L., Ciardi, M., Abdelly, C., Hamed, K. Ben, Magné, C., & Longo, V. (2021). Nutraceutical Potential of Leaf Hydro-Ethanollic Extract of the Edible Halophyte *Crithmum maritimum* L. *Molecules*, 26(17), 5380. <https://doi.org/10.3390/molecules26175380>
- Sousa, G., Alves, M. I., Neves, M., Tecelão, C., & Ferreira-Dias, S. (2022). Enrichment of Sunflower Oil with Ultrasound-Assisted Extracted Bioactive Compounds from *Crithmum maritimum* L. *Foods*, 11(3), 439. <https://doi.org/10.3390/foods11030439>
- Stanković, M., & Jakovljević, D. (2021). Phytochemical Diversity of Halophytes. Em M.-N. Grigore (Ed.), *Handbook of Halophytes: From Molecules to Ecosystems Towards Biosaline Agriculture* (Vol. 3, pp. 2089–2109). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-57635-6>
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- Thiviya, P., Gamage, A., Piumali, D., Merah, O., & Madhujith, T. (2021). Apiaceae as an Important Source of Antioxidants and Their Applications. *Cosmetics*, 8(4), 111. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040111>

- Tiwari, S., & Talreja, S. (2022). Thin Layer Chromatography (TLC) VS. Paper Chromatography: A Review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 05–09. <https://doi.org/10.31080/ASPS.2022.06.0894>
- Todd, E. C. D. (2014). Bacteria: *Staphylococcus aureus*. Em *Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 1, pp. 530–534). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00115-3>
- Tsoukatou, M., Tsitsimpikou, C., Vagias, C., & Roussis, V. (2001). Chemical Intra-Mediterranean Variation and Insecticidal Activity of *Crithmum maritimum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(3–4), 211–215. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-3-407>
- Wanyo, P., Kaewseejan, N., Meeso, N., & Siriamornpun, S. (2016). Bioactive compounds and antioxidant properties of different solvent extracts derived from Thai rice by-products. *Applied Biological Chemistry*, 59(3), 373–384. <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0173-8>
- Xu, Q., Deng, H., Li, X., & Quan, Z.-S. (2021). Application of Amino Acids in the Structural Modification of Natural Products: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.650569>
- Xu, Z., & Chang, L. (2017). Apiaceae or Umbelliferae. Em *Identification and Control of Common Weeds: Volume 3* (pp. 3–49). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5403-7_1
- Zaier, M. M., Heleno, S. A., Mandim, F., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Achour, L., Kacem, A., Dias, M. I., & Barros, L. (2022). Effects of the seasonal variation in the phytochemical composition and bioactivities of the wild halophyte *Suaeda fruticosa*. *Food Bioscience*, 50, 102131. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102131>

