



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Manuela Cristina do Souto Moreira

MICROPROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA
DE CAMARINHA (*Corema album*) E FUNCHO-DO-MAR
(*Chritmum maritimum*)

Nome do Curso de Mestrado
Engenharia Agronómica

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Ana Patrícia Serra Peyroteo Guedes
Professora Doutora Isabel Maria Barreira Afonso Paula

Novembro de 2023

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está à espera de ser descoberta.”

Carl Sagan

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
AGRADECIMENTOS	VII
TRABALHOS REALIZADOS NO ÂMBITO DA DISSERTAÇÃO	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE QUADROS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Micropropagação	3
2.2. Metabolismo vegetal e compostos bioativos	6
2.2.1. Compostos fenólicos	7
2.2.2. Flavonoides	9
2.2.3. Taninos	11
2.3. Importância das espécies <i>Corema album</i> e <i>Crithmum maritimum</i>	12
2.3.1. Espécie <i>Corema album</i>	12
2.3.2. Espécie <i>Crithmum maritimum</i>	13
2.4. Caracterização da espécie <i>Corema album</i>	14
2.4.1. Taxonomia	15
2.4.2. Morfologia	15
2.4.3. Distribuição geográfica e ecologia	18
2.4.4. Propagação	20
2.4.5. Metabolismo de <i>Corema album</i>	22
2.5. Caracterização da espécie <i>Crithmum maritimum</i>	23
2.5.1. Taxonomia	23

2.5.2. Morfologia.....	24
2.5.3. Distribuição geográfica e ecologia.....	25
2.5.4. Propagação.....	26
2.5.5. Metabolismo de <i>Crithmum maritimum</i>	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Caracterização da área de estudo	29
3.2. Micropropagação de <i>Corema album</i>	31
3.2.1. Material vegetal	31
3.2.2. Protocolo de desinfecção.....	31
3.2.3. Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	32
3.3. Micropropagação de <i>Crithmum maritimum</i>	35
3.3.1. Material vegetal	35
3.3.2. Protocolo de desinfecção	35
3.3.3. Ensaio de multiplicação <i>in vitro</i>	35
3.4. Compostos bioquímicos em <i>Corema album</i> e <i>Crithmum maritimum</i>	37
3.4.1. Material vegetal.....	37
3.4.2. Extração do material vegetal	38
3.4.3. Quantificação do teor total de compostos fenólicos.....	39
3.4.4. Quantificação do teor de flavonoides totais.....	40
3.4.5. Quantificação do teor de taninos totais	42
3.4.6. Determinação do teor de gordura	43
3.4.7. Determinação do teor de humidade	44
3.5. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Análise de resultados de <i>Corema album</i>	45
4.1.1. Otimização de um protocolo de micropropagação	45

4.1.2. Estádios fenológicos	51
4.1.3. Compostos bioativos	56
4.1.4. Teor de humidade e teor de gordura	62
4.2. Análise de resultados de <i>Crithmum maritimum</i>	63
4.2.1. Otimização de um protocolo de micropropagação	63
4.2.2. Estádios fenológicos	67
4.2.3. Compostos bioativos	68
4.2.4. Teor de humidade e teor de gordura	74
5. CONCLUSÕES	75
6. PERSPETIVAS FUTURAS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. ANEXOS	100
9. APÊNDICES	101

RESUMO

Corema album (camarinha) e *Crithmum maritimum* (funcho-do-mar) são duas espécies vegetais que integram a flora do litoral português, nomeadamente a zona dunar de Moledo do Minho.

O conhecimento sobre as plantas e os seus benefícios nutricionais e terapêuticos têm incitado a investigação científica, tanto no âmbito da propagação como da identificação de propriedades bioquímicas, com o intuito de procurar novos compostos fitoquímicos que possam contribuir de forma ativa para a regulação dos sistemas vitais do organismo e prevenção do desenvolvimento de determinadas doenças.

O objetivo principal da presente dissertação prendeu-se com a micropropagação e caracterização bioquímica das espécies *C. album* e *C. maritimum*. O trabalho de investigação consistiu na otimização de protocolo de propagação *in vitro* de *C. album* e *C. maritimum*, bem como na caracterização de compostos bioativos produzidas pelas plantas, nos vários estádios fenológicos, onde foram avaliados parâmetros químicos como o teor de humidade, teor de gordura, teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos.

Os resultados obtidos nos ensaios de micropropagação demonstraram que a espécie *C. album* apresenta considerável regeneração de rebentos em meio de cultura WPM suplementado com cinetina (1 mg/L) e 2iP (2mg/L). No que concerne à espécie *C. maritimum*, não se observou formação de gomos foliares, mas verificou-se intensa formação de tecido radicular em meio de cultura MS suplementado com BA (0,5 mg/L) e NAA (0,1 mg/L).

No que diz respeito à caracterização fitoquímica de *C. album*, os dados revelam que, nos extratos cetónicos, a composição fitoquímica é significativamente influenciada pela data da colheita, verificando-se uma diminuição da quantidade de compostos fenólicos totais e de taninos e uma tendência de aumento dos flavonoides totais entre dezembro e julho. Relativamente a *C. maritimum*, constatarem-se diferenças significativas em função da data de colheita, verificando-se um aumento na concentração dos compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos totais, com a aproximação do verão.

Com a realização deste estudo pode concluir-se que a camarinha e o funcho-do-mar são espécies vegetais portadoras de um grande potencial em diversos compostos bioativos, com elevados benefícios para a saúde dos consumidores e passíveis de utilização na indústria farmacêutica, agroalimentar e cosmética.

Palavras chave: *Corema album*, camarinha, *Crithmum maritimum*, funcho-do-mar, micropropagação, fenologia, caracterização fitoquímica, compostos bioativos.

ABSTRACT

Corema album and *Crithmum maritimum* are two plant species that are part of the flora of the Portuguese coast, namely the dune area of Moledo do Minho.

The knowledge about plants and their nutritional and therapeutic benefits has spurred scientific research, both in the field of plant propagation and on the identification of biochemical properties, in order to search for new phytochemical compounds that can actively contribute to the regulation of the body's vital systems and the prevention of the development of certain diseases.

The main objective of this work was the establishment of a micropropagation protocol from *C. album* and *C. maritimum* plants, as well as the characterization of the *in vivo* plants. For the last, bioactive compounds such as phenolic compounds, flavonoids and tannins were quantified from plants at different phenological stages. Also, the moisture and fat contents of both plant species were evaluated.

Micropropagation results showed that *Corema album* plants present high capacity of shoot regeneration in WPM medium supplemented with kinetin (1 mg/L) and 2iP (2 mg/L); while for *C. maritimum*, no leaf bud formation was observed, but there was an intense root development in MS medium supplemented with BA (0.5 mg/L) and NAA (0.1 mg/L).

For ketonic extracts the phytochemical composition of *C. album* plants is significantly influenced by the harvest date. Between December and July, it is registered a decrease in the amount of total phenolic compounds and tannins, but an increasing trend is seen in total flavonoids.

Generally, there is a significant increase in the concentrations of all bioactive compounds from January to May in the extracts of *C. maritimum* plants. Plant phenological stages significantly influence the phytochemical composition of this species, with an increase of phenolic compounds, flavonoids and tannins in the flowering phase.

From this study it can be concluded that *C. album* and *C. maritimum* because of the bioactive compounds that they produce, are plant species with a great potential for the high health benefits for consumers and suitable for use in the pharmaceutical industry and the agro-food and cosmetic industries as well.

Keywords: *Corema album*, camarinha, *Crithmum maritimum*, sea fennel, micropropagation, phenology, biochemical characterization, bioactive compounds.

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste trabalho de investigação, cruzei-me com pessoas de inestimável valor, que me apoiaram, acarinharam e foram imensamente pacientes e disponíveis, tornando esta investigação possível. Assim, não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos:

À professora Doutora Ana Patrícia Serra Peyroteo Guedes por, acima de tudo ter aceitado ser minha orientadora. Por toda a paciência, imensa compreensão, disponibilidade, conselhos, ensinamentos e orientação prestada, além da confiança e amizade demonstrada.

À professora Doutora Isabel Maria Barreira Afonso Paula, pelos conhecimentos transmitidos, por toda a ajuda, preocupação, paciência e disponibilidade prestada.

A toda a equipa técnica dos Laboratórios da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, nomeadamente às técnicas Maria Marinho, Maria Cunha, Maria Helena e Engenheiro Virgílio, por toda a ajuda na resolução de problemas que foram surgindo no decorrer do trabalho de laboratório e pela imensa disponibilidade e paciência.

À família e aos amigos, pelo imenso carinho, apoio incondicional, constante incentivo e motivação.

Um bem-haja a todos!

TRABALHOS REALIZADOS NO ÂMBITO DA DISSERTAÇÃO

Pósteres

Manuela Moreira, Isabel M. Afonso, Nuno V. Brito, Ana P. Guedes; 2024; Micropropagação de *Corema album* de Moledo do Minho; Póster apresentado na Conferência Nutrir Território – CISAS-IPVC, Melgaço, Portugal.

Manuela Moreira, Isabel M. Afonso, Júlio Lopes, Nuno V. Brito, Ana P. Guedes; 2024; Fitoquímicos de *Crithmum maritimum*; Póster apresentado na Conferência Nutrir Território – CISAS-IPVC, Melgaço, Portugal.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

2iP - N6-(2-Isopentenil)adenina

AC - (do inglês *antioxidant capacity*) - atividade antioxidante

BA - 6-Benzyladenina

BAP - 6-Benzilaminopurina

DP – Desvio padrão

EDTA - (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) - ácido etilenodiamino tetra-acético

GAE – Equivalente de Ácido gálico

MHA - Muller-Hinton Ágar

MS - Meio de cultura de Murashige & Skoog

NAA - ácido 1-naftalenoacético ou ácido α -naftalenoacético

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

QE - Quercetina

TPC - (do inglês *total phenolic content*) - conteúdo total de fenóis

UV - Ultravioleta

WPM - (do inglês *woody plant medium*) – meio para plantas lenhosas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das vias de síntese dos três principais grupos de compostos bioativos das plantas. (Fonte: Aguiar, 2017.)	7
Figura 2. Estrutura química de um fenol simples. (Adaptado de Bravo, 1998.)	8
Figura 3. Classificação dos compostos fenólicos nas diversas subclasses. (Adaptado de Oliveira, 2014.)	9
Figura 4. Estrutura química básica e sistema de numeração dos flavonoides. (Fonte: Balasundram <i>et al.</i> , 2006.)	10
Figura 5. Estrutura química do ácido tânico. (Fonte: Bravo, 1998.)	11
Figura 6. A - Aspectos descritivos de <i>Corema album</i> : a) hábito em exemplar feminino frutificado; b) secção longitudinal de uma flor; c) fruto aberto; d-f) sementes; g) hábito em exemplar masculino em flor; h) detalhe da inserção das folhas; i) ramo com as cicatrizes das folhas; j, k) folhas; l) ramo com flores masculinas; m, n) flores masculinas; ñ) sépala; o) pétala; p) estame. (Fonte: Castroviejo <i>et al.</i> , 1993). B – Hábito da planta.....	16
Figura 7. Flor feminina (A) e masculina (B) de <i>Corema album</i> . (Fonte: autor.)	17
Figura 8. Planta em frutificação (A e B) e fruto de <i>Corema album</i> (C). (Fonte: autor.)	18
Figura 9. Área de distribuição de <i>Corema album</i> . (Fonte: Marques, E., 2007.).....	19
Figura 10. A - Aspectos descritivos de <i>Crithmum maritimum</i> : a) hábito da planta; b) bráctea; c) bractéola; d) flor; e) pétala, face externa; f) pétala, face interna; g) fruto; h) mericarpo, face dorsal; i) mericarpo, face comissural; j) secção transversal do mericarpo (Fonte: Castroviejo <i>et al.</i> , 1993.) B - Hábito da planta. (Fonte: autor.).....	24
Figura 11. Plantas de <i>Crithmum maritimum</i> em Moledo do Minho. A – Flores. B – Plantas em floração. (Fonte: autor.)	25
Figura 12. Distribuição de <i>Crithmum maritimum</i> em Portugal continental. (Fonte: UTAD, Jardim Botânico).....	26
Figura 13. Localização da área de estudo. A – Local de recolha de <i>Corema album</i> , B – Local de recolha de <i>Crithmum maritimum</i> . (Fonte: Google Earth).	29

Figura 14. Processo de inoculação. A – Explantes de <i>C. album</i> ; B – Explantes em câmara de cultura. (Fonte: autor.)	33
Figura 15. Processo de inoculação. A – Explantes de <i>C. maritimum</i> ; B – Câmara de fluxo laminar. (Fonte: autor.)	37
Figura 16. A e B - Processo de moagem (Fonte: autor.)	38
Figura 17. Processo de extração. A e B - Filtração; C - Extrato. (Fonte: autor.)	39
Figura 18. A e B - Processo de secagem. (Fonte: autor.)	44
Figura 19. A, B e C: Rebentos de <i>Corema album</i> obtidos a partir da cultura <i>in vitro</i> dos explantes iniciais. (Fonte: autor.)	49
Figura 20. Cronograma fenológico de indivíduos masculinos e femininos de <i>Corema album</i> , em Moledo do Minho, entre janeiro de 2022 e outubro de 2023.....	51
Figura 21. Planta feminina em início de floração (à esquerda) e planta masculina em floração avançada (à direita) de <i>Corema album</i> , em Moledo do Minho, em março de 2023. (Fonte: autor.)	51
Figura 22. Planta feminina de <i>Corema album</i> : gomos de floração (A); antese (B); gomos de renovo (C, D e E); crescimento vegetativo (F); frutificação (G e H) e maturação dos frutos (I). (Fonte: autor.)	54
Figura 23. Planta masculina de <i>Corema album</i> : gomos de floração (A e B); antese (C); deiscência (D); gomos de renovo (E e F); crescimento vegetativo (G e H). (Fonte: autor.).....	55
Figura 24. Explantes de <i>Crithmum maritimum</i> inoculados em meio de cultura MS: suplementado com BA (0,5 mg/L) e NAA (0,1 mg/L) após 23 dias de cultura (A); suplementado com BA (0,5 mg/L) após 16 dias de cultura (B) e sem suplementação após 8 dias de cultura (C). (Fonte: autor.)	65
Figura 25. Cronograma fenológico de indivíduos de <i>Crithmum maritimum</i> , em Moledo do Minho, entre janeiro de 2022 e outubro de 2023.	67
Figura 26. Planta de <i>Crithmum maritimum</i> : gomos de renovo (A) e crescimento vegetativo (B e C). (Fonte: autor.)	67

Figura 27. Planta de <i>Crithmum maritimum</i> : gomos de floração (A); Antese (B); Frutificação (C e D). (Fonte: autor.)	68
--	----

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Dados edafoclimáticos da região de Moledo do Minho, onde foram colhidas as plantas em estudo, entre novembro de 2022 e julho de 2023.	31
Quadro 2. Protocolos de desinfecção a que foram sujeitos os explantes de <i>C. album</i> , colhidos na natureza no processo de otimização de micropropagação da espécie.	32
Quadro 3. Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> de <i>C. album</i> em meio de cultura WPM com diferentes suplementações hormonais.	34
Quadro 4. Protocolos de desinfecção a que foram sujeitos os explantes de <i>C. maritimum</i> , colhidos na natureza no processo de otimização de micropropagação da espécie.	35
Quadro 5. Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> de <i>C. maritimum</i> em meio de cultura MS com diferentes suplementações hormonais.	36
Quadro 6. Dados de recolha de <i>C. album</i>	37
Quadro 7. Dados de recolha de <i>C. maritimum</i>	38
Quadro 8. Taxa de contaminação (%) e regeneração (%) de explantes de <i>C. album</i> , colhidas na natureza, sob ação de diferentes protocolos de desinfecção.	46
Quadro 9. Taxa de regeneração (%) de explantes de <i>C. album</i> , sujeitos a repicagem (sub-cultura), em diferentes meios de cultura.	49
Quadro 10. Efeito do solvente de extração, para cada data de colheita, na composição fitoquímica das folhas de <i>C. album</i> . (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.) ..	57
Quadro 11. Efeito da data de colheita, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica das folhas de <i>C. album</i> . (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.) ..	58
Quadro 12. Efeito do estado fenológico, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica da parte aérea de <i>C. album</i> . (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.) ..	60
Quadro 13. Caracterização das diferentes partes aéreas de <i>C. album</i> , em diferentes datas de colheita. (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.) ..	62
Quadro 14. Taxas de contaminação (%) e regeneração (%) de explantes de <i>C. maritimum</i> , colhidas na natureza, sob ação de diferentes protocolos de desinfecção.	64

Quadro 15. Efeito do solvente de extração, para cada data de colheita, na composição fitoquímica da parte aérea de <i>C. maritimum</i> . (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.)	69
Quadro 16. Efeito da data de colheita, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica da parte aérea de <i>C. maritimum</i> . (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.)	70
Quadro 17. Efeito do estado fenológico, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica da parte aérea de <i>C. maritimum</i> . (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.)	72
Quadro 18. Caracterização das diferentes partes aéreas de <i>C. maritimum</i> , em diferentes datas de colheita. (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca.)	74

1. INTRODUÇÃO

A linha de costa de Portugal continental tem uma extensão aproximada de 987 km de comprimento. Cerca de 48 % é constituída por arribas rochosas e 42 % por litoral baixo e arenoso, apresentando uma grande diversidade litológica, morfológica, biológica e paisagística (IPMA, 2018). Desta extensão, aproximadamente metade é pontuada por ecossistemas dunares.

As dunas são o resultado da interação entre o vento, a areia e a vegetação. A areia é arrastada pelo vento até ser retida por um determinado obstáculo, onde se vai acumulando e sendo lentamente povoada por plantas pioneiras da orla costeira. As dunas são estruturas geológicas importantes para diversos ecossistemas, uma vez que são responsáveis pela transição entre o ambiente marinho e o meio terrestre, servindo de proteção às transgressões do nível do mar, evitando a contaminação dos aquíferos continentais pela água salgada, a salinização dos solos, a destruição de infraestruturas humanas e a abrasão marítima das falésias.

Os ecossistemas dunares possuem características edáficas e microclimáticas que exigem uma grande especialização das comunidades vegetais que os colonizam, sendo estas cada vez mais especializadas à medida que se avança em direção ao mar (Silva, 2006). Quanto maior a proximidade ao mar, maior é a salinidade, a mobilidade das areias e a velocidade do vento, diminuindo a temperatura média anual. As plantas associadas a este ecossistema, fixam a areia com as suas raízes e possuem uma elevada resistência à salinidade, às grandes amplitudes térmicas, ao excesso de luminosidade e à falta de água doce (Silva, 2006).

Nas dunas primárias podem ser encontradas espécies como o Cordeiro-da-praia (*Otanthus maritimus* L.), o Feno-das-areias (*Elymus farctus* Simonet e Guinochet), o Estorno (*Ammophila arenaria* L.), a Morganheira-das-praias (*Euphorbia paralias* L.), o Cardo-marítimo (*Eryngium maritimum* L.) e o Funcho-do-mar (*Crithmum maritimum* L.). Já nas dunas secundárias, enriquecidas por matéria orgânica, encontram-se espécies como o Narciso-das-areias (*Pancratium maritimum* L.) ou a Madorneira (*Artemisia crithmifolia* L.), enquanto nas dunas terciárias se instalam espécies como a Camarinha (*Corema album* L.) e o Pinheiro-manso (*Pinus pinea* L.).

A vegetação mediterrânica, em especial a vegetação dunar portuguesa, detém uma elevada importância dado a sua antiguidade (Silva, 2006). As glaciações do Quaternário, menos severas em Portugal do que noutros locais da Europa, permitiram a sobrevivência de um grande número de espécies do Cenozoico que se extinguiram no resto do continente europeu (Jansen, 2002).

Neste âmbito, para o estudo em causa, foram selecionadas duas espécies vegetais cujo habitat é o ecossistema dunar da praia de Moledo do Minho: Camarinha (*Corema album* L.) e Funcho-do-mar (*Crithmum maritimum* L.).

O presente trabalho de investigação teve como objetivo a caracterização bioquímica de plantas da espécie *Corema album* e da espécie *Crithmum maritimum* colhidas na região de Moledo, assim como o estabelecimento de protocolos de micropropagação das mesmas.

Desta forma, os propósitos da investigação pendem-se com:

- definir um protocolo de desinfeção adequado à micropropagação de cada uma das espécies;
- avaliar a regeneração de explantes de *Corema album* em meio de cultura WPM com diferentes concentrações de cinetina;
- avaliar a regeneração de explantes de *Crithmum maritimum* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BA e NAA;
- estimar os teores de humidade e gordura em plantas de *Corema album* e de *Crithmum maritimum*;
- avaliar o teor de compostos bioativos (fenólicos totais, flavonoides e taninos) em plantas de *Corema album* e de *Crithmum maritimum*.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. Micropropagação

A tecnologia nas ciências biológicas possui um papel fundamental na multiplicação e no melhoramento genético de plantas, através da utilização de práticas de regeneração *in vitro* e de transformação genética (Bhatia e Sharma, 2015). Conhecem-se diversas espécies que produzem compostos de elevado interesse, mas que são difíceis de cultivar (Mulabagal e Tsay, 2004; Rates, 2001) e que a síntese química dos compostos derivados das mesmas é frequentemente inviável economicamente (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004). Para além disso, a colheita descontrolada de plantas em *habitats* naturais tem levado a que algumas espécies se tornem cada vez mais raras e em perigo de extinção, sendo a sua proteção urgente (Liao *et al.*, 2006). Assim, a micropropagação tornou-se uma ferramenta basilar na multiplicação vegetativa, podendo resolver alguns dos problemas referidos.

O termo foi utilizado pela primeira vez por Hartman e Kester (1975) e passou a ser empregue para definir os processos de propagação vegetativa na cultura de tecidos vegetais. Esta técnica utiliza pequenas secções de tecidos ou órgãos, denominados explantes, removidos de um órgão/planta dadora, desinfetados e cultivados assepticamente em meio de cultura líquido ou sólido, geralmente quimicamente definido, sob condições ambientais controladas (Flickinger, 2010). A micropropagação baseia-se na capacidade de totipotência apresentada pelas células vegetais, onde a diferenciação é reversível. A maioria das células diferenciadas mantém a capacidade de se desdiferenciar e adquirir um estado meristemático, podendo posteriormente ocorrer a diferenciação das células descendentes e, via organogénese/embriogénese originar-se uma planta completa (Bhojwani e Razdan, 1996).

Dependendo do material inicial e da resposta obtida, os métodos de micropropagação de plantas podem resultar na proliferação de meristemas existentes no explante inicial, na indução da organogénese ou na formação de embriões somáticos. Vários autores (Murashige (1974) e Debergh e Maene (1981)), propuseram a divisão de um processo de cultura de tecidos vegetais em cinco fases distintas:

etapa 0 – seleção da planta-matriz/planta-mãe;

etapa 1 – estabelecimento do explante *in vitro*;

etapa 2 – multiplicação;

etapa 3 – alongamento e enraizamento;

etapa 4 – aclimatização.

A micropropagação apresenta algumas vantagens comparativamente aos métodos de cultura tradicionais, nomeadamente: a produção um elevado número de plantas num espaço e período de tempo relativamente reduzidos (Debnath *et al.*, 2006); a conservação de genótipos de “elite”, raros e/ou economicamente importantes (Rani e Raina, 2000); a produção de uma elevada quantidade de plantas com características semelhantes às da planta mãe (tamanho, forma, cor das flores, presença e concentração de metabolitos) (Suman, 2017) e a produção de plantas em condições de cultura (luz, temperatura e humidade) constantes e controladas, ou seja, sem estarem sujeitas às condições atmosféricas, estação do ano ou condições ambientais (Mehrotra *et al.*, 2007).

No entanto, este processo revela potenciais desvantagens. São exemplo disso os elevados custos de produção, maioritariamente derivados do custo da mão-de-obra (Etienne e Berthouly, 2002); os problemas de contaminação, quer endógena ou induzida durante o processo (Leifert *et al.*, 1994); os níveis de variação somaclonal, por vezes, superiores aos aceitáveis (Bairu *et al.*, 2011; Miguel e Marum, 2011) e a taxa de sobrevivência reduzida das plântulas durante a etapa de aclimatização (Chandra *et al.*, 2010).

O sucesso da cultura de células e tecidos vegetais como estratégia de propagação de plantas é particularmente influenciado pela composição do meio de cultura selecionado (George *et al.*, 2008). O meio de cultura utilizado na micropropagação é habitualmente constituído por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos ou outros suplementos de azoto, açúcares como fonte de energia e carbono, outros suplementos orgânicos indefinidos, agentes de gelificação e reguladores de crescimento ou fitorreguladores, que mimetizam as hormonas vegetais produzidas pelas próprias plantas (Torres, 1989). Os reguladores de crescimento incluem cinco classes de hormonas vegetais: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (Poonam *et al.*, 2014).

Os meios de cultura podem apresentar-se sólidos ou líquidos, consoante possuem na sua composição um agente gelificante (ágar ou goma gelana) ou não. As culturas vegetais desenvolvidas em meios sólidos são mantidas estáticas em recipientes de vidro ou plástico, logo somente a parte inferior da superfície do explante, órgão ou tecido está em contato com o meio de cultura. Esta situação, pode levar a um gradiente de nutrientes e de produtos residuais do metabolismo, entre o meio de cultura e os tecidos, à medida que o crescimento avança (George *et al.* 2008). No que diz respeito ao meio de cultura, para além da sua composição ser fundamental também o valor do pH é um outro fator limitante no sucesso da micropropagação. De uma forma genérica, os valores de pH mais recomendados para a cultura *in vitro* na maioria das plantas situa-se entre 5,5 e 5,8 (George, 1993; Ostrolucká *et al.*, 2010).

Existem vários meios de cultura sólidos descritos, entre eles o WPM para plantas lenhosas (Lloyd e McCown, 1980), contudo, o meio Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) continua a ser o mais comumente utilizado.

Após a inoculação, o material vegetal deverá ser mantido sob condições ambientais controladas, de modo a atingir um crescimento ótimo, nomeadamente condições de temperatura estáveis, evitando flutuações superiores a $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$, humidade relativa geralmente elevada durante a cultura *in vitro* (≈ 98) e luz com baixa intensidade e ajustável em termos de quantidade e duração do fotoperíodo (dias longos, dias neutros ou dias curtos) (Bhatia e Sharma, 2015).

Para além da seleção do meio de cultura e das condições de incubação, outros fatores como a escolha das plantas-mãe (plantas-stock, plantas-dadoras, plantas-matriz ou plantas de elite), é fundamental no processo de micropropagação. A parte da planta da qual os explantes são obtidos, depende do tipo de cultura a ser iniciada, do propósito da cultura e das espécies vegetais a serem utilizadas (George *et al.*, 2008). Estas são selecionadas com base nas características desejáveis para a sua multiplicação em grande escala (Bhatia e Sharma, 2015) e envolve a recolha e/ou preparação da planta-mãe, de modo a fornecer explantes de qualidade para um melhor estabelecimento em condições assépticas (Bhojwani e Razdan, 1996).

O objetivo crucial da etapa de estabelecimento de uma cultura de plantas *in vitro* centra-se na obtenção de uma cultura vegetal em condições assépticas com uma percentagem satisfatória de explantes que sobreviva e apresente um rápido crescimento (Murashige, 1974). Ácaros, fungos, leveduras e bactérias têm sido descritos como os mais frequentes agentes contaminantes em culturas *in vitro* de plantas (Blake 1988; Enjalric *et al.* 1987; Leggat *et al.* 1988; Leifert *et al.* 1989), embora a presença de bactérias seja considerada a forma mais grave de contaminação, podendo conduzir a taxas reduzidas de multiplicação e enraizamento, ou até mesmo à morte das culturas vegetais (Leifert *et al.* 1989).

A proliferação de agentes contaminantes é potenciada no meio de cultura (Bertoncelli *et al.* 2009), os quais competem com os tecidos vegetais pelos nutrientes (Odutayo *et al.* 2007). Uma vez estabelecidos no meio de cultura, os contaminantes podem apresentar um crescimento rápido, conduzindo a uma depleção dos nutrientes e produzindo toxinas que afetam os explantes (Guri e Patel, 1998). Assim, torna-se um verdadeiro desafio conseguir a obtenção de protocolos de desinfecção eficientes na eliminação destes agentes contaminantes sobretudo, quando se iniciam protocolos de micropropagação com material vegetal *in vivo*, ou seja, explantes retirados de plantas colhidas na Natureza.

Na etapa de multiplicação, é dada primazia à proliferação de órgãos e estruturas, que são capazes de formar plantas completas (Sathyanarayana e Verghese, 2007), podendo ser aperfeiçoada através da adição dos reguladores de crescimento. Um exemplo será a suplementação do meio de cultura com citocinina isolada ou combinada com uma pequena quantidade de auxina, no entanto, e até ao momento, a presença e a quantidade destes reguladores de crescimento é empiricamente determinada, uma vez que depende de vários fatores, entre eles a espécie vegetal em estudo (Sathyanarayana e Verghese, 2007). Em casos específicos em que os rebentos não possuem dimensões adequadas (geralmente < 1cm), a multiplicação pode ser seguida de uma subfase denominada alongamento, na qual os rebentos adquirem um tamanho superior devido à ação de agentes como as giberelinas, tornando-se mais resistentes para o enraizamento (Canhoto, 2010; Shani *et al.*, 2013).

2.2. Metabolismo vegetal e compostos bioativos

O metabolismo refere-se ao conjunto de reações químicas que ocorre permanentemente nas células e que são responsáveis pela degradação e síntese de compostos químicos fundamentais utilizados no crescimento e desenvolvimento dos organismos.

Todos os seres vivos possuem um metabolismo geral comum designado metabolismo primário, que tem como objetivo a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies (Santos, 2001). Nas plantas, o metabolismo primário compreende os processos químicos universais responsáveis pelo seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, estando relacionado com fenómenos de obtenção de matéria orgânica, obtenção de energia e reprodução celular, entre outros.

Em contrapartida, o metabolismo secundário está restrito a processos químicos, por vezes únicos para uma dada espécie ou família, que mesmo não sendo imprescindível à sobrevivência da planta, permite-lhe produzir compostos que são fundamentais na defesa e proteção da planta contra qualquer dano ecológico (Samuni-Blank *et al.*, 2012). Assim, os metabolitos secundários têm origem no processo de conversão da energia luminosa em energia química, permitindo que a planta responda a diferentes fatores ambientais, quer bióticos ou abióticos, possibilitando a comunicação e a interação com diferentes organismos, atraindo-os ou repelindo-os, sustentando-os ou destruindo-os (Castro *et al.*, 2005; Maraschin e Vepoorte, 1999). Devido às suas características, estes compostos apresentam valor comercial para a indústria farmacêutica, para a indústria alimentar, agronómica, cosmética, entre outras (Simões *et al.*, 2010).

De acordo com Croteau *et al.* (2000), os compostos bioativos das plantas podem ser divididos em três grupos principais: os terpenos, que provêm da via do ácido mevalônico e da via não-mevalonato; os alcaloides, que são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos (via do ácido chiquímico) e de aminoácidos alifáticos (provenientes do ciclo do ácido tricarboxílico); e os compostos fenólicos, que são sintetizados através da via do ácido chiquímico e da via do ácido malônico.

Os compostos de cada um dos referidos grupos apresentam características estruturais particulares decorrentes da forma como são sintetizados. Na figura 1 encontra-se exemplificada a origem biossintética dos metabolitos secundários.

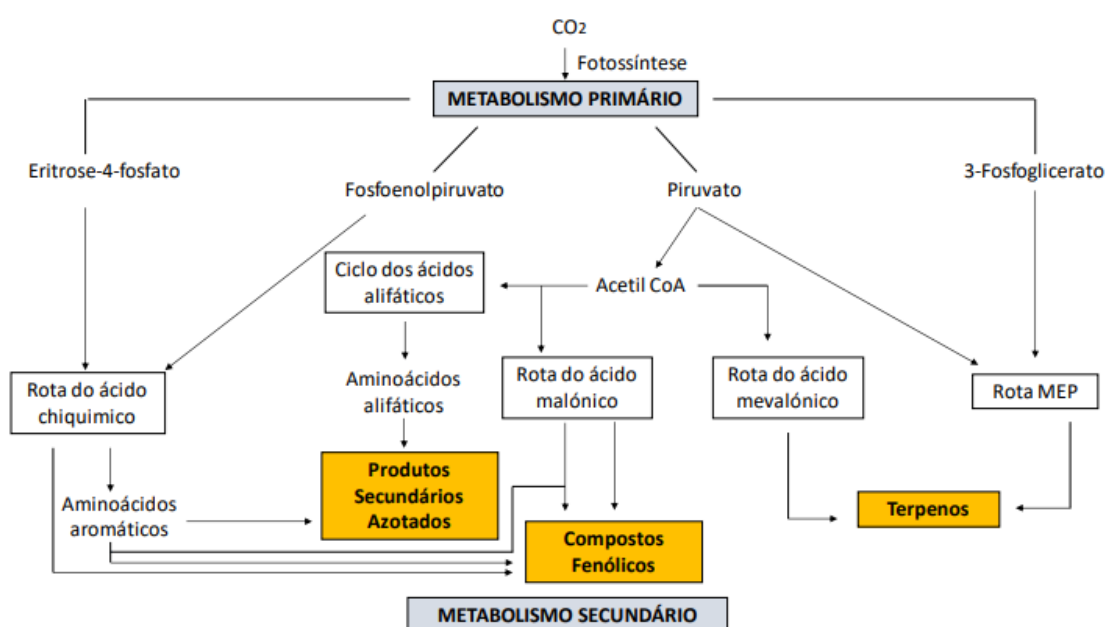


Figura 1. Esquema representativo das vias de síntese dos três principais grupos de compostos bioativos das plantas (Fonte: Aguiar, 2017).

2.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também designados de polifenóis, são produtos do metabolismo secundário das plantas, constituindo um dos grupos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal. Em geral, estes metabolitos possuem um papel importante na fisiologia e na morfologia das plantas, sendo fundamentais, quer na sua proteção contra predadores/herbívoros e agentes patogénicos, quer na atribuição de determinadas características organoléticas às frutas e aos vegetais (Bravo, 1998; Balasundram *et al.*, 2006; Aguiar, 2017). Os compostos fenólicos não se distribuem uniformemente nas plantas, ou seja, os fenólicos insolúveis fazem parte da constituição das paredes celulares, enquanto os fenólicos

solúveis são compartimentados dentro dos vacúolos das células vegetais. Ao nível dos tecidos, as camadas externas das plantas contêm níveis mais elevados de fenólicos do que as que se localizam nas suas partes internas. Os fenólicos da parede celular, como as ligninas e os ácidos hidroxicinâmicos, contribuem para a resistência mecânica das paredes celulares, desempenham um papel regulador no crescimento e morfogénese das plantas, bem como na resposta celular ao stresse e aos agentes patogénicos (Shahidi e Naczk, 2004).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em compostos flavonoides e não-flavonoides. Os principais representantes destes compostos são os flavonoides, subdivididos em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas. Os não-flavonoides subdividem-se em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos ou ácidos hidroxicinâmicos), estilbenos, cumarinas e taninos hidrolisáveis e complexos (Oliveira, 2014). Do ponto de vista nutricional, os ácidos fenólicos são os que apresentam maior interesse, devido às suas propriedades antioxidantes (Soares, 2002; Crozier *et al.*, 2006).

Estruturalmente, os compostos fenólicos apresentam um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilo (figura 2), podendo variar desde moléculas fenólicas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados como os taninos (Bravo, 1998; Crozier *et al.*, 2006; Aguiar, 2017).

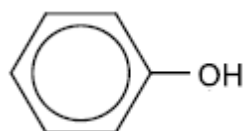


Figura 2. Estrutura química de um fenol simples (Adaptado de Bravo, 1998).

Na natureza, os compostos fenólicos encontram-se maioritariamente associados a mono ou polissacarídeos, que podem estar ligados a um ou mais grupos fenólicos. A associação destes compostos com ácidos orgânicos, aminas e lípidos também têm sido encontrados na natureza (Balasundram *et al.*, 2006; Aguiar, 2017). Dada a sua grande diversidade estrutural, os compostos fenólicos são agrupados em várias classes, como se pode verificar na figura 3.

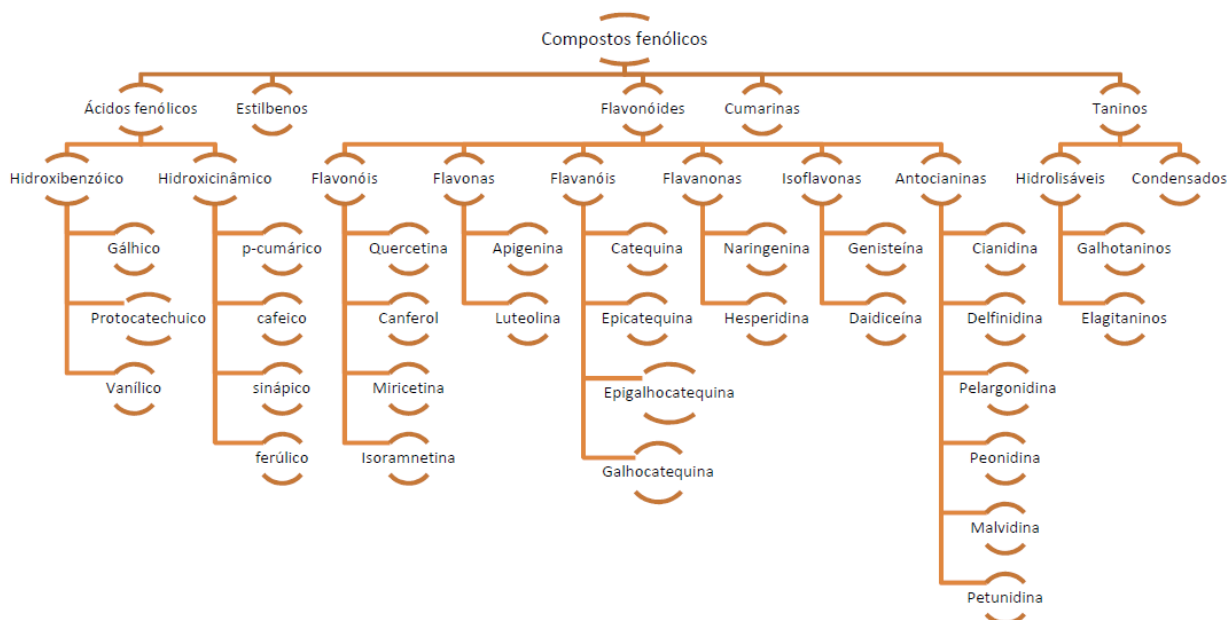


Figura 3. Classificação dos compostos fenólicos nas diversas subclasses (Adaptado de Oliveira, 2014).

2.2.2. Flavonoides

Os flavonoides são caracterizados por possuírem uma estrutura básica $C_6-C_3-C_6$ e por constituírem o maior grupo de compostos fenólicos presentes na natureza, representando mais de metade do total de polifenóis que ocorrem na natureza (Balasundram *et al.*, 2006; Crozier *et al.*, 2006). Nas plantas, os flavonoides desempenham um papel fundamental na defesa contra os herbívoros e agentes patogénicos, devido às suas propriedades fungicidas e bactericidas, (Heim *et al.*, 2002) bem como na proteção contra a radiação ultravioleta (Harborne e Williams, 2000). Desempenham ainda um papel importante na biologia vegetal por responderem à luz e controlarem os níveis de auxinas reguladoras do crescimento e diferenciação das plantas. São igualmente essenciais na fixação de metais como o ferro e o cobre e conferem coloração às plantas podendo, desta forma, contribuir para os fenómenos de polinização (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Estes compostos encontram-se em grande quantidade nas folhas, sementes, flores e frutos tendo já sido identificados mais de 4000 flavonoides (Heim *et al.*, 2002).

Relativamente à sua estrutura, os flavonoides são compostos de baixo peso molecular constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma cadeia alifática de três carbonos, normalmente na forma de um anel heterocíclico (C) (figura 4) (Bravo, 1998; Balasundram, *et al.*, 2006).

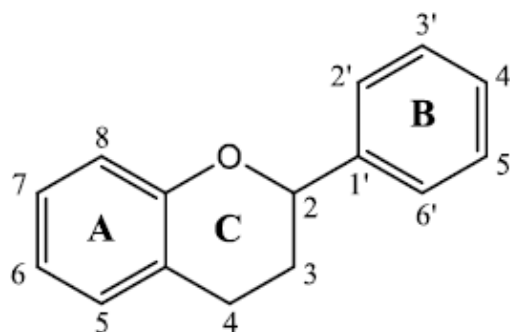


Figura 4. Estrutura química básica e sistema de numeração dos flavonoides (Fonte: Balasundram *et al.*, 2006).

Como mencionado acima, e de acordo com as características químicas e biossintéticas dos flavonoides, estes podem ser classificados em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (Crozier *et al.*, 2006).

De entre os flavonoides, as antocianinas estão associadas a vários efeitos benéficos para a saúde, como resultado da sua ação antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, anti-glicêmica e antivírica (Hou, 2003; Hidalgo *et al.*, 2012). Na planta são também responsáveis por conferirem a cor à maioria das flores, frutos e tubérculos, sobretudo tonalidades que variam entre vermelho, laranja e roxo, de acordo com condições intrínsecas da planta (por exemplo, o pH) e da interação das mesmas com outros compostos (Manach *et al.*, 2004; Sass-Kiss *et al.*, 2005).

Nos alimentos, as antocianinas encontram-se, principalmente, nas frutas, vinho tinto, sumos de uva e em alguns vegetais, nomeadamente beringelas, repolhos, cebolas e rabanetes (Manach *et al.*, 2004; Sass-Kiss *et al.*, 2005). Nos frutos são, maioritariamente, encontradas na casca/película, com exceção de alguns frutos vermelhos, como a cereja e os morangos, onde são encontradas na polpa, (Manach *et al.*, 2004; Sass-Kiss *et al.*, 2005).

Os flavonoides não são sintetizados no organismo humano tendo, por isso, obrigatoriamente que ser obtidos pela dieta, através da ingestão de alimentos de origem vegetal que os contenham, ou de suplementos alimentares (Cao *et al.*, 1997).

2.2.3. Taninos

Os taninos são compostos de elevado peso molecular e são os principais responsáveis pela sensação de adstringência nos frutos, apresentando um papel fundamental na definição das propriedades sensoriais dos frutos frescos e produtos derivados (Soares, 2002; Jimenez-Garcia *et al.*, 2012). Atendendo à sua estrutura, estes podem ser classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas (Soares, 2002).

Os taninos hidrolisáveis (constituídos pelos galotaninos e elagitaninos), apresentam uma estrutura comum formada por um poliol como núcleo central (geralmente a D-glucose), cujos grupos hidroxilos se encontram total ou parcialmente esterificados por grupos fenólicos (Khanbabaee e van Ree, 2001; Soares, 2002; Falcão e Araújo, 2011). Os galotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples, menos abundantes na natureza e podem ser descritos como esteres do ácido gálico e/ou do ácido digálico. O tanino hidrolisável mais conhecido é o ácido tânico (figura 5). Os elagitaninos são taninos constituídos por um poliol central ligado a pelo menos uma unidade de ácido hexahidroxidifenólico. Por hidrólise, este ácido fica livre e converte-se espontaneamente em ácido elágico. Os elagitaninos são muito mais comuns na natureza do que os galotaninos, sendo os principais taninos presentes em espécies vegetais (Khanbabaee e van Ree, 2001).

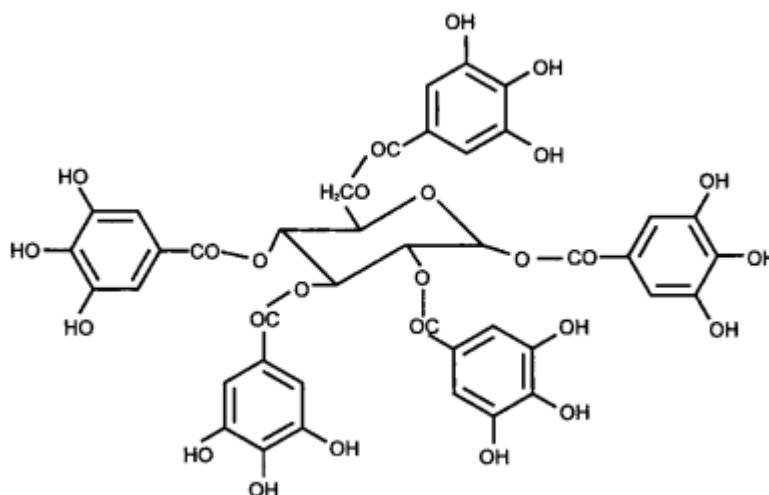


Figura 5. Estrutura química do ácido tânico (Fonte: Bravo, 1998).

Os taninos condensados ou proantocianidinas podem ser oligoméricos ou poliméricos, solúveis ou insolúveis em água, e são formados pela condensação sucessiva de duas a mais de cinquenta unidades de flavan-3-ol (flavanóis), como por exemplo: catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina (Khanbabaee e van Ree, 2001).

Apesar dos efeitos benéficos que os taninos podem trazer para a saúde (reconhecidos pela sua atividade antioxidante) (Monteiro *et al.*, 2005; Barbosa, 2014), estes podem ser considerados compostos anti nutricionais (quando ingeridos em grandes quantidades), uma vez que se ligam fortemente aos grupos -NH das proteínas e dos péptidos, evitando assim a sua hidrólise e dificultando a digestão gástrica (Shahidi e Nacz, 2004).

Os taninos têm vindo a ser cada vez mais valorizados por parte indústria, sendo utilizados na preparação de floculantes para o tratamento de águas, na indústria de curtimento, na obtenção de polímeros naturais, na estabilização de cerveja e na síntese de produtos farmacêuticos (Silva e Silva, 1999; Battistin *et al.*, 2004; Oliveira, 2016).

2.3. Importância das plantas das espécies *Corema album* e *Crithmum maritimum*

As espécies vegetais em estudo, correspondem a vegetação que, para além do seu valor intrínseco, constituem o habitat de alimentação, refúgio e reprodução da entomofauna, avifauna, herpetofauna e fauna vertebrada terrestre associada às dunas, assumindo um papel importante na manutenção da biodiversidade e o equilíbrio do ecossistema. É também determinante na manutenção da dinâmica geomorfológica dos sistemas dunares litorais ativos, uma vez que estas espécies contribuem para a prevenção de fenómenos catastróficos, participando na estabilização das dunas, e sendo essenciais para a formação e retenção do solo. Estas plantas prestam ainda informação histórica e são de grande relevância para a educação e ciência (ICNB, 2022).

2.3.1. Espécie *Corema album*

O nome *Corema* tem origem na palavra grega “Korema”, que significa “vassoura” (Gil-López, 2011). Este nome reflete uma das principais funções atribuídas aos ramos destes arbustos tal como aconteceu com outros, nomeadamente a giesta. As populações rurais utilizaram ao longo de vários séculos as plantas com densa e fina ramagem para servirem de vassouras (León-González *et al.*, 2012). Já o restritivo específico “album”, refere-se à cor branca do fruto.

Os frutos de *Corema album* são consumidos na costa atlântica ibérica desde o período islâmico (frescos ou em compotas) e têm sido utilizados na medicina popular como antipiréticos e antiparasitários (Oliveira e Dale, 2012; León-González *et al.*, 2012). Estudos efetuados, concluíram que estas bagas contêm flavonoides, antocianinas e derivados fenólicos, nomeadamente éster cafeico, ácido benzoico e ácido clorogénico (León-González *et al.*, 2013;

Andrade *et al.*, 2017) e são ricos em cálcio ($1673,50 \pm 199,13$ mg/kg), e magnésio ($1256,32 \pm 32,05$ mg/kg) (Domingues, 2021).

Estes compostos são responsáveis por uma significativa capacidade antioxidante, que confere a estes frutos propriedades fisiológicas interessantes, particularmente como agentes preventivos contra infeções urinárias (Jepson e Craig, 2007), distúrbios cardiovasculares e neurológicos (Sesso *et al.*, 2007; Fuentealba *et al.*, 2011) ou cancro (Neto, 2011; Pappas *et al.*, 2009; Seeram, 2008). O efeito antioxidante destes frutos é mediado pela regulação positiva da glutathione e por enzimas celulares antioxidantes, bem como pela supressão de espécies reativas de oxigénio (Fuentealba *et al.*, 2011).

Recentemente, em Portugal, num projeto liderado por Cláudia Santos a decorrer na Universidade Nova de Lisboa, foi identificado um composto da folha de camarinha, a genipina, substância promissora no tratamento da doença de Parkinson. Os resultados demonstram que a genipina, retirada da camarinha, consegue proteger as células dos efeitos negativos da agregação da proteína alfa-sinucleína e prevenir os défices motores daí advindos em modelos vivos. A agregação desta proteína no cérebro torna-se tóxica e mata os neurónios que são responsáveis pela produção de dopamina, dando origem aos problemas relacionados com o controlo de movimentos. O facto da genipina ser uma molécula de origem natural confere uma maior segurança e pode vir a servir como “molécula líder”, adquirindo um grande valor no desenvolvimento de fármacos ou terapias (Rosado-Ramos *et al.*, 2023; Público, 2023).

Assim, a camarinha é uma espécie com potencial para vir a integrar o mercado dos pequenos frutos, floricultura, indústria agroalimentar ou farmacêutica, não só pelo elevado valor nutritivo e composição em antioxidantes dos frutos (Oliveira e Dale, 2012; Lima, *et al.*, 2018; Simões, 2018), mas também devido à composição bioquímica das folhas da planta que, embora não comestíveis, podem ter interessante aplicação na indústria farmacêutica.

2.3.2. Espécie *Crithmum maritimum*

O termo *Crithmum* provem da palavra grega “krithe” para cevada, fazendo referência à semelhança das sementes do funcho-do-mar a grãos de cevada, enquanto a palavra “maritimum” se refere ao seu habitat próximo ao mar (Atia *et al.*, 20011). Esta planta foi mencionada na obra “Rei Lear” de Shakespeare, onde este descreveu o perigoso hábito de colhê-la em penhascos no litoral (Shakespeare, 1606).

As plantas halófitas encontram-se naturalmente adaptadas às condições de alta salinidade do solo e/ou da atmosfera. Estas constituem um excelente modelo para investigar os diferentes

mecanismos de resposta das plantas ao stresse salino, a fim de melhorar a tolerância ao sal. Recentemente, ganharam ainda mais interesse, uma vez que algumas delas podem ser consideradas fontes valiosas de compostos para a indústria agroalimentar, cosmética ou farmacêutica (Meot-Duros L. e Magné C., 2008).

O funcho-do-mar (*Crithmum maritimum* L.) é uma halófita comestível com diversos interesses económicos devido ao seu alto teor em metabolitos secundários, nomeadamente em flavonoides, carotenoides e vitamina C (Meot-Duros L. e Magné C., 2008). O fruto desta planta é rico em lípidos (cerca de 44% com base no peso seco), sendo o ácido oleico o maior constituinte (78,6% do total de ácidos gordos) (Atia *et al.*, 2001).

Crithmum maritimum, é há muito utilizado como vegetal comestível ou especiaria. Para além de cozido, as suas folhas suculentas e galhos jovens, são frequentemente utilizados em saladas, sopas ou conservados em vinagre e empregues como condimento (anexo 1). Esta erva aromática possui um sabor levemente salgado com algumas notas de aipo, seguido de notas leves de erva-doce comum e casca de citrino verde com um sabor pungente (Renna e Gonnella, 2013). Este vegetal foi esquecido durante muito tempo, mas nos últimos anos foi redescoberto e tornou-se um ingrediente marcante da culinária mediterrânica (Özcan *et al.*, 2001; Maleš *et al.*, 2003; Renna e Gonnella, 2013).

O funcho-do-mar foi também amplamente utilizado na medicina popular como tónico, antimicrobiano, carminativo, diurético e usado no tratamento da obesidade, devido ao seu alto teor em compostos biologicamente ativos, como a vitamina C, os ácidos gordos ómega-3 e 6, o iodo, os carotenoides, os minerais, os ácidos orgânicos e os fenólicos (Franke, 1982; Guil-Guerrero e Rodriguez-Garcia, 1999; Atia *et al.*, 2011; Siracusa *et al.*, 2011). No passado, o seu consumo protegia os marinheiros do escorbuto, atualmente, os óleos essenciais desta espécie são utilizados em cosméticos (Atia *et al.*, 2011; Jallali *et al.*, 2014).

2.4. Caracterização da espécie *Corema album*

Corema album (L.) D. Don, também designada como camarinheira ou simplesmente camarinha e internacionalmente conhecida como *Portuguese crowberry*, é um arbusto selvagem perene, pertencente à família Ericaceae. Esta espécie desenvolve-se maioritariamente em sistemas dunares (dunas secundárias e vales dunares), mas também pode ser encontrada em arribas, orla de zimbrais ou subcoberto de pinhais próximos de sistemas dunares (Oliveira e Dale, 2012; Alvarez-Cansino *et al.*, 2010).

A planta apresenta dimorfismo sexual, sendo a sua identificação facilitada entre julho e setembro, pela presença do fruto carnudo do tipo drupa comestível, redondo e branco como pérolas, de sabor agri-doce. Os seus ramos libertam uma fragrância semelhante à do mel e possuem a capacidade de controlar a evapotranspiração de modo a manter o conteúdo hídrico, o que se revela de extrema importância dado o habitat árido em que se desenvolve (Alvarez-Cansino *et al.*, 2010).

2.4.1. Taxonomia

A camarinha pertence ao domínio Eukarya (Archaeplastida), reino Plantae (Embryophyta), divisão Spermatophyta, Subdivisão Magnoliophyta (Angiospermophyta), classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Ericales, família Ericaceae, género *Corema* e espécie *Corema album* (UTAD - Jardim Botânico, 2023).

O género *Corema* é constituído por duas espécies: *Corema conradii* Torr. Ex Loud e *Corema album* D. Don. A espécie *Corema album*, contém 26 cromossomas e inclui duas subespécies: *Corema album azoricum* Pinto da Silva, nativa dos Açores e outra subespécie designada *Corema album album* existente nos restantes locais (Andrade *et al.*, 2017; Calviño-Cancela, 2002; Oliveira e Dale, 2012; Tutin *et al.*, 1972).

2.4.2. Morfologia

A espécie *C. album* (figura 6) é um arbusto perene formado por diversos ramos que derivam de um caule comum e que, em geral, não ultrapassa 1 m de altura (Oliveira e Dale, 2012; Tutin *et al.*, 1972). A espécie é geralmente descrita como sendo dioica, no entanto, também é considerada subdioica dado as plantas masculinas, ocasionalmente, apresentarem inflorescências com flores pistiladas e estaminadas. Os indivíduos hermafroditas são escassos e presentes apenas nas populações mais meridionais da área geográfica da espécie, tendo sido reportados em Asperillo (sudoeste de Espanha) e em Vila Real de Santo António (Sul de Portugal). Um estudo levado a cabo ao longo de toda a área de distribuição natural desta espécie, concluiu que a população localizada em Asperillo apresentou uma proporção de indivíduos hermafroditas maior (1-4%), comparativamente à percentagem encontrada em Vila Real de Santo António (<2%) (Zunzunegui *et al.*, 2006).



Figura 6. A - Aspectos descritivos de *Corema album*: a) hábito em exemplar feminino frutificado; b) secção longitudinal de uma flor; c) fruto aberto; d-f) sementes; g) hábito em exemplar masculino em flor; h) detalhe da inserção das folhas; i) ramo com as cicatrizes das folhas; j, k) folhas; l) ramo com flores masculinas; m, n) flores masculinas; ñ) sépala; o) pétala; p) estame. (Fonte: Castroviejo *et al.*, 1993.) **B** – Hábito da planta (Fonte: autor).

A planta masculina apresenta ramos mais eretos, em comparação com a planta feminina, a qual possui ramos mais curtos e rasteiros (Oliveira e Dale, 2012). As raízes desta espécie são espessas e dispersas, características comuns com outras espécies da família Ericaceae. O caule é castanho escuro a cinzento.

As folhas são numerosas, lineares, oblongas, alternadas ou verticiladas, duras e possuem dimensões reduzidas (ericoides), com comprimento compreendido entre 6 a 10 mm e largura de 1 mm (Tutin *et al.*, 1972). Apresentam cor verde-escura, são brilhantes, glabras, possuem os bordos revirados (sendo convexas superiormente e côncavas inferiormente) e persistem por apenas duas estações de crescimento (Castroviejo *et al.*, 1993).

As flores são de cor castanho-avermelhado, actinomorfas e possuem dimensões reduzidas (Oliveira e Dale, 2012). As flores masculinas dispõem-se em fascículos terminais, mais ou menos condensados e são providos de brácteas, enquanto as flores femininas são solitárias ou geminadas (Castroviejo *et al.*, 1993) (figura 7). O número de flores por inflorescência pode variar dependendo do sexo, no entanto, no máximo cada inflorescência apresenta 20 flores (Gutián *et al.*, 1997). A floração pode ocorrer entre o final do inverno e o início da primavera, mais precisamente a partir dos primeiros dias de fevereiro estendendo-se até abril (Silva *et al.*, 2021).



Figura 7. Flor feminina (A) e masculina (B) de *Corema album* (Fonte: autor).

A polinização é anemófila e os frutos são bagas esféricas brancas ou branco-rosadas com tamanho compreendido entre 5 a 8 mm de diâmetro (Andrade *et al.*, 2017; León-González *et al.*, 2013; Oliveira e Dale, 2012). Os frutos possuem 2 a 4 sementes, sendo o mais comum 3 sementes, as quais apresentam um endocarpo espesso e lenhoso (Calvino-Cancela, 2002) (figura 8). O aparecimento do fruto verifica-se no verão ou no início do outono, entre os meses de julho e outubro, num período que corresponde a temperaturas elevadas, radiação intensa e ausência de chuva, particularmente nas dunas (Andrade *et al.*, 2015; Díaz-Barradas *et al.*, 2016).



Figura 8. Planta em frutificação (A e B) e fruto de *Corema album* (C) (Fonte: autor).

2.4.3. Distribuição geográfica e ecologia

As espécies pertencentes ao género *Corema* são endémicas, verificando-se a sua distribuição geográfica em ambos os lados do oceano atlântico. A espécie *C. conradii* desenvolve-se no Norte da América, enquanto que a espécie *C. album* se encontra presente ao longo da costa sudoeste da Europa, na Península Ibérica, desde o noroeste de Espanha até ao sul de Gibraltar (Gil-López, 2011) (figura 9). Esta espécie foi ainda naturalizada em França.



Figura 9. Área de distribuição de *Corema album* (Fonte: Marques, E., 2007).

As populações de *C. album* encontram-se distribuídas ao longo de 1500 km, que vão desde Camariñas (A Corunha, Espanha) até à sua localização mais austral em Punta Camarinal (Cádiz, Espanha), extremos que, tendo em conta as suas denominações, nos fazem crer que os seus topónimos tiveram origem na abundância deste arbusto nestas zonas (Fernández, 1988). É relativamente fácil encontrar muitas outras localidades na costa oeste peninsular com toponímias resultantes da presença da camarinha, como por exemplo Casais das Camarinheiras (Soure) ou até mesmo no caso em estudo, a Mata do Pinhal do Camarido, mandado plantar por D. Dinis durante o seu reinado (século XIII), com o objetivo de fixar as dunas, impedindo assim o avanço das águas do oceano na zona de foz do rio Minho. Reza a lenda, que as camarinhas são lágrimas da Rainha Santa Isabel, que chorava enquanto caminhava pelo pinhal. Cada lágrima vertida, caindo na erva daninha, transformava-se em deliciosas pérolas de sabor simultaneamente doce e ácido (Silva *et al.*, 2021).

Verifica-se ainda a existência de uma população isolada, nos Açores, que corresponde à subespécie *azoricum* (Alvarez-Cansino *et al.*, 2010; Larrinaga e Guitián, 2016; León-González *et al.*, 2013; Oliveira e Dale, 2012). Esta subespécie é um endemismo dos Açores, onde é espécie protegida, ocorrendo nas ilhas de São Miguel, Graciosa, São Jorge, Pico e Faial.

Os resultados de um estudo realizado pela Universidade de Sevilha, o qual tinha como objetivos a identificação e caracterização das populações de camarinha ao longo de toda a sua área de

distribuição, mostraram que só existem duas zonas com populações extensas desta espécie, contendo indivíduos de todas as classes de idades: no litoral português, entre a Nazaré e Ovar, e na costa de Huelva, no sistema dunar de Asperillo (Espanha). Contudo, existe também, outra população importante localizada na península de Tróia (Portugal). As restantes populações, constituídas essencialmente por indivíduos velhos, estão limitadas a zonas de areia sobre arribas ou encontram-se fragmentadas, como se verifica no caso da foz do rio Minho. A sobrevivência destas populações fragmentadas, reduzidas a ilhas de areia sem regeneração natural, está dependente de medidas de proteção e regeneração de *habitats* (Clavijo *et al.*, 2002).

Segundo a Direção Geral de Ambiente da Comissão Europeia, os camarinhas correspondem ao Habitat 2250 - Dunas e paleodunas com matagais de zimbro, possuindo proteção legal sob a Diretiva Habitats nº 92/43/CEE, o que lhes confere a designação de *habitat* prioritário, pela sua distribuição restrita e vulnerabilidade (ICNB, 2023). As comunidades de camarinha são muito vulneráveis ao pisoteio, uma vez que a mobilização das areias desenterra as pequenas plântulas que nunca se chegam a desenvolver.

Atualmente, esta espécie encontra-se em acelerado declínio devido à elevada degradação ou destruição dos *habitats* costeiros, à redução do número de populações em consequência do desenvolvimento urbano, ao impacto do turismo e da florestação das dunas, bem como à disseminação das espécies invasoras no seu *habitat* (Calvinõ e Cancela, 2005), pelo que a obtenção de um protocolo de propagação de plantas em larga escala seria de extrema importância.

2.4.4. Propagação

O desenvolvimento da planta de *C. album* ocorre em solos constituídos por, pelo menos, 70% de componente arenosa e no máximo, 30% de argila, podendo ainda conter matéria orgânica até 2,6% e um valor de pH compreendido entre 5,6 e 7,8 (Marques, 2007; Oliveira e Dale, 2012).

Como referido anteriormente, esta espécie possui uma polinização do tipo anemófila, dependendo do vento para a dispersão do seu pólen (Gutián *et al.*, 1997). Quanto à dispersão das sementes, esta é do tipo zoocoria, estando dependente de animais como coelhos, raposas, gaivotas e melros, os quais possuem a capacidade de transportar as sementes para outros locais (Calviño, 2000).

A cor da camarinha, maioritariamente branca e muito brilhante, é uma característica peculiar desta fruta, sendo de extrema importância na propagação da espécie. No Verão, as zonas dunares são propícias ao aparecimento de nevoeiro, momento que coincide com o

amadurecimento do fruto. Estas condições favorecem o seu contraste e aumentam a sua visibilidade, o que consequentemente aumenta a atenção dos animais, favorecendo assim a dispersão da semente e a perpetuação da espécie (Díaz-Barradas *et al.*, 2016).

Os sistemas dunares litorais da Península Ibérica, onde se desenvolve esta espécie, são ecossistemas que têm sofrido uma grande regressão nos últimos anos devido à ocupação antrópica. O impacto humano tem-se verificado na crescente urbanização das zonas costeiras, na alteração da vegetação dos ecossistemas com a introdução de espécies exóticas, nomeadamente a espécie *Acacia sp* e *Carpobrotus edulis* (Calviño-Cancela, 2005) e no aumento do turismo nas zonas dunares, o que provoca uma redução significativa dos animais intermediários na propagação da espécie, principalmente durante o verão, coincidindo com a época de dispersão das sementes. Estas perturbações têm originado a degradação destes locais e consequentemente a fragmentação e diminuição da espécie *C. album* (Clavijo, *et al.*, 2002).

Várias técnicas de micropropagação como a embriogénese somática (Canhoto *et al.* 1999), a organogénese (Arezki *et al.*, 2000) e a proliferação de rebentos axilares (Jain e Häggman 2007) têm sido aplicadas na propagação *in vitro* de diversas plantas lenhosas. De entre estas metodologias, a proliferação de rebentos axilares é a mais frequentemente utilizada na propagação clonal de espécies da família Ericaceae (Gomes e Canhoto, 2009). A espécie *C. album* tem sido alvo de diversos trabalhos experimentais de propagação por via vegetativa e seminal não existindo, no entanto, um protocolo consensual para a sua multiplicação.

Para a propagação vegetativa desta espécie, Álvarez-Cansino e outros (2017) testaram a capacidade de enraizamento em material colhido de plantas adultas, utilizando tratamentos com reguladores de crescimento e dois tipos de substrato, perlite/vermiculite (1:1) e areia/turfa (1:1). Estes autores obtiveram os melhores resultados na sobrevivência e enraizamento das estacas através da aplicação de ácido indol butírico (AIB) em estacas colocadas no substrato perlite/vermiculite, com taxas de sucesso perto de 60%.

A propagação seminal tem sido mais estudada, tendo para o efeito sido utilizado material vegetal de várias origens, dos quais se destacam: sementes extraídas de excrementos de aves ou mamíferos (Clavijo *et al.* 2003; Calviño-Cancela, 2004; Costa, 2011; Lopes, 2015; Álvarez-Cansino, 2016), bancos de sementes em condições naturais (Lopes, 2015) e sementes extraídas dos frutos frescos ou conservados (Clavijo *et al.*, 2003; Costa, 2011; Santos *et al.*, 2014; Lopes, 2015; Álvarez-Cansino *et al.*, 2017). Foram ainda utilizados tratamentos que pretendiam mimetizar as condições naturais de germinação, como a escarificação química e/ou mecânica (Clavijo *et al.*, 2003; Costa, 2011; Santos *et al.*, 2014; Lopes, 2015; Álvarez-Cansino *et al.*, 2017)

para simular a passagem das sementes pelo trato digestivo dos animais uma vez que a espécie tem sido considerada obrigatoriamente endozoocórica; a estratificação com frio (Clavijo *et al.*, 2003; Álvarez-Cansino *et al.*, 2017) e o tratamento com fumo (Álvares-Cansino *et al.*, 2017) para simular as condições ambientais climáticas e de fogos. Os reguladores de crescimento têm sido, igualmente, utilizados com o objetivo de quebrar a dormência das sementes (Santos *et al.*, 2014; Álvarez-Cansino *et al.*, 2017). O sucesso da germinação tem sido variável, sendo que as melhores percentagens foram obtidas por Álvares-Cansino e outros (2017) com a utilização de reguladores de crescimento, obtendo uma percentagem de germinação próxima de 40% (Oliveira *et al.*, 2020).

Atualmente, alguns estudos referentes à cultura *in vitro* para o estabelecimento e multiplicação da camarinha demonstram que o meio de cultura *Woody Plant Medium* (WPM) suplementado com N6-(2-Isopentenil)adenina (2iP) e cinetina, obtiveram os melhores resultados (Alves, 2019).

2.4.5. Metabolismo de *Corema album*

Vários estudos têm evidenciado o caráter antioxidante dos frutos e folhas de *Corema album*, fundamentalmente associado à sua riqueza em compostos fenólicos (Andrade *et al.*, 2017; Diaz-Barradas *et al.*, 2016; León-González *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2015). León-González e outros colaboradores (2013) identificaram e quantificaram, através de técnicas de cromatografia, quinze compostos presentes no fruto da camarinha, incluindo ácidos fenólicos (2268 mg/Kg), flavonoides (638 mg/Kg) e antocianinas (19 mg/Kg), verificando-se que os ácidos fenólicos são os principais constituintes deste fruto. Foram ainda identificados onze compostos distintos: ácido benzoico, ácido salicílico, ácido *t*-cinâmico, ácido *p*-hidrobenzóico, ácido vanílico, ácido gentísico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido cafeico, sendo os ácidos benzoico, vanílico, ferúlico e cafeico os mais abundantes. Para além da identificação dos compostos presentes nos extratos fenólicos do fruto desta espécie, León-González e outros (2012) também comprovaram os seus efeitos protetores contra o stresse oxidativo em células hepáticas. Mais tarde, Ferreira (2018) evidenciou igualmente os frutos e folhas de *C. album* como potenciais fontes de compostos fenólicos e flavonoides, apresentando as folhas uma maior riqueza face ao fruto, assim como uma maior atividade antioxidante.

Estudos realizados em sementes de *C. album* mostraram que estas são ricas em lípidos insaturados, tendo sido verificada a presença do ácido alfa-linólico em todas as partes da planta estudadas, o que revela que esta espécie é uma fonte de lípidos saudáveis (Martin *et al.*, 2019; Brito *et al.*, 2020).

Ensaios acerca do potencial antioxidante das folhas de *C. album* evidenciaram que a sua fração rica em polifenóis apresenta uma ação protetora contra o stresse oxidativo, assim como contra a toxicidade induzida pela alfa-sinucleína (Macedo *et al.*, 2015). A genipina, substância extraída das folhas de camarinha, tem revelado resultados promissores no combate à agregação de alfa-sinucleína no cérebro, uma proteína que está associada ao aparecimento da doença de Parkinson, interferindo no controlo de movimentos (Rosado-Ramos *et al.*, 2023).

Para além disso, verificou-se que os extratos das folhas da camarinha apresentam efeitos citotóxicos contra a linha celular HT-29 de cancro do cólon, induzindo a morte celular destas (Silva e Barroca, 2020).

2.5. Caracterização da espécie *Crithmum maritimum*

Crithmum maritimum L., comumente conhecido como funcho-do-mar, funcho-marítimo, funcho-marinho, perrexil-do-mar ou bacila, é uma planta halófita facultativa perene que cresce em falésias marítimas e praias de areia, encontrando-se amplamente distribuída ao longo das áreas costeiras do Mar Mediterrâneo e do Oceano Atlântico.

Esta espécie pertence à família Apiaceae, a qual inclui plantas como a cenoura, a salsa e o aipo. A presença de canais produtores/condutores de óleos aromatizantes na sua estrutura, confere às apiáceas uma essência odorífera e um sabor único, da qual o funcho-do-mar não é exceção (Castroviejo *et al.*, 1993).

2.5.1. Taxonomia

O funcho-do-mar pertence ao domínio Eukarya (Archaeplastida), reino Plantae (Embryophyta), divisão Spermatophyta, Subdivisão Magnoliophyta (Angiospermophyta), classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Apiales, família Apiaceae, género *Crithmum* e à espécie *Crithmum maritimum* (UTAD, 2023). Esta espécie contém 20 cromossomas (Castroviejo *et al.*, 1993).

A família Apiaceae é também conhecida como Umbelliferae, tendo recebido esta denominação pela característica inconfundível das suas inflorescências umbeladas. Este *taxa* abrange cerca de 3.700 espécies distribuídas por 455 géneros.

2.5.2. Morfologia

C. maritimum (figura 10) é uma espécie de plantas herbáceas aromáticas perenes e eretas, com rizoma lenhoso rastejante e desprovida de pelos. Os caules são maciços e estriados, possuem altura compreendida entre os 15 e os 45 cm e apresentam-se profusamente ramificados. Estes são habitualmente lenhosos na base, apresentado frequentemente restos de bainhas foliares (Castroviejo *et al.*, 1993).



Figura 10. A - Aspectos descritivos de *Crithmum maritimum*: a) hábito da planta; b) bráctea; c) bractéola; d) flor; e) pétala, face externa; f) pétala, face interna; g) fruto; h) mericarpo, face dorsal; i) mericarpo, face comissural; j) secção transversal do mericarpo (Fonte: Castroviejo *et al.*, 1993); **B** - Hábito da planta (Fonte: autor).

As folhas dispõem-se 2 a 3 penatissetas, exibem cor verde-clara, são brilhantes, carnudas, de contorno triangular, com segmentos terminais espessos, de 1 a 5 cm linear-lanceolados e subagudos. As folhas inferiores possuem pecíolos longos e bainhas levemente envolventes enquanto as folhas superiores são ligeiramente mais curtas, têm pecíolos curtos e bainhas que envolvem completamente o caule.

As flores encontram-se dispostas em umbelas verde-amareladas com 10 a 32 raios de 1 a 4,5 cm, lisos, que aumentam de diâmetro e habitualmente alongam durante a frutificação. As

umbelas possuem flores maioritariamente hermafroditas e algumas funcionalmente masculinas, com raios de 5 a 10 mm (figura 11). Os frutos são lisos, possuem forma ovoide (3-6 x 1,5-4,5 mm) e ostentam cor amarelada ou purpúrea (Castroviejo *et al.*, 1993).

A época de floração ocorre de maio a outubro e os frutos iniciam a sua maturação de novembro a dezembro.



Figura 11. Plantas de *Crithmum maritimum* em Moledo do Minho: **A** – Flores; **B** – Plantas em floração (Fonte: autor).

2.5.3. Distribuição geográfica e ecologia

O funcho-do-mar cresce selvagem nas fendas de rochedos em arribas, quebra-mares, esporões litorais e mais raramente em praias arenosas. Desenvolve-se ao longo da costa do Mar Mediterrâneo e do Mar Negro, bem como na costa atlântica de Portugal, Sul e Sudoeste de Inglaterra, País de Gales e Sul da Irlanda (Özcan, 2000; Ben Amor *et al.*, 2005; Cornara *et al.*, 2009) (figura 12).

Segundo a Direção Geral de Ambiente da Comissão Europeia, o Funcho-do-mar insere-se no Habitat 1230 – Falésias com vegetação das costas atlânticas e bálticas, possuindo proteção legal sob a Diretiva Habitats nº 92/43/CEE, o que lhes confere a designação de habitat prioritário, pela sua distribuição restrita e vulnerabilidade (ICNB, 2023). Este habitat é caracterizado por possuir vegetação em fendas mais ou menos terrosas de rochedos graníticos litorais e em plataformas expostas à salsugem, tipicamente organizada sob a forma de complexos de vegetação permanente (Comissão Europeia, 2003).



Figura 12. Distribuição de *Crithmum maritimum* em Portugal continental (Fonte: UTAD, Jardim Botânico).

2.5.4. Propagação

A polinização de *C. maritimum* é essencialmente entomófila, levada a cabo por diversas espécies de insetos e facilitada pela disposição do pólen na planta e pela mudança de coloração da flor. No entanto, a reprodução também pode ocorrer por autopolinização. Esta espécie produz um elevado número de sementes viáveis, o que permite uma fácil multiplicação por germinação. Fatores como temperatura, a salinidade e as condições de luz, têm um impacto significativo no processo de germinação de sementes e produção de mudas de funcho-do-mar (Okusanya *et al.*, 1977).

Em laboratório, a germinação das sementes de Funcho-do-mar tem sido realizada com êxito em água destilada, sendo que compostos nitrogenados promovem e aceleram significativamente a sua germinação (Atia *et al.*, 2009). É possível o cultivo desta espécie em ambientes salinos, no entanto, durante a germinação e os estágios iniciais de crescimento, é necessário a irrigação com água não salina (Atia *et al.*, 2011).

Embora esta espécie forneça um número limitado de estacas, a propagação por este meio também é possível, sendo a transplantação para campo relativamente fácil, desde que os explantes produzam raízes suficientes (Atia *et al.*, 2011).

A propagação *in vitro* é uma técnica útil para a multiplicação e conservação de germoplasma de qualquer espécie vegetal (Kavitha *et al.*, 2010), tornando-se uma possível alternativa para a produção de plantas em massa. A cultura *in vitro* de *C. maritimum*, foi relatada por Grigoriadou e Maloupa (2008), tendo o meio de cultura MS sido o que pareceu ser mais eficaz para a regeneração de explantes da extremidade apical desta planta, pois leva a um incremento significativo do número de novos rebentos produzidos por explante (3 a 4) e melhora a altura destes (3,1 cm). Segundo os mesmos autores, a combinação dos reguladores de crescimento ácido α -naftalenoacético (NAA) com 6-Benziladenina (BA), favorece a proliferação e enraizamento, resultando numa elevada percentagem de enraizamento e aumento do número de raízes (Grigoriadou e Maloupa, 2008).

2.5.5. Metabolismo de *Crithmum maritimum*

Os rebentos e os frutos de *C. maritimum* são ricos em compostos voláteis (Atia *et al.*, 2009), sendo a sua quantidade presente nos frutos de cerca de 0,8% e de 0,15 - 0,3% nas folhas (Franke, 1981). Os principais compostos voláteis identificados consistem em sabineno, dilapiol, α -pineno, γ -terpineno (crithmen), p -cimol, apiole, cis- β -ocimene, timol e terpinen-4-ol, sendo a concentração destes compostos nas folhas de *C. album* muito variável e dependente de diversos fatores bióticos e abióticos (Pateira *et al.*, 1999). Relativamente aos frutos, descreve-se que estes contêm aproximadamente 8 – 40 % de dilapiol, 12 % de α -pineno e até 48 % de γ -terpineno (Franke, 1981).

As folhas de *C. maritimum* são ricas em diversos compostos como vitamina C, carotenoides e flavonoides (Guil-Guerrero e Rodríguez-Garcia, 1999). Os mesmos autores identificaram o ácido quínico, um importante composto fenólico, considerado benéfico para a saúde humana devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Este é produzido sinteticamente por hidrólise do ácido clorogénico e empregue no fabrico de “Tamiflu”, um medicamento antiviral utilizado para o tratamento da gripe A e B (Buchler GMBH, 2023).

O éter aromático O-geranilvanilina 3 também foi isolado a partir de *C. maritimum* (Cunsolu *et al.*, 1993), verificando-se igualmente a presença de ácido crítmico e compostos de poliacetileno (Hegnauer, 1973; Franke, 1981). Recentemente, foi descrita a ocorrência de dois flavonoides

bioativos nesta espécie: a diosmina (3', 5, 7-trihidroxi-4'-metoxiflavona 7-rutinosídeo) e a hesperidina (3', 5, 7-tri-hidroxi-4'-etoxiflavanona 7-ramnoglicosídeo) (Cornara *et al.*, 2009).

Meot-Duros e outros (2010) purificaram o faltarindiol a partir de um extrato apolar da folha de *C. maritimum*, sendo que este composto possui propriedades antibacterianas e citotóxicas com múltiplas atividades biológicas, como anti-inflamatórios, antiagregantes plaquetários e propriedades antimutagénicas (Christensen e Brandt, 2006). Estudos realizados, concluíram que o Faltarindiol extraído a partir das folhas desta espécie inibiu fortemente o crescimento de *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*, tendo também apresentado toxicidade contra células IEC-6 (células do epitélio intestinal de rato) (Meot-Duros *et al.*, 2010).

Os óleos extraídos das folhas de *C. maritimum* apresentam altas concentrações de ácidos gordos ω -3 e ω -6 (Guil-Guerrero e Rodriguez-Garcia, 1999). Com base no peso seco, a percentagem de lípidos atinge 2,02 % para lípidos neutros, 0,57 % para glicolípidos e 0,26 % para os fosfolípidos. Nos frutos, a percentagem de lípidos chega a 44,4 %, contendo altos valores de ácido oleico (78,6 %), baixo teor de ácido palmítico (4,8 %) e uma quantidade significativa de ácido linoleico (15,4 %) (Atia *et al.*, 2010a). Esta composição é semelhante ao azeite e ao óleo de colza, sendo que estes resultados confirmam a boa qualidade dos lípidos presentes nesta espécie.

C. maritimum apresenta ainda vários compostos solúveis em água, entre os quais se encontram hidratos de carbono, nomeadamente sacarose e glicose, e ácidos orgânicos como malato e quinato (Meot-Duros e Magné, 2009). As folhas desta planta são uma fonte significativa de minerais como cloridratos, sulfatos, carbonatos, potássio, acetato, iodo e brometo, enquanto nos frutos foram identificados fosfatos, cálcio, enxofre e aminoácidos sulfurados (Atia *et al.*, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da área de estudo

As espécies vegetais do estudo crescem na zona dunar de Moledo do Minho, no Noroeste de Portugal continental, concelho de Caminha, distrito de Viana do Castelo. A colheita de *Corema album* foi realizada na extremidade Norte da praia de Moledo (coordenadas: 41.851197, -8.865898) e a recolha de *Crithmum maritimum* na extremidade Sul da mesma praia (coordenadas: 41.8413662, -8.870401) (figura 13).



Figura 13. Localização da área de estudo: A – Local de recolha de *Corema album*, B – Local de recolha de *Crithmum maritimum* (Fonte: Google Earth).

A proximidade da foz do rio Minho e o ambiente de moderada energia faz com que nesta zona costeira se acumulem sedimentos, dando origem a praias, nomeadamente a praia de Moledo do Minho. Com base na Carta Geológica de Portugal na escala 1/50000, o sector litoral que compreende a praia de Moledo é maioritariamente arenoso e de idade moderna, com predominância de areia de grão fino e a presença de algumas formações rochosas na extremidade Sul (Teixeira, 1961). A extremidade Norte encontra-se parcialmente protegida da agitação marítima de Noroeste pela presença da Ilha da Ínsua e do vento, pela presença da Mata Nacional do Camarido. A área é abrangida pelo Parque Natural do Litoral Norte, que se estende na orla costeira de Caminha até Esposende.

No Alto Minho o clima é temperado, sobretudo de influência atlântica, embora se identifiquem características mediterrânicas. O clima é fresco e húmido, com verões e invernos amenos, devido à abertura para o Atlântico. Contudo, por influência mediterrânica, o verão pode ser bastante quente e seco, com luminosidade forte, grande insolação e carência de chuvas, enquanto o inverno se apresenta chuvoso e frio (Ribeiro *et al.*, 1988).

A temperatura média anual varia entre 12,5 °C e 15,0 °C, podendo considerar-se amena. As amplitudes térmicas médias anuais rondam os 15 °C, com a temperatura mínima a variar entre os 4,8 °C e 15,2 °C e a temperatura máxima a alterar-se entre os 14,5 °C e os 26,2 °C. As temperaturas negativas raramente se fazem sentir na região e as que ascendem dos 20 °C ocorrem entre os meses de maio a outubro (Ribeiro *et al.*, 1988).

A precipitação média anual assume o valor de 1758 mm e apresenta-se de forma intensa nos meses de inverno, por influência dos ventos marítimos. Considerando os valores de precipitação, disponibilizados pelo SNIRH, da estação mais próxima do concelho de Caminha (Ponte de Lima), verifica-se que os valores médios mensais se situam entre os 76 e 168 mm, podendo ser considerado um valor significativo de precipitação (CMC, 2016-2020).

No que concerne à humidade relativa do ar, considerando os valores obtidos pela estação meteorológica próxima de As Eiras (Galiza), verifica-se que os valores médios são bastante elevados, encontrando-se na sua maioria acima de 80 %. Relativamente aos valores de evapotranspiração, estes encontram-se entre os 700 mm e 800 mm (CMC, 2016-2020).

A radiação solar, nesta região, possui um valor médio inferior a 140 kcal/cm², constituindo assim um dos valores mais baixos de Portugal continental. Estes valores devem-se ao efeito da nebulosidade que aumenta progressivamente do interior para a costa e de Sul para Norte (Silva, 2021). Nesta área, os valores de insolação média anual, variam entre 2400 horas e 2500 horas, que correspondem a um número médio de horas de sol considerável (Silva, 2021).

Os ventos dominantes neste território, são sobretudo de quadrante norte e noroeste, atingindo velocidades por vezes acima dos 80 km/h, caracterizando as vulgarmente conhecidas nortadas (Ribeiro *et al.*, 1988).

A colheita de *Corema album* foi realizada em dezembro de 2022 e em fevereiro, abril e julho de 2023. Já a recolha de *Crithmum maritimum* foi efetuada em janeiro, março, maio e julho de 2023. No quadro 1 estão registados os dados edafoclimáticos da região, referentes às datas da colheita do material biológico (IPMA, 2022; IPMA, 2023; Weather spark, 2022; Weather spark, 2023).

Quadro 1. Dados edafoclimáticos da região de Moledo do Minho, onde foram colhidas as plantas em estudo, entre novembro de 2022 e julho de 2023. (Adaptado de IPMA, 2022-2023; Weather spark, 2022-2023).

Mês	Temperatura média mínima (°C)	Temperatura média máxima (°C)	Precipitação total (mm)	Velocidade média do vento (km/h)	Classificação climática (em relação à temperatura do ar e à precipitação)
Novembro	9,8	16,9	257,3	13,4	Quente e chuvoso
Dezembro	10,1	15,7	302,2	13,6	Extremamente quente e muito chuvoso.
Janeiro	5,9	13,6	155,5	14,1	Quente e normal.
Fevereiro	4,7	16,1	15,9	13,3	Normal e extremamente seco.
Março	8,8	16,4	110,7	13	Quente e seco.
Abril	9,5	19,9	31,3	13,8	Muito quente e extremamente seco.
Maio	12,3	22,6	39,9	12,5	Muito quente e muito seco.
Junho	15,1	23,4	119,9	11,6	Muito quente e muito chuvoso
Julho	13,9	23,6	13,1	12	Muito quente e extremamente seco.

3.2. Micropropagação de *Corema album*

3.2.1. Material vegetal

A colheita de *Corema album* foi realizada em dezembro, fevereiro, abril e maio na extremidade Norte da praia de Moledo do Minho (coordenadas: 41.851197, -8.865898), com a licença nº 547 para recolha de amostras de exemplares da flora selvagem no território de Portugal continental. Os explantes foram obtidos a partir de ramos axiais de plantas femininas e masculinas desta espécie, tendo sido acondicionados em sacos de plástico durante o transporte e inoculados de seguida.

3.2.2. Protocolo de desinfeção

Os explantes retirados do material colhido na natureza foram sujeitos a processos de desinfeção, de acordo com o quadro 2.

Quadro 2. Protocolos de desinfecção a que foram sujeitos os explantes de *C. album*, colhidos na natureza no processo de otimização de micropropagação da espécie.

Procedimento	Protocolo					
	1 (controle)	2	3	4	5	6
Lavagem dos explantes em água corrente.	x	x	x	x	x	x
Imersão dos explantes em solução de etanol a 70 % durante 2 minutos.	x		x	x	x	x
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 30 minutos.			x			
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 15 minutos.	x					
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 10 minutos.					x	
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 5 minutos.						x
Submersão dos explantes numa solução de detergente (10 gotas/100 ml H ₂ O) em banho de ultrassons durante 15 minutos a 20°C.		x				
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 20 minutos.		x		x		
Submersão dos explantes numa solução de Benomyl ¹ (0,1g/L) em agitação durante 30 minutos.			x			
Submersão dos explantes numa solução de Mancozebe ¹ (1g/L) durante 10 minutos.				x	x	
Submersão dos explantes numa solução de Mancozebe ¹ (1g/L) durante 5 minutos.						x
Lavagem dos explantes com água destilada estéril durante 5 minutos, repetindo este procedimento 3 vezes.	x	x	x	x	x	x

¹ Substância antifúngica.

3.2.3. Ensaios de multiplicação *in vitro*

▪ Preparação do meio WPM

O meio de cultura WPM foi preparado com os macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e hidrato de carbono, de acordo com o descrito por *HiMedia Laboratories*, 2017, tendo sido suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (cinetina - 0,5 mg/L e 1 mg/L e 2iP (N6-(2-Isopentenil)adenina) - 0 mg/L e 2 mg/L), como descrito no quadro 1 (apêndice 1). O valor de pH do meio de cultura foi ajustado a 5,85 e o meio de cultura foi solidificado com agar (7 g/L).

Para uma maior facilidade de legendagem, passou a dignar-se os diferentes meios de cultura da seguinte forma:

- WPM 1 - meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (1 mg/L);
- WPM 2 - meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (0,5 mg/L) e 2iP (2mg/L);
- WPM 3 - meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (1 mg/L) e 2iP (2mg/L).

▪ Inoculação dos explantes de *Corema album*

A inoculação de todos os explantes foi realizada em ambiente estéril em câmara de fluxo laminar (CAUMA FL-2), em frascos com meio de cultura WPM, previamente esterilizado por autoclave (pressão de 1 atmosfera durante 15 minutos) de acordo com o quadro 3. Utilizaram-se como explantes rebentos axilares com comprimento de cerca de 10 mm, os quais foram tratados de três formas distintas:

- remoção das folhas basais e manutenção do ápice caulinar (parte aérea com ápice caulinar);
- remoção, das folhas basais e remoção do ápice caulinar (parte aérea sem ápice caulinar);
- segmentos nodais com remoção da totalidade das folhas (segmentos nodais).

Após inoculação, os frascos foram colocados em câmara de cultura a uma temperatura de 25°C, humidade relativa de 65 %, intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão (figura 14).

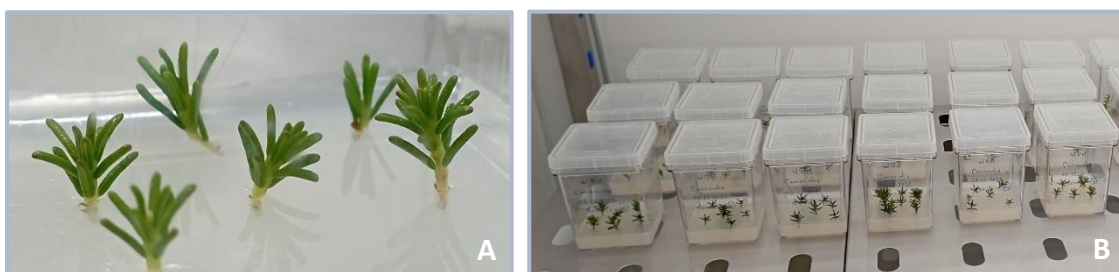


Figura 14. Processo de inoculação: **A** – Explantes de *C. album*; **B** – Explantes em câmara de cultura (Fonte: autor).

Decorridas 12 semanas após a inoculação, procedeu-se à repicagem dos explantes do ensaio 5 e 6. A repicagem dos explantes dos ensaios 15, 16, 17 e 18 foi realizada após 10 semanas da respetiva inoculação, enquanto a repicagem dos explantes dos ensaios 19, 20, 21 e 22 foi feita após 8 semanas da sua inoculação.

Quadro 3. Estabelecimento da cultura *in vitro* de *C. album* em meio de cultura WPM com diferentes suplementações hormonais.

Ensaio	Data da inoculação	Explante	Protocolo de desinfecção	Meio de cultura
1	05.12.2022	Parte aérea com ápice caulinar	1	WPM 1
2	02.02.2023	Parte aérea com ápice caulinar	2	WPM 1
3	09.02.2023	Parte aérea com ápice caulinar	3	WPM 1
4	05.04.2023	Parte aérea com ápice caulinar	4	WPM 1
5	05.04.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	4	WPM 1
6	05.04.2023	Segmentos nodais	4	WPM 1
7	09.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	5	WPM 1
8	09.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	5	WPM 1
9	09.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	5	WPM 2
10	09.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	5	WPM 2
11	09.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	5	WPM 3
12	09.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	5	WPM 3
13	15.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	6	WPM 1
14	15.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	6	WPM 1
15	15.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	6	WPM 2
16	15.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	6	WPM 2
17	15.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	6	WPM 3
18	15.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	6	WPM 3
19	22.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	6	WPM 2
20	22.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	6	WPM 2
21	22.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	6	WPM 3
22	22.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar	6	WPM 3

3.3. Micropropagação de *Crithmum maritimum*

3.3.1. Material vegetal

A recolha de *Crithmum maritimum* foi realizada em janeiro, fevereiro, maio e julho na extremidade Sul da praia de Moledo do Minho (coordenadas: 41.8413662, -8.870401), com a licença nº 547 para recolha de amostras de exemplares da flora selvagem no território de Portugal continental. Os explantes foram obtidos a partir de ramos axiais das plantas, tendo sido acondicionados em sacos de plástico durante o transporte e inoculados de seguida.

3.3.2. Protocolo de desinfeção

Os explantes retirados do material colhido na natureza foram sujeitos a dois processos de desinfeção, de acordo com o quadro 4.

Quadro 4. Protocolos de desinfeção a que foram sujeitos os explantes de *C. maritimum*, colhidos na natureza no processo de otimização de micropropagação da espécie.

Procedimento	Protocolo	
	1	2
Lavagem dos explantes em água corrente.	x	x
Imersão dos explantes em solução de etanol a 70 % durante 2 minutos.	x	x
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 15 minutos.	x	
Imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 10 minutos.		x
Submersão dos explantes numa solução de Mancozebe (1 g/L) durante 10 minutos.		x
Lavagem dos explantes com água destilada estéril durante 5 minutos, repetindo este procedimento 3 vezes.	x	x

3.3.3. Ensaio de multiplicação *in vitro*

▪ Preparação do meio MS

O meio de cultura MS foi preparado com os macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e hidrato de carbono de acordo com o descrito por Murashige e Skoog (1942), tendo-se adquirido o meio de cultura à empresa Duchefa (Sais da marca “*Duchefa*” para meio MS com vitaminas). Ao meio de cultura basal foram adicionadas diferentes concentrações de

reguladores de crescimento (6-Benziladenina (BA) - 0 mg/L e 0,5 mg/L e ácido 1-naftalenoacético (NAA) - 0 mg/L e 0,1 mg/L), como descrito no quadro 2 (apêndice 2). O valor de pH do meio de cultura foi ajustado a 5,85 e o meio de cultura foi solidificado com agar (7 g/L).

▪ **Inoculação dos explantes de *Crithmum maritimum***

A inoculação de todos os explantes foi realizada em ambiente estéril em câmara de fluxo laminar (CAUMA FL-2). O estabelecimento da cultura foi realizado em meio de cultura MS de acordo com o quadro 5. Utilizaram-se como explantes segmentos nodais e entrenós com aproximadamente 10 mm de comprimento, retirados de rebentos axilares de funcho-do-mar (figura 15).

Quadro 5. Estabelecimento da cultura *in vitro* de *C. maritimum* em meio de cultura MS com diferentes suplementações hormonais.

Ensaio	Data da inoculação	Explante	Protocolo de desinfecção	Suplementação hormonal
1	09.01.2023	Segmentos nodais	1	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
2	09.01.2023	Segmentos com entrenós	1	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
3	30.01.2023	Segmentos nodais	1	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
4	30.01.2023	Segmentos com entrenós	2	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
5	13.02.2023	Segmentos nodais	2	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
6	13.02.2023	Segmentos com entrenós	2	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
7	08.05.2023	Segmentos nodais	2	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
8	23.05.2023	Segmentos nodais	2	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)
9	17.07.2023	Segmentos nodais	2	BA (0,5 mg/L)
10	17.07.2023	Segmentos nodais	2	Sem fitoreguladores

Após inoculação, os frascos foram colocados em câmara de cultura a uma temperatura de 25°C, humidade relativa de 65%, intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão.

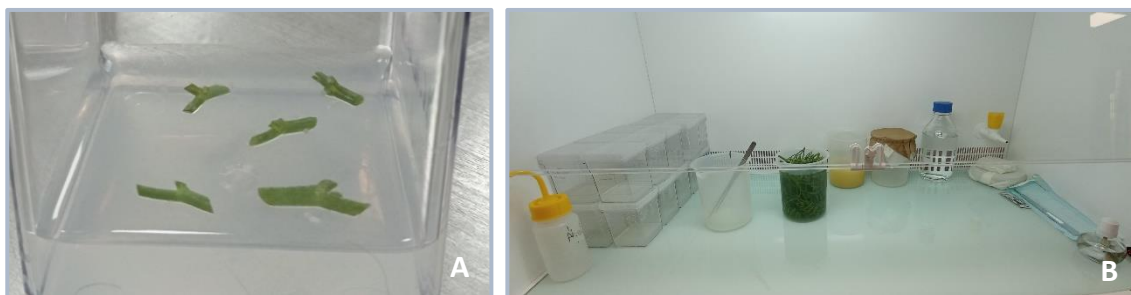


Figura 15. Processo de inoculação: **A** – Explantes de *C. maritimum*; **B** – Câmara de fluxo laminar (Fonte: autor).

3.4. Compostos bioquímicos em *Corema album* e *Crithmum maritimum*

3.4.1. Material vegetal

A colheita de *C. album* foi realizada na extremidade Norte da praia de Moledo do Minho (coordenadas: 41.851197, -8.865898), de acordo com os dados do quadro 6, totalizando 8 amostras.

Quadro 6. Dados de recolha de *C. album*.

Amostra	Data de recolha	Estado fenológico	Parte da planta
1	Dezembro	Vegetativo	Folhas + caules
2			Folhas
3	Fevereiro	Vegetativo	Folhas
4		Floração precoce	Folhas + flores
5		Floração avançada	Folhas + flores
6	Abril	Início da frutificação	Folhas + frutos
7		Floração avançada	Folhas + flores
8	Julho	Frutificação	Folhas + frutos

A recolha de *C. maritimum* foi realizada na extremidade Sul da praia de Moledo do Minho (coordenadas: 41.8413662, -8.870401), de acordo com os dados do quadro 7, perfazendo um total de 5 amostras.

Quadro 7. Dados de recolha de *C. maritimum*.

Amostra	Data de recolha	Estado fenológico	Parte da planta
1	Janeiro	Vegetativo	Folhas + caules
2	Março	Vegetativo	Folhas + caules
3	Maio	Floração	Folhas + caules
4	Julho	Floração	Folhas + caules
5			Flores

As amostras foram desidratadas em estufa a 45 °C (modelo Binder WTB 7200, Tuttlingen, Germany), durante 96 horas e posteriormente trituradas em moinho (modelo Retsch ZM 200) (figura 16).

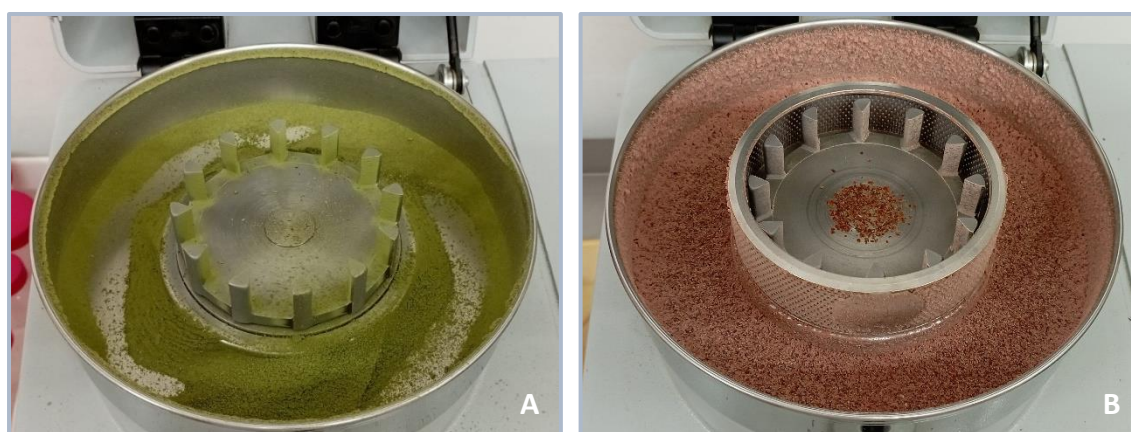


Figura 16. A e B - Processo de moagem (Fonte: autor).

3.4.2. Extração do material vegetal

A extração de compostos bioativos através da utilização de ultrassons é um método frequentemente utilizado e que facilita a extração dos metabolitos do material vegetal. Nesta metodologia, a aplicação de ultrassons com elevada intensidade gera tensões mecânicas na suspensão celular que levam à rutura das células, aumentando assim a solubilização dos metabolitos no solvente e, consequentemente, a eficiência da extração (Aguiar, 2017; Boeira *et al.*, 2018).

No presente trabalho, a extração de cada uma das matrizes foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Annegowda *et al.* (2011) e Tahirović *et al.* (2019), com algumas modificações.

No processo de extração das amostras em estudo foi utilizado como solvente uma solução de metanol e água 70:30 (v/v) na proporção de 1:10 (m/v). Após homogeneização do solvente com

as amostras, estas foram colocadas em banho de ultrassons (35 kHz) durante 30 minutos a 25°C. As amostras foram, depois, centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos a 20 °C e filtradas através de papel de filtro VWR 413 (figura 17). O extrato resultante foi mantido a 4 °C até ser analisado.

Repetiu-se o processo de extração das amostras com uma solução de etanol e água 70:30 (v/v) na proporção de 1:10 (m/v) e com uma solução de acetona e água 70:30 (v/v) na proporção de 1:10 (m/v).

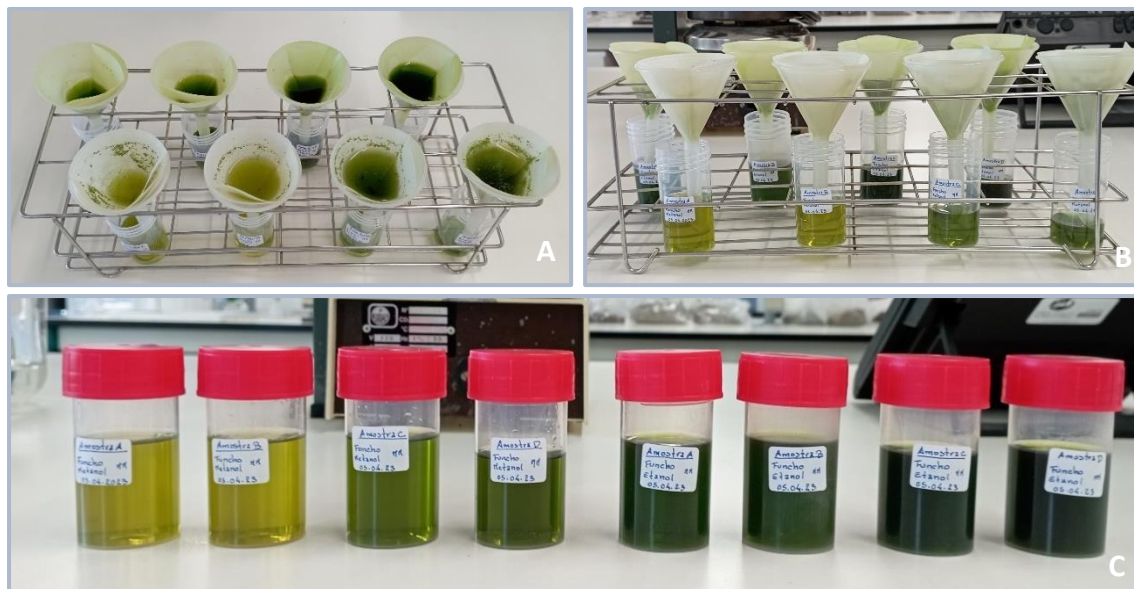


Figura 17. Processo de extração: A e B - Filtração; C – Extrato (Fonte: autor).

3.4.3. Quantificação do teor total de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos foi mensurado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Tawaha *et al.*, (2007), com algumas alterações. Os compostos fenólicos reagem com o reagente Folin-Ciocalteu para produzir fosfomolibdato e fosfotungstato, que resultam numa cor azul e são detetados espectrofotometricamente a 750 nm (Blainski, 2013).

A 50 µl de extrato, previamente diluído, foram adicionados 450 µl de água destilada e 2,5 ml de reagente Folin-Ciocalteu 1:10 (v/v). Após 5 minutos de repouso adicionaram-se 2 ml de carbonato de sódio 7,5 % (p/v) a cada tubo de ensaio. Após incubação a 30°C durante 30 minutos, foi lida a absorvância das amostras por espectrofotometria a 765 nm. Nestes ensaios, foi utilizado o metanol, o etanol ou a acetona como branco, de acordo com o solvente de extração, tendo-se executado igual procedimento ao das amostras.

Para a quantificação do teor em compostos fenólicos foram construídas três curvas de calibração (cetónica, etanólica e metanólica) com uma solução de ácido gálico (apêndice 3). Com os valores de absorvância e o declive da reta, foi calculada a concentração de equivalentes de ácido gálico (GAE) (mg/L) através da equação 1. Este valor de concentração de GAE foi, posteriormente, utilizado na equação 2 para calcular o teor de compostos fenólicos totais presente em cada uma das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados apresentados correspondem aos valores médios.

$$[GAE] \text{ (mg/ml)} = \frac{\left(\frac{Abs}{Declive da reta}\right) \times FD}{1000} \quad \text{Equação 1}$$

$$Fenólicos totais \text{ (mg GAE/g amostra)} = \left(\frac{[GAE] \times V}{m}\right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

[GAE] - Concentração de ácido gálico (mg/ml);

Abs - Absorvância da amostra lida a 765 nm;

FD - Fator de diluição;

1000 - Fator de conversão de mg/L para mg/ml;

V - Volume de solvente utilizado na extração (ml);

m - Massa da amostra utilizada (g).

3.4.4. Quantificação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais presentes nos extratos foi determinado através do método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl₃) descrito por Pourmorad *et al.* (2006) e Gouveia e Castilho (2011). Neste método, o catião alumínio (Al³⁺) forma complexos estáveis com os flavonoides, o que permite determinar a quantidade de flavonoides, evitando interferências de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais (Luís, 2014).

Neste ensaio, a 0,5 ml (500 µl) de extrato previamente diluído adicionaram-se 1,5 ml de metanol, 100 µl de AlCl₃ a 10 % em metanol (p/v), 100 µl de acetato de potássio 1 M e 2,8 ml de água

destilada. Após agitação no vórtex, os tubos de ensaio foram colocados no escuro durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A absorvância das amostras foi lida a 415 nm. Nestes ensaios, foi utilizado o metanol tendo-se realizado igual procedimento ao das amostras.

Procedeu-se de igual forma para a determinação do teor de flavonoides totais nos extratos em solução etanólica e nos extratos em solução cetónica, substituindo o metanol pelo solvente empregue na extração.

Para a quantificação do teor em flavonoides foram construídas três curvas de calibração (cetónica, etanólica e metanólica) com uma solução padrão de quercetina em diferentes concentrações (apêndice 4). Com os valores de absorvância e o declive da reta, foi calculada a concentração de equivalentes de quercetina (QE) (mg/L) através da equação 3. Este valor de concentração de QE foi, depois, utilizado na equação 4 para calcular o teor de flavonoides totais presente em cada uma das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados apresentados correspondem aos valores médios.

$$[QE] \text{ (mg/ml)} = \frac{\left(\frac{Abs}{Declive \text{ da reta}}\right) \times FD}{1000} \quad \text{Equação 3}$$

$$Flavonoides \text{ totais (mg QE/g amostra)} = \left(\frac{[QE] \times V}{m}\right) \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

[QE] - Concentração de quercetina (mg/ml);

Abs - Absorvância da amostra lida a 415 nm;

FD - Fator de diluição;

1000 - Fator de conversão de µg/ml para mg/ml;

V - Volume de solvente utilizado na extração (ml);

m - Massa da amostra utilizada (g).

3.4.5. Quantificação do teor de taninos totais

O teor de taninos totais presente nos extratos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Luís *et al.* (2011), através da diferença entre os compostos fenólicos totais e os compostos fenólicos simples resultantes do tratamento com polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP), tendo por base o pressuposto de que este polímero se liga aos taninos, precipitando-os (Vitti *et al.*, 2005).

Numa primeira fase do processo pesou-se 100 mg de PVPP para tubos Eppendorf e de seguida adicionaram-se 1 ml de água destilada e 1 ml de extrato. Após agitação vigorosa, as amostras foram colocadas a 4 °C durante 15 minutos, de forma a desenvolver o complexo tanino-PVPP (Wannes *et al.*, 2010). Após centrifugação das amostras a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido (no qual se encontram presentes apenas os compostos fenólicos simples, uma vez que os taninos sofreram precipitação com o PVPP) e utilizado para quantificar os compostos fenólicos simples presentes, seguindo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito no ponto 3.2. O teor de taninos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE) (mg/g) e foi calculado através da diferença entre os compostos fenólicos totais e os compostos fenólicos simples (equação 5). Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados apresentados correspondem aos valores médios.

$$\text{Taninos totais (mg GAE/g amostra)} = [FT] - [FS] \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

[FT] - Teor de fenólicos totais (mg/g amostra);

[FS] - Teor de fenólicos simples (mg/g amostra).

3.4.6. Determinação do teor de gordura

O teor de gordura foi obtido através do método Soxhlet. Este é um método de extração contínua de lípidos a partir de alimentos, em que a gordura é extraída através de repetidas lavagens com um solvente orgânico sob refluxo.

Utilizou-se, para o efeito, a unidade de extração (modelo behr EB, behr LaborTechnik GmbH, Düsseldorf, Germany), copos de extração (behr EB 75), reguladores de ebulição (esferas de vidro 5 mm), papel de filtro e cartuchos de extração em celulose (33 × 80 mm, behr). O solvente orgânico empregue foi o éter de petróleo 40-60 °C.

Iniciou-se o processo com a inserção de 10 esferas de vidro em cada copo de extração, os quais foram colocados na estufa a 145 °C durante 30 minutos. Procedeu-se depois ao arrefecimento dos copos de extração em exsicador durante 30 minutos e após este período registou-se o peso de cada um (m_1). Pesou-se 2 g de amostra (m_3), previamente seca e moída, num papel de filtro e acondicionou-se no cartucho de extração. Os cartuchos foram introduzidos na estufa a 125 °C durante 30 minutos e colocados depois em exsicador durante 1 hora, para arrefecimento.

Findo este processo, os cartuchos com as amostras e os copos com o solvente foram colocados no extrator e mantidos sob extração contínua (quatro a cinco gotas por segundo), através de repetidas lavagens com o solvente, sob refluxo. Após evaporação total do solvente, os copos de extração foram removidos da unidade de extração e colocados em estufa a 105 °C durante 30 minutos. Seguidamente, aguardou-se o seu arrefecimento em exsicador durante 30 minutos e procedeu-se à sua pesagem (m_2).

O teor de gordura foi calculado através da equação 6. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada amostra e os resultados apresentados correspondem aos valores médios, expressos em percentagem.

$$\text{Teor de gordura (\%)} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_3)} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

m_1 - Massa do copo extrator com esferas de vidro (g);

m_2 - Massa do copo extrator com gordura após estufa (g);

m_3 - Massa da amostra utilizada (g).

3.4.7. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado a partir de amostras frescas, as quais foram pesadas (m_2) em sacos de papel previamente pesados (m_1). Estes, foram depois colocados em estufa a 45 °C durante cerca de 96 horas (figura 18). Após este tempo, registou-se novamente a massa dos sacos contendo a amostra (m_3) e calculou-se o teor de humidade através da equação 7. Os resultados foram expressos em percentagem.

$$\text{Teor de humidade (\%)} = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2)} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

m_1 - Massa do saco (g);

m_2 - Massa da amostra utilizada (g);

m_3 - Massa da amostra após estufa (g).



Figura 18. A e B - Processo de secagem (Fonte: autor).

3.5. Análise estatística

Estatísticas descritivas (média e desvio padrão (DP)) foram geradas para todas as variáveis do conjunto de dados. A análise de variância foi realizada em avaliações de composição fitoquímica usando o IBM SPSS Statistics 22.0 para Windows (IBM Corporation, 2013). Para avaliação dos efeitos da data de colheita e do solvente de extração nos diferentes parâmetros analisados utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey nas comparações das médias pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$. Nas variáveis em estudo, que contemplavam apenas dois grupos de dados, realizou-se a comparação das médias através do teste de t para amostras independentes, com nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de resultados de *Corema album*

4.1.1. Otimização de um protocolo de micropropagação

O processo de micropropagação de *C. album*, iniciou-se com a recolha do material biológico, em que a seleção da fonte de explantes foi feita com base nas seguintes características: ser representante da espécie ou cultivar desejada; apresentar aspeto saudável e vigoroso, com potencial para responder às condições da cultura e encontrar-se aparentemente livre de doenças e contaminações endógenas (Flickinger, 2010).

A etapa seguinte prendeu-se com a desinfecção dos explantes em laboratório. De uma forma genérica, identificam-se quatro fontes distintas de infeção: a planta, o meio nutritivo, o ar e o manipulador, sendo que a planta representa a fonte de infeção mais relevante (Pierik, 1997). Com o intuito de evitar a contaminação durante a propagação *in vitro*, têm sido desenvolvidos vários protocolos de desinfecção (Barrett e Cassells, 1994; Hussain *et al.*, 1994; Mihaljevic *et al.*, 2013). As superfícies dos materiais vegetais encontram-se naturalmente contaminadas com microrganismos provenientes do meio ambiente. Por esse motivo, a desinfecção do material vegetal usando substâncias químicas é um processo crítico. Os desinfetantes mais comumente utilizados são o hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, etanol, cloreto de mercúrio, peróxido de hidrogénio e o nitrato de prata (Mihaljevic *et al.*, 2013). Frequentemente, adiciona-se uma substância surfactante (ex.: Tween 20) à solução de desinfecção, com o objetivo de aumentar a eficiência da mesma (Oyebanji *et al.*, 2009).

Os resultados do estabelecimento *in vitro* dos explantes de *C. album* encontram-se descritos no quadro 8. O ensaio número 1, sujeito ao protocolo de desinfecção 1, descrito no ponto 2.1 da secção Materiais e Métodos, apresentou uma taxa de contaminação dos explantes de 100 % (quadro 8), o que levou à necessidade de alteração do mesmo. Assim, numa nova tentativa de desinfecção do material vegetal foram acrescentados ao protocolo anterior a lavagem dos explantes numa solução de detergente (10 gotas/100 ml H₂O) e em banho de ultrassons (ensaio 2). Contudo, também neste ensaio os explantes apresentaram uma taxa de contaminação de 100 % (quadro 8). Dado ter-se identificado que os principais agentes de contaminação eram fungos, procedeu-se a nova modificação do protocolo de desinfecção, introduzindo-se uma etapa de imersão dos explantes numa solução antifúngica de Benomyl 0,1 g/L (protocolo de desinfecção 3, descrito no ponto 2.1). Mas, uma vez mais, se observou a contaminação de todos os explantes

inoculados (quadro 8), mostrando que o Benomyl 0,1 g/L não seria a solução mais indicada para eliminar os fungos que se encontravam no material vegetal.

Quadro 8. Taxas de contaminação (%) e regeneração (%) de explantes de *C. album*, colhidas na natureza, sob ação de diferentes protocolos de desinfecção.

Ensaio	Data de inoculação	Explante	Meio de cultura	Número de explantes	Taxa de contaminação (%)	Taxa de regeneração (%)
1	05.12.2022	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	120	100	0
2	02.02.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	144	100	0
3	09.02.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	78	100	0
4	05.04.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	36	33,33	25
5		Parte aérea sem ápice caulinar		36	58,33	27,78
6		Segmentos nodais		36	100	0
7	09.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	2	0	0
8		Parte aérea sem ápice caulinar		2	0	0
9		Parte aérea com ápice caulinar	WPM 2	12	0	0
10	15.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar		13	0	0
11		Parte aérea com ápice caulinar	WPM 3	12	0	0
12		Parte aérea sem ápice caulinar		13	0	0
13	22.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	2	0	100
14		Parte aérea sem ápice caulinar		2	0	100
15		Parte aérea com ápice caulinar	WPM 2	12	33,33	66,66
16	15.05.2023	Parte aérea sem ápice caulinar		12	41,66	58,33
17		Parte aérea com ápice caulinar	WPM 3	12	50	50
18		Parte aérea sem ápice caulinar		12	50	50
19	22.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 2	30	100	0
20		Parte aérea sem ápice caulinar		30	40	60
21		Parte aérea com ápice caulinar	WPM 3	30	40	60
22		Parte aérea sem ápice caulinar		30	60	40

***WPM 1** - Meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (1 mg/L); **WPM 2** – Meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (0,5 mg/L) e 2-iP (2mg/L); **WPM 3** – Meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (1 mg/L) e 2-iP (2mg/L).

Face aos resultados obtidos, e na tentativa de eliminar os agentes contaminantes, maioritariamente fungos, a solução antifúngica de Benomyl (0,1 g/L) foi substituída por Mancozebe (1 g/L). Assim, nos ensaios seguintes para o estabelecimento da cultura *in vitro* de Camarinha (ensaios 4, 5 e 6) foi utilizado o protocolo de desinfecção 4 (descrito no ponto 2.1.), no qual os explantes foram lavados em solução de Mancozebe (1 g/L). Nos ensaios 4 e 5 a taxa

de contaminação dos explantes diminuiu para valores de 33,33 % e 58,33 % (quadro 8), respetivamente. No ensaio 6 obtiveram-se, novamente 100% dos explantes contaminados (quadro 8). Dada a inconsistência dos resultados testou-se um novo protocolo de desinfeção, idêntico ao anterior, mas com alteração do período de lavagem com hipoclorito de sódio 20 % (protocolo de desinfeção 5, descrito no ponto 2.1). Nos ensaios de 7 a 12, a taxa de contaminação foi nula, contudo, nenhum dos explantes regenerou, tendo estes adquirido coloração castanha (quadro 8). A necrose dos explantes pode estar relacionada com a oxidação dos mesmos. Os explantes de plantas lenhosas, ao libertarem compostos fenólicos e outros produtos de oxidação junto da superfície excisada, modificam a composição do meio e diminuem a absorção de nutrientes, fazendo com que os mesmos pereçam (Andrade *et al.*, 2000). Por outro lado, Nietzsche *et al.* (2006), afirmam que dependendo do tempo de imersão na solução de hipoclorito de sódio, pode ocorrer desidratação do explante, comprometendo desta forma a viabilidade do tecido vegetal. Depreende-se, portanto, que o facto de não se ter observado regeneração nem contaminação nestes ensaios, pode estar relacionado com o tempo de imersão ou concentração do produto.

Assim, nos ensaios de 13 a 22, recorreu-se ao protocolo de desinfeção 6 (descrito no ponto 2.1), no qual se alterou a duração dos períodos de lavagem com o hipoclorito de sódio 20 % e o Mancozebe (1 g/L), comparativamente ao protocolo de desinfeção anterior. Nestes ensaios, verificou-se uma taxa média de contaminação de 29,17 % e uma percentagem de regeneração dos explantes acima dos 40 %. Com base nos resultados obtidos, o protocolo de desinfeção que revelou maior eficácia, em termos de contaminação vs taxa de regeneração de explantes, foi o protocolo de desinfeção 6.

Depois de otimizado o processo de desinfeção dos explantes iniciais, para que um protocolo de Micropropagação de plantas tenha sucesso é necessário garantir o desenvolvimento dos explantes e a regeneração de rebentos e/ou novas plântulas. Uma vez que a capacidade de regeneração de plantas *in vitro*, é influenciada por diversos fatores, tais como a composição do meio de cultura, incluindo os fitorreguladores adicionados, e o explante utilizado (Long *et al.*, 2022), neste trabalho foi utilizado o meio de cultura Woody Plant Medium (WPM) com diferentes suplementações hormonais e dois tipos de explantes (parte aérea com e sem ápice caulinar). O meio de cultura WPM foi selecionado com base nas características lenhosas da planta em estudo e atendendo a que diversos estudos mostraram já que este meio de cultura é mais adequado para plantas lenhosas (Alves, 2019). Segundo Philips e Garda (2019), as plantas lenhosas têm menores necessidades dos sais de macronutrientes, nomeadamente de amónia e azoto total, sendo o meio de cultura WPM mais adequado do que, por exemplo, o meio de cultura MS.

Também para *C. album*, Gonçalves e Pinto (2019) demonstraram que o meio de cultura WPM obteve melhores resultados de multiplicação do que o meio Murashige & Skoog (MS), mesmo com os macronutrientes a metade da concentração.

Relativamente ao efeito dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura de regeneração dos explantes iniciais (quadro 8), verificou-se que os explantes inoculados no meio de cultura WPM1, suplementado com Cinetina (1 mg/L), obtiveram uma taxa de regeneração de 30 %, enquanto os explantes inoculados no meio de cultura WPM2 suplementado com Cinetina (0,5 mg/L) e 2-iP (2 mg/L), atingiram os 35 % de regeneração e os explantes inoculados no meio de cultura WPM3 suplementado com Cinetina (1 mg/L) e 2-iP (2 mg/L), revelaram taxas de regeneração na ordem dos 50 %. Estes resultados sugerem que o meio de cultura WPM3 foi o mais indicado para o estabelecimento de protocolos de micropropagação de *C. album*. Estudos anteriores revelaram também o efeito positivo da presença do 2-iP na multiplicação de explantes de camarinha (Gonçalves e Pinto, 2019; Alves *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos na regeneração de rebentos em função do explante inicial utilizado (parte aérea com e sem ápice caulinar) apresentaram valores de regeneração entre 40 % e 58,33 % para parte aérea sem ápice, nos meios de cultura WPM2 e WPM3 (quadro 8). No entanto, nos ensaios de inoculação de parte aérea com ápice caulinar em meio de cultura WPM2 no dia 15 de maio foi de 66,66 %, ao passo que no dia 22 de maio foi de 0 %. Deste modo, estes resultados não pareceram muito conclusivos no que diz respeito à definição do melhor explante. Trabalhos anteriores utilizaram como explante a parte aérea com ápices caulinares (Alves *et al.*, 2021). Mesmo *in vitro*, a presença do ápice caulinar pode favorecer o desenvolvimento de novos rebentos devido ao efeito de dominância apical. Isto porque, na planta, a síntese de auxinas ocorre principalmente nas zonas apicais e durante o seu transporte, do ápice para a base promovem um crescimento mais vigoroso do eixo central da planta (efeito da dominância apical), permitindo o seu crescimento em altura. Este pode ser um dos fatores que explica melhores resultados obtidos em explantes de ápices caulinares quando comparados a explantes de gemas axilares (Grattapaglia e Machado, 1990).

Cerca de 2-3 meses após inoculação dos explantes iniciais, os rebentos obtidos foram sujeitos a repicagem, nos três meios de cultura anteriormente testados, por forma a confirmar o seu efeito na formação de novos rebentos (quadro 9). Nestes ensaios foram também utilizados como explante parte aérea, com e sem ápice, na tentativa de esclarecer os resultados obtidos anteriormente. Após análise visual da progressão das culturas verificaram-se 100 % de regeneração nos explantes, em qualquer um dos meios, sem registo de qualquer contaminação (quadro 9 e figura 19).

Quadro 9. Taxa de regeneração (%) de explantes de *C. album*, sujeitos a repicagem (sub-cultura), em diferentes meios de cultura.

Ensaio	Data da inoculação	Explante	Meio de cultura	Número de explantes	Taxa de regeneração (%)
R1	06.07.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 1	40	100
R2	Repicagem dos explantes de 05.04.2023	Parte aérea sem ápice caulinar		12	100
R3	25.07.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 2	17	100
R4		Parte aérea sem ápice caulinar		16	100
R5	Repicagem dos explantes de 22.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 3	17	100
R6		Parte aérea sem ápice caulinar		16	100
R7	01.08.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 2	18	100
R8		Parte aérea sem ápice caulinar		17	100
R9	Repicagem dos explantes de 15.05.2023	Parte aérea com ápice caulinar	WPM 3	15	100
R10		Parte aérea sem ápice caulinar		15	100

***WPM 1** - Meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (1 mg/L); **WPM 2** – Meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (0,5 mg/L) e 2-iP (2mg/L); **WPM 3** – Meio de cultura WPM suplementado com Cinetina (1 mg/L) e 2-iP (2mg/L).

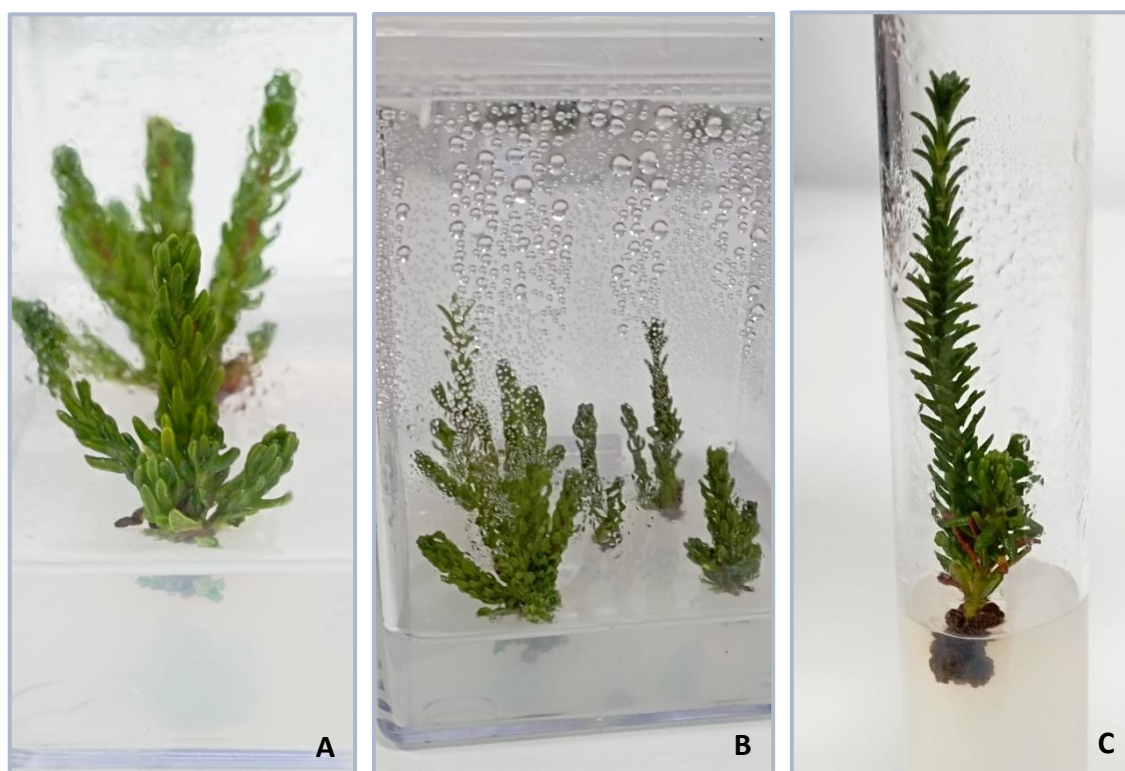


Figura 19. A, B e C - Rebentos de *Corema album* obtidos a partir da cultura *in vitro* dos explantes iniciais (Fonte: autor).

Contudo, por falta de tempo para execução das avaliações seguintes necessárias, nomeadamente determinação do número de rebentos por explante, do peso médio dos rebentos, do comprimento médio dos rebentos, que permitiriam distinguir o efeito dos diferentes meios de cultura, não foi possível definir o melhor meio de cultura e o melhor explante para a micropropagação de *C. album* nestes ensaios. Embora, com base nas observações efetuadas ao longo do ensaio, é possível sugerir o meio de cultura WPM3 como o que se revelou melhor para o estabelecimento *in vitro* de rebentos de *C. album*, visto que os explantes tiveram uma regeneração mais rápida.

É de salientar que o enraizamento *in vitro* de *C. album* ainda não foi alcançado, tendo sido descrito *ex vitro* dos rebentos obtidos *in vitro* com uma taxa de sucesso aceitável em termos de indução radicular, permitindo a formação de um sistema radicular desenvolvido (Alves, 2019; Alves *et al.*, 2021).

A necessidade do estabelecimento de protocolos de micropropagação de plantas da espécie *C. album* adquire maior relevância quando se perspetivam possíveis repovoamentos, uma vez que as plantas estudadas possuem proteção legal sob a Diretiva Habitats nº 92/43/CEE, o que lhes confere a designação de habitat prioritário, pela sua distribuição restrita e vulnerabilidade.

4.1.2. Estádios fenológicos

Após observação e registo fotográfico quinzenal das plantas de *C. album* da área dunar de Moledo do Minho, foi possível elaborar o cronograma fenológico que a seguir se apresenta (figura 20). Pela sua análise é possível verificar que o desenvolvimento das plantas masculinas e femininas foi similar, embora com diferenças temporais.

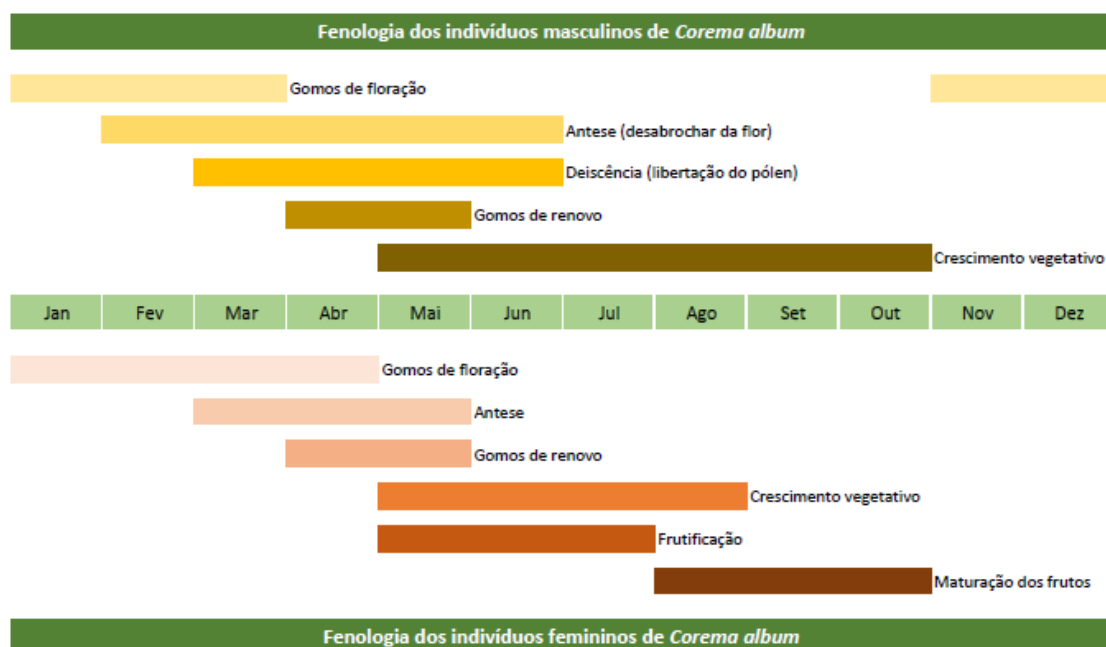


Figura 20. Cronograma fenológico de indivíduos masculinos e femininos de *Corema album*, em Moledo do Minho, entre janeiro de 2022 e outubro de 2023.

Nesta espécie, os estádios reprodutivos antecedem os estádios vegetativos, sendo que a formação de gomos de floração dos indivíduos masculinos ocorre entre os meses de novembro e março, enquanto nos indivíduos femininos esta fase sucede entre janeiro e abril (figura 21).



Figura 21. Planta feminina em início de floração (à esquerda) e planta masculina em floração avançada (à direita) de *Corema album*, em Moledo do Minho, em março de 2023 (Fonte: autor).

Foram observadas duas formas diferentes de crescimento vegetativo: na primeira, uma única gema terminal desenvolve-se, originando um único rebento, enquanto na outra forma se desenvolvem gemas axilares ao lado da gema terminal. A mesma situação é descrita por Jacinto e outros (2022), em estudos realizados com esta espécie na Praia do Meco.

Nas plantas masculinas (figura 23), o desenvolvimento de gomos de floração é uma fase mais prolongada e ocorre durante o período em que não se verifica crescimento vegetativo. De destacar a fase de desabrochar da flor (antese), que se observa mais longa nos indivíduos masculinos (fevereiro a junho) comparativamente aos indivíduos femininos (março a maio). O período de sincronia ocorre nos meses de abril e maio, com a formação dos gomos de renovo. Nas plantas femininas (figura 22), o crescimento vegetativo é simultâneo à fase inicial de frutificação, sendo um estágio mais curto (maio a agosto) comparativamente às plantas masculinas (maio a outubro).

Estes resultados corroboram estudos fenológicos realizados em Cabo Carvoeiro para esta espécie (Marques, 2007), os quais concluíram que a floração das plantas masculinas é mais distribuída ao longo do tempo e apresenta um maior número de inflorescências e flores quando comparada com a floração das plantas femininas. Ainda que os arbustos masculinos iniciem primeiro a floração, o auge desta fase é síncrono, uma vez que a floração feminina se observa menos morosa (Santos *et al.*, 2016).

Não foram encontradas plantas hermafroditas neste local de amostragem, como foi descrito em Asperillo e Vila Real de Santo António por Zunzunegui *et al.* (2006). Tal facto pode dever-se às maiores taxas de aridez destes locais (Jacinto *et al.*, 2022), quando comparado com a Praia de Moledo.

A frutificação de *C. album* observa-se no período de temperaturas mais elevadas e precipitação quase inexistente (Zunzunegui *et al.*, 2006), o que corrobora os resultados das observações das plantas em estudo. A frutificação das plantas de *C. album* em Moledo do Minho ocorreu nos meses de maio, junho e julho, época do ano em que as temperaturas médias mínimas e máximas se verificaram mais elevadas e, excetuando o mês de junho, a pluviosidade foi menor (quadro 1). De igual forma, estes resultados são apoiados por estudos efetuados por Andrade e colaboradores (2015) e Diaz-Barradas e colaboradores (2016), quando afirmam que o aparecimento do fruto se verifica no verão ou no início do outono, entre os meses de julho e outubro, num período que corresponde a temperaturas elevadas, radiação intensa e ausência de chuva.

O desenvolvimento dos frutos inicia-se com a intumescência do ovário, que apresenta coloração verde-amarelada, com uma depressão na base dos estigmas. Essa concavidade começa a ficar preenchida pelo fruto, o qual adquire uma cor verde translúcida, comprovando observações realizadas por Jacinto *et al.* (2022).

A maturação dos frutos é o estágio mais tardio, sendo fortemente influenciada pelas condições meteorológicas/climáticas. Na população em estudo, a maturação dos frutos observou-se de agosto a outubro, com estes a adquirirem cor branca (figura 22 G-I). Jacinto (2019) comparou quatro populações de *C. album* na costa portuguesa, concluindo que, ao longo de um gradiente latitudinal, a maturação dos frutos das plantas a Sul ocorreu mais cedo (início de agosto) quando comparada à maturação dos frutos das plantas do Norte (final setembro). A libertação dos frutos observa-se nos últimos meses do ano e estes, apesar de adquirirem posteriormente cor castanho clara, ainda permanecem na planta durante algum tempo do ciclo de crescimento seguinte (figura 22 e figura 23). Quando o volume dos frutos começa a aumentar, as plantas femininas apresentam uma diminuição no crescimento vegetativo, em comparação às plantas masculinas (Álvarez-Cansino *et al.*, 2010; Zunzunegui *et al.*, 2006).

Por ser uma planta perene, *C. album* não apresenta uma fase fenológica definida de queda das folhas. A formação de novas folhas coincide com o estágio vegetativo, a partir da primavera, fase em que a planta experimenta um maior crescimento. Estes dados corroboram os resultados de estudos efetuados por Jacinto *et al.* (2022).



Figura 22. Planta feminina de *Corema album*: gomos de floração (A); antese (B); gomos de renovo (C, D e E); crescimento vegetativo (F); frutificação (G e H) e maturação dos frutos (I) (Fonte: autor).

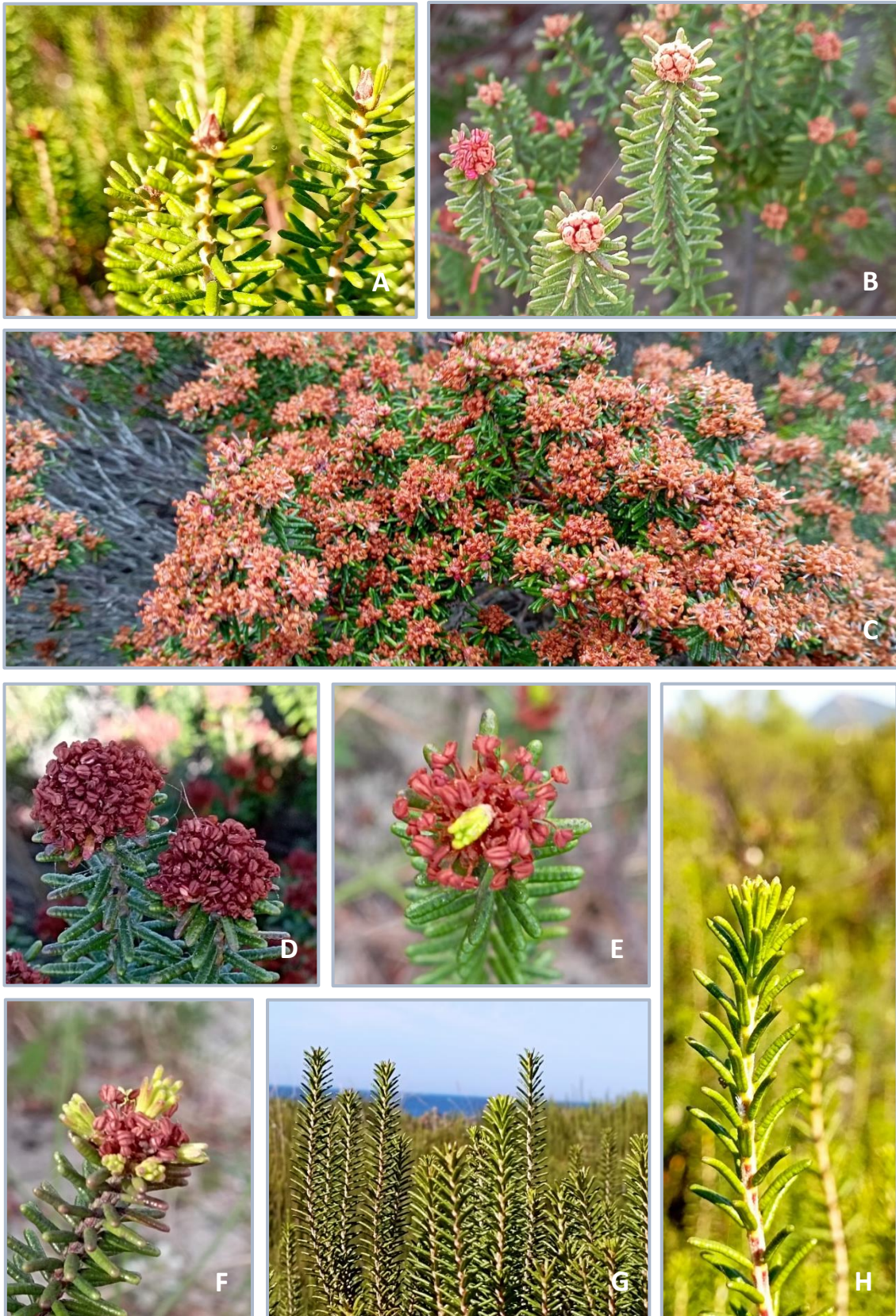


Figura 23. Planta masculina de *Corema album*: gomos de floração (A e B); antese (C); deiscência (D); gomos de renovo (E e F); crescimento vegetativo (G e H) (Fonte: autor).

Na área estudada, verifica-se uma predominância de plantas do género masculino comparativamente a plantas do género feminino. Segundo Díaz Barradas *et al.* (2000), em populações maduras e estáveis ocorre, em geral, equilíbrio entre os dois sexos. Em ambientes menos favoráveis é comum a predominância de indivíduos masculinos, enquanto em ambientes favoráveis, a razão pode ser de 1:1 ou ocorrer a supremacia de plantas femininas (Díaz Barradas e Correia, 1999; Obeso, 1997; Clavijo *et al.*, 2007). A ocorrência de ventos fortes frequentes, a instabilidade do solo e a idade avançada das plantas de *Corema album* deste local, podem estar na origem desta distribuição desequilibrada entre géneros. Outro fator pode estar relacionado com a existência de frutos nas plantas do género feminino. Tal facto implica um predomínio de indivíduos masculinos em ambientes com stresse, uma vez que estes não apresentam gastos energéticos na produção de frutos, sendo o investimento dirigido ao crescimento vegetativo na parte aérea e radicular (Obeso *et al.*, 1998; Díaz Barradas *et al.*, 2000).

Apesar das plantas desta espécie poderem alcançar alturas de cerca de 100 cm, os indivíduos da área estudada atingem, em média, os 50 cm. Segundo Clavijo *et al.* (2007), plantas dunares submetidas a instabilidade do solo e ventos fortes têm variação fenotípica da estrutura da canópia para resistir a fatores ambientais locais tais como: velocidade do vento, competição com outras espécies e idade das populações.

4.1.3. Compostos bioativos

De entre a imensa variedade de compostos bioativos que as plantas produzem, destacam-se aqueles que apresentam atividades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante, por possuírem a capacidade de interagir de forma segura com os radicais livres, protegendo as células do metabolismo oxidativo. (Lobo *et al.*, 2010).

Assim, neste estudo, efetuou-se a quantificação de algumas classes de compostos bioativos presentes nos extratos metanólicos 70 %, etanólicos 70 % e cetónicos 70 % de folhas de *C. album* em diferentes estádios fenológicos, nomeadamente compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos totais, muitos dos quais estão descritos como compostos com atividade antioxidante.

No quadro 10, encontram-se expressos os resultados dos compostos bioativos estudados, em três datas de colheita, em função do solvente de extração.

Quadro 10. Efeito do solvente de extração, para cada data de colheita, na composição fitoquímica das folhas de *C. album* (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Data de colheita	Solvente de extração	Fenólicos totais (mg GAE/g de amostra)	Flavonoides totais (mg QE/g de amostra)	Taninos totais (mg GAE/g de amostra)
02.12.2022	Metanol 70%	81,04b $\pm$ 8,48	13,74a $\pm$ 1,22	73,97b $\pm$ 9,28
	Etanol 70%	85,14b $\pm$ 11,33	9,52b $\pm$ 0,36	77,88b $\pm$ 11,58
	Acetona 70%	114,00a $\pm$ 8,33	7,43c $\pm$ 0,44	96,50a $\pm$ 8,37
02.02.2023	Metanol 70%	66,35b $\pm$ 15,00	8,70a $\pm$ 1,84	60,63a $\pm$ 14,59
	Etanol 70%	68,36b $\pm$ 8,31	7,40ab $\pm$ 0,67	60,79a $\pm$ 7,97
	Acetona 70%	87,99a $\pm$ 6,71	5,96b $\pm$ 0,43	74,37a $\pm$ 7,22
03.07.2023	Metanol 70%	78,40ab $\pm$ 9,11	15,76a $\pm$ 0,52	68,58a $\pm$ 8,89
	Etanol 70%	87,74a $\pm$ 6,07	16,68a $\pm$ 0,99	68,02a $\pm$ 5,57
	Acetona 70%	68,43b $\pm$ 12,14	11,69b $\pm$ 1,18	36,14b $\pm$ 10,30

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada data, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Pela análise do quadro 13, observa-se que a composição fitoquímica das folhas de *C. album* é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada pelo solvente de extração, tendo-se verificado que o solvente com maior capacidade de extração de compostos fenólicos totais e taninos, na maioria das amostras, é a acetona.

O valor de compostos fenólicos totais e taninos mais elevados foram obtidos no extrato com acetona 70 %, na amostra recolhida em dezembro. No entanto, foi também neste extrato que se obtiveram os valores mais baixos de flavonoides totais em todas as amostras.

Contrariamente às amostras anteriores, na amostra recolhida em julho, os valores mais elevados de compostos fenólicos totais e flavonoides foram obtidos no extrato etanólico 70%, sendo o extrato preparado com acetona 70 % o que apresentou concentração mais baixa destes grupos de compostos. Para os flavonoides, o metanol 70 % revelou ser o solvente com maior capacidade de extração, não se verificando diferenças significativas entre os extratos metanólico 70 % e etanólico 70 % na amostra de julho. As variações observadas nos grupos de compostos nos três extratos podem ser explicadas pelo facto de existir uma grande diversidade de compostos fenólicos nas folhas de *C. album*. Ainda que neste trabalho não tenham sido quantificados todos os grupos de compostos de natureza fenólica, foi já reportada a presença de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, para além de flavonoides em extratos hidroetanólicos de folhas de *C. album* (Cerquido *et al.*, 2022). De igual modo, diferenças no conteúdo em compostos fenólicos totais e flavonoides foram também reportadas para extratos aquosos e metanólicos de folhas e frutos de camarinha, tendo sido o extrato metanólico aquele que

apresentou maior capacidade de extração de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas (Ferreira, 2018). Este facto pode estar relacionado com a solubilidade dos compostos no solvente de extração. Isto porque, a solubilidade dos compostos fenólicos e dos flavonoides nestes solventes depende dos grupos funcionais presentes nestes fitoquímicos, o tamanho da molécula e a cadeia hidrocarbonatada (Zama *et al.* 2020). Assim, a eficiência da extração é claramente dependente, entre outros, da escolha do solvente, sendo os mais comumente utilizados o metanol, a acetona, o etanol e a água, devido ao seu carácter polar, que resulta na afinidade com compostos fenólicos em geral (Garzón, 2008). Um solvente de polaridade semelhante ao soluto dissolverá adequadamente o soluto, sendo a ordem crescente de polaridade dos solventes mais comuns a seguinte: acetona < etanol < metanol < água (Reichardt e Welton, 2010).

Mas a extração de compostos fenólicos em materiais vegetais pode ser, também, influenciada pelas condições de armazenamento e processamento das amostras previamente à extração, assim como pelo tempo de extração. Ferreira (2018) encontrou diferenças no teor de compostos fenólicos em extratos aquosos de folhas de camarinha obtidos após 6h e 16h de extração, tendo reportado uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos totais com o aumento do tempo de extração. Segundo a autora, esta redução sugere que tempos mais prolongados de extração com água sejam acompanhados do início da degradação de alguns compostos fenólicos presentes nas folhas. Contudo, esta tendência não se verificou no teor de flavonoides, cuja concentração foi superior no extrato sujeito a 16h de extração.

No quadro 11, encontram-se expressos os resultados obtidos na quantificação destes grupos de compostos bioativos, nos três extratos, em função da data da colheita.

Quadro 11. Efeito da data de colheita, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica das folhas de *C. album* (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Solvente de extração	Data de colheita	Fenólicos totais (mg GAE/g de amostra)	Flavonoides totais (mg QE/g de amostra)	Taninos totais (mg GAE/g de amostra)
Metanol 70 %	02.12.2022	81,04a $\pm$ 8,48	13,74b $\pm$ 1,22	73,97a $\pm$ 9,28
	02.02.2023	66,35a $\pm$ 15,00	8,70c $\pm$ 1,84	60,63a $\pm$ 14,59
	03.07.2023	78,40a $\pm$ 9,11	15,76a $\pm$ 0,52	68,58a $\pm$ 8,89
Etanol 70 %	02.12.2022	85,14a $\pm$ 11,33	9,52b $\pm$ 0,36	77,88a $\pm$ 11,58
	02.02.2023	68,36b $\pm$ 8,31	7,40c $\pm$ 0,67	60,79ab $\pm$ 7,97
	03.07.2023	87,74a $\pm$ 6,07	16,68a $\pm$ 0,99	68,02ab $\pm$ 5,57
Acetona 70 %	02.12.2022	114,00a $\pm$ 8,33	7,43b $\pm$ 0,44	96,50a $\pm$ 8,37
	02.02.2023	87,99b $\pm$ 6,71	5,96c $\pm$ 0,43	74,37b $\pm$ 7,22
	03.07.2023	68,43c $\pm$ 12,14	11,69a $\pm$ 1,18	36,14c $\pm$ 10,30

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada solvente, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Pela análise dos dados do quadro 14, verifica-se que a composição fitoquímica das folhas de *C. album* é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada pela data da colheita, para os três solventes de extração.

É de salientar que ao longo do ano a tendência de variação de concentração dos vários grupos de compostos foi idêntica, com a sua diminuição entre dezembro e fevereiro seguida de um aumento entre fevereiro e julho, à exceção das amostras extraídas com acetona 70 %, em que se verificou a diminuição da quantidade de compostos fenólicos totais de taninos totais, entre dezembro e julho. As concentrações mais elevadas de flavonoides totais registaram-se em julho e as menores em fevereiro. Por outro lado, os taninos totais tiveram maior acumulação no mês de dezembro. Já os compostos fenólicos totais apresentaram valores máximos em dezembro, para os solventes acetona 70 % e metanol 70%. Esta maior acumulação de compostos fenólicos em dezembro, comparativamente ao mês de fevereiro, pode estar relacionada com fatores meteorológicos, uma vez que no mês de dezembro foram ultrapassados os valores normais máximos de temperatura esperados na região para esta época do ano, verificando-se valores médios de temperatura máxima de 15,7 °C (quadro 1).

A tendência de aumento dos flavonoides totais na amostra recolhida em julho, comparativamente às amostras de dezembro e fevereiro, pode estar associada a uma maior exposição à radiação solar.

A síntese de flavonoides é intensificada em situações que favorecem o stresse oxidativo, tanto abiótico como biótico (Kumar e Pandey, 2013). Todos os flavonoides são absorvidos nos comprimentos de onda ultravioleta (UV). Estes acumulam-se principalmente na epiderme das células vegetais e a sua síntese é geralmente ativada após a exposição a radiações desta gama, absorvendo o excesso de radiação que chega à planta. Presume-se, por isso, que protegem as plantas contra a exposição à radiação UV, minimizando o risco de danos oxidativos e, consequentemente, aumentando a resistência ao stresse luminoso (Borges *et al.* 2020; Ferreyra *et al.* 2021;).

Na região onde foram recolhidas as amostras de *C. album* para o presente trabalho, fatores como a temperatura, intensidade de luz, radiância e escassez de pluviosidade apresentam, consistentemente, valores máximos nos meses de junho, julho e agosto. Estes dados estão de acordo com as condições abióticas que se fizeram sentir na região onde foram recolhidas as amostras de *C. album*, nos meses de junho e julho, nomeadamente a elevada intensidade luminosa e radiância. Da mesma forma, também se poderão justificar os valores mais elevados de flavonoides obtidos nas amostras do mês de dezembro comparativamente às do mês de

fevereiro, uma vez que o mês de novembro e dezembro se apresentaram, excepcionalmente, quentes. É também de salientar que, além da elevada intensidade luminosa, durante os meses de verão as plantas são, também, submetidas a fontes limitadas de água, o que promove o fecho dos estomas, resultando numa diminuição acentuada da absorção e fixação de dióxido de carbono. Como consequência, os processos metabólicos são impelidos para a síntese de compostos reduzidos, como os fenóis (Selmar e Kleinwächter, 2013).

O conteúdo de compostos fenólicos na planta também pode variar em função de fatores bióticos, nomeadamente, na interação com microrganismos. A pluviosidade elevada que se fez sentir no mês de dezembro (quadro 1), aliada a temperaturas mais elevadas para esta época do ano, pode ter favorecido o crescimento de microrganismos patogénicos, particularmente de fungos. Tal facto pode explicar os valores de taninos mais elevados observados no mês de dezembro, uma vez que os taninos vegetais são caracterizados por desempenharem um importante papel na defesa das plantas contra microrganismos (Borges *et al.* 2020).

No quadro 12, encontram-se expressos os resultados dos compostos bioativos investigados, para os três solventes de extração, em função do estágio fenológico.

Quadro 12. Efeito do estágio fenológico, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica da parte aérea de *C. album* (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Solvente de extração	Estádio fenológico	Fenólicos totais (mg GAE/g de amostra)	Flavonoides totais (mg QE/g de amostra)	Taninos totais (mg GAE/g de amostra)
Metanol 70%	Vegetativo	74,93a $\pm$ 12,28	12,52a $\pm$ 3,21	68,43a $\pm$ 12,11
	Floração precoce	79,83a $\pm$ 6,62	10,38ab $\pm$ 0,80	74,32a $\pm$ 6,36
	Floração avançada	73,97a $\pm$ 7,93	8,69b $\pm$ 0,67	68,36a $\pm$ 7,75
	Início da frutificação	80,25a $\pm$ 7,46	11,12ab $\pm$ 0,44	73,08a $\pm$ 7,63
Etanol 70%	Vegetativo	78,40a $\pm$ 12,09	9,75a $\pm$ 2,17	70,63a $\pm$ 12,08
	Floração precoce	76,49a $\pm$ 5,12	7,04b $\pm$ 0,81	70,20a $\pm$ 4,31
	Floração avançada	72,10ab $\pm$ 5,69	7,30ab $\pm$ 1,13	64,68a $\pm$ 6,09
	Início da frutificação	71,84a $\pm$ 3,57	8,64ab $\pm$ 0,76	64,36a $\pm$ 3,68
Acetona 70%	Vegetativo	97,57a $\pm$ 14,78	7,07ab $\pm$ 1,04	81,59a $\pm$ 13,62
	Floração precoce	97,61a $\pm$ 8,11	5,73bc $\pm$ 0,29	83,94a $\pm$ 7,92
	Floração avançada	86,998a $\pm$ 5,86	5,36c $\pm$ 1,54	75,44a $\pm$ 5,52
	Início da frutificação	89,90a $\pm$ 14,86	7,85a $\pm$ 0,39	74,71a $\pm$ 14,61

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada solvente de extração, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Os dados do quadro 12, demonstram que não existem diferenças significativas na concentração dos compostos fenólicos totais e dos taninos entre as diferentes fases do ciclo fenológico. No entanto, verificaram-se diferenças significativas nos flavonoides totais ($p < 0,05$), sendo a sua concentração significativamente maior nas amostras do estado vegetativo para os solventes metanol 70 % e etanol 70 %.

Para o parâmetro dos compostos fenólicos totais, foram obtidos valores entre $74,93 \pm 12,28$ mg GAE/g e $97,57 \pm 14,78$ mg GAE/g no estágio vegetativo; $76,49 \pm 5,12$ mg GAE/g e $97,61 \pm 8,11$ mg GAE/g, no estágio de floração precoce; $72,10 \pm 5,69$ mg GAE/g e $86,998 \pm 5,86$ mg GAE/g, no estágio de floração avançada e entre $71,84 \pm 3,57$ mg GAE/g e $89,90 \pm 14,86$ mg GAE/g, no estágio de início de frutificação.

Brito *et al.* (2020) demonstraram que as folhas desta espécie apresentam um conteúdo de compostos fenólicos elevado ($2,47 \pm 0,21$ mg GAE/g de peso fresco) quando comparado com as restantes partes da planta (flores: $0,32 \pm 0,02$ mg GAE/g de peso fresco; fruto: $0,83 \pm 0,01$ mg GAE/g de peso fresco). Bertotti (2019) avaliou o conteúdo de compostos fenólicos totais em folhas de *C. album*, extraídas com acetona, obtendo o valor de $246,73 \pm 21,20$ mg GAE/100 g de peso fresco. Cerquido (2022) refere valores de $67,1 \pm 4,0$ mg GAE/g de peso seco em extratos etanólicos, para a quantificação de compostos fenólicos totais em folhas de camarinha. A diferença de valores obtidos neste estudo, comparativamente a outros autores, pode dever-se ao local de colheita, ao ano meteorológico, ao estágio fenológico em que as amostras foram colhidas e à metodologia utilizada.

Para o parâmetro dos flavonoides totais, foram obtidos valores entre $7,07 \pm 1,04$ mg GAE/g e $12,52 \pm 3,21$ mg GAE/g no estágio vegetativo; $5,73 \pm 0,29$ mg GAE/g e $10,38 \pm 0,80$ mg GAE/g, no estágio de floração precoce; $5,36 \pm 1,54$ mg GAE/g e $8,69 \pm 0,67$ mg GAE/g, no estágio de floração avançada; $7,85 \pm 0,39$ mg GAE/g e entre $11,12 \pm 0,44$ mg GAE/g no estágio de início de frutificação.

Para o parâmetro dos taninos totais, foram obtidos valores entre $68,43 \pm 12,11$ mg GAE/g e $81,59 \pm 13,62$ mg GAE/g no estágio vegetativo; $70,20 \pm 4,31$ mg GAE/g e $83,94 \pm 7,92$ mg GAE/g, no estágio de floração precoce; $64,68 \pm 6,09$ mg GAE/g e $75,44 \pm 5,52$ mg GAE/g, no estágio de floração avançada; $64,36 \pm 3,68$ mg GAE/g e entre $74,71 \pm 14,61$ mg GAE/g, no estágio de início de frutificação.

Relativamente ao conteúdo de taninos totais nas folhas de *C. album*, não foram encontrados valores na literatura que tornassem possível uma comparação com os resultados obtidos neste estudo.

Os resultados observados no presente trabalho corroboram a ideia de que as diferentes fases fenológicas das plantas apresentam um impacto considerável na produção dos diversos compostos fenólicos e, ainda que, estes compostos estejam presentes em todas as plantas de *C. album*, a sua distribuição é desigual entre as diferentes plantas e nas diferentes partes desta, pois são produzidos como forma de adaptação ao ambiente envolvente (Salunkhe *et al.*, 1982).

De acordo com a teoria da alocação em fisiologia vegetal, o limitado fornecimento de recursos essenciais disponíveis para as plantas força-as a negociar entre funções fisiológicas concorrentes (Caretto *et al.*, 2015). Assim, é expectável que durante os estágios de crescimento mais intensivo, a planta de *C. album* aloque os recursos disponíveis para os processos de metabolismo primário em detrimento do metabolismo secundário (Silva *et al.*, 2023).

As folhas da espécie *C. album* apresentam-se, desta forma, como uma fonte de compostos bioativos. A colheita, cuja finalidade passe pela obtenção destes compostos, deve ser realizada nos meses de verão, época na qual a planta exhibe maior teor de compostos fenólicos e flavonoides.

4.1.4. Teor de humidade e teor de gordura

Os resultados obtidos para os teores de humidade e gordura, são apresentados no quadro 13.

Quadro 13. Caracterização das diferentes partes aéreas de *C. album*, em diferentes datas de colheita (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Parte da planta	Data de colheita	Teor de humidade (%)	Teor de gordura (%)
Folhas*	02.12.2022	45,42a $\pm$ 1,02	6,43a $\pm$ 0,03
	02.02.2023	50,26a $\pm$ 10,18	5,66ab $\pm$ 0,82
	03.07.2023	46,24a $\pm$ 0,06	4,90b $\pm$ 0,01
Folhas + caules	02.12.2022	47,18 $\pm$ 0,76	5,07 $\pm$ 0,43
Folhas + flores*	02.02.2023	44,70a $\pm$ 4,04	5,02a $\pm$ 0,86
	05.04.2023	38,11b $\pm$ 2,40	4,42a $\pm$ 0,38
Folhas + frutos	05.04.2023	52,05 $\pm$ 1,70	5,27 $\pm$ 0,30
Frutos	03.07.2023	62,83 $\pm$ 0,24	5,82 $\pm$ 0,03

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada parte da planta, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Aquando da observação do quadro 13, constata-se que o teor de humidade nas folhas não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$), não se verificando, por isso, influência da data da colheita no teor de humidade das folhas de *C. album*. O teor de humidade mais elevado

verificou-se nos frutos. Contudo, o valor obtido no presente estudo ($62,83 \pm 0,24 \%$), é inferior ao referido por Herrera (1987) de 74,6 %, Santos *et al.* (2014) de 83,41 % e Simões (2018) de 84,79 %. Esta diferença de valores pode dever-se, entre outros fatores, ao local de colheita, ao ano meteorológico e ao grau de maturação dos frutos.

Os dados do quadro revelam que o teor de gordura é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciado pela data da colheita no que respeita às folhas da planta, sendo a amostra recolhida em dezembro a que apresenta maior teor. O segundo maior valor de teor de gordura foi obtido para os frutos de *C. album* com $5,82 \pm 0,03 \%$. Tal resultado é corroborado por estudos de Herrera (1987), quando este menciona o valor de 5,8 % para o teor de gordura nas bagas de camarinha, enquanto Simões (2018) refere valores 4,77 % para frutos da mesma espécie.

Relativamente ao teor de humidade e gordura nas folhas, flores e caules de *C. album*, não foram encontrados dados na literatura para comparação.

O alto teor de ácidos fenólicos apresentados pela espécie *C. album* é acompanhado pela presença de outros ácidos orgânicos, como ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, ómega-3 e ómega-6, principalmente nas folhas, polpa e sementes, o que também podem justificar o efeito neuroprotetor e anti-inflamatório característicos desta planta (Andrade *et al.*, 2017; Macedo *et al.*, 2015; León-González *et al.*, 2012).

4.2. Análise de resultados de *Crithmum maritimum*

4.2.1. Otimização de um protocolo de micropropagação

Na tentativa de estabelecer um protocolo de micropropagação de *C. maritimum*, foram utilizados os mesmos critérios aplicados em *C. album*, nomeadamente plantas com aspeto saudável, vigoroso e com aparente potencial de resposta às condições de cultura, como fontes de explantes.

Os resultados do estabelecimento *in vitro* dos explantes de *C. maritimum* encontram-se descritos no quadro 14. O procedimento iniciou-se com a desinfeção dos explantes seguindo-se o protocolo de desinfeção 1, (ponto 2.2 da secção Materiais e Métodos) nos primeiros 6 ensaios. Nos referidos ensaios, verificou-se a contaminação de todos os explantes (segmentos nodais e entrenós), sendo os agentes de contaminação essencialmente de carácter fúngico.

Quadro 14. Taxas de contaminação (%) e regeneração (%) de explantes de *C. maritimum*, colhidas na natureza, sob ação de diferentes protocolos de desinfecção.

Ensaio	Data da inoculação	Explante	Meio de cultura	Suplementação hormonal	Número de explantes	Taxa de contaminação (%)	Taxa de regeneração (%)
1	05.12.2022	Nós	MS	BA (0,5 mg/L)	80	100	0
2		Entrenós		NAA (0,1 mg/L)	80	100	0
3	30.01.2023	Nós	MS	BA (0,5 mg/L)	50	100	0
4		Entrenós		NAA (0,1 mg/L)	50	100	0
5	13.02.2023	Nós	MS	BA (0,5 mg/L)	50	100	0
6		Entrenós		NAA (0,1 mg/L)	50	100	0
7	08.05.2023	Nós	MS	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)	100	0	90
8	23.05.2023	Nós	MS	BA (0,5 mg/L) NAA (0,1 mg/L)	100	0	100
9	17.07.2023	Nós	MS	BA (0,5 mg/L)	50	70	30
10				Sem fitoreguladores	50	30	70

Tendo em conta o agente de contaminação, o procedimento de desinfecção foi alterado, sendo acrescentado um passo de imersão dos explantes numa solução aquosa, à qual foi adicionado o antifúngico Mancozebe (1 g/L) (protocolo de desinfecção 2 descrito no ponto 2.2 da secção Materiais e Métodos). Este protocolo de desinfecção foi utilizado nos ensaios 7 a 10, tendo-se verificado ser mais eficiente do que o anterior, atendendo aos resultados obtidos (ensaios 7 e 8: sem contaminação; ensaio 9: taxa de contaminação 70 % e ensaio 10: a taxa de contaminação atingiu os 30 %).

Relativamente à etapa de regeneração, nos explantes dos ensaios de 1 a 6, esta não foi possível avaliar, dado a taxa de contaminação ter sido de 100 %, inviabilizando todo o material vegetal.

Nos ensaios 7 e 8, foram inoculados explantes de nós dos caules da espécie em estudo em meio de cultura MS, suplementado com BA (0,5 mg/L) e NAA (0,1 mg/L). Os explantes destes ensaios apresentaram uma taxa de regeneração de 90 % (90/100) e 100 % (100/100), respetivamente. Contudo, não houve formação de gomos foliares, nem rebentos caulinares, tendo a regeneração consistido na formação de tecido caloso e raízes (figura 24 - A). Por este motivo, no ensaio 9, a suplementação hormonal do meio de cultura foi alterada tendo-se retirado o regulador de crescimento NAA, uma vez que a sua função está relacionada com a indução de tecidos radiculares (George *et al.*, 2008)., mas mantendo-se o BA (0,5 mg/L). A regeneração dos explantes neste ensaio atingiu os 30 % (15/50) com a formação de tecido caloso e produção de raízes, sem, contudo, se ter observado formação de rebentos e/ou plântulas (figura 24 - B). No ensaio 10 foram inoculados explantes de nós dos caules em meio de cultura MS sem

suplementação. A regeneração dos explantes neste ensaio atingiu os 70 % (35/50) com a formação de tecido caloso e produção de raízes, sem, no entanto, se ter verificado a formação de plântulas (figura 24 - C).

Segundo Grigoriadou e Maloupa (2008), quando adicionado o regulador de crescimento BA numa concentração de 2,5 μ M em meio de cultura MS, verifica-se um aumento significativo da proliferação de rebentos de *C. maritimum*. Segundo os autores a combinação deste fotorregulador (BA 2,5 μ M) com o ácido α -naftalenoacético (NAA) em concentrações que variaram entre 1 a 2,5 μ M, teve, simultaneamente, influência positiva na proliferação de rebentos caulinares e no enraizamento, resultando numa elevada percentagem de enraizamento (82,5 – 95 %), assim como no aumento do número de raízes. A percentagem de enraizamento atingiu os 100 % quando foi adicionado ácido indol-3-butírico (IBA) (0,5 a 1 μ M) e BA (2,5 μ M), aumentando significativamente o número de rebentos enraizados, o número de raízes e o comprimento da raiz (Grigoriadou e Maloupa, 2008).

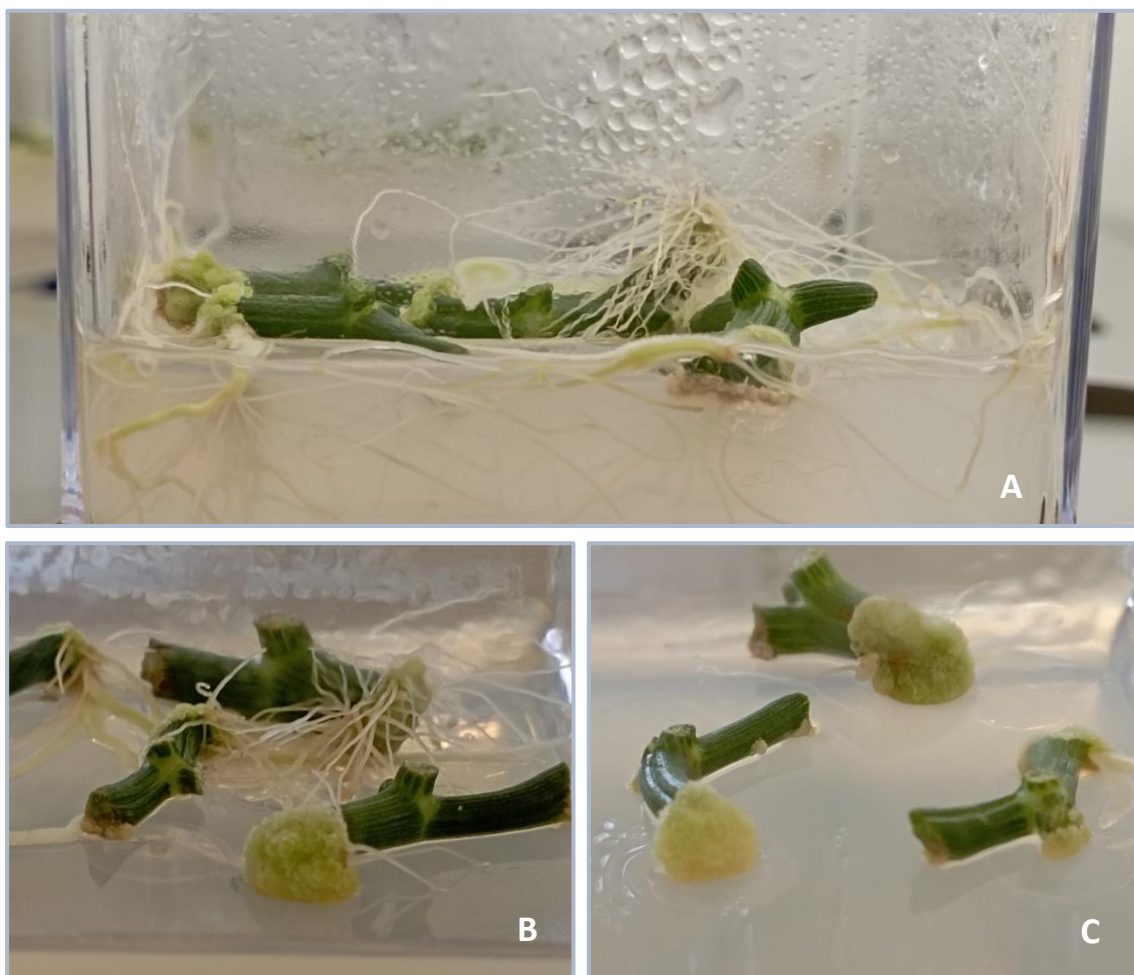


Figura 24. Explantes de *Crithmum maritimum* inoculados em meio de cultura MS: suplementado com BA (0,5 mg/L) e NAA (0,1 mg/L) após 23 dias de cultura (A); suplementado com BA (0,5 mg/L) após 16 dias de cultura (B) e sem suplementação após 8 dias de cultura (C) (Fonte: autor).

C. maritimum é uma espécie halófito, como tal, naturalmente adaptada a solos com alto teor de sal. Tal facto pode explicar a inexistência da formação de plântulas no trabalho desenvolvido, uma vez que não foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) ao meio de cultura. Segundo Ben Amor *et al.* (2005), *C. maritimum* requer salinidade moderada para expressar o seu potencial máximo de crescimento. Em estudos levados a cabo por estes autores, os valores de biomassa da parte aérea e da raiz foram significativamente aumentados com NaCl 50 mM, em plantas submetidas a cultura hidropónica. No entanto, o crescimento foi consideravelmente reduzido na concentração de sal mais elevada (NaCl 200 mM) em ambos os órgãos. A tolerância ao sal de *C. maritimum*, quando cultivado hidroponicamente, foi atribuído à sua capacidade de manter um abastecimento conveniente de água aos tecidos e exibir elevada atividade enzimática antioxidante (Ben Amor *et al.*, 2005). Também Grigoriadou e Maloupa (2008), concluíram que a proliferação de rebentos se verificou em concentrações de NaCl 0-50 mM e foi gradualmente reduzida em concentrações mais elevadas de cloreto de sódio (100 - 300 mM), quando testaram a resposta *in vitro* ao stresse salino nesta planta. Por esse motivo, alguns autores consideram *C. maritimum* uma planta halófito facultativa, uma vez que a taxa máxima de crescimento desta espécie não corresponde necessariamente a altos níveis de salinidade (Renna, 2018). Hamed *et al.* (2004) cultivou esta planta em vasos com solo arenoso, usando soluções nutritivas com diferentes concentrações de NaCl e concluiu que *C. maritimum* possui uma tolerância moderada ao NaCl, uma vez que a concentração de sal que levou à redução de 50% na matéria seca da parte aérea, na área de superfície foliar e no número de folhas foi de 150 mM de NaCl.

Os fitorreguladores são componentes cruciais no meio de cultura, uma vez que, por mimetizarem as hormonas vegetais, coordenam o crescimento e resposta ao stresse, bem como a regulação da maioria dos processos fisiológicos nas plântulas (Stirk e Staden, 2014). Estes são responsáveis por estimular a divisão celular e controlar o crescimento e diferenciação de rebentos, raízes e embriões nos explantes (Narayana *et al.* 2016). Atualmente, sabe-se que a razão auxina/citocinina adicionada ao meio de cultura é de extrema importância na resposta dos explantes *in vitro*. Assim, de um modo geral, vários estudos têm demonstrado que concentrações mais elevadas de citocininas favorecem o desenvolvimento de rebentos (caulogénese), enquanto concentrações mais elevadas de auxinas promovem o desenvolvimento de raízes (rizogénese). Por outro lado, concentrações equilibradas de ambos os fitorreguladores, aproximando a razão auxina /citocinina de 1, conduzem à formação de tecido caloso (*callus*) (George *et al.*, 2008). Embora os resultados obtidos neste trabalho não tenham sido promissores, no que diz respeito ao desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de *C. maritimum*, mais estudos deverão ser levados a cabo, visto que as

técnicas de micropropagação de plantas da espécie *C. maritimum* adquirem maior relevância quando se perspetivam possíveis repovoamentos. A suportar esta necessidade está o facto desta espécie possuir proteção legal sob a Diretiva Habitats nº 92/43/CEE, o que lhe confere a designação de habitat prioritário, pela sua distribuição restrita e vulnerabilidade.

4.2.2. Estádios fenológicos

Na zona dunar de Moledo do Minho, verificou-se que o desenvolvimento das plantas de *C. maritimum* (figura 25) tem início com a formação de gomos de renovo nos meses de janeiro e fevereiro, meses em que os primeiros indivíduos começam a despontar no areal (figura 26 A). Estes gomos assumem cor vermelho-acastanhada até se encontrarem completamente expostos ao sol.

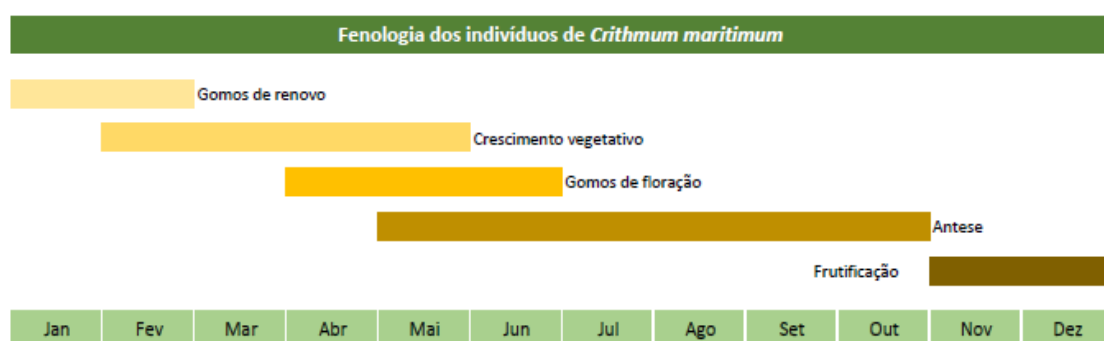


Figura 25. Cronograma fenológico de indivíduos de *Crithmum maritimum*, em Moledo do Minho, entre janeiro de 2022 e outubro de 2023.

Segue-se o estágio de crescimento vegetativo que decorre entre os meses de fevereiro e maio, período em que as folhas jovens apresentam um tom verde claro (figura 26 B e C).



Figura 26. Planta de *C. maritimum*: gomos de renovo (A) e crescimento vegetativo (B e C) (Fonte: autor).

Os primeiros gomos de floração observam-se desde abril até ao final de junho, coincidindo, em parte, com o crescimento vegetativo. O estágio mais longo verifica-se de maio a outubro, com o desabrochar das flores e a frutificação a ocorrer nos últimos meses do ano (figura 27). Estes dados são corroborados por Castroviejo e outros (1993), quando descrevem que a época de floração ocorre de maio a outubro e os frutos iniciam a sua maturação de novembro a dezembro.



Figura 27. Planta de *Crithmum maritimum*: gomos de floração (A); Antese (B); Frutificação (C e D) (Fonte: autor).

4.2.3. Compostos bioativos

Neste trabalho de investigação efetuou-se a quantificação de algumas classes de compostos bioativos (compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos totais) presentes nos extratos metanólicos 70 %, etanólicos 70 % e cetónicos 70 % da parte aérea de *C. maritimum* em vários estádios fenológicos.

No quadro 15, encontram-se expressos os resultados dos compostos bioativos estudados, em quatro datas de colheita, em função do solvente de extração.

Quadro 15. Efeito do solvente de extração, para cada data de colheita, na composição fitoquímica da parte aérea de *C. maritimum* (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Data de colheita	Solvente de extração	Fenólicos totais (mg GAE/g de amostra)	Flavonoides totais (mg QE/g de amostra)	Taninos totais (mg GAE/g de amostra)
09.01.2023	Metanol 70%	9,68a $\pm$ 1,74	1,73c $\pm$ 0,18	5,10a $\pm$ 2,11
	Etanol 70%	10,44a $\pm$ 0,92	2,68a $\pm$ 0,16	5,82a $\pm$ 1,08
	Acetona 70%	10,85a $\pm$ 1,20	2,19b $\pm$ 0,18	5,20a $\pm$ 1,74
16.03.2023	Metanol 70%	14,47b $\pm$ 2,84	2,90b $\pm$ 0,41	6,81a $\pm$ 3,98
	Etanol 70%	15,50ab $\pm$ 1,73	3,94a $\pm$ 0,70	8,58a $\pm$ 2,47
	Acetona 70%	17,80a $\pm$ 1,67	3,34ab $\pm$ 0,66	8,63a $\pm$ 2,78
08.05.2023	Metanol 70%	23,28b $\pm$ 1,60	4,35b $\pm$ 0,33	12,50a $\pm$ 1,34
	Etanol 70%	25,18a $\pm$ 1,38	5,36a $\pm$ 0,24	13,32a $\pm$ 2,33
	Acetona 70%	22,88b $\pm$ 1,66	3,59c $\pm$ 0,30	8,91b $\pm$ 2,26
03.07.2023	Metanol 70%	24,42a $\pm$ 2,24	4,06b $\pm$ 0,44	14,65a $\pm$ 2,45
	Etanol 70%	25,62a $\pm$ 2,49	5,86a $\pm$ 0,84	14,85a $\pm$ 2,40
	Acetona 70%	19,74b $\pm$ 2,12	4,63b $\pm$ 0,61	10,46b $\pm$ 1,11

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada data, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Analisando o quadro 15, em todas as amostras, o etanol 70 % foi o extrato com maior capacidade extrativa para os flavonoides totais e para os taninos totais, com exceção da amostra colhida em março cujo teor de taninos totais foi superior no extrato cetónico 70 %. Contudo, para esta amostra não se verificaram diferenças significativas entre os extratos etanólicos 70 % e cetónicos 70 %. No caso dos compostos fenólicos totais, o etanol 70 % foi, também, o solvente que extraiu maior quantidade de compostos fenólicos nas amostras de maio e julho. Nas amostras colhidas em janeiro e março, a maior quantidade de compostos fenólicos foi registada nos extratos com acetona 70 %, contudo não se verificaram diferenças significativas entre estes e os valores obtidos nos extratos etanólicos 70 %. É de salientar que para a quantidade de taninos totais extraídas, apenas se verificaram diferenças significativas entre a extração com acetona 70 % e os restantes solventes, nos meses de maio e julho.

Aquando da quantificação de compostos fenólicos totais em *C. maritimum*, Andrade (2021) obteve valores de 0,255 mg GAE/g de amostra fresca em extratos etanólicos 80 %. Para os mesmos compostos, Costa *et al.* (2018) alcançou valores de 23,44 mg GAE/g de amostra seca em extratos etanólicos 40 %, Jallali *et al.* (2012) obteve 8,27 mg GAE/g de amostra seca em extratos

cetônicos 80 %, Souid *et al.* (2021) obteve 20,3 mg GAE/g de amostra seca em extratos metanólicos 80 % e Souid *et al.* (2020) obteve 31,7 mg GAE/g de amostra seca em extratos etanólicos 80 % (Kraouia *et al.* 2023).

Perante os resultados obtidos, e à semelhança do que se verificou para *C. album*, os resultados sugerem que o solvente utilizado na extração tem efeito, sobretudo, nos compostos fenólicos totais e nos flavonoides que são extraídos da parte aérea de *C. maritimum*. As diferenças verificadas na quantificação dos compostos pode dever-se, como anteriormente mencionado, a questões relacionadas com a diversidade de metabolitos produzidos pela planta, com a metodologia, nomeadamente afinidade e solubilidade dos compostos para com os solventes de extração (Garzón, 2008; Zama *et al.*, 2020).

Embora no presente trabalho se tenha verificado que o etanol 70 % será o solvente que, no geral, apresenta maior capacidade extrativa, outros solventes, como o metanol e a acetona, são frequentemente empregues no processo de extração em estudos de caracterização fitoquímica de *C. maritimum*. No entanto, o etanol é o único solvente com qualidade alimentar, seguro para uso na produção e extração de alimentos, e menos tóxico para o ambiente (Chatzimitakos *et al.*, 2023).

No quadro 16, encontram-se expressos os resultados destes compostos bioativos, nos três extratos, em função da data da colheita.

Quadro 16. Efeito da data de colheita, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica da parte aérea de *C. maritimum* (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Solvente de extração	Data de colheita	Fenólicos totais (mg GAE/g de amostra)	Flavonoides totais (mg QE/g de amostra)	Taninos totais (mg GAE/g de amostra)
Metanol 70 %	09.01.2023	9,68c $\pm$ 1,74	1,73c $\pm$ 0,18	5,10b $\pm$ 2,11
	16.03.2023	14,47b $\pm$ 2,84	2,90b $\pm$ 0,41	6,81b $\pm$ 3,98
	08.05.2023	23,28a $\pm$ 1,60	4,35a $\pm$ 0,33	12,50a $\pm$ 1,34
	03.07.2023	24,42a $\pm$ 2,24	4,06a $\pm$ 0,44	14,65a $\pm$ 2,45
Etanol 70 %	09.01.2023	10,44c $\pm$ 0,92	2,68c $\pm$ 0,16	5,82c $\pm$ 1,08
	16.03.2023	15,50b $\pm$ 1,73	3,94b $\pm$ 0,70	8,58b $\pm$ 2,47
	08.05.2023	25,18a $\pm$ 1,38	5,36a $\pm$ 0,24	13,32a $\pm$ 2,33
	03.07.2023	25,62a $\pm$ 2,49	5,86a $\pm$ 0,84	14,85a $\pm$ 2,40
Acetona 70 %	09.01.2023	10,85c $\pm$ 1,20	2,19c $\pm$ 0,18	5,20b $\pm$ 1,74
	16.03.2023	17,80b $\pm$ 1,67	3,18b $\pm$ 0,36	8,63a $\pm$ 2,78
	08.05.2023	22,88a $\pm$ 1,66	3,59ab $\pm$ 0,30	8,91a $\pm$ 2,26
	03.07.2023	19,74b $\pm$ 2,12	3,97a $\pm$ 0,61	10,46a $\pm$ 1,11

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada solvente, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Através da análise do quadro 16, observam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) nos compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos totais entre as diferentes datas de colheita, em todos os solventes. Para todos os solventes, constatou-se que a concentração dos compostos bioativos aumenta progressivamente de janeiro a maio, com a exceção das amostras extraídas com acetona 70 % entre maio e julho, para os fenólicos totais. É de salientar, que exceto esta última amostra, não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de concentração dos vários compostos nas colheitas de maio e de julho.

Assim, atendendo à data de colheita e estação do ano correspondente foi possível verificar um aumento na concentração destes compostos com a aproximação do verão, tendo-se obtido maiores concentrações de flavonoides e taninos nas amostras de maio e julho. Nos compostos fenólicos esta tendência não se observou no mês de julho, no extrato com acetona 70 %, o que pode dever-se à natureza dos compostos que são produzidos nesta fase e à sua afinidade para com o solvente, como revisto anteriormente. Tendo em conta a sua polaridade, os compostos fenólicos podem não ser extraídos pela acetona e assim não serem quantificados. É importante referir que, à semelhança do que se verificou para *C. album*, a maior acumulação de compostos de natureza fenólica observada nas amostras de *C. maritimum* nos meses de maio e julho possa estar relacionada com a necessidade de proteção da planta contra a radiação UV. Ou seja, verifica-se um aumento na síntese de compostos foto-protetores, por parte da planta, como resposta ao aumento intensidade luminosa, com o objetivo de minimizar a fotodegradação dos tecidos (Del Valle *et al.*, 2020). Também os resultados da investigação de Jallali *et al.* (2012) demonstraram que as plantas de *C. maritimum* no verão apresentavam maior teor de compostos fenólicos do que na primavera. Popović e colaboradores (2024), observaram que a maior acumulação de compostos fenólicos em *C. maritimum* se verificava no início do verão, antes da planta atingir a fase de floração. A análise distinguiu também o período de fevereiro a abril como sendo a época do ano em que a planta continha menos compostos bioativos. De igual modo, Malës e colaboradores (2003), apuraram que a maior quantidade de compostos fenólicos totais se encontrava em amostras de *C. maritimum* recolhidas antes da floração.

No quadro 17, encontram-se expressos os resultados dos compostos bioativos investigados, para os três solventes de extração, em função do estágio fenológico.

Quadro 17. Efeito do estado fenológico, para cada solvente de extração, na composição fitoquímica da parte aérea de *C. maritimum* (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Solvente de extração	Estádio fenológico	Fenólicos totais (mg GAE/g de amostra)	Flavonoides totais (mg QE/g de amostra)	Taninos totais (mg GAE/g de amostra)
Metanol 70 %	Vegetativo	15,81b $\pm$ 6,14	3,00b $\pm$ 1,14	8,14b $\pm$ 4,14
	Floração	24,42a $\pm$ 2,24	4,06a $\pm$ 0,44	14,65a $\pm$ 2,45
Etanol 70 %	Vegetativo	17,04b $\pm$ 6,43	4,00b $\pm$ 1,20	9,24b $\pm$ 3,72
	Floração	25,62a $\pm$ 2,49	5,86a $\pm$ 0,84	14,85a $\pm$ 2,40
Acetona 70 %	Vegetativo	17,18b $\pm$ 5,27	2,98b $\pm$ 0,66	7,58b $\pm$ 2,77
	Floração	19,74a $\pm$ 2,12	3,97a $\pm$ 0,61	10,46a $\pm$ 1,11

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada solvente de extração, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Os dados apresentados no quadro 17, revelam que a composição fitoquímica é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada pelo estágio fenológico, verificando-se diferenças significativas em todos os parâmetros ($p < 0,05$), para os três solventes de extração analisados.

No que diz respeito ao parâmetro dos compostos fenólicos totais, foram obtidos valores entre 15,81 $\pm$ 6,14 - 17,18 $\pm$ 5,27 mg GAE/g de peso seco no estágio vegetativo e entre 19,74 $\pm$ 2,12 - 25,62 $\pm$ 2,49 mg GAE/g de peso seco, no estágio de floração.

Relativamente ao parâmetro dos flavonoides totais, os valores obtidos variaram entre 2,98 $\pm$ 0,66 - 4,00 $\pm$ 1,20 mg GAE/g de peso seco no estágio vegetativo e 3,97 $\pm$ 0,61 - 5,86 $\pm$ 0,84 mg GAE/g de peso seco, no estágio de floração.

No que concerne ao parâmetro dos taninos totais, os valores obtidos variaram entre 7,58 $\pm$ 2,77 - 9,24 $\pm$ 3,72 mg GAE/g de peso seco no estágio vegetativo e 10,46 $\pm$ 1,11 - 14,85 $\pm$ 2,40 mg GAE/g de peso seco, no estágio de floração. Verificou-se que a concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos totais aumentou no estágio fenológico correspondente à floração. Esta maior acumulação observada na fase de floração está de acordo a interação coordenada do papel ecológico de alguns compostos fenólicos com o estágio fenológico da planta descrita na literatura (Li *et al.*, 2024). Isto é, o aumento da síntese de compostos desta natureza durante a floração favorece a polinização da planta e consequente disseminação, visto que são compostos que dão cor, aroma às flores atraindo agentes

polinizadores (Cheynier *et al.*, 2013). Contudo, resultados não concordantes foram obtidos por Mékinic e colaboradores (2018), cujo extrato etanólico 80 % com maior teor de compostos fenólicos e flavonoides foi obtido na fase antes da floração. Noutro estudo, as amostras que apresentaram maior conteúdo em flavonoides, taninos e polifenóis totais foram as obtidas antes e no início da floração (Maleš *et al.*, 2003).

Análises quantitativas do conteúdo de flavonoides, taninos e polifenóis totais nas partes aéreas desta planta demonstraram que o teor de flavonoides era de 0,08 a 0,42 %, o teor de taninos variou de 0,10 a 2,65 %, enquanto o conteúdo de polifenóis totais variou de 4,72 a 9,48 %. Como anteriormente mencionado, Jallali e colaboradores reportaram uma maior quantidade de compostos fenólicos na fase reprodutiva (meses de verão) de plantas de *C. maritimum*, comparativamente ao seu estado vegetativo (meses de primavera).

Estudos realizados por Nabet *et al.* (2017), utilizando a parte aérea de *C. maritimum*, indicaram valores de compostos fenólicos totais na ordem dos $47,1 \pm 0,1$ (g GAE/kg), valores de flavonoides de $17,3 \pm 0,7$ (g CE/kg) e valores de taninos totais de $0,04 \pm 0,01$ (g CE/kg). Embora no atual trabalho, não tenha sido efetuada a identificação dos compostos bioativos presentes nos extratos obtidos, vários estudos anteriores já mostraram que na fração fenólica de plantas desta espécie estão presentes ácidos hidroxicinâmicos (Nabet *et al.*, 2017) e ácido clorogénico, identificado com um dos maioritários (Nabet *et al.*, 2017; Meot-Duros e Magné, 2009). Este composto encontra-se frequentemente nas folhas de *C. maritimum*, acumulando-se maioritariamente durante a fase de crescimento e floração da planta (Meot-Duros e Magné, 2009). Nas folhas de *C. maritimum*, foram também já quantificadas quantidades apreciáveis de vitamina C, iodo, carotenoides e óleos essenciais (Guil-Guerrero e Rodríguez-Garcia, 1999; Ben Amor *et al.* 2005; Nabet *et al.*, 2017; Mekinik *et al.*, 2024), incluindo de plantas colhidas em Portugal (Pateira *et al.*, 1999; Pedreiro *et al.*, 2023).

A diferença de valores obtidos neste estudo, comparativamente a outros autores, pode dever-se ao local de colheita, ao ano meteorológico, ao estágio fenológico em que as amostras foram colhidas e à metodologia utilizada.

4.2.4. Teor de humidade e teor de gordura

Os resultados obtidos para os teores de humidade e gordura, são apresentados no quadro 18.

Quadro 18. Caracterização das diferentes partes aéreas de *C. maritimum*, em diferentes datas de colheita (Resultados expressos em média $\pm$ DP de amostra seca).

Parte da planta	Data de colheita	Teor de humidade (%)	Teor de gordura (%)
Folhas + caules*	09.01.2023	88,52ab $\pm$ 1,21	2,44b $\pm$ 0,11
	16.03.2023	87,14b $\pm$ 0,57	2,20c $\pm$ 0,10
	08.05.2023	89,86a $\pm$ 0,59	2,47b $\pm$ 0,09
	03.07.2023	84,52c $\pm$ 0,28	2,92a $\pm$ 0,02
Flores	03.07.2023	82,61 $\pm$ 0,16	2,72 $\pm$ 0,09

*Médias com letras diferentes na mesma coluna, para cada parte da planta, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Aquando da observação do quadro 18, constata-se que o teor de humidade nas folhas + caules apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$), verificando-se, assim, a influência da data da colheita no teor de humidade destas estruturas. Os teores de humidade obtidos variam entre os 84,52 $\pm$ 0,28 % e os 89,86 $\pm$ 0,59 %. O teor de humidade mais baixo é observado nas flores (82,61 $\pm$ 0,16 %).

Estudos realizados por Andrade (2021) em folhas de *C. maritimum* recolhidas na região de Faro, alcançaram teores de humidade da ordem dos 88.80 $\pm$ 0.89 %, que se assemelham aos valores obtidos. Sabe-se que um dos principais fatores responsáveis pela adaptação das plantas halófitas a condições extremas de temperatura é a manutenção da hidratação. *C. maritimum* é considerada uma planta suculenta e, como tal, a existência de partes aéreas suculentas contribuem para a proteção da planta (Maatallah *et al.* 2021).

Relativamente ao teor de gordura, os dados do quadro revelam que este é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciado pela data da colheita, sendo a amostra de folhas + caules, recolhida em julho, a que apresenta maior teor de gordura (2,92 $\pm$ 0,02 %). Andrade (2021) obteve valores de gordura total na ordem dos 0,500 $\pm$ 0,005 (g/100g), em folhas de *C. maritimum*.

5. CONCLUSÕES

Com a realização do presente estudo, conclui-se que para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação de *C. album*, o protocolo de desinfecção que revelou maior eficácia foi aquele em que se utilizou a solução de etanol a 70 % durante 2 minutos, hipoclorito de sódio a 20 % durante 5 minutos, solução de Mancozebe (1g/L) durante 5 minutos, terminando-se com a lavagem dos explantes com água destilada estéril durante 5 minutos.

Para a espécie *C. maritimum*, o protocolo de desinfecção que revelou maior eficiência na remoção dos agentes contaminantes aquando da inoculação dos explantes, foi aquele em que se utilizou solução de etanol a 70 % durante 2 minutos, solução de hipoclorito de sódio a 20 % durante 10 minutos, solução de Mancozebe (1g/L) durante 10 minutos e se concluiu a desinfecção com a lavagem dos explantes com água destilada estéril durante 5 minutos.

Os resultados obtidos nos ensaios da cultura *in vitro* demonstraram que a espécie *C. album* apresenta considerável regeneração em meio WPM suplementado com cinetina (1 mg/L) e 2iP (2mg/L). No que concerne à espécie *C. maritimum*, não se observou formação de gomos foliares, mas verificou-se intensa formação de tecido radicular em meio MS suplementado com BA (0,5 mg/L) e NAA (0,1 mg/L).

Nas plantas de *C. album*, uma vez tratar-se de uma espécie dioica, os estádios fenológicos, apesar de similares, não ocorreram em simultâneo. A formação de gomos de floração dos indivíduos masculinos ocorreu entre os meses de novembro e março, enquanto nos indivíduos femininos esta fase sucedeu entre janeiro e abril, verificando-se que o estágio de floração é mais longo nos indivíduos masculinos (fevereiro a junho) comparativamente aos indivíduos femininos (março a maio). Nas plantas femininas, o crescimento vegetativo foi simultâneo à fase inicial de frutificação, tendo sido um estágio mais curto (maio a agosto) comparativamente às plantas masculinas (maio a outubro). A frutificação observou-se no período de temperaturas mais elevadas e precipitação quase inexistente, tendo decorrido entre os meses de agosto e outubro.

Os dados recolhidos pela observação do ciclo de vida das plantas em estudo permitiram concluir que o desenvolvimento das plantas de *C. maritimum* teve início com o estágio de crescimento vegetativo que decorreu entre os meses de fevereiro e maio. O estágio mais longo verificou-se entre maio a outubro com a época da floração e o estágio de frutificação observou-se nos meses de novembro e dezembro.

Relativamente aos diferentes métodos de extração foi possível concluir que a solução de acetona/água foi a que demonstrou maior eficiência na extração dos diferentes compostos

bioativos na espécie *C. album*. Contudo, para a espécie *C. maritimum*, o solvente que apresentou maior poder de extração foi o etanol 70 %.

Dados obtidos na caracterização fitoquímica de *C. album*, revelam que a composição fitoquímica é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada pela data da colheita, verificando-se uma diminuição da quantidade de taninos totais e um aumento de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais, entre fevereiro e julho. Os estudos revelam ainda que a composição fitoquímica é também significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada pelo estágio fenológico, verificando-se que a quantidade de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos diminui no estágio fenológico correspondente à frutificação.

O teor de humidade nas folhas de camarinha não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$), não se verificando, por isso, influência da data da colheita no teor de humidade. O teor de humidade mais elevado é apresentado pelos frutos. Quanto ao teor de gordura, este é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciado pela data da colheita, sendo a amostra recolhida em dezembro a que apresenta maior teor de gordura.

Após a avaliação dos compostos fitoquímicos produzidos por *C. maritimum*, de uma forma geral, constata-se um aumento significativo das concentrações de todos os compostos bioativos de janeiro a maio. Os dados revelam que a composição fitoquímica é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada pelo estágio fenológico, verificando-se uma maior acumulação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos no estágio fenológico correspondente à floração.

Ainda para *C. maritimum*, o teor de humidade da parte aérea constituída por folhas + caules apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$), observando-se influência da data da colheita no teor de humidade destas estruturas. O teor de humidade mais baixo é observado nas flores. Quanto ao teor de gordura, este é significativamente ($p \leq 0,05$) influenciado pela data da colheita, sendo a amostra de folhas + caules, recolhida em julho, a que apresenta maior teor de gordura.

A extração e caracterização de compostos bioativos presentes nas folhas de *C. album* possibilita um maior conhecimento desta planta, ainda quimicamente pouco explorada. Estudos como o atual, são um contributo para o pleno aproveitamento do potencial farmacológico e nutritivo desta espécie vegetal e para o desenvolvimento de novas terapias no combate a doenças como o cancro e doenças neurodegenerativas.

As folhas e flores de *C. maritimum* são ricas em compostos bioativos, cujas propriedades conferem a esta espécie uma possível utilização, não apenas tradicional, mas também na indústria farmacêutica, indústria agroalimentar e cosmética. Os resultados, destacam o potencial medicinal e nutricional desta planta halófita em comparação com outras plantas.

Neste trabalho foi possível verificar que, quer para *C. album* quer para *C. maritimum* os metabolitos secundários produzidos não apresentam uma concentração constante durante todo o ciclo de vida da planta, assim como também variam em diferentes condições ambientais, dependendo das necessidades das plantas.

Com a realização deste estudo pode concluir-se que a camarinha e o funcho-do-mar são espécies vegetais portadoras de um grande potencial em diversos compostos bioativos, com elevados benefícios para a saúde dos consumidores.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

No seguimento do estudo realizado e dos resultados obtidos nas duas espécies vegetais, as perspectivas de trabalho futuras prendem-se com:

Para *Corema album*,

- i. Estudos complementares para otimização do protocolo de cultura *in vitro* com ensaios de enraizamento;
- ii. Estudos de avaliação dos compostos bioquímicos de plântulas obtidas *in vitro*;
- iii. Análise dos compostos bioativos dos diferentes órgãos da planta;
- iv. Estudos comparativos dos compostos bioativos em plantas femininas e masculinas;
- v. Estudos complementares visando a caracterização dos compostos fenólicos;
- vi. Avaliação de atividades biológicas nos extratos obtidos, nomeadamente atividade microbiana e antioxidante.

Para *Crithmum maritimum*,

- i. Manipulação dos fitorreguladores com o intuito de induzir a formação de gomos foliares e posterior formação de plântula completa;
- ii. Estudos complementares visando a caracterização dos compostos fenólicos;
- iii. Avaliação de atividades biológicas nos extratos obtidos, nomeadamente atividade microbiana e antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, J. M. V. 2017. *Determinação de Compostos Bioativos em Frutas e Vegetais Consumidos na Região Autónoma da Madeira*. Tese de Mestrado. Departamento de Bioquímica. Universidade da Madeira. Portugal. p. 160.
- Alvarez-Cansino, L.; Zunzunegui, M.; Díaz Barradas, M.C.; Esquivias, M.P. 2010. *Gender-specific costs of reproduction on vegetative growth and physiological performance in the dioecious shrub Corema album*. Annals of Botany, 106, pp. 989-998.
- Alves, V. 2019. *Uso de ferramentas biotecnológicas para a valorização de Corema album: Micropropagação*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade do Porto.
- Alves, V.; Pinto, R.; Debiassi, C. et al. 2021. *Micropropagation of Corema album from adult plants in semisolid medium and temporary immersion bioreactor*. Plant Cell Tiss Organ Cult 145, pp. 641–648.
- Andrade, Fábio A. S, 2021. *Study of halophyte plants produced in Portugal*. Tese de mestrado em qualidade alimentar e saúde. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
- Andrade, M. W.; Luz, J. M.; Lacerda, A. S.; Melo, P. R. 2000. *Micropropagação da aroeira (Myracrodruon urundeuva Fr. All)*. Lavras: Ciênc. agrotec., v.24, n.1, pp. 174-180, jan./mar.
- Andrade, S. C.; Guiné, R. P. F.; Gonçalves, F. J. A. 2017. *Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowberry (Corema album)*. Journal of Food Measurement and Characterization, 11, pp. 1936-1946.
- Annegowda, H. V.; Bhat, R.; Min-Tze, L.; Karim, A. A.; Mansor, S. M. 2011. *Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits*. Journal of Food Science and Technology, 49, pp. 510-514.
- Arezki, O.; Boxus P.; Kevers C.; Gaspar T. 2000. *Hormonal Control of Proliferation in Meristematic Agglomerates of Ecalyptus Camaldulensis Dehn*. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 36, pp. 398–401.
- Atia, A.; Barhoumi, Z.; Mokded, R.; Abdelly, C.; Smaoui, A. 2011. *Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte Crithmum maritimum L. (Apiaceae)*. J. Med. Plants Res., 5, pp. 3564-3571.

- Bairu, M. W.; Aremu A. O.; Staden J. V. 2011. *Somaclonal Variation in Plants: Causes and Detection Methods*. Plant Growth Regulation, 63, pp. 147-73.
- Balasundram, N., Sundram, K., e Samman, S., 2006. *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry. 99, pp. 191-203.
- Barbosa, N. C. 2014. *Uma revisão bibliográfica dos fatores anti nutricionais: Taninos, inibidores de Proteases e Lectinas*. Trabalho de Conclusão de Licenciatura, Departamento de Química, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás, Brasil, p. 87.
- Barrett, C.; Cassells A. C. 1994. *An Evaluation of Antibiotics for the Elimination of Xanthomonas campestris Pv. Pelargonii (Brown) from Pelargonium x Domesticum cv. 'Grand Slam' Explants in Vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 3, pp. 169-75.
- Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Figueiredo, A. C.; Pais, M. S.; Scheffer, J. J. C. 1992. *Seasonal variation in the composition of the essential oil of Crithmum maritimum L.* Flavour Fragr. J., 7, pp. 147-150.
- Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Pais, M. S.; Scheffer J. J. C. 1991. *Analysis of the essential oil of Crithmum maritimum L.* J. Essent. Oil Res., 3 pp. 313-316.
- Battestin, V.; Matsuda, L. K. e Macedo, G. A. 2004. *Fontes e aplicações de Taninos e Tanases em alimentos*. Alimentos e Nutrição, 15, pp. 63-72.
- Ben Amor, N.; Ben hamed, K.; Debez, A.; Grignon, C.; Abdelly, C. 2005. *Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte Crithmum maritimum to salinity*. Plant Science, 168, pp. 889-899.
- Bertoncelli, D. J.; Hasse I.; Oliveira M. C. 2009. *Desinfecção e Estabelecimento in Vitro de Explantes de Jacaranda Mimosaeifolia D. Don*. In III Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária- Engenharia Florestal.
- Bertotti, Taciana R.; 2019; *Corema album (L.) D. Don: caracterização físico-química, capacidade antioxidante in vitro em ensaios de DPPH, ABTS e FRAP e perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa*. Dissertação de mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar; Politécnico de Leiria - Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar.
- Bhatia, S. e Sharma K. 2015. *Micropropagation*. In Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. Academic Press, pp. 109-15.

- Bhojwani, S. S. e Razdan M. K. 1996. *Clonal Propagation. In Plant Tissue Culture Theory and Practice*, a Revised Edition, Elsevier. pp. 483-536.
- Blainski, A.; Lopes, G. C.; Mello, J. C. P. 2013. *Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L.* Molecules, 18, pp. 6852-6865.
- Blake, J. 1988. *Mites and Thrips as Bacterial and Fungal Vectors between Plant Tissue Cultures.* Acta Horticulturae, 225, pp. 163-66.
- Boeira, C. P.; Piovesan, N.; Soquetta, M. B.; Flores, D. C. B.; Lucas, B. N.; Barin, J. S.; Rosa, S. R.; Terra, N. N. 2018. *Ultrasonic assisted extraction to obtain bioactive, antioxidant and antimicrobial compounds from marcela.* Ciência Rural, 48.
- Boratynski, A. e Vera de la Puente, M. L. 1994. *The Empetraceae on the Iberian Peninsula.* Willdenowia, 25, pp. 29-53.
- Borges, Larissa Pacheco; Amorim, Víctor Alves. 2020. *Metabólitos secundários de plantas.* Revista Agrotecnologia, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67.
- Bravo, L., 1998. *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance.* Nutrition Reviews, 56, pp. 317-333.
- Brito, C. 2018. *Caracterização da Camarinha (Corema album): Estudo da viabilidade de incorporação em produtos alimentares.* Dissertação de mestrado. Universidade Nova de Lisboa.
- Brito, C. et al. 2020. *Corema album spp: Edible wild crowberries with a high content in minerals and organic acids.* Food Chemistry. nº 345.
- Buchler GMBH - Disponível em <https://www.buchler-gmbh.com/produkt/quinic-acid/> (consultado a 12 de setembro de 2023).
- Cabezudo, B. -1987- Corema D. Don, in Valdés, B.; Talavera, S.; Fernández-Galiano, E. *Flora Vascular de Andalucía Occidental.* Barcelona.
- Cabezudo, B.; Talavera, S.; Blanca, G.; Salazar, C.; Cueto, M.; Valdés, B.; Hernández Bermejo, J.E.; Herrera, C.M.; Rodríguez Hiraldo, C.; Navas, D. 2005. *Lista Roja de la Flora Vascular de Andalucía.* Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente.
- Calviño e Cancela, M. 2002. *Spatial patterns of seed dispersal and seedling recruitment in Corema album (Empetraceae): the importance of unspecialized dispersers for regeneration.* Journal of Ecology, 90, pp. 775-784.

- Canhoto, J. M. 2010. *Biotecnologia Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Canhoto, J. M.; Lopes M. L.; Cruz G. S. S. 1999. *Somatic Embryogenesis in Myrtaceous Plants*. In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Edited by S. M. Jain, P. K. Gupta, and R. J. Newton. Springer. pp. 293-340.
- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. 1997. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology & Medicine*. 22, pp. 749-760.
- Carapeto A., Araújo P.V., Clamote F., Porto M., Beja P., Frade D., Holyoak D.T., Gomes C.T., et al. 2023. *Corema album* (L.) D.Don - mapa de distribuição.
- Caretto, S.; Linsalata, V.; Colella, G.; Mita, G.; Lattanzio, V. 2015. *Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress*. *Int. J. Mol. Sci.* 16; pp. 26378-26394.
- Castro, P. R. et al. 2005. *Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática*. Piracicaba: Agronômica Ceres.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J. & Soriano, C. (1993). *Flora ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Volume IV. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid. pp. 524-526.
- Castroviejo, S., Feliner G.N., Jury S.L., Herrero, A. (2003). *Flora iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Volume X. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid. p. 498.
- Cerquido, A.S.; Vojtek, M.; Ribeiro-Oliveira, R.; Gonçalves-Monteiro, S.; Barroca, M.J.; Moreira da Silva, A.; Viegas, O.; Freitas, V.; Sousa, J.B.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; et al. 2022. *Corema album* Leaves Mediate DNA Damage in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44, pp. 3598–3610.
- Chandra, S.; Bandopadhyay, R.; Kumar, V.; Chandra, R. 2010. *Acclimatization of Tissue Cultured Plantlets: From Laboratory to Land*. *Biotechnology Letters*, 32, pp. 1199-1205.
- Chatzimitakos, T.; Athanasiadis, V.; Makrygiannis, I.; Kalompatsios, D.; Bozinou, E.; Lalas, S.I. 2023. *An Investigation into Crithmum maritimum L. Leaves as a Source of Antioxidant Polyphenols Compounds*. 3, pp. 532 - 551.

- Cheyrier, V.; Comte, G.; Davies, K.M.; Lattanzio, V.; Martens, S. 2013. *Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology*. Plant Physiology and Biochemistry, 72, pp. 1-20
- Christensen, Lars P e Brandt, Kirsten. 2006. *Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 41, Issue 3, pp. 683-693.
- Clavijo, A., Barradas, Díaz; M.C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Alvarez Cansino, L., Correia, O. García Novo, F. 2003. *Conservação de Corema album no litoral atlântico da Península Ibérica; a influência de dispersores animais na regeneração natural*. Revista de Biología, 21, pp. 43-56.
- Clavijo, A.; Barradas, D.; Ain-Lhout, F.; Zunzunegui, M.; Correia, O. 2002. *A fragmentação como causa principal da redução do habitat de Corema album na sua área de distribuição*. Revista Biología, 20, pp. 109-120.
- CMC – Câmara Municipal de Caminha. *Plano municipal de defesa da floresta contra incêndios (PMDFCI) 2016-2020*. Disponível em <https://www.cmcaminha.pt/cmcaminha/uploads/document/file/2180/cadernoidiagnostico.pdf> (Consultado a 29 de agosto de 2023).
- Comissão Europeia, Direção Geral de Ambiente e Agência Europeia do Ambiente, Centro Temático Europeu da Proteção da Natureza e da Biodiversidade. 2003. *Mediterranean Region. Reference list of habitat types and species presente in the region*; Doc. Med/B/fin. 5. Bruxelas-Paris.
- Comissão Europeia, Direção Geral de Ambiente, Unidade Natureza e Biodiversidade. 2003. *Interpretation Manual of European Union Habitats*. Bruxelas.
- Cornara, L.; Rocca, A. La; Marsili, S.; Mariotti, M.G. 2009. *Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy)*. J. Ethnopharmacol. 125: pp. 16 - 30.
- Costa J. C.; Capelo J.; Lousã M.; Espirito-Santo M. D. 1998. *Sintaxonomia da vegetação halocasmofítica das falésias marítimas portuguesas*. Itinera Geobot. volume 11, pp. 227-247.
- Costa, C.; Padalino, L.; Spinelli, S.; Serio, F.; Del Nobile, M.A.; Conte, A. 2018. *Study of the efficacy of two extraction techniques from Crithmum maritimum and Salicornia europaea*. J. Food Nutr. Res. 6, pp. 456 - 463.

- Costa, C.A. 2011. *Fatores que condicionam a dispersão e o recrutamento da camarinha em sistemas dunares*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. p. 42.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. 2000. *Natural products (secondary metabolites)*. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1250-1318.
- Crozier, A.; Jaganath, I. B.; e Clifford, M. N.; 2006. *Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview*. In: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and role in the Human. Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H.; Blackwell Publishing Ltd, pp. 1-24.
- Debergh, C.; Maene, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture, *Scientia Horticulturae*, Volume 14, Issue 4, pp. 335-345.
- Debnath, M., Malik, C., Bisen P. 2006. *Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-Based Medicines*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, pp. 33-49.
- Del Valle, J.C.; Buide, M.L.; Whittall, J.B.; Valladares, F.; Narbona, E. 2020. *UV radiation increases phenolic compound protection but decreases reproduction in *Silene litorea**. *PLOs ONE*. Nº 15.
- Diaz-Barradas, M. C., Costa, C., Correia, O., León-González, A. J., Navarro-Zafra, I., Zunzunegui, M., Martín-Cordero, C. 2016. *Pentacyclic triterpenes responsible for photoprotection of *Corema album* (L.) D. Don white berries*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 67, pp. 103-109.
- Dijhane, B.; Nouioua, W.; Soltani, E.; De Haro, J. P.; Angeles, E. M.; Zerroug, M. M. 2017. *Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans**. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25, pp. 780-787.
- Domingues, Jéssica C. 2021. *Caracterização e valorização de bagas e frutos silvestres autóctones da região do Alto Minho*; Dissertação de mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar. Universidade do Minho.
- Enjalric, F.; Carron, M. P.; Lardet, L. 1987. *Contamination of Primary Cultures in Tropical Areas: The Case of *Hevea Brasiliensis**. *Acta Horticulturae*, 225, pp. 57-66.
- Etienne, H. e Berthouly, M. 2002. *Temporary Immersion Systems in Plant Micropropagation*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, pp. 215-31.

- Falcão, Lina e Araújo, Maria Eduarda M. 2011. *Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests*. Journal of Cultural Heritage, Volume 12, Issue 2, pp. 149-156.
- Fernández de la Cigoña, E. 1988. *La Camariña: Distribución histórica y actual. Posibilidades de recuperación en Galicia*. Revista de Estudios Provinciais. Pontevedra, N 5. Servizo de Publicacións da Deputación Provincial de Pontevedra.
- Ferreira, Liliana Andreia dos Santos. 2018. *A contribution to the valorisation of a maritime plant: the Corema album (L.) D. Don*. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Ferreira, M. L. F.; Serra, P.; Casati, P. 2021. *Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure*. Physiologia Plantarum, Nov, 173(3):736-749.
- Flickinger, M. C. 2010. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons.
- Flora ibérica – Disponível em <http://www.floraiberica.org/> (Consultado a 05 de setembro de 2023).
- Flora-On - Flora de Portugal Interativa. Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.floraon.pt/#wCorema+album> (Consulta a 10 de agosto de 2023.).
- Flora-On - Flora de Portugal Interativa. Sociedade Portuguesa de Botânica. Disponível em <http://www.flora-on.pt/#wPistorinia+hispanica> (Consultado a 25 de setembro de 2023).
- Franke, W. 1982. *Vitamin C in sea fennel (Crithmum maritimum), an edible wild plant*. Econ. Bot., 36, pp. 163-165.
- Gama, A. 2009. *Camarinha, o arbusto adornado de pérolas*. QUERCUS Ambiente, nº 37, p. 26.
- Garzón, G. 2008. *Las antocianinas como colorants naturales y compuestos bioativos: Revisión*, Acta Biológica Colombiana. v. 13, n. 3, p. 27-36.
- Generalić, Ivana et al. 2016. *Sea fennel (Crithmum maritimum L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity*. Association of Food Scientists & Technologists. India.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1: The Technology. Exegetics Limited. Westbury, UK.

- George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volume 1 - The Background. Springer. 3ª edição. Netherlands.
- Gil-López, M. J. 2011. *Etnobotánica de la camarina (corema album, Empetraceae) en Cádiz*. Ata Etnobotánica Malacitana. Universidade de Cádiz. pp. 137-144.
- Gomes, F. e Canhoto, J. M. 2009. *Micropropagation of Strawberry Tree (Arbutus Unedo L.) from Adult Plants*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 45, pp. 72-82.
- Gonçalves, J. C. e Pinto, R. F. 2019. *Micropropagação de Corema Album: Primeiros Resultados*. Pequenos Frutos. pp. 12-13.
- Gouveia, S. e Castilho, P. C. 2011. *Antioxidant potential of Artemisia argentea L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition*. Food Research International, 44, pp. 1620-1631.
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. 1990. *Micropropagação*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, p.183-260.
- Grigoriadou, K. e Eleni, M.E. 2008. *Micropropagation and salt tolerance of in vitro grown Crithmum maritimum L.* Plant Cell Tiss. Organ Cult., 94, pp. 209-217.
- Guil-Guerrero, J.L.; Rodriguez-Garcia, I 1999. *Lipid classes, fatty acids and carotenoids of the leaves of six edible wild plants*. Eur. Food Res. Technol., 209, pp. 313-316.
- Gutián, P., Medrano, M., Rodríguez, M. 1997. *Reproductive biology of Corema album (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula*. Acta Botanica Gallica, 144, pp. 119-128.
- Guri, A. Z., Patel, K. N. 1998. *Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media*. U.S. Patent, No. 5, issued.
- Hamed, K.B.; Debez, A.; Chibani, F.; Abdelly, C. 2004. *Salt response of Crithmum maritimum, an oleagineous halophyte*. Trop. Ecol., 45, 151–159.
- Harborne, J. B. e Williams, C. A. 2000. *Advances in Flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 55, pp. 481-504.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. 2002. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. Journal of Nutritional Biochemistry, 13, pp. 572-584.

- Herrera, C. M.; 1987. *Vertebrate-Dispersed Plants of the Iberian Peninsula: A Study of Fruit Characteristics*. ESA - Ecological Society of America. Ecological Monographs, Vol. 57, No. 4 (Dec., 1987), pp. 305-331.
- Hidalgo, M.; Martin-Santamaria, S.; Recio, I.; Sanchez-Moreno, C.; Pascual-Teresa, B.; Rimbach, G. e Pascual-Teresa, S. 2012. *Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites*. Genes & Nutrition, 7, pp. 295-306.
- HiMedia Laboratories. 2017. *Woody Plant Medium - Product information*. Mumbai, Índia.
- Hou, D. X. 2003. *Potential Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anthocyanins*. Current Molecular Medicine, 3, pp. 149-159.
- Hussain, S.; Lane, S. D.; Price, D. N. 1994. *A Preliminary Evaluation of the Use of Microbial Culture Filtrates for the Control of Contaminants in Plant Tissue Culture Systems*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36, pp. 45-51.
- ICNB – Instituto de Conservação da Natureza e da Biodiversidade. Disponível em <https://www.icnf.pt/api/file/doc/0ec3196288a264f0> (Consultado a 10 de setembro de 2023).
- IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2018. *Diretiva-quadro “estratégia marinha”*.
- IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2022. *Boletim Climatológico Mensal - dezembro*.
- IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2023. *Boletim Climatológico Mensal - janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, julho*.
- Jacinto, João. 2019. *Morphological and genetic characterization of four populations of Corema album (L.) Don*. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa-ISA.
- Jacinto, João; Magalhães, Tomás; Oliveira, Pedro B.; Oliveira, Cristina; Luz, Francisco; Trindade, Cândida Sofia & Valdivieso, Teresa; 2022. *Corema album (L.) D. Don Phenological Growth Stages according to Extended BBCH Scale*. International Journal of Fruit Science, 22:1, pp. 317-328.
- Jain, S. M. e Häggman, H., 2007. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer.

- Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A, Abdelly C, Ksouri R. 2014. *Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonetic extracts of two edible halophytes: Crithmum maritimum L. and Inula crithmoides L.* Food Chem., 145, pp. 1031-1038.
- 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, pp. 1451–1459.
- Jansen, J. 2002. *Guia Geobotânico da Serra da Estrela.* Parque Natural da Serra da Estrela. Instituto da Conservação da Natureza. p. 276.
- Jepson, Ruth G., Craig, Jonathan C. 2007. *A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention* Molecular Nutrition Food Research. Volume 51, p. 738.
- Jimenez-Garcia, S. N.; Guevara-Gonzalez, R. G.; Miranda-Lopez, R.; Feregrino-Perez, A. A.; Torres-Pacheco, I. e Vazquez-Cruz, M. A. 2013. *Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics.* Food Research International, 54, pp. 1195-1207.
- Kavitha, C.; Rajamani, K.; Vadivel, E. 2010. *Coleus forskohlii: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects.* J. Med. Plant. Res., 4, pp. 278-285.
- Khanbabaee, K. e van Ree, T. 2001. *Tannins: Classification and Definition.* Natural Product Reports, 18, pp. 641-649.
- 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, 4741.
- Kulišić-Bilušić, T.; Blažević, I.; Dejanović, B.; Miloš, M.; Pifat, G. 2010. *Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from caper (Capparis spinosa) and sea fennel (Crithmum maritimum) by different methods.* J. Food Biochem., 34, pp. 286-302.
- Kumar, S.; Pandey, A. K. 2013. *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview.* The Scientific World Journal, v. 2013, p. 10-16.
- Larrinaga, Asier R. e Guitián, Pablo. 2016. *Intraspecific variation in fruit size and shape in Corema album (Ericaceae) along a latitudinal gradient: from fruits to. populations* Biological Journal of the Linnean Society, Volume 118, Issue 4, pp. 940–950.

- Leggat, I.; Waites, W.M.; Leifert, C.; Nicholas, J. 1988. *Characterisation of Micro-Organisms Isolated from Plants during Micropropagation*. Acta Horticulturae 225, pp. 93-102.
- Leifert, C.; Morris, C. E.; Waites, W. M. 1994. *Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems in Vitro*. Reviews in Plant Science, 13, pp. 139-83.
- Leifert, C.; Waites, W. M.; Nicholas, J. R. 1989. *Bacterial Contaminants of Micropropagated Plant Cultures*. Journal of Applied Bacteriology, 67, pp. 353-61.
- León-González, A. J.; Mateos, R.; Ramos, S.; Martín, M. A.; Sarriá, B.; Martín-cordero, C.; López-Lázaro, M.; Goya, L. 2012. *Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from Corema album*. Food Research International, 49, pp. 728-738.
- León-González, A.J.; Truchado, P.; Tomás-Barberan, F.A.; López-Lázaro, M.; Barradas, M.C.D.; Martín-Cordero, C. 2013. *Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in Corema album (L.) D. Don berries*. Journal of Food Composition and Analysis, 29, pp. 58-63.
- Li, Y., Bao, T.; Zhang, J.; Li, H.; Shan, X.; Yan, H.; Kimani, S.; Zhang, L.; Gao, X. 2024. *The coordinated interaction or regulation between floral pigments and volatile organic compounds*. Horticultural Plant Journal.
- Liao, Z.; Chen, M.; Sun, X.; Tang, K. 2006. *Micropropagation of Endangered Plant Species*. In Plant Cell Culture Protocols. Humana Press. pp. 179-85.
- Lima, M. A.; Oliveira, P. B.; Vasconcelos, L. T.; Ramalho, J. 2018. *Camarinha – divulgar um recurso silvestre da nossa zona costeira*. Valorização da Camarinha. INIAV, Dossier Técnico. pp. 30-32.
- Linsmaier, E. M. e Skoog, F. 1965. *Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture*. Physiologia Plantarum, 18, pp. 100-127.
- Lloyd, G. B. e McCown, B. H. 1980. *Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, Kalmia Latifolia, by Use of Shoot-Tip*. Proceedings - International Plant Propagators' Society, 30, pp. 421-27.
- Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. 2010. *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacognosy Reviews, 4, 8, 118.
- Long, Y.; Yang, Y.; Pan, G.; Shen, Y. 2022. *New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms*. Front Plant Sci. 2022 Jun 30; 13:926752.

- Lopes, Miguel Raposo Monereo. 2015. *O coelho bravo como facilitador da invasão do chorão nos sistemas dunares: implicações para a conservação de uma espécie endémica (Corema album)*. Dissertação de mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Luís, A. F. S. 2014. *Pesquisa e Identificação de Compostos Bioativos em Plantas Florestais*. Tese de Doutoramento, Departamento de Bioquímica, Universidade de Ciências da Beira Interior, Portugal.
- Luís, A.; Domingues, F.; Duarte, A. P. 2011. *Bioactive Compounds, RP-HPLC Analysis of Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Portuguese Shrub Species Extracts*. Natural Product Communications, 6, pp. 1863-1872.
- Maatallah, Zaier M.; Ciudad-Mulero, M.; Cámara, M.; Pereira, C.; Ferreira, I.C.F.R.; Achour, L. et al. *Revalorization of Tunisian wild Amaranthaceae halophytes: Nutritional composition variation at two different phenotypes stages*. J Food Compos Anal 2020, 89.
- Macedo, D. et al. 2015. *(Poly)phenols protect from α -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy*. Human Molecular Genetics, 24, pp. 1717–1732.
- Magalhães, T. 2015. *Propagação e fenologia da Corema album (L.) D. Don. Ensaios de propagação vegetativa por estaca. Caracterização fenológica e proposta de escala BBCH*. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa-ISA.
- Magalhães, T.; Oliveira, P.B.; e Oliveira, C. 2017. *Propagação e fenologia da Corema album. D. (L.)*. Don Novas Edições Académicas.
- Maleš, Ž.; Žuntar, I.; Nigović, B.; Plazibat, M.; Bilušić, c.; Vundač, V., B.; 2003. *Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire—Crithmum maritimum L*. Acta Pharm., 53, pp. 139-144.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. e Jiménez, L. 2004. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 79, pp. 727-747.
- Maraschin, M. e Verpoorte, R. 1999. *Engenharia do metabolismo secundário: otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2, pp. 24-28.
- Marques, E. 2007. *Caracterização das populações de Camarinha (Corema album L.) no Cabo Carvoeiro*. Tese de mestrado em Ciências da Terra e da Vida para o Ensino. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, Portugal.

- Martin, D.; Marques, J.; Amado, A.M. et al. 2019. *Shedding light into the healthbeneficial properties of Corema album—A vibrational spectroscopy study*. Journal of Raman Spectroscopy.
- Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J. 2002. *Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Nutrición Hospitalaria, 6, pp. 271-278.
- Massimiliano, Renna. 2018. *Reviewing the Prospects of Sea Fennel (Crithmum maritimum L.) as Emerging Vegetable Crop*. Journal Plants.
- Mehrotra, S.; Goel, M. K.; Kukreja, A. K.; Mishra, B. N. 2007. *Efficiency of Liquid Culture Systems over Conventional Micropropagation: A Progress towards Commercialization*. African Journal of Biotechnology 6: pp. 1484-92.
- Mekinić et al. 2018. *Influence of the vegetation period on sea fennel, Crithmum maritimum L. (Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities*. Industrial Crops and Products, 124: 947-953.
- Mékinic et al. 2024. *The alphabet of sea fennel: Comprehensive phytochemical characterisation of Croatian populations of Crithmum maritimum L.* Food Chemistry: X, 22: 101386.
- Meot-Duros, L.; Cérantola, S.; Talarmin, H.; Le, M.C.; Le, F.G.; Magné, C. 2010. *New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in Crithmum maritimum L. leaf extract*. Food Chem. Toxicol., 48, pp. 553-557.
- Meot-Duros, L.; Le, F. G.; Magné, C. 2008. *Radical scavenging, antioxidante and antimicrobial activities of halophytic species. J. Ethnopharmacol.*, 116, pp. 258-262.
- Meot-Duros, L.; Magné, C. 2009. *Antioxidant activity and phenol content of Crithmum maritimum L. leaves*. Plant Physiol. Biochem., 47, pp. 37-41.
- Meot-Duros, Laetitia e Magné, Christian. 2008. *Antioxidant activity and phenol content of Crithmum maritimum L. leaves*. Plant Physiology and Biochemistry. Volume 47. Issue 1, January 2009, pp. 37-41.
- Miguel, C.; Marum, L. 2011. *An Epigenetic View of Plant Cells Cultured in Vitro: Somaclonal Variation and Beyond*. Journal of Experimental Botany, 62: pp. 3713-25.
- Mihaljevic, I. K.; Dugalic, V.; Tomas, M.; Viljevac, A.; Pranjin, Z.; Cmelik, B.; Puskar, Z.; Jurkovic. 2013. *In Vitro Sterilization Procedures for Micropropagation of 'Oblacinska' Sour Cherry*. Journal of Agricultural Sciences, 58, pp. 117-26.

- Monteiro, J. M.; Albuquerque, U. P. e Araújo, E. L. 2005. *Taninos: uma abordagem da química à ecologia*. Químicas Nova, 28, pp. 892-896.
- Mulabagal, V.; Tsay, H. 2004. *Plant Cell Cultures - an Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites*. International Journal of Applied Science and Engineering, 2, pp. 29-48.
- Murashige, T. 1974. *Plant Propagation through Tissue Cultures*. Annual Review of Plant Physiology, 25, pp. 135 - 66.
- Murashige, T., e Skoog, F. 1962. *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture*. Physiologia Plantarum 15, pp. 473-97.
- Nabet, N.; Boudries, H.; Chougui, N.; Loupassaki, S.; Souagui, S.; Burló, F.; Lariat R. 2017. *Biological activities and secondary compound composition from Crithmum maritimum aerial parts*. International Journal of Food Properties, 20 (8), pp. 1843-1855.
- Narayana, P. S.; Varalakshmi, D.; Pullaiah, T. 2016. *Research Methodology In Plant Science*. Scientific Publishers. 3, Plant Tissue Culture, pp. 58-86.
- Neto, C.C., 2011. *Cranberries: ripe for more cancer research?* Journal of the Science of Food and Agriculture 91, 2303–2307.
- Nietsche, S. et al. 2006. *Estabelecimento in vitro de explantes de três cultivares de bananeira*. Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 989-991.
- Nitsch, J.P.; Nitsch, C. 1969. *Haploid Plants from Pollen Grains*. Science, 16, pp. 85-87.
- Obeso, J. R.; Alvarez-Santullano, M.; Retuerto, R. 1998. *Sex ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree Ilex aquifolium (Aquifoliaceae)*. Am. J. Bot. 85, pp. 1602 - 1608.
- Obeso, J.R. 1997. *Costs of reproduction in Ilex aquifolium: effects at tree, branch and leaf levels*. J. Ecol. 85 pp. 159 - 166.
- Odutayo, O. I.; Amusa, N. A.; Okutade, O. O.; Ogunsanwo. Y. R. 2007. *Sources of Microbial Contamination in Tissue Culture Laboratories in Southwestern Nigeria*. African Journal of Agricultural Research, 2, pp. 67-72.
- Oksman-Caldentey, K.; Inzé, D. 2004. *Plant Cell Factories in the Post-Genomic Era: New Ways to Produce Designer Secondary Metabolites*. Trends in Plant Science 9, pp. 433-40.
- Okusanya, O. T. 1977. *The effect of sea water and temperature on the germination behaviour of Crithmum maritimum*. Physiol. Plant., 41, 265-267.

- Oliveira, Mónica Ferreira. 2014. *Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de Vaccinium corymbosum (mirtilo) num modelo de artrite reumatoide*. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa- Faculdade de Farmácia.
- Oliveira, P. B.; Valdivieso, T.; Trindade, S.; Evaristo, I.; Nóbrega, F.; Lima, A. A.; Silva, A. R.; Santos, M.; Magalhães, T.; Lisboa, A.; C. M. Oliveira. 2016. *Os Primeiros Passos Na Investigação Em Corema Album (Camarinha)*. Vida Rural, pp. 29-31.
- Oliveira, P.B.; Dale, A. 2012. *Corema album (L.) D. Don, the white crowberry-a new crop*. Journal of Berry Research, 2, pp. 123-133.
- Oliveira, Pedro B.; Rosado-da-Luz, Francisco; Magalhães, Tomás; Lisboa, Ana; Oliveira, Cristina M.; Valdivieso, Teresa. 2020. *Propagação vegetativa e seminal em Corema album (L.) D. Don*; Actas Portuguesas de Horticultura, nº 30.
- Ostrolucká, M. G.; Gajdošová, A.; Ondrušková, E.; Lateěková, M.; Libiaková, G. 2010. *Effect of Medium PH on Axillary Shoot Proliferation of Selected Vaccinium Vitis-Idaea L. Cultivars*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52, pp. 92-96.
- Oyebanji, O. B.; Nweke, O.; Odebunmi, O.; Galadima, N. B.; Idris, M. S.; Nnodi, U. N.; Afolabi, A. S.; Ogbadu, G. H. 2009. *Simple, Effective and Economical Explant-Surface Sterilization Protocol for Cowpe , Rice and Sorghum Seeds*. African Journal of Biotechnology, 8, pp. 5395-99.
- Özcan, M.; Akgül, A.; Başcı, K. H. C.; Özçk, T.; Tabanca, N. 2001. *Essential oil composition of sea fennel (Crithmum maritimum) from Turkey*. Nahrung Food, 45, pp. 353-356.
- Pal, A. et. al. 2014. *Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review*. Open Access Library Journal, 1, pp. 752-769.
- Pappas, E., Schaich, K.M., 2009. *Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 49, 741–781.
- 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, pp. 333-343.

- 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), p. 252.
- Phillips, G.C.; Garda, M. 2019. *Plant tissue culture media and practices: an overview*. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 55, pp. 242 – 257.
- Pierik, R. L. M. 1997. *Sterilization of Plant Material*. In Vitro Culture of Higher Plants, Springer, Dordrecht; pp. 89-94.
- Pinto, R. 2014. *O Papel do Ordenamento do Território na Adaptação às Alterações Climáticas no Estuário do Rio Minho*. Tese de doutoramento em Ciências do Mar e do Ambiente. Universidade de Aveiro.
- Poonam, R.; Bhardwaj, R.; Sharma, N.; Handa, H.; Kaur, R.; Kaur, G.; Sirhindi, A. K.; Thukral. 2014. *Prospects of Field Crops for Phytoremediation of Contaminants*. In Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, edited by P. Ahmad & S. Rasool. Academic Press, 2, pp. 449-70.
- Popović, Marijana; Radman, Sanja; Mekinić, Ivana Generalić; Runjić, Tonka Ninčević; Urlić, Branimir; Bratinčević, Maja Veršić. 2024. *A Year in the Life of Sea Fennel: Annual Phytochemical Variations of Major Bioactive Secondary Metabolites*. Applied Sciences 14, no. 8: 3440.
- Pourmorad, F.; Hosseinimehr, S. J.; Shahabimajd, N.; 2006. *Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants*. African Journal of Biotechnology, 5, pp. 1142-1145.
- Ramalho, Tiago. 2023. *Neurociências - Doença de Parkinson: equipa portuguesa identifica planta que recupera movimento parcial*; Jornal Público de 12 de maio de 2023.
- Rani, V.; Raina, S. N. 2000. *Genetic Fidelity of Organized Meristem-Derived Micropropagated Plants: A Critical Reappraisal*. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 36, pp. 319-30.
- Rates, S. M. K. 2001. *Plants as Source of Drugs*. Toxicon, 39, pp. 603-13.
- Reichardt, Christian; Welton, Thomas. 2010. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 7, pp. 425-508.

- Renna, M.; Gonnella, M. 2013. *The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations*. Int. J. Gastron Food Sci., 1, pp. 111-115.
- 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*. Genet. Resour. Crop Evol., 64, pp. 205-216.
- Renna, Massimiliano. 2018. *Reviewing the Prospects of Sea Fennel (Crithmum maritimum L.) as Emerging Vegetable Crop*. Plants 7, no. 4: 92.
- Ribeiro, O. 1988. *O ritmo climático e a paisagem*. Geografia de Portugal.
- Ribeiro, V. S.; Leitão, A. E.; Ramalho, J. C.; Lidon, F. C. 2014. *Chemical characterization and antioxidant properties of a new coffee blend with cocoa, coffee silverskin and green coffee minimally processed*. Food Research International, 61, pp. 39-47.
- Rosado-Ramos, R.; Poças, G. M.; Marques, D. et al. 2023. *Genipin Prevents Alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity by Affecting Endocytosis, Metabolism, and Lipid Storage*. Nature Communications, 14, pp. 1918.
- Salunkhe, D. K.; Jadhav, S. J.; Kadam, S. S.; Chavan, J. K. e Luh, B. S. 1982. *Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes*. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 17, pp. 277 - 305.
- Samuni-Blank, M. et. al. 2012. *Intraspecific directed deterrence by the mustard oil bomb in a desert plant*. Current Biol., 22, pp. 1218-1220.
- Santos, M. S.; Oliveira, C. M.; Valdivieso, T. e Oliveira, P. B. 2014. *Effects of pretreatments on Corema album (L.) D. Don (subsp. album) seeds germination*.
- Santos, Marta; Magalhães, Tomás; Lisboa, Ana; Oliveira, Cristina M. 2016. *Os primeiros passos na investigação em Corema album (camarinha)*. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa. Dossier técnico, INIAVE I.P.
- Santos, P. A. G.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Deans, S. G.; Scheffer, J. J. C. 2002. *Composition of the essential oils from populations of Crithmum maritimum L. grown on four Azorean islands*. In Rauter, A. P.; Palma, F. B.; Justino, J.; Araújo, M. E.; Santos, S. P. *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Vol. 47, pp. 135-141.

- Santos, R. I. 2001. *Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários*. In Simões, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC.
- Sass-Kiss, A.; Kiss, J.; Milotay, P.; Kerek, M. M.; e Toth-Markus, M. 2005. *Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables*. Food Research International, 38, pp. 1023-1029.
- Sathyanarayana, B. N.; Verghese, D. B. 2007. *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. IK International Publishing House Pvt. Ltd.
- Savithramma, N. et. al. 2011. *Screening of medicinal plants for secondary metabolites*. Middle-East J. Sci. Res., 8, pp. 579-584.
- Schenk, R. U.; Hildebrandt A. C. 1972. *Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures*. Canadian Journal of Botany 50, pp. 199-204.
- Seeram, N.P., 2008. *Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 630–635.
- Selmar, D. e Kleinwächter, M. 2013. *Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants*. Ind. Crop. Prod. 42 pp. 558–566.
- Sesso, H. D.; Gaziano, J. M.; Jenkins, D. J. A.; Buring, J. E.; Am, J. 2007. Coll. Nutrition. Volume 26, pp. 303.
- Shahidi, F. e Naczki, M., 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, pp. 131-155.
- SHAKESPEARE, William. 1606. *Rei Lear*. Página a página. Ato IV, Cena VI.
- Shani, E.; Weinstain, R.; Zhang, Y.; Castillejo, C.; Kaiserli, E.; Chory, J.; Tsien, R. Y.; Estelle M. 2013. *Gibberellins Accumulate in the Elongating Endodermal Cells of Arabidopsis Root*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, pp. 4834-39.
- Silva, A. M.; Barroca, M. J. 2020. *Investigação: Extrato de camarinha poderá ter propriedades anticancerígenas*. Sul informação. Disponível em <https://www.sulinformacao.pt/2020/07/investigacao-extrato-de-camarinha-podera-terpropriedadesanticancerigenas> (Consultado a 10 de setembro de 2023).
- Silva, A. M.; Barroca, M. J.; Guiné, R. P. F. 2021. *Knowledge and consumption habits related with white crowberries (Corema album L.)*. Appl. Sci. 11.

- Silva, Alexandre *et al.* 2021. *Sítios de Interesse Botânico de Portugal Continental – Tomo II*. Imprensa Nacional-Casa da Moeda, S. A. Lisboa.
- Silva, Daniela J. S.; Santos, João A. V. *et al.* 2023. *Spectrochemical analysis of seasonal and sexual variation of antioxidants in Corema album (L.) D. Don leaf extracts*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. Elsevier.
- Silva, G. M. 2006. *Padrões Fitogeográficos em Sistemas Dunares do Noroeste de Portugal Continental*. Dissertação de Mestrado em Ecologia da Paisagem e Conservação da Natureza. Universidade do Porto.
- Silva, M. R. e Silva, M. A. A. P. 1999. *Aspetos nutricionais de Fitatos e Taninos*. Revista Nutricional Campinas, 12, pp. 5-19.
- Silva, P., Pinho, P., Correia, A. I., Branquinho, C., Correia, O. 2004. *Estudo de Indicadores de Vulnerabilidade de Sistemas Dunares: Um Contributo para a Gestão Integrada de Zonas Costeiras*. Atas da 8ª Conferência Nacional do Ambiente.
- Simões, C. M. O *et al.* 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC.
- Simões, Luís. 2018. *Desenvolvimento de Estratégias para a Valorização de uma Planta Endógena da Costa Marítima Portuguesa: a Corema album (L.) D. Don*. Relatório de Estágio Profissionalizante. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Coimbra.
- Siracusa, L.; Kulisic-Bilusic, T.; Politeo, O.; Krause, I.; Dejanovic, B.; Ruberto, G. 2011. *Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from Capparis spinosa L. and Crithmum maritimum L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model*. J. Agric. Food Chem., 59, pp. 12453-12459.
- Soares, S. E., 2002. *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. Revista Nutricional Campinas, 15, pp. 71-81.
- Souid A., Della Croce C.M., Frassinetti S., Gabriele M., Pozzo L., Ciardi M., Abdelly C., Ben Hamed K., Magné C., Longo V. 2021. *Nutraceutical Potential of Leaf Hydro-Ethanollic Extract of the Edible Halophyte Crithmum maritimum L.* Molecules, 26:5380.
- Souid A., Della Croce C.M., Pozzo L., Ciardi M., Giorgetti L., Gervasi P.G., Abdelly C., Magné C., Ben Hamed K., Longo V. *Antioxidant Properties and Hepatoprotective Effect of the Edible Halophyte Crithmum maritimum L. against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats*. 2020. Eur. Food Res. Technol. 246:1393–1403.

- Stevens, P. F. 2017. Angiosperm Phylogeny Website - ERICALES. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. (Consultado em setembro de 2023).
- Stirk, W. A.; Staden, J. V. 2014. *Plant Growth Regulators in Seaweeds: Occurrence, Regulation and Functions*. In *Advances in Botanical Research*, 71, pp. 125-59.
- Suman, S. 2017. *Plant Tissue Culture: A Promising Tool of Quality Material Production with Special Reference to Micropropagation of Banana*. *Biochemical and Cellular Archives*, 17, pp. 1-26.
- Tahirović, A.; Mehić, E.; K Josevski, N.; Bašić, N. 2019. *Phenolics content and antioxidant activity of three Sorbus species*. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 53, pp. 15-21.
- Tawaha, K.; Alali, F.; Gharaibeh, M.; Mohammad, M.; Elelimat, T. 2007. *Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species*. *Food Chemistry*, 104, pp. 1372-1378.
- Teixeira, C.; Assunção, T. 1961. *Notícia explicativa da folha 1– C (Caminha) da Carta Geológica de Portugal à escala 1:50 000*. Direção Geral de Minas e Serviços Geológicos. Serviços Geológicos de Portugal. Lisboa.
- Torres, K. C. 1989. *Tissue Culture Media-Composition*. In *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. Springer. Boston, MA. pp. 26-51.
- Tutin, T.G.; Heywood, V.H.; Burges, N.A.; Moore, D.M.; Valentine, D.H.; Walters, S.M.; Webb, D.A. 1972. *Flora Europaea - Diapensiaceae to myoporaceae*. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra. 3, pp. 70.
- UTAD - Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Disponível em <https://jb.utad.pt> (consultado a 20 de setembro de 2023).
- UTAD – Jardim botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 2023. *Ficha Técnica Corema album*. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Corema_album_ (Consultado a 10 de agosto de 2023).
- Verma, N.; Shukla, S. 2015. *Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2 pp. 105–113.

- Vitti, D. M. S. S.; Abdalla, A. L.; Bueno, I. C. S.; Filho, J. C. S.; Costa, C.; Bueno, M. S.; Nozella, E. F.; Longo, C.; Vieira, E. Q.; Cabral Filho, S. L. S.; Godoy, P. B.; Mueller-Harvey, I. 2005. *Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes*. Animal Feed Science and Technology, 119, pp. 345-361.
- Wannes, W. A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Ben Jemia, M.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Elyes Kchouk, M. E.; Marzouk, B. 2010. *Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower*. Food and Chemical Toxicology, 48, pp. 1362-1370.
- Weather Spark. 2023. Disponível em <https://pt.weatherspark.com/map?cc=PT>. (Consultado a 10 de novembro de 2023).
- Zaman, Kamarul M. A.; Azzeme, A. M.; Ramli, S. N.; Shaharuddin, N. A.; Ahmad, S.; Abdullah, S. N. A. 2020. *"Solvent extraction and its effect on phytochemical yield and antioxidant capacity of woody medicinal plant, Polyalthia bullata"* BioRes. 15(4), 9555-9568.
- Zunzunegui, M.; Díaz-Barradas, M.C.; Clavijo, A.; Álvarez-Cansino, L.; Ain Lhout, F.; García Novo, F. 2006. *Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of Corema album*. Plant Ecology. 183, pp. 35-46.

8. ANEXOS

Anexo 1

Quadro 1. Diferentes usos de produtos à base de funcho-do-mar descritos na literatura (Fonte: Renna, 2018).

Uses	Product Type	References
Agri-food	Pickled leaves	Renna et al.
Aromatic herb	Potted plant	Montesano et al.
Folk medicine	Fresh leaves	Atia et al.
Folk medicine	Fruits infusion	Pavela et al.
Folk medicine	Pickled leaves	Carrió and Vallès
Folk medicine	Plant decotion	Cornara et al. Savo et al.
Folk medicine	Plant juice	Pavela et al.
Food colorant	Dehydrated leaves	Renna et al. Renna and Gonnella
Gastronomy	Fresh-cut leaves	KopperCress
Spice	Dehydrated leaves	Renna et al. Renna and Gonnella Giungato et al.

9. APÊNDICES

Apêndice 1

Quadro 1. Composição do meio de cultura WPM utilizado na cultura *in vitro* de *C. album* (Adaptado de *HiMedia Laboratories*, 2017).

	Nutriente	Concentração
Macronutrientes	Nitrato de amônio (NH_3NO_3)	400 mg/L
	Cloreto de Cálcio	72,5 mg/L
	Nitrato de Cálcio	386,340 mg/L
	Sulfato de magnésio	180,690 mg/L
	Fosfato de Potássio	170 mg/L
	Sulfato de Potássio	990 mg/L
Micronutrientes	Ácido Bórico	6,2 mg/L
	Sulfato de Manganês	22,3 mg/L
	Sulfato de zinco	8,6 mg/L
	EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)	37,3 mg/L
	Sulfato de Ferro	27,8 mg/L
	Sulfato de Cobre	0,025 mg/L
	Molibdato de Sódio (MoNa_2O_4)	0,213 mg/L
Vitaminas	Mio-inositol	100 mg/L
	Ácido nicotínico	0,5 mg/L
	Piridoxina	0,5 mg/L
	Tiamina	1 mg/L
Aminoácido	Glicina	2 mg/L
Fitorreguladores	Cinetina	0,5 mg/L / mg/L
	2iP (N6-(2-Isopentenil)adenina)	0 mg/L / 2 mg/L
Hidrato de carbono	Sacarose	30 g/L
Agente gelificante	Ágar	7 g/L

Apêndice 2

Quadro 2. Composição do meio de cultura MS utilizado na cultura *in vitro* de *C. maritimum* (Adaptado de Murashige e Skoog, 1962).

	Nutriente	Concentração
Sais	Sais da marca “Duchefa” para meio MS com vitaminas	4406,09 mg/L
Fitorreguladores	6-Benziladenina (BA)	0 mg/L / 0,5 mg/L
	ácido 1-naftalenoacético (NAA)	0 mg/L / 0,1 mg/L
Hidrato de carbono	Sacarose	30 g/L
Agente gelificante	Ágar	7 g/L

Apêndice 3 – Curvas de calibração de ácido gálico (GAE) utilizadas para determinar o teor de compostos fenólicos totais em *C. album* e *C. maritimum*.

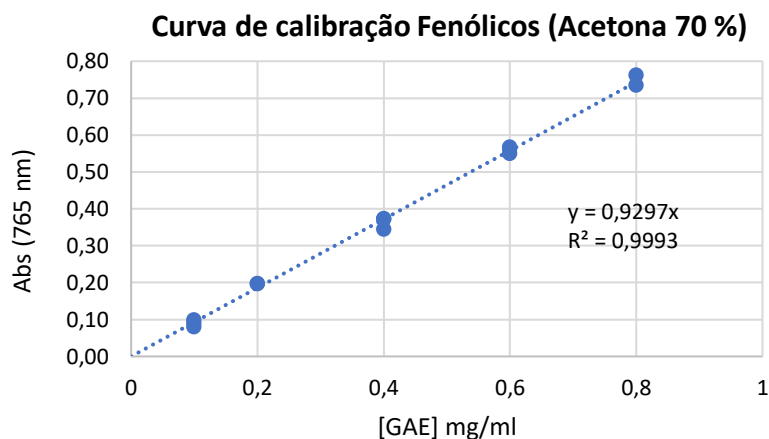


Figura 1. Curva de calibração de ácido gálico (GAE) preparado em acetona 70 %.

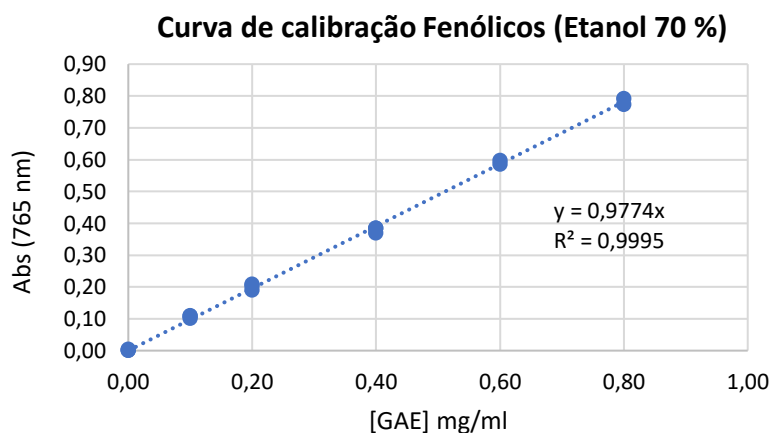


Figura 2. Curva de calibração de ácido gálico (GAE) preparado em etanol 70 %.

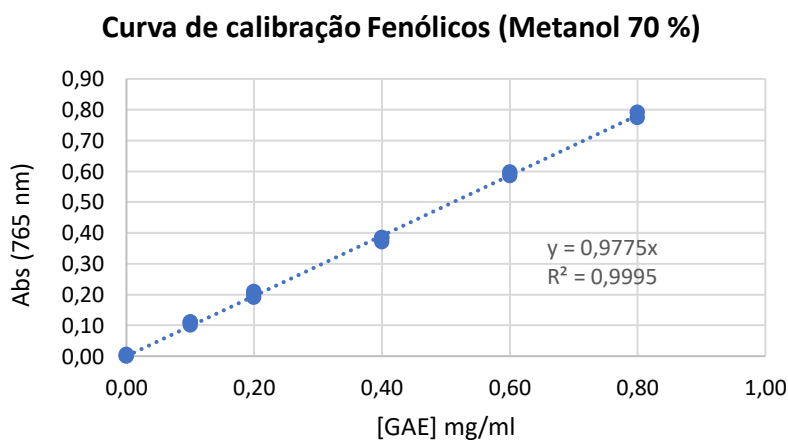


Figura 3. Curva de calibração de ácido gálico (GAE) preparado em metanol 70 %.

Apêndice 4 – Curvas de calibração de quercetina (QE) utilizadas para determinar o teor de flavonoides totais em *C. album* e *C. maritimum*.

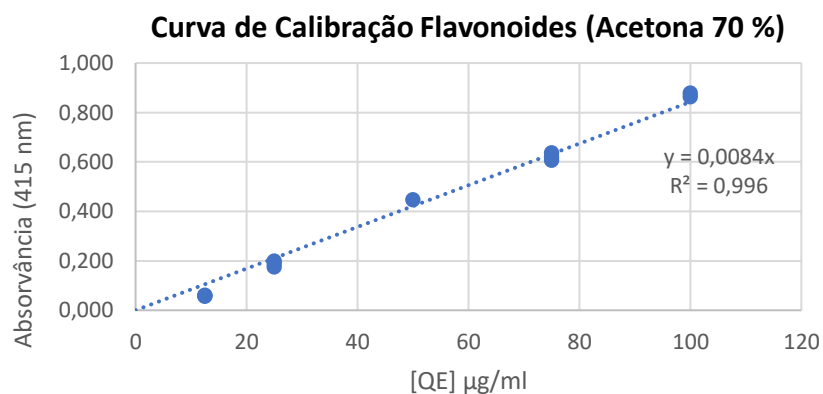


Figura 4. Curva de calibração de quercetina (QE) preparada em acetona 70 %.

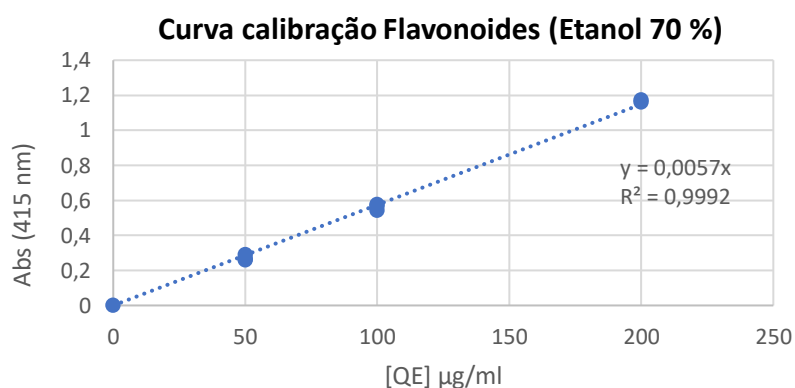


Figura 5. Curva de calibração de quercetina (QE) preparada em etanol 70 %.

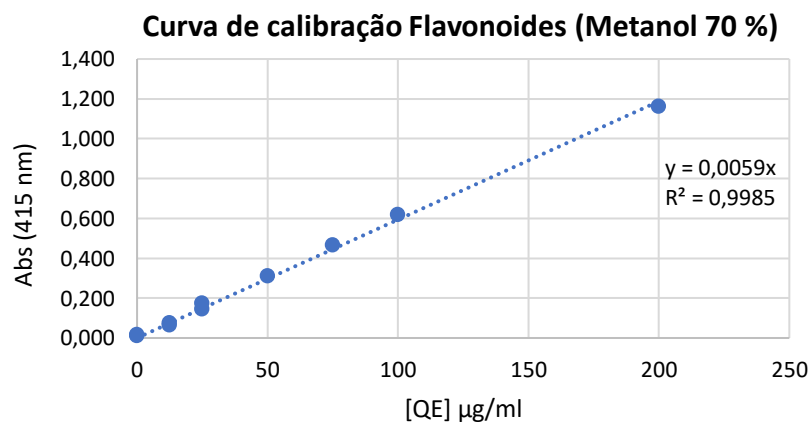


Figura 6. Curva de calibração de quercetina (QE) preparada em metanol 70 %.