



**Catarina Margarida Duarte Belo Calado Brito**

Licenciada em Bioquímica

## **Caracterização da Camarinha (*Corema album*): Estudo da viabilidade de incorporação em produtos alimentares**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientador: Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro, Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde do Politécnico de Leiria

Co-orientador: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Professor auxiliar com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa

Vogal(ais): Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro

Doutora Cidália Daniela Dionísio de Almeida Pereira



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2018





**Catarina Margarida Duarte Belo Calado Brito**

Licenciada em Bioquímica

## **Caracterização da Camarinha (*Corema album*): Estudo da viabilidade de incorporação em produtos alimentares**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Fitotecnologia Nutricional para a Saúde Humana

Orientador: Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro, Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde do Politécnico de Leiria

Co-orientador: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Professor auxiliar com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Maria Fernanda Guedes Pessoa

Vogal(ais): Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro

Doutora Cidália Daniela Dionísio de Almeida Pereira



*Copyright* © - Todos os direitos reservados. Catarina Margarida Duarte Belo Calado Brito. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Caracterização da camarinha (*Corema album*): Estudo da viabilidade de incorporação em produtos alimentares

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



## Agradecimentos

Ao professor **Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo** por me ter incentivado para aceitar esta oportunidade e por me ter ajudado a trilhar o caminho que me levou à descoberta da investigação na área alimentar.

À professora **Doutora Vânia Sofia Santos Ribeiro** por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela disponibilidade com que prontamente respondeu a todas as minhas dúvidas, inquietudes e ansiedades.

À professora Doutora **Ana Cristina Rodrigues** por todos os ensinamentos na parte de microbiologia e pela coragem que sempre me transmitiu para enfrentar todos os desafios.

À professora Doutora **Daniela Vaz** por todos os ensinamentos relativamente às células CACO-2 e à oportunidade que me proporcionou por desenvolver os testes de viabilidade celular no departamento de Química da Universidade de Coimbra.

À professora **Doutora Maria João Moreno**, à **Doutora Patrícia Martins** e à **Cristiana Pires** pela disponibilidade com que me receberam na Universidade de Coimbra, pela paciência e simpatia no ensinamento das técnicas de viabilidade celular.

Ao professor **Doutor Mauro Guerra** do Departamento de Física da FCT/UNL pela disponibilidade e pelo contributo que deu na análise de minerais.

À técnica de laboratório **Maria Rodrigues** por me ter acolhido no laboratório de forma excecional e por todo o apoio laboratorial que me deu.

Às minhas amigas do mestrado pelo apoio, pela coragem e por todas as partilhas, em especial à **Maria João Primitivo** e à **Sofia Santoalha**.

A todos os **meus amigos** pelas horas de atenção que lhes roubei e por toda a boa disposição que sempre me transmitiram ao longo do percurso, em particular à **Carolina Costa, João Campoa, Pedro Pereira, Iryna Brovchenko, Cristiano Conceição, Santiago Almeida, Joana Valente e Mariana Matos**.

Aos **meus pais Paulo Brito e Helena Brito** pela tenacidade com que me encorajaram para enfrentar este desafio e por todo o amor e valores que me transmitiram que tornaram possível o empenho que dediquei a este projeto.

À **minha irmã Susana Brito** por ser sempre um apoio incondicional na minha vida, por todas as alegrias e vivências que partilhou comigo e pela positividade que sempre me transmitiu.

À **minha sobrinha Leonor Silva** por todas as gargalhadas genuínas que tornaram os meus dias menos bons em dias melhores e que me transmitiram força para nunca desistir.

Aos **meus avós José Reis, Fátima Reis e Victória Belo** pela compreensão das escassas visitas que lhes fiz durante este período.

Ao **meu namorado Telmo Rodrigues** pelo apoio incondicional que me deu no incentivo à realização deste trabalho e por toda a paciência que teve de ter ao longo destes meses.



## Resumo

A camarinha é um fruto silvestre comestível proveniente da espécie *Corema album*, que se desenvolve maioritariamente ao longo da costa da Península Ibérica e que apresenta potencial para ser introduzido no mercado dos pequenos frutos. Contudo, encontra-se atualmente com um baixo reconhecimento sendo necessário apostar no seu estudo de forma a avaliar o seu verdadeiro potencial.

O objetivo principal da presente dissertação foi a caracterização físico-química da camarinha e a avaliação do seu potencial na introdução da dieta humana.

A realização do presente trabalho de investigação consistiu na caracterização físico-química do fruto, onde foram avaliados parâmetros físicos, nomeadamente tamanho médio do fruto e parâmetros químicos como o pH e °Brix do sumo, análise elementar e capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana. Procedeu-se também à realização de alguns testes de viabilidade celular com células CACO-2. Na última etapa foi realizada uma formulação de um chocolate com incorporação de camarinha e consequentemente avaliada por um painel de consumidores.

Os resultados obtidos demonstraram que a camarinha apresenta atividade antioxidante e características físico-químicas tais como acidez, cor e açúcares, com relevante interesse para a formulação de novos produtos alimentares. Estes atributos contribuirão para a valorização de um recurso nacional que pode pela inovação conquistar alguns nichos de mercado, tendo sempre em atenção sua sustentabilidade.

**Termos chave:** camarinha, inovação, planta silvestre comestível, pequenos frutos



## Abstract

Camarinha is a wild edible berry that comes from *Corema album* that develops mostly along the coast of the Iberian Peninsula. This berry presents a big potential to be introduced to small fruit markets, however, currently it finds itself with a low recognition, and as such, some investment is needed to study this berry in order to evaluate its true potential.

The main goal of this dissertation is the physical-chemical characterization of the camarinha and its potential in the human diet.

The present work consisted in the physical-chemical characterization of the fruit, in which physical parameters were evaluated, namely average fruit size and chemical parameters such as pH and Brix degree of juice, elemental analysis, antioxidant capacity and antimicrobial activity. There were some Cell viability tests performed with CACO-2 cells. In the last stage, a formula for a chocolate with camarinha was made and consequently evaluated by a panel of consumers.

The results show that the white crowberry exhibited antioxidant activity and physical-chemical properties such as acidity, color and sugars which are relevant for the creation of new food products. These attributes will contribute to the valorization of the product as a national resource, that through innovation may well conquer some market niches, taking into account its history and sustainably.

**Key words:** White crowberry, innovation, edible wild plant, small fruits



## Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo .....	III
Abstract.....	V
Índice .....	VII
Índice de Tabelas .....	XI
Introdução.....	1
Objetivos de investigação.....	3
Capítulo 1 - Enquadramento Teórico .....	6
1.1 - Caracterização da espécie <i>Corema album</i> .....	6
1.1.1 - Taxonomia.....	6
1.1.2 - Distribuição geográfica.....	6
1.1.3 - Morfologia.....	7
1.1.4 - Propagação .....	7
1.1.5 - Fatores que representam ameaças à propagação .....	8
1.2 - Avaliação do potencial do fruto, camarinha, proveniente da espécie <i>Corema album</i> .....	9
1.2.1 - Caracterização física do fruto.....	9
1.2.2 - Caracterização química do fruto .....	9
1.2.3 - Atividade antibacteriana .....	12
1.2.4 - Avaliação do efeito benéfico para a saúde .....	13
1.3 - Inovação alimentar - viabilidade da introdução de camarinha.....	14
1.3.1 - A necessidade de desenvolver novos produtos alimentares.....	14
1.3.2 - Introdução de plantas silvestres comestíveis na dieta.....	15
1.4 - Avaliação da potencial produção de camarinha .....	16
Capítulo 2 - Material e Métodos .....	20
2.1 - Recolha e preparação de amostras .....	20
2.2 - Caracterização físico-química.....	21
2.2.1 - Determinação do peso médio .....	21
2.2.2 - Determinação da altura e do diâmetro médio .....	21
2.2.3 - Determinação da parte edível .....	22
2.2.4 - Determinação do teor de humidade .....	23
2.2.5 - Determinação do pH do sumo .....	24
2.2.6 - Determinação dos sólidos solúveis do sumo .....	24
2.2.7 - Análise elementar.....	24
2.3 - Atividade antioxidante .....	26
2.3.1 - Extração de compostos fenólicos .....	26
2.3.2 - Quantificação dos compostos fenólicos totais .....	27
2.3.3 - Avaliação da capacidade de redução do radical ABTS .....	28
2.4 - Avaliação da atividade antibacteriana.....	29
2.4.1 - Estirpes bacterianas.....	29
2.4.2 - Método de difusão em disco .....	29

2.5 - Teste de Viabilidade Celular .....	30
2.5.1 - Cultura das células .....	30
2.5.2 - Ensaio MTT .....	31
2.5.3 – Preparação de amostras .....	31
2.6 - Estudo da viabilidade de incorporação do fruto camarinha em produtos alimentares .....	32
2.6.1 - Desenvolvimento de uma formulação de chocolate com incorporação de camarinha .....	32
2.6.1.1 - Formulação do produto .....	32
2.6.1.2 - Teste de consumidor .....	33
2.7 - Análise Estatística .....	33
Capítulo 3 - Resultados e Discussão .....	36
3.1 - Caracterização físico-química .....	36
3.1.1 - Determinação do peso médio .....	36
3.1.2 - Determinação da altura e do diâmetro médio .....	37
3.1.3 - Determinação da parte edível .....	39
3.1.4 - Determinação do teor de humidade .....	40
3.2 - Capacidade antioxidante .....	47
3.2.1 - Quantificação dos compostos fenólicos totais .....	47
3.2.2 - Determinação da capacidade antioxidante .....	49
3.3 - Avaliação da Capacidade Antibacteriana .....	50
3.4 - Teste de viabilidade Celular – Ensaio de células CACO-2 .....	53
3.5 - Incorporação da camarinha na dieta humana .....	54
3.5.1 - Chocolate com incorporação do fruto camarinha .....	54
Capítulo 4 - Considerações finais .....	58
Capítulo 5 - Perspetivas futuras .....	62
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas .....	68
Anexo .....	80

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Mapa representativo da distribuição geográfica da espécie <i>C. album</i> em Portugal Continental .....	6
<b>Figura 1.2</b> - Fotografia da espécie <i>Corema album</i> .....	7
<b>Figura 1.3</b> - Fotografia do fruto da espécie <i>Corema album</i> .....	9
<b>Figura 1.4</b> - Representação da estrutura molecular do composto fenol .....	10
<b>Figura 1.5</b> - Estrutura molecular do composto ácido clorogénico... ..	12
<b>Figura 1.6</b> - Estrutura molecular do composto ácido cafeico... ..	12
<b>Figura 2.1</b> - Mapa de Portugal Continental onde se encontra assinalado o local de recolha das amostras estudadas no presente estudo .....	21
<b>Figura 2.2</b> - Representação demonstrativa da medição da altura da baga, assinalado a amarelo e do diâmetro assinalado a azul, com recurso a um micrómetro manual .....	22
<b>Figura 2.3</b> - Sistema M4 Tornado (Espectrometria por Fluorescência de Raios-X).....	25
<b>Figura 2.4</b> - Pastilha constituída por camarinha desidratada e pressionada a uma força equivalente a 10 toneladas, colocada no filme de mylar e inserida no respetivo slide.....	26
<b>Figura 2.5</b> - Estudo de viabilidade celular de células CACO-2 na presença de sumo de camarinha, com recurso ao ensaio MTT realizado em placa ELISA de 96 poços.....	31
<b>Figura 3.1</b> - Mapa de Portugal Continental representativo das diferentes zonas da recolha de camarinha onde foram efetuados diversos estudos .....	37
<b>Figura 3.2</b> - Camarinha desidratada a uma temperatura de 60°C durante aproximadamente 72 horas .....	39
<b>Figura 3.3</b> - Representação gráfica da comparação entre os resultados, referente ao teor de humidade, dos frutos desenvolvidos no pinhal e nas dunas ( $P<0,05$ ). Os frutos foram desidratados a uma temperatura de 60°C durante aproximadamente 72 horas.....	41
<b>Figura 3.4</b> - Representação gráfica da comparação entre os resultados, referente ao teor de sólidos solúveis, do sumo dos frutos desenvolvidos no pinhal e nas dunas ( $P<0,05$ ).....	44
<b>Figura 3.5</b> - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe <i>Escherichiacoli</i> . II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe <i>Escherichia coli</i> (controlo positivo).....	52

<b>Figura 3.6</b> - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe <i>Staphylococcus epidermidis</i> . II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe <i>Staphylococcus epidermidis</i> (controlo positivo).....	52
<b>Figura 3.7</b> - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (controlo positivo).....	52
<b>Figura 3.8</b> - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe <i>Enterococcus faecalis</i> . II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe <i>Enterococcus faecalis</i> (controlo positivo).....	52
<b>Figura 3.9</b> - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe <i>Staphylococcus aureus</i> . II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe <i>Staphylococcus aureus</i> (controlo positivo).....	52
<b>Figura 3.10</b> - Gráfico de resultados de viabilidade celular das células CACO-2, avaliada pelo teste MTT, quando submetidas à presença (6 horas de incubação) de diferentes concentrações de sumo de camarinha .....	54
<b>Figura 3.11</b> - Chocolate com incorporação de sumo desidratado de camarinha .....	55
<b>Figura 5.1</b> - Potenciais produtos para introdução de camarinha na dieta humana.....	65

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Concentrações testadas de extrato liofilizado de camarinha no ensaio de viabilidade celular em células CACO-2... ..	32
<b>Tabela 3.1</b> - Peso médio do fruto recolhido em diferentes zonas .....	37
<b>Tabela 3.2</b> – Resultados referentes ao diâmetro médio do fruto obtidos em diferentes estudos.....	38
<b>Tabela 3.3</b> - Resultados referentes à altura média do fruto obtidos em diferentes estudo .....	39
<b>Tabela 3.4</b> - Resultados referentes à parte edível do futo desidratado .....	40
<b>Tabela 3.5</b> - Resultados referentes à parte edível do fruto fresco.....	40
<b>Tabela 3.6</b> - Resultados referentes ao teor de humidade obtidos em diferentes estudos .....	41
<b>Tabela 3.7</b> - Valores de pH de diversos frutos .....	42
<b>Tabela 3.8</b> - Teor de sólidos solúveis de diferentes frutos .....	44
<b>Tabela 3.9</b> - Constituição mineral do fruto camarinha determinada com recurso à técnica de $\mu$ -fluorescência de raios-X. As concentrações de todos os elementos encontram-se expressas em mg/100 g de fruto, excepto no potássio em que se encontram expressas em %. .....	47
<b>Tabela 3.10</b> - Concentrações (mg/100g de fruto edível) de Cálcio, Ferro e Zinco em diferentes frutos em peso fresco de parte edível .....	47
<b>Tabela 3.11</b> - Comparação do teor de compostos fenólicos totais entre diferentes frutos determinados pelo método de Folin-Ciocalteau.....	48
<b>Tabela 3.12</b> - Comparação da capacidade antioxidante entre diferentes frutos determinada através do método de ABTS .....	50
<b>Tabela 3.13</b> - Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes seleccionadas.....	51
<b>Tabela 3.14</b> - Resultados de viabilidade celular das células CACO-2, avaliada pelo teste MTT, quando submetidas à presença (6 horas de incubação) de diferentes concentrações de sumo de camarinha .....	54



## Lista de Abreviaturas

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

AMP - Ampicilina

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

CIP - Ciprofloxacina

CT - Colistina

DHC - Dihydrochalcone (Dihidrochalcona)

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

*E. coli* - *Escherichia coli*

*E. faecalis* - *Enterococcus faecalis*

ECACC - *European Collection of Cell Cultures*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FBS - Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino)

GAE - Equivalentes em ácido gálico

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

MHA - Muller-Hinton Agar

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

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

P - *P-value*

*P. aeruginosa* - *Pseudomonas aeruginosa*

PB - Polimixina B

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

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

*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*

*S.Epidermis* - *Staphylococcus epidermidis*

VCEAC - Capacidade Antioxidante equivalente em vitamina C



## Introdução

Existem cerca de 27 mil espécies de plantas que apresentam potencial para ser introduzidas na alimentação humana (Drausal e Rapoport, 2001). Apesar disso, constata-se que apenas uma pequena parte é utilizada na alimentação, o que se traduz na dependência excessiva de várias espécies (Romojaro *et al.*, 2013). Algumas destas plantas comestíveis confinam-se a pequenos nichos geográficos, sendo conhecidas e utilizadas apenas pela população local havendo, no entanto, outras às quais não lhes é conferida qualquer utilização. O desconhecimento geral das pessoas leva à subvalorização das espécies. (Leal *et al.*, 2018).

Define-se como planta comestível aquela que possui uma ou várias partes que podem ser consumidas. Para além do consumo direto da planta pode obter-se através dela óleos, temperos e condimentos utilizados na confeção de alimentos (Drausal e Rapoport, 2001; FAO, 1992; Leal *et al.*, 2018).

As plantas silvestres comestíveis fazem parte de um património cultural e genético de diferentes regiões do mundo (Pinela *et al.*, 2017). Surgiram da necessidade de encontrar novos alimentos em situações de escassez alimentar, devido ao seu valor nutricional, tendo tido assim um importante papel na complementação da alimentação básica. Deste modo, foram muito importantes no fornecimento de vitaminas, minerais e oligoelementos, contribuindo assim para uma dieta equilibrada (Pinela *et al.*, 2017; Romojaro *et al.*, 2013). Atualmente, tem-se verificado um aumento no interesse destas espécies, não só devido ao seu perfil nutricional, mas também como forma de diversificar os hábitos alimentares, contribuir para um aumento nos recursos disponíveis e também promover a sustentabilidade ecológica (Romojaro *et al.*, 2013). A conservação da biodiversidade, a utilização de forma sustentável dos recursos e a distribuição equitativa destes recursos devem ser questões prioritárias para a humanidade, tal como é defendido na convenção sobre a diversidade biológica em conjunto com o tratado internacional sobre os recursos fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura, da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (Romano *et al.*, 2015).

Apesar das plantas comestíveis serem alimentos vantajosos, é de salientar que o seu consumo deve ser feito de forma controlada e segura devido às substâncias tóxicas que podem conter (Pinela *et al.*, 2017). Torna-se, desta forma, de máxima importância, a investigação, a produção e a comercialização destes frutos de forma segura, bem como, a disponibilização de informação às populações acerca dos mesmos.

A espécie *Corema album* é um pequeno arbusto, geralmente encontrado ao longo da costa da Península Ibérica, sendo considerada uma planta silvestre comestível (Bicho, 2015). A parte comestível desta espécie é o seu fruto, a camarinha. Este fruto apresenta-se sob a forma de uma baga redonda, pequena, branca e carnuda (Oliveira e Dale, 2012). Devido ao seu valor nutricional, à sua cor distinta e à sua sustentabilidade, tem potencial para ser produzido e introduzido no mercado dos pequenos frutos. Com o passar dos anos, tem perdido muita notoriedade e o seu consumo é, por conseguinte, cada vez menor. É um recurso nacional e com alguma disponibilidade, pelo que se encontra subestimado.



## Objetivos de investigação

### Objetivo Geral:

Este trabalho de investigação teve como objetivo estudar o potencial de incorporação do fruto de *Corema album* em novos produtos alimentares com recurso à caracterização físico-química, capacidade antioxidante, atividade antibacteriana e viabilidade celular das células CACO-2.

### Objetivos Específicos:

- Caracterizar a camarinha (*Corema album*) da região dunar e do pinhal através de análises físicas e químicas;
- Avaliar a capacidade antioxidante pelo método de ABTS e o teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Caracterizar a camarinha relativamente à sua composição mineral com recurso à técnica de  $\mu$ -fluorescência de raios-X;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato de camarinha em cinco estirpes de bactérias, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.
- Estudar a viabilidade celular das células CACO-2 na presença de extrato de camarinha, através do ensaio MTT;
- Desenvolver um produto alimentar com incorporação de camarinha e realizar testes sensoriais de consumidores;



---

# 1 - Enquadramento Teórico

---

## Capítulo 1 - Enquadramento Teórico

### 1.1 - Caracterização da espécie *Corema album*

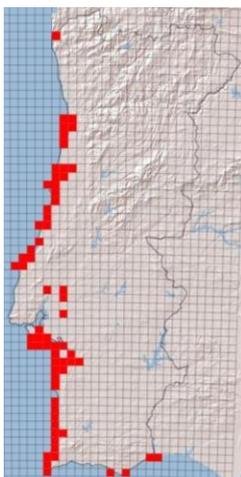
*Corema album* (L.) D. Don também designada como camarinheira é um pequeno arbusto selvagem, perene e pertencente à família Ericaceae. Esta espécie desenvolve-se maioritariamente nos sistemas dunares, nas arribas de constituição rochosa e também em pinhais que se encontrem próximos destes sistemas dunares (Oliveira e Dale, 2012; Alvarez-Cansino *et al.*, 2010).

#### 1.1.1 - Taxonomia

Ericales é uma ordem de plantas angiospérmicas, pertencente à classe Magnoliopsida. Segundo a APG (Grupo de Filogenia das Angiospérmicas) esta ordem contém 25 famílias, 346 géneros e 11 515 espécies (Stevens, 2017). Uma das famílias contida nesta ordem é a Ericaceae que contém o género *Corema*. A espécie *Corema conradii* (Torr.) Torr. Ex Loud e *Corema album* D. Don. são as espécies que constituem o género *Corema*. A espécie *Corema album*, contém 26 cromossomas e inclui duas subespécies a *C.album azoricum* Pinto da Silva, nativa dos Açores e a outra subespécie designada *C.album ssp album* existente nos restantes locais sendo esta maioritária (Andrade *et al.*, 2017; Calviño-Cancela, 2002; Oliveira e Dale, 2012; Tutin *et al.*, 1972).

#### 1.1.2 - Distribuição geográfica

Ambas as espécies pertencentes ao género *Corema* D. Don são endémicas verificando-se a sua distribuição geográfica em ambos os lados do oceano atlântico. A espécie *Corema conradii* desenvolve-se no Norte da América, enquanto que a espécie *Corema album* é possível encontrar ao longo da costa sudoeste da Europa, na Península Ibérica, desde o norte da Galiza até ao sul de Gibraltar (Figura 1.1). 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).



**Figura 1.1** - Mapa representativo da distribuição geográfica da espécie *Corema album* em Portugal Continental (Araújo *et al.* 2018).

### 1.1.3 - Morfologia

A espécie *Corema album* é um arbusto formado por diversos ramos que procedem de um caule comum, com comprimento geralmente compreendido entre 30 e 75 cm (Figura 1.2) (Oliveira e Dale, 2012; Tutin *et al.*, 1972). A espécie é geralmente descrita como sendo dioica, contudo já foram reportadas espécies hermafroditas em Asperillo (sudoeste da Espanha) e em Vila Real de Santo António (Sul de Portugal). Foi realizado um estudo ao longo de toda a área de distribuição natural desta espécie, sendo que apenas nos dois locais acima referidos foram encontradas espécies hermafroditas. A população localizada em Asperillo apresentou uma proporção de indivíduos hermafroditas maior (1-4%) comparativamente com a percentagem encontrada em Vila Real de Santo António (<2%) (Zunzunegui *et al.*, 2006).

A planta masculina é mais vertical uma vez que os seus ramos são mais eretos, comparativamente com as plantas femininas que apresentam 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. Possui folhas de dimensões reduzidas, com comprimento compreendido entre 6 e 10 mm e largura de 1 mm (Tutin *et al.*, 1972).

As flores são actinomorfas e possuem dimensões reduzidas (Oliveira e Dale, 2012). 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. O aparecimento do fruto verifica-se no verão ou no início do outono, entre os meses de julho e outubro. Este é um período que corresponde a temperaturas elevadas, radiação intensa e ausência de chuva, particularmente nas dunas, áreas com baixo sombreamento (Andrade *et al.*, 2015; Diaz-Barradas *et al.*, 2016).



Figura 1.2 - Fotografia da Espécie *Corema album*.

### 1.1.4 - Propagação

Para que seja possível o desenvolvimento deste arbusto é necessário um conjunto de fatores. O solo deve ser constituído por, pelo menos, 70% de componente arenosa e no máximo, conter 30% de argila, pode ainda conter matéria orgânica até 2,6% e o pH deve ser compreendido entre 5,6 e 7,8. (Marques, 2007; Oliveira e Dale, 2012).

Esta espécie possui uma polinização do tipo anemófila, significando assim, que depende do vento para fazer a dispersão do seu pólen (Gutián *et al.*, 1997). Relativamente à dispersão das sementes é do tipo zoocoria, o que significa que depende dos animais. Relativamente a alguns trabalhos que têm sido realizados para demonstrar o papel que alguns animais têm na propagação da espécie, concluiu-se que estes são essenciais para a perpetuação da espécie. As gaivotas, os melros e os coelhos são os principais intermediários na propagação da espécie, principalmente pela sua capacidade de transportar as sementes. A cor da camarinha, maioritariamente branca e muito brilhante, é uma característica muito peculiar desta fruta. O facto de a cor da camarinha ser adjuvante na propagação da espécie, confere-lhe o estatuto ecológico. No Verão as zonas dunares são muito propícias ao aparecimento de nevoeiro, que coincide com a altura do amadurecimento. Estas condições favorecem o seu contraste e aumentam a sua visibilidade, o que conseqüentemente aumenta a atenção dos animais, favorecendo assim a dispersão da semente. Estes fatores contribuem para a perpetuação da espécie (Diaz-Barradas *et al.*, 2016)

### 1.1.5 - Fatores que representam ameaças à propagação

As zonas dunares, onde se desenvolve esta espécie, são ecossistemas que têm sofrido um grande impacto humano nos últimos anos o que tem provocado a degradação destes locais e conseqüentemente a fragmentação e diminuição da espécie (Clavijo, *et al.*, 2002). O impacto humano tem-se verificado principalmente devido à urbanização das zonas costeiras e ao aumento do turismo nas zonas dunares. Outro fator que também tem demonstrado ser uma ameaça à espécie é a alteração de vegetação nos ecossistemas e a presença de algumas espécies invasoras, nomeadamente a espécie *Acacia sp* (Calviño-Cancela, 2005; Marchante *et al.*, 2003). Um estudo realizado na Universidade de Sevilha, cujo um dos objetivos era a identificação e caracterização das populações deste fruto ao longo de toda a sua área de distribuição, concluiu que, só existiam duas zonas com populações extensas da espécie *Corema album*, que contêm indivíduos de todas as classes de idades, uma localiza-se entre a Nazaré e Ovar, Portugal e a outra está situada na costa de Huelva (Espanha), no Parque Nacional Doñana. Este estudo refere ainda, outra população importante localizada na península de Tróia, Portugal. As restantes populações, encontram-se limitadas a zonas de areia sobre arribas ou encontram-se fragmentadas constituídas essencialmente por indivíduos velhos. Para que seja possível reverter esta situação, de diminuição da espécie, é necessário adquirir medidas de proteção, bem como assegurar a regeneração de habitat (Clavijo *et al.*, 2002).

A perturbação causada pelo Homem pode também ser responsável por uma redução significativa, nas zonas dunares, dos animais que são intermediários na propagação da espécie, comprometendo assim a propagação da mesma. A presença humana pode ter um impacto altamente negativo na regeneração natural da espécie, uma vez que, o verão coincide com a época de dispersão de sementes da espécie *Corema album* (Calviño-Cancela, 2005). Desta forma, locais mais movimentados são conseqüentemente menos frequentados por estes animais, o que torna a regeneração natural da espécie muito difícil. É de máxima importância a existência de zonas protegidas, permitindo assim uma regeneração natural da espécie (Clavijo *et al.*, 2002).

Contudo e apesar do supracitado a camarinheira não está catalogada como espécie em vias de extinção (Oliveira e Dale, 2012).

## 1.2 - Avaliação do potencial do fruto, camarinha, proveniente da espécie *Corema album*

### 1.2.1 - Caracterização física do fruto

O fruto proveniente deste arbusto é uma pequena baga esférica, que apresenta uma epiderme uniforme e consistente, com um diâmetro compreendido entre 5 e 8 mm e que apresenta 2-4 sementes, sendo o mais comum 3 sementes (Figura 1.3) (Andrade *et al.*, 2017; León-González *et al.*, 2013; Oliveira e Dale, 2012). As sementes apresentam um endocarpo espesso e lenhoso (Calvino-Cancela, 2002). A cor da baga é maioritariamente branca, contudo existem algumas bagas que podem apresentar uma tonalidade rosa ou até mesmo translúcidas. Na fase translúcida é possível observar as sementes no interior do fruto, através da zona exterior da epiderme da baga (Oliveira e Dale, 2012).



Figura 1.3 - Fotografia do fruto da espécie *Corema album*.

### 1.2.2 - Caracterização química do fruto

#### 1.2.2.1 - Antioxidantes e compostos fenólicos

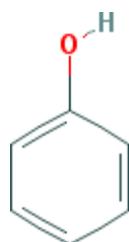
Um antioxidante é uma substância que quando se encontra presente em pequenas concentrações, comparativamente àquelas de um substrato oxidável, atrasa ou previne significativamente a oxidação do substrato (Brenna *et al.*, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1995).

Para um funcionamento normal do organismo é necessário assegurar um equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas). Um aumento de radicais livres no organismo, conduz a uma situação de stress oxidativo que consequentemente pode induzir danos lipídicos celulares, nas proteínas e até mesmo no DNA (Ferreira e Abreu, 2007; Fu *et al.*, 1998; Valko *et al.*, 2007). Com o avanço da investigação, tem sido possível perceber que o consumo de antioxidantes pode ter efeitos protetores em muitas doenças, nomeadamente doenças cardiovasculares e cancerígenas. O envelhecimento celular é também um processo que está relacionado com o stress oxidativo (Brenna *et al.*, 2001). Em organismos aeróbios faz parte do normal funcionamento das células a produção continuada de radicais livres, principalmente de espécies reativas de oxigénio (ROS). O organismo possui assim, mecanismos endógenos de proteção que levam

à eliminação destas espécies. Para além destes mecanismos do próprio organismo existem alguns antioxidantes naturais, nomeadamente os fitoquímicos, que podemos adquirir através de uma dieta e que podem auxiliar o sistema de proteção endógeno reduzindo assim os danos oxidativos. Estes fitoquímicos estão descritos como compostos bioativos provenientes de diferentes partes das plantas (Ferreira e Abreu, 2007; Lachance *et al.*, 2001). O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos, tais como frutas e vegetais, tem sido associado à prevenção de algumas doenças tais como cardiovasculares e cancro (Scalbert, *et al.*, 2005).

Uma definição mais recente de compostos fenólicos indica que se tratam de compostos que possuem um ciclo ou ciclos aromáticos, que não são azotados e que provêm principalmente do metabolismo do ácido siquímico e/ou de um poliacetato. Os ácidos fenólicos, os compostos cumarínicos, os flavonóides, os taninos e os compostos quinónicos, são alguns dos compostos fenólicos que se destacam pela sua atividade farmacológica (Cunha, 2014).

Deste modo, os compostos fenólicos são dos antioxidantes mais estudados devido às suas propriedades farmacológicas (Balasundram, 2006). O interesse nestes compostos tem aumentado devido aos seus efeitos biológicos, nomeadamente, à sua contribuição na eliminação de radicais livres, ao seu efeito como quelante de metais, à modulação da atividade enzimática, à inibição da proliferação celular e à alteração das vias de transdução de sinal (León-gonzález *et al.*, 2012; Scalbert *et al.*, 2005). Contudo, é de realçar que alguns estudos sugerem que o consumo de elevadas concentrações de compostos fenólicos pode traduzir-se em efeitos cancerígenos, tóxicos e ainda apresentar interações com alguns fármacos (Balasundram, 2006; Mennen *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos são produtos provenientes do metabolismo secundário das plantas. Os produtos provenientes do metabolismo secundário não possuem uma distribuição equitativa em todas as plantas, pois eles são produzidos como forma de adaptação ao meio envolvente. (Pereira e Cardoso, 2012). Assim, não é possível obter uma quantificação exata dos compostos fenólicos presentes numa determinada planta. O modo como todo o processo de quantificação é executado influencia também os resultados, designadamente o método utilizado na extração e na quantificação, o armazenamento da amostra e a parte da planta utilizada para análise (King, 1993).



**Figura 1.4** - Representação da estrutura molecular do composto fenol (Pubchem 2018).

O fruto camarinha apresenta na sua constituição compostos fenólicos, tal como se assemelha aos restantes pequenos frutos com a morfologia semelhante. Todavia o teor de compostos fenólicos totais deste fruto não é tão elevado, comparativamente a outras bagas da família Ericaceae, Rosaceae e Grossulariaceae, caso dos mirtilos, morangos e groselhas, respetivamente (León-González *et al.*, 2013; Maatta-Riihinen *et al.*, 2004; Wang e Zuo, 2011). A grande maioria das bagas apresenta cor devido à elevada quantidade de antocianinas que representa uma elevada proporção dos compostos fenólicos totais. Deste modo, sendo a camarinha de cor branca contém um baixo teor deste composto. Para além do supracitado, a camarinha é também um fruto que apresenta um elevado teor de água e uma grande proporção de sementes, o que podem também ser razões explicativas de um teor mais baixo destes compostos.

Um estudo realizado em Espanha, na universidade de Sevilha, permitiu identificar os principais compostos fenólicos da espécie *Corema album*. Nas análises realizadas, recorrendo a cromatografia líquida acoplada à Espectroscopia de massa e detetor UV-VIS foi possível identificar no total 11 compostos fenólicos resultando numa quantificação total de compostos fenólicos de  $1214,4 \pm 122,7$  mg equivalentes em ácido gálico (GAE)/kg de fruto fresco ou  $7318,6 \pm 739,6$  mg GAE/kg fruto seco. Dos compostos identificados, os ácidos fenólicos, são os compostos que se encontram em maior proporção ( $2268,1 \pm 229,9$  mg/kg peso seco de fruto), o que justifica o sabor ácido do fruto. Deste modo, foram identificados os seguintes ácidos fenólicos: clorogénico, neoclorogénico, para-hidroxibenzoico, ferúlico, para-cumárico e caféico, sendo que aquele que se encontra em maior quantidade é o ácido clorogénico ( $1857,6 \pm 180,3$  mg/kg peso seco de fruto). Na categoria dos flavonóides foi possível detetar a presença de flavonóis ( $638,3 \pm 80,1$  mg/kg peso seco de fruto) e uma baixa quantidade de antocianinas ( $19,6 \pm 2,4$  mg/kg peso seco de fruto) (León-González *et al.*, 2013). Todos os ácidos presentes no fruto, acima referidos, são ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico. Tradicionalmente, plantas que contenham estes ácidos são utilizadas como coleréticas e hipocolesterolemiantes. Mais recentemente, estes compostos têm sido cada vez mais estudados devido à sua atividade antioxidante e anti-radicalar (Cunha, 2014). O ácido clorogénico (Figura 1.5) é um composto de elevada importância na dieta humana. Um dos metabolitos mais importantes do ácido clorogénico é o ácido caféico, sendo que a hidrólise de ácido clorogénico em caféico ocorre no intestino delgado (Sato *et al.*, 2011). Devido à atividade antioxidante do ácido clorogénico, este tem capacidade de sequestrar os radicais livres, tornando-se assim um composto protetor em diversas patologias (Granado-Serrano *et al.*, 2007). Este composto apresenta uma forte atividade de citotoxicidade em algumas linhas celulares e ainda uma atividade antiproliferativa (Khalifa *et al.*, 2018). Estudos realizados com o intuito de estudar possíveis efeitos benéficos na saúde humana, devido à presença de ácido clorogénico e caféico (Figura 1.6), demonstraram que estes têm a capacidade de inibir a oxidação de LDL, podendo assim ter efeito protetor relativamente às doenças cardiovasculares (Olthof *et al.*, 2018). Estes ácidos apresentam ainda um grande potencial para investigação de efeitos promissores para a saúde humana (Khalifa *et al.*, 2018).

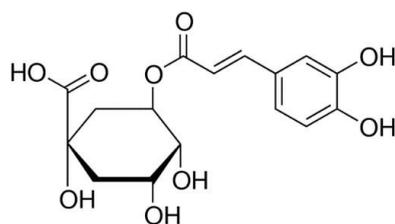


Figura 1.5 - Estrutura molecular do composto ácido clorogénico (sigma-aldrich , 2018b).

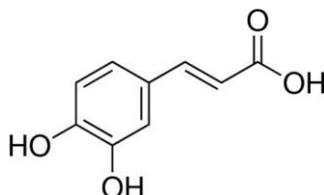


Figura 1.6 - Estrutura molecular do composto ácido caféico (sigma-aldrich , 2018a).

### 1.2.2.2 - Triterpenóides

Os triterpenóides são metabolitos de oligómeros de pirofosfato de isopentenilo. Encontram-se distribuídos pelo reino vegetal, na forma de triterpenóides livres, glicósidos de triterpenóides, fitoesteróis e/ou dos seus precursores. Deste modo, estes representam o maior grupo de compostos fitoquímicos, estimando-se que existam na natureza mais de 20.000 triterpenóides diferentes (Conceição, 2016; Yadav *et al.*, 2010).

O ácido oleanólico e o ácido ursólico são frequentemente encontrados em vários frutos do tipo baga, principalmente pertencentes à ordem Ericaceae. Desta forma, também estão presentes na constituição da cera epicuticular que envolve a camarinha e que confere ao fruto a proteção contra a radiação UV e visível em simultâneo (Diaz-Barradas *et al.*, 2016). Ambos os ácidos estão referidos como benéficos para a saúde Humana.

Os benefícios do ácido ursólico são descritos como tendo efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes e é ainda referido o seu potencial como cardioprotetor (Shishodia *et al.*, 2003; Liobikas *et al.*, 2011)

Relativamente ao ácido oleanólico são lhe conhecidas funções antibacteriana, antiparasitária, antihipertensora, diurética, antidiabética, anti-inflamatória, gastroprotectora, hepatoprotectora, anti-HIV, antihiperlipidémica e a capacidade de inibir a via do complemento (Bednarczyk-Cwynar *et al.*, 2016; Conceição, 2016; Parikh *et al.*, 2014; Pollier e Goossens, 2012)

### 1.2.3 - Atividade antibacteriana

Atualmente, uma das maiores ameaças à saúde global e segurança alimentar é a resistência aos antibióticos. Internamentos mais longos, custos médicos mais elevados e aumento da mortalidade são algumas das consequências desta problemática. O aparecimento de novos mecanismos de resistência

ameaça, cada vez mais, a prevenção eficaz e o tratamento de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. A falta de antibióticos e de outros agentes antimicrobianos eficazes compromete o sucesso de muitos tratamentos tais como cirurgias e quimioterapia. O presente problema de saúde pública está a complicar a luta de algumas doenças, designadamente HIV e malária (WHO, 2018). Desde a antiguidade, é conhecido o potencial das plantas no tratamento de doenças, nomeadamente o seu efeito antimicrobiano. Hoje em dia sabemos que esse potencial é devido a compostos produzidos pelo próprio metabolismo vegetal (Cowan, 1999). Nos últimos anos tem-se realizado vários estudos com o intuito de comprovar a eficácia do efeito antimicrobiano destes compostos (Nascimento *et al.*, 2000). A investigação neste campo tem levado à descoberta de muitos compostos com atividade antimicrobiana. A introdução destes compostos na terapêutica é feita criteriosamente com base nos efeitos de cada composto em determinadas células e em diferentes doses, sendo que o mesmo composto pode apresentar toxicidade, ou não, dependente das condições escolhidas. Os que têm sido introduzidos na terapêutica são suficientes para considerar que o seu uso no tratamento das doenças infecciosas, provocadas por bactérias e agentes criptogâmicos, tem sido um grande contributo no avanço da terapêutica e do problema de saúde pública acima referido (Cunha, 2014)

#### **1.2.4 - Avaliação do efeito benéfico para a saúde**

Antigamente, este fruto era conhecido não só como alimento, mas também pela sua eficácia como antipirético e pela sua ajuda no combate aos parasitas intestinais, tais como lombrigas (Gonzalez, 2001; Oliveira e Dale, 2012).

Atualmente, assistimos cada vez mais a um aumento do interesse nos efeitos protetores que alguns compostos naturais presentes nos alimentos podem ter no stress oxidativo, bem como os mecanismos de defesa associados. A camarinha possui propriedades medicinais, comprovadas por diversos estudos, em doenças que tenham como causa ou como contributo o stress oxidativo, devido ao seu perfil de compostos fenólicos (León-gonzález *et al.*, 2012). Um estudo realizado com extratos de fruto maduro obteve resultados que suportam o uso desta planta como planta medicinal, devido ao efeito quimioprotetor dos seus compostos fenólicos, nomeadamente como hepatoprotetor, sugerindo assim a inclusão deste fruto na alimentação como preventivo nas doenças associadas ao stress oxidativo (León-González *et al.*, 2012).

Na presente investigação irá ser abordado o fruto da espécie, contudo estudos anteriores indicam que a folha da espécie *Corema album*, apresenta também um potencial que deve ser estudado. Um estudo realizado a uma fração de polifenóis, provenientes da folha da espécie *Corema album*, demonstrou que estes têm um efeito neuroprotetor no desenvolvimento da doença de Parkinson. Os resultados obtidos neste estudo tornam-se assim promissores em futuras investigações que poderão decorrer com o intuito de desenvolver novos fármacos para esta doença (Macedo, 2015). Foram também testados os polifenóis provenientes da folha da mesma planta, num outro estudo, com o intuito de verificar se alguns destes extratos continham atividade anticancerígena, tendo-se observado que os extratos apresentavam atividade anti proliferativa, devido à presença do composto Dihidrochalcona (DHC), que tem a capacidade de bloquear o ciclo celular (Sánchez-Pico, *et al.*, 2014).

Tal como acima referido, o interesse demonstrado pelo valor nutricional da camarinha, bem como o benefício que esta acarreta para a saúde, tem sido crescente ao longo dos anos. Diversos estudos têm demonstrado as suas propriedades antioxidantes, a sua composição em compostos fenólicos e o benefício que advém destes no tratamento e prevenção de algumas patologias. Contudo, a quantificação total destes compostos não é suficiente, uma vez que é imprescindível a execução de estudos que demonstrem a biodisponibilidade e bioacessibilidade dos mesmos, sendo que é possível a ocorrência de perdas ao longo do processo de digestão. Do ponto de vista nutricional, a biodisponibilidade, corresponde à proporção de um determinado nutriente ou alimento, que fica efetivamente disponível para o organismo utilizar, após a ingestão do mesmo (Benito e Miller, 1998). A biodisponibilidade torna-se assim um conceito fundamental para uma nutrição eficiente, uma vez que, o que é realmente relevante é a quantidade de alimento disponível após a ingestão, digestão e absorção, representando assim a quantidade disponível para armazenamento ou para exercer funções metabólicas (Fernández-García *et al.*, 2009; Parada e Aguilera, 2007).

A bioacessibilidade é definida como a proporção de alimento que é libertado a partir da sua matriz alimentar, no trato gastrointestinal, para absorção no intestino (Benito e Miler, 1998; Parada e Aguilera, 2007). Foi realizada uma investigação que demonstrou a bioacessibilidade dos compostos fenólicos da camarinha, através do estudo da digestão *in vitro*. Deste modo foram estudadas amostras da polpa da fruta e das sementes, liofilizadas e trituradas. O estudo concluiu que após a digestão apenas 13-20% dos compostos fenólicos se encontram disponíveis para absorção no intestino delgado, nas amostras da polpa do fruto. Relativamente às sementes, a percentagem disponível para absorção após o processo digestivo é ligeiramente maior, 22-36% (Andrade *et al.*, 2017).

### **1.3 - Inovação alimentar - viabilidade da introdução de camarinha na dieta**

#### **1.3.1 - A necessidade de desenvolver novos produtos alimentares**

Atualmente o mundo é excessivamente dependente de algumas espécies vegetais. É necessário incentivar à diversificação de hábitos de produção e de consumo, principalmente pelas espécies que hoje em dia se encontram subvalorizadas, de forma a contribuir para uma nutrição eficiente, uma sustentabilidade ecológica e ainda, assegurar a existência de meios de subsistência (Leonti, 2012; Romojaro *et al.*, 2013).

A disponibilização e a divulgação de informação relativamente à relação entre a alimentação e a saúde têm aumentado ao longo dos anos. Deste modo, tem surgindo uma consciencialização por parte da população acerca dos seus hábitos alimentares, aumentando assim o grau de exigência nos alimentos desenvolvidos (Barrena *et al.*, 2015; Sajdakowska *et al.*, 2018). Denota-se por parte da população uma maior preocupação com a higiene e segurança alimentar, com a qualidade de vida e com os benefícios para a saúde que advém dos alimentos (Barrena *et al.*, 2014; Sajdakowska *et al.*, 2018; Sehgal, 2018). A obtenção de compostos bioativos, que revelam efeito benéfico para a saúde, através da alimentação, tem tido uma crescente atenção por parte da população, na última década. O desenvolvimento dos métodos de produção e conseqüentemente o aumento do grau de processamento nos alimentos, tem sido alvo de preocupação por parte das populações (Sehgal, 2018).

A indústria alimentar enfrenta agora grandes desafios, na produção de alimentos menos processados e mais saudáveis. Pelos motivos supramencionados os consumidores procuram cada vez mais produtos artesanais e orgânicos (Sehgal, 2018). O aumento da exigência por parte do consumidor, impulsiona e torna inevitável a inovação alimentar (Maina, 2018; Sajdakowska *et al.*, 2018).

O sucesso dos novos produtos desenvolvidos é altamente dependente da aceitação do consumidor, por este motivo torna-se de máxima importância a inclusão do consumidor no processo de desenvolvimento do produto, contribuindo assim para o sucesso do setor alimentar. A análise sensorial é a ferramenta mais utilizada para tornar todo este processo viável e tem como objetivo avaliar a opinião do consumidor, tendo em conta as características perceptíveis através do sentido da visão, do olfato, do tato, do paladar e da audição, avaliando assim parâmetros como a aparência, o odor, o sabor e a textura (Guiné *et al.*, 2010; Sehgal, 2018).

### **1.3.2 - Introdução de plantas silvestres comestíveis na dieta**

O consumo de plantas silvestres comestíveis encontra-se associado a fatores socioculturais e ambientais. A riqueza da flora comestível selvagem, bem como as condições climáticas são alguns dos fatores que contribuem para o consumo, ou não, destas espécies. A forma individual de vivenciar a vida irá determinar e muito este consumo, através dos valores culturais, do paladar individual e do contacto que a pessoa mantém com a natureza. A divulgação de informação acerca destas espécies e as tendências alimentares que vão surgindo estão muito presentes nas populações, o que influencia também as suas escolhas. As plantas silvestres comestíveis foram desvalorizadas durante muito tempo devido ao estigma da associação do seu consumo às populações mais desfavorecidas. Contudo, denota-se uma mudança na mentalidade das pessoas, o que já se reflete no aumento de notoriedade de alguns frutos silvestres (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007) .

Nos meios urbanos as populações devido ao ritmo de vida acelerado que têm, procuram refeições já cozinhadas ou que sejam fáceis de confeccionar. O cansaço devido à repetição dos mesmos pratos e à rotina na forma de confeção, estimulam a procura de novos ingredientes com diferentes sabores, texturas e cores (Mlcek e Rop, 2011; Romojaro *et al.*, 2013). Torna-se assim necessário privilegiar a inovação alimentar garantindo a satisfação do consumidor.

A incorporação de plantas silvestres comestíveis na gastronomia pode responder a algumas das necessidades das populações. Atualmente, já se verifica a introdução de algumas destas espécies em gastronomia regional e *gourmet*, o que tem impulsionado o conhecimento e a criatividade (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007) Estas espécies podem também constituir uma alternativa aos aditivos alimentares sintéticos, sendo uma boa resposta para as indústrias agroalimentares e para a gastronomia, conseguindo assim satisfazer os consumidores e ter em conta as suas preocupações (Leonti, 2012; Romojaro *et al.*, 2013).

### 1.3.3 - Camarinha como alimento

A camarinha, tal como já foi referido anteriormente, é um fruto silvestre comestível (Bicho, 2015), contudo, ainda têm pouca notoriedade como alimento.

O uso da camarinha na Península Ibérica, como alimento, remonta ao tempo da ocupação islâmica (Bugalhão e Queiroz 2005; Oliveira e Dale, 2012). Por se tratar de uma planta espontânea e de fácil acessibilidade era consumida pelas populações, da orla costeira, mais desfavorecidas. A par disso, também era comercializada nos mercados da Galiza, Portugal e Andaluzia, constituindo assim, uma fonte de rendimento. Antigamente era consumida de forma fresca ou em preparados culinários, como em limonadas, licores e compotas, devido ao sabor ligeiramente ácido que apresenta (Álvarez-Cansino *et al.*, 2010; León-González *et al.*, 2013). A partir de meados do século XX, era vendida nas praias aos veraneantes, pelas populações locais, aumentando assim o seu consumo e a sua popularidade. Nos nossos dias, as pessoas nativas dos locais onde as camarinhas crescem ainda as colhem diretamente do arbusto para consumo próprio (Andrade *et al.*, 2017). Contudo, com as perdas de ecossistemas a que temos vindo a assistir e as alterações socioeconómicas que se observam, o consumo da camarinha encontra-se cada vez mais em decréscimo (León-González *et al.*, 2013).

A camarinha caracteriza-se por um agradável e revitalizante sabor ácido e fresco, o que torna o seu paladar tão peculiar (León-González *et al.*, 2013). Estas características aliadas à cor podem apresentar um grande potencial na gastronomia e no desenvolvimento de novos produtos.

Relativamente à sua constituição, tal como a maioria dos pequenos frutos, é comumente caracterizada pelo seu elevado teor de humidade, açúcar e fibra. Deste modo, foi realizado um estudo de forma a quantificar estes parâmetros no fruto da espécie *Corema album*. Os resultados relativamente ao teor de açúcar e de fibra foram expressos em % de matéria seca, com os valores de 36,52 e 62,80 respetivamente. Foram ainda quantificados os açúcares redutores (41,24). Para além destes resultados foi também determinada a % de sólidos solúveis (6,20) e a acidez (10,7 g/100, g de ácido cítrico)(Andrade *et al.*, 2015)

## 1.4 - Avaliação da potencial produção de camarinha

Hoje, assistimos à introdução de alimentos que anteriormente não eram muito consumidos e cujo potencial era desconhecido. Desta forma, o investimento na investigação e na descoberta do potencial de novas frutas tem sido cada vez maior, enriquecendo diariamente a alimentação com novas texturas e sabores. Apesar da camarinha ser conhecida como alimento há muitos anos, é pouco explorada e investigada. Pelas razões anteriormente referidas, tem-se verificado nos últimos anos um aumento do interesse na comercialização e produção deste fruto (Oliveira e Dale, 2012). Tendo em consideração as características organoléticas, nutricionais e físicas que apresenta, a camarinha patenteia um grande potencial para ser introduzida no mercado dos pequenos frutos. A cultura dos pequenos frutos (morango, framboesa, mirtilo, amora e groselha) tem hoje uma expressão importante em Portugal. Devido à sua dimensão, Portugal não poderá ser um importante competidor em volumes de produção comparativamente com outros países europeus, no entanto, pode ter um lugar no mercado com produções de elevada qualidade (Rederural, 2014). As camarinhas, tal como outras espécies

endêmicas, ainda não se encontram exploradas e podem constituir novas oportunidades e criar oportunidades em alguns nichos de mercado. Torna-se assim pertinente a investigação, produção e comercialização da camarinha de forma a atingir um maior reconhecimento do fruto e um maior aproveitamento dos recursos nacionais. Atualmente, o seu crescimento é praticamente selvagem e por esta razão ainda não existe aplicação industrial para esta fruta (Andrade *et al.*, 2017).

A camarinha possui algumas características que podem impulsionar o seu reconhecimento no mercado dos pequenos frutos, especialmente a cor e o seu prazo de validade.

A cor é uma característica peculiar que pode ser muito importante em alguns nichos de mercado. São conhecidos poucos frutos que se apresentam sob a forma de baga branca. A groselha branca é o único fruto conhecido, que é comercializado e que é branco. A groselha (*Ribes rubrum* L.) é tradicionalmente conhecida por ser vermelha, contudo, a groselha branca é desta cor por conter um alelo que impede a produção de antocianina no fruto, que é cultivado no norte da Europa. Existem outros frutos brancos, como a forma branca do morango chileno (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.) que é vendido apenas em mercados locais do Chile (Hancock, 1999) (Oliveira e Dale, 2012). Na Ucrânia, foram também encontrados mirtilos selvagens (*Vaccinium myrtillus* L.) de cor branca (Konovalchuk, 2009). A espécie *Flueggea virosa*, é também uma baga branca comestível, que é nativa de África, Indonésia e Austrália. Existe também o género *Symphoricarpos*, contudo é considerada venenosa (Oliveira e Dale, 2012; Tutin *et al.*, 1972).

Para além da cor, outra vantagem que o fruto apresenta é a robustez da sua epiderme, tornando assim possível uma colheita manual ou mecânica. A durabilidade desta fruta, pode também ser um ponto positivo para a sua posterior comercialização. Um estudo realizado a amostras recolhidas entre Sines e Aveiro, identificou diferentes genótipos desta espécie. Este estudo demonstrou que dois dos genótipos identificados, após 5 meses da sua recolha, a uma temperatura de 4°C ainda se encontravam preservados (Oliveira e Dale, 2012).

De forma a estudar a viabilidade da produção do fruto, alguns estudos têm sido realizados relativamente à germinação artificial. Os resultados têm demonstrado que a taxa de germinação artificial da espécie é baixa. Desta forma, têm sido realizadas algumas investigações cujo objetivo é estudar e otimizar a germinação, tornando assim possível e rentável a sua produção. Um estudo realizado na estação biológica de Doñana, demonstrou que a produção desta espécie de forma não selvagem tem uma germinação baixa, 6,7% (96 de 1440) (Fedriani e Delibes, 2009). Um outro estudo realizado no INIAV obteve resultados que sugerem que o sucesso na germinação de sementes de *C. album* está mais dependente do genótipo do que da localização da mesma. Concluem ainda que esta espécie apresenta um crescimento lento, sendo que o valor médio de crescimento de todos os genótipos em estudo foi de 12 cm no primeiro ano, com um aumento do diâmetro do ramo principal de 0,49 cm/ano. Este estudo demonstrou ainda, que em condições de cultura, o período que apresentou maior taxa de crescimento foi entre abril e outubro (Oliveira *et al.*, 2016).

Relativamente ao cultivo, esta é uma espécie que precisa de locais com características muito específicas para que seja possível o seu crescimento. Sendo a camarinha uma planta que habita em

dunas com condições extremas de temperatura e de falta de água no período de verão, é de esperar que a germinação das suas sementes seja difícil (Oliveira *et al.*, 2016).

---

## **2 - Material e Métodos**

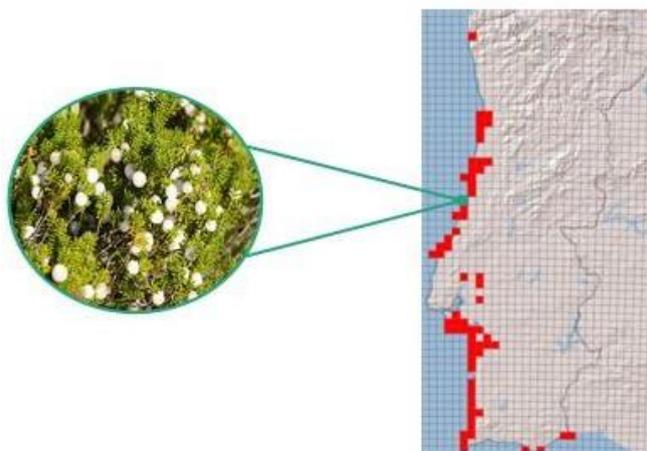
---

## Capítulo 2 - Material e Métodos

A espécie *Corema album* é um arbusto que se desenvolve maioritariamente nos sistemas dunares e nos pinhais adjacentes (Oliveira e Dale, 2012). Deste modo e considerando que as condições climáticas e o solo têm uma grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo muitas vezes determinante na sua composição físico-química, tornou-se pertinente avaliar também a existência de diferenças entre os frutos desenvolvidos no pinhal e nas dunas (Ramakrishna e Ravishankar, 2011). Assim sendo, as análises foram realizadas em ambas as amostras exceto a atividade antimicrobiana e o estudo de viabilidade celular. Estas últimas análises foram concretizadas com a mistura de ambas as amostras por não terem sido verificadas diferenças significativas para a maioria dos parâmetros analisados. Por se tratar de um fruto que não é comercializado e que é desconhecido por muita população, tornou-se pertinente utilizar um fruto comercial, a uva, sob as mesmas condições utilizadas na camarinha com o intuito de comparar resultados em algumas análises realizadas. A uva utilizada foi adquirida numa superfície comercial, sendo uma uva de baga branca proveniente do continente africano. O fruto escolhido foi a uva por se tratar de um fruto consumido em ampla escala, ser economicamente acessível e também por apresentar algumas semelhanças morfológicas com a camarinha. A determinação do pH, determinação dos sólidos solúveis e determinação do teor total de compostos fenólicos e capacidade antioxidante foram as análises em que a uva foi utilizada como comparação.

### 2.1 - Recolha e preparação de amostras

Para a realização deste trabalho foram recolhidas amostras de camarinhas nas dunas e no pinhal. As amostras foram recolhidas junto da praia do Vigão, Coimbra (Latitude: 39.89132 e Longitude: -8.964576), pertencente ao distrito de Leiria (Figura 2.1). As amostras das dunas foram colhidas mesmo junto à praia, enquanto as do pinhal foram colhidas no pinhal que se encontra adjacente à praia. A recolha decorreu entre o mês de julho e setembro de 2017. Após a colheita os frutos foram higienizados com água destilada e armazenados a uma temperatura de aproximadamente -16 ° C.



**Figura 2.1** - Mapa de Portugal Continental onde se encontra assinalado o local de recolha das amostras estudadas no presente estudo.

## 2.2 - Caracterização físico-química

### 2.2.1 - Determinação do peso médio

Para avaliar o peso médio do fruto (equação 1) foram selecionadas aleatoriamente 100 camarinhas, de forma a obter uma amostra heterogénea, sendo de seguida realizada a pesagem das mesmas em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AB204-S.

$$\text{Peso médio do fruto} = \frac{\sum \text{Peso do fruto}}{n}$$

Equação 1

#### Legenda:

n – Número de frutos que constituem a amostra, neste caso em particular n=100.

### 2.2.2 - Determinação da altura e do diâmetro médio

De forma a obter um valor médio do diâmetro (equação 2) e da altura média da baga (equação 3), procedeu-se à medição dos parâmetros referidos em 50 camarinhas, escolhidas aleatoriamente, com recurso a um micrómetro manual (Figura 2.2).

$$\text{Diâmetro médio do fruto} = \frac{\sum \text{Diâmetro do fruto}}{n}$$

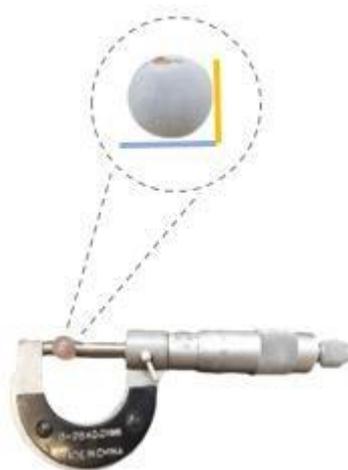
Equação 2

$$\text{Altura média do fruto} = \frac{\sum \text{Altura do fruto}}{n}$$

Equação 3

#### Legenda:

n – Número de frutos que constituem a amostra, neste caso em particular n=50



**Figura 2.2** - Representação demonstrativa da medição da altura da fruta, assinalado a amarelo e do diâmetro assinalado a azul, com recurso a um micrómetro manual.

Após calculados os valores do peso médio, altura e diâmetro, calculou-se o calibre (equação 4) e o volume médio do fruto (equação 5).

$$\text{Calibre} = \frac{\text{Altura do fruto} + \text{Diâmetro do fruto}}{2}$$

Equação 4 (Sonia Andrade *et al.*, 2015)

$$\text{Volume} = \pi \frac{4}{3} \text{Calibre}^3$$

Equação 5 (Sonia Andrade *et al.*, 2015)

### 2.2.3 - Determinação da parte edível

A parte edível de um alimento é expressa em percentagem e corresponde ao peso do produto que pode ser utilizado como alimento, deste modo, exclui-se tudo aquilo que não será ingerido. O valor da parte edível irá assim depender da forma como o alimento será consumido, do aproveitamento e dos hábitos e gostos alimentares de cada indivíduo. Deste modo, o valor calculado deve ser considerado como um valor indicativo, uma vez que na prática poderá haver variações dependendo dos fatores acima referidos (INSA, 2016).

Tendo em conta o supracitado, a parte edível do fruto, irá depender da forma como este será ingerido. Procedeu-se assim ao cálculo da parte edível do fruto, considerando o seu consumo em fresco e desidratado. Relativamente ao cálculo do fruto em fresco e desidratado descartaram-se apenas as sementes.

#### 2.2.3.1 - Determinação da parte edível do fruto desidratado

Desde sempre que a população se alimenta de frutos frescos, mais recentemente, temos vindo a observar uma grande apreciação da ingestão de frutas desidratadas em forma de *snack*. A desidratação é um dos métodos mais antigos de conservação de alimentos devido à estabilização da atividade microbiológica, à redução das reações químicas e enzimáticas e ainda à diminuição da atividade da água. Assim, torna-se um processo altamente vantajoso, principalmente para frutos sazonais uma vez

que permite a existência do fruto todo o ano e possibilita a diminuição de custos de transporte e de armazenamento (Ferreira e Candeias, 2005). Para o cálculo da percentagem da parte edível do fruto desidratado (equação 6 e 7) realizou-se a desidratação de 5 g de amostra em estufa Heraeus modelo D-6450 Hanau, a uma temperatura constante de 60°C, durante aproximadamente 72 horas. Após a secagem completa das amostras procedeu-se à remoção das sementes para posteriormente pesar. A remoção das sementes foi realizada manualmente com recurso a duas pinças.

$$\text{Peso Edível da Amostra} = \text{Peso da amostra desidratada} - \text{Peso das sementes desidratadas}$$

Equação 6

$$\% \text{edível do fruto desidratado} = \frac{\text{Peso Edível da Amostra} \times 100}{\text{Peso da amostra desidratada}}$$

Equação 7

### 2.2.3.2 - Determinação da parte edível do fruto fresco

Para a determinação da percentagem da parte edível no fruto fresco (equação 8 e 9), selecionou-se e pesou-se uma amostra constituída por 100 camarinhas. As sementes foram removidas de forma manual com recurso a duas pinças e procedeu-se à pesagem das mesmas.

$$\text{Peso Edível da Amostra} = \text{Peso da amostra fresca} - \text{Peso das sementes}$$

Equação 8

$$\% \text{edível do fruto fresco} = \frac{\text{Peso Edível da Amostra} \times 100}{\text{Peso da amostra fresca}}$$

Equação 9

### 2.2.4 - Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade foi realizada através da desidratação completa, de uma amostra constituída por 5 g de fruto, em estufa Heraeus modelo D-6450 Hanau à temperatura constante de 60°C durante aproximadamente 72 horas. Os resultados foram expressos em percentagem de teor de humidade (equação 10). A análise foi realizada em triplicado.

$$\text{Teor de Humidade} = \frac{\Delta \text{Peso} \times 100}{P_i}$$

Equação 10

### Legenda:

$\Delta$ Peso - Diferença entre o peso inicial da amostra e o peso da amostra após a secagem na estufa

Pi – Peso inicial da amostra

### 2.2.5 - Determinação do pH do sumo

O potencial hidrogeniónico (pH), corresponde a uma escala numérica (0-14 a 25°C), utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução («IUPAC», 2018).

A amostra de sumo de camarinha foi obtida por pressão manual mecânica, com recurso a almofariz com pilão, seguida de centrifugação em centrifugadora de bancada Heraeus modelo Labofuge 200, a uma velocidade de 4000 rpm durante 20 minutos. Após a centrifugação realizou-se uma filtração simples em papel de filtro qualitativo, com 90 mm de diâmetro. Após a obtenção do sumo procedeu-se à leitura do seu pH recorrendo a um potenciómetro de bancada Hanna instruments pH 212. A análise foi realizada em triplicado.

### 2.2.6 - Determinação dos sólidos solúveis do sumo

A quantificação dos sólidos solúveis consiste na contagem dos compostos que se encontram dissolvidos no sumo da fruta. A maior parte dos sólidos solúveis são açúcares e por esta razão, a análise quantitativa por refratometria é muitas vezes equiparada ao teor de açúcar do sumo do fruto. Os açúcares são utilizados como referência na colheita, devido à facilidade que existe na sua medição e também porque traduzem bem a perceção do sabor da fruta. A unidade de medida do conteúdo de sólidos solúveis é o grau Brix (°Brix) (Harrill, 1998).

A percentagem de sólidos solúveis do sumo foi determinada com recurso a um refratómetro manual Zuzi série 300. O sumo produzido para realizar a presente análise foi realizado seguindo o mesmo procedimento do sumo para a análise de pH, indicado na secção 2.2.5.

### 2.2.7 - Análise elementar

O conteúdo mineral do fruto da espécie *Corema album* foi determinado através da técnica de  $\mu$ -fluorescência de raios-X em aparelho de Espectrometria modelo M4 Tornado da Bruker (Figura 2.3). O instrumento utilizado na presente caracterização permite a obtenção de resultados com elevada exatidão e de uma grande variedade de amostras (Bruker, 2018). Este aparelho encontra-se equipado com um alvo de Rh como ânodo do tubo de raios-X. A sua óptica policapilar de raios-X foca a radiação do tubo em áreas muito pequenas, gerando pontos focais de radiação de elevada intensidade numa superfície de cerca de 25  $\mu$ m de diâmetro. O arranjo convexo de micro-capilares de vidro que apresenta foca a radiação do tubo num ponto focal muito pequeno através de reflexões múltiplas. Isto resulta num aumento da intensidade focal de até 10000 vezes relativamente a um colimador. A elevada intensidade da radiação combinada com uma excelente resolução espacial conferem a este aparelho a capacidade de executar medições rápidas e com grande detalhe. Possui também colimadores de Zircónio (Zr) que se encontram entre a amostra e o detetor. É ainda composto por um SDD XFlash® que lhe confere uma excelente resolução energética mesmo para contagens elevadas. Este tipo de detetor apresenta

resoluções energéticas melhores que 145 eV, o que se traduz numa excelente capacidade de separação de picos.

Para análise do conteúdo mineral, amostras desidratadas previamente reduzidas a pó em almofariz de ágata, foram pressionados por uma força equivalente a 10 toneladas e transformados em pastilhas de 2 cm de diâmetro e 1 mm de espessura. Com o objetivo de ser possível inferir incertezas estatísticas relativas à homogeneização do processo de moagem, efetuou-se um mínimo de três pastilhas por cada amostra. Cada pastilha, com um peso de aproximadamente 0,3 mg, foi colocada num filme de Mylar e inserida no respetivo slide (Figura 2.4). Seguidamente procedeu-se à colocação do slide diretamente em frente do feixe de raios-X para determinação elementar. Foram efetuadas três análises por cada amostra, uma em cada pastilha. O tempo de aquisição, para cada espectro, foi de 1000s. A quantificação absoluta dos vários elementos foi realizada com o método dos parâmetros fundamentais. Este método permite obter a concentração relativa de cada elemento presente na amostra com a ajuda de parâmetros atômicos de interação de radiação com a matéria, como por exemplo os rendimentos de fluorescência ou secções eficazes de absorção. Validou-se o presente método através da comparação das concentrações obtidas com concentrações conhecidas presentes em materiais de referência padrão de matrizes de tipo orgânico. Entre estes materiais de referência estão as folhas de pomar (NIST-SRM1571), folhas de Choupo (GBW07604) e ramos de arbusto (GBW07603). Estes materiais contêm matrizes orgânicas leves com várias concentrações dos elementos de interesse, o que permite a avaliação do presente método para diferentes regimes de concentração. A preparação de pastilhas dos materiais de referência padrão seguiu o mesmo procedimento que as outras amostras testadas. No geral, o método de parâmetros fundamentais é capaz de obter as mesmas concentrações elementares que os valores certificados, dentro do nível de incerteza. No caso, a incerteza corresponde a limites de confiança de 68%, isto é, a um desvio padrão.



**Figura 2.3** – Sistema M4 Tornado (Espectrometria por Fluorescência de Raios-X).



**Figura 2.4** – Pastilha constituída por camarinha desidratada e pressionada a uma força equivalente a 10 toneladas, colocada no filme de mylar e inserida no respetivo slide.

## 2.3 - Atividade antioxidante

O estudo da capacidade antioxidante do fruto na presente investigação consistiu na quantificação dos compostos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu e na avaliação da capacidade antioxidante através do método ABTS. As análises referidas foram realizadas ao fruto inteiro e ao sumo do fruto.

Por se tratar de um fruto pouco investigado tornou-se pertinente a utilização de um fruto comercial para validação das técnicas. Assim, a capacidade antioxidante foi estudada na camarinha e na uva utilizando sempre o mesmo procedimento.

### 2.3.1 - Extração de compostos fenólicos

Primeiramente realizou-se a extração dos compostos fenólicos. A extração dos compostos fenólicos influencia a avaliação da capacidade antioxidante, verificando-se resultados diferentes consoante a extração realizada. Tendo isto em consideração o solvente utilizado no presente estudo foi a acetona, sendo verificado em diversos estudos que este solvente apresenta bons resultados na extração de compostos fenólicos (Allothman *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2015). Os compostos fenólicos presentes nos frutos foram extraídos de acordo com Ribeiro *et al.*, (2014), com algumas adaptações.

#### 2.3.1.1 – Fruto inteiro

A extração foi realizada em 1 g de amostra previamente pesada em balança analítica de precisão Mettler Toledo, modelo AB204-S. Seguidamente a amostra foi colocada em frasco de vidro graduado com 10 mL do solvente, acetona a 70%. A mistura manteve-se em agitação em agitador magnético P selecta, modelo Agimatic-N, durante duas horas, a temperatura ambiente e protegida da luz. A amostra foi centrifugada em centrifugadora de bancada Heraeus modelo Labofuge 200, a uma velocidade de 4000 rpm durante 20 minutos. Após a centrifugação realizou-se uma filtração simples em papel de filtro qualitativo, com 90 mm de diâmetro.

### 2.3.1.2 – Sumo

O sumo de camarinha foi também avaliado relativamente à atividade antioxidante. A amostra de sumo de camarinha foi obtida por pressão manual mecânica com auxílio de almofariz. Para realização de extração dos compostos fenólicos, 1 mL de sumo foi adicionado a 10 mL de solvente de extração, acetona, tendo a mistura permanecido em agitação em agitador magnético P selecta, modelo Agimatic-N, durante uma hora, a temperatura ambiente e protegida da luz. Após a centrifugação realizou-se uma de filtração simples em papel de filtro qualitativo, com 90 mm de diâmetro.

### 2.3.2 - Quantificação dos compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais no presente trabalho, foi utilizado o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, em meio alcalino, através da reação com os compostos fenólicos presentes na amostra. Ao ocorrer a redução do reagente, existe a transformação do fosfomolibdato-fosfotungstato em molibdénio, que apresenta uma coloração azul, tornando assim possível a leitura da solução no espectrofotómetro. Quanto mais forte for a cor azul, maior será a quantificação total dos compostos fenólicos (Lordêlo *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2009).

A implementação do método utilizado foi realizado tendo em conta o procedimento de Giao *et al.*, (2007) com adaptações. Em tubo de ensaio foi adicionado 0,250 mL do extracto e 0,250 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Scharlau). A solução resultante foi agitada recorrendo a vortéx e posteriormente adicionou-se 5 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (70g/L) (Scharlau) e 7 mL de água destilada. A solução resultante foi homogeneizada no vortéx e colocou-se em repouso durante 1 hora, à temperatura ambiente e protegida da luz. Por fim, realizou-se a leitura das soluções, a 760 nm em espectrofotómetro Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible. O branco foi realizado tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas a amostra por água destilada. A reta de calibração (anexo 1) foi preparada com ácido gálico como padrão e os resultados correspondentes à quantificação total dos compostos fenólicos foram expressos em mg GAE/g de fruto e mg GAE/mL de sumo. A análise foi realizada em triplicado com duplicados de cada solução.

A quantificação total de compostos fenólicos (equação 11), é calculada através da equação correspondente à reta de calibração (anexo 1).

$$C = \frac{\text{Abs} - 0,0825}{1,9779}$$

Equação 11

#### Legenda:

Abs - Absorvância de cada amostra

### 2.3.3 - Avaliação da capacidade de redução do radical ABTS

No presente trabalho foi utilizado o método do radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> para a avaliação da capacidade antioxidante das camarinhas. Este é um método que tem sido amplamente utilizado em alimentos e bebidas, devido à sua aplicabilidade em fases aquosas. Este método, espectrofotométrico, determina a atividade antioxidante total através da captura do radical. O ABTS<sup>•+</sup> é um radical livre sintético que apresenta uma coloração verde/azul. A capacidade antioxidante da amostra biológica a ser testada depende da capacidade, desta, reduzir ou eliminar o radical livre (Floegel, *et al.*, 2011). Quanto maior for a descoloração verificada no ABTS<sup>•+</sup> maior a atividade antioxidante existente na amostra testada. Deste modo, a extensão da descoloração permite o cálculo da percentagem de inibição (PI), determinado em função da concentração e do tempo em relação ao padrão, sob as mesmas condições (Re *et al.*, 1999).

O método utilizado na presente investigação decorreu de acordo com Giao *et al.*, (2007) com algumas adaptações. Para iniciar o método, é necessário primeiramente a preparação da solução de ABTS concentrado. Assim, foi preparada uma solução de 10 mL de ABTS (7 mmol/L). Paralelamente foi preparada uma solução de 10 mL de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (2,45 mmol/L). Procedeu-se assim à junção das duas soluções e deixou-se em repouso cerca de 16 horas à temperatura ambiente na ausência de luz, originando assim o radical ABTS<sup>•+</sup>. Após o período de espera realizou-se a filtração da solução com auxílio de uma bomba de vácuo e filtro. Seguidamente, realizou-se a diluição desta solução com água destilada tendo como objetivo a obtenção de uma solução com valores de absorvância, de 0,700 ± 0,020 para um comprimento de onda de 734 nanómetros. Para se proceder à implementação do método adicionou-se 1 mL do radical e 20 µL de extratos, à mesma cuvete (descartáveis, Brand standard – PMMA semi-micro, Sigma-Aldrich). De forma a evitar o contacto com o oxigénio, colocou-se parafilm na cuvete e agitou-se manualmente. Após 6 minutos procedeu-se à leitura das soluções, a 734 nm, no espectrofotómetro Varian Cary modelo 50 Scan UV Visible (Haddouchi *et al.*, 2014). O branco foi realizado tendo em conta o mesmo procedimento, substituindo apenas a amostra por água destilada. A reta de calibração (anexo 2) foi preparada com ácido ascórbico (Panreac) como padrão e os resultados correspondentes à atividade antioxidante foram expressos em mg VCEAC/g de fruto e mg VCEAC/mL de sumo (VCEAC: equivalente em vitamina C). A análise foi realizada em triplicado com triplicados de cada solução.

Para calcular a capacidade antioxidante do fruto (equação 13) é necessário previamente calcular a percentagem de inibição (equação 12).

$$PI = \frac{Abs\ r - Abs\ a}{Abs\ r} \times 100$$

**Legenda:**

Equação 12

Abs r - Absorvância inicial da solução de ABTS

Abs a – Absorvância da solução resultante após 6 minutos

$$C = \frac{PI - 2,7555}{429,04}$$

Equação 13

## 2.4 - Avaliação da atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana da camarinha foram utilizados o sumo do fruto e um extrato de sumo em acetona/água (7:3). A avaliação foi efetuada *in vitro* pelo método de difusão em disco, e estudado o seu efeito sobre diferentes estirpes de bactérias.

### 2.4.1 - Estirpes bacterianas

A atividade antibacteriana do extrato de acetona do sumo do fruto e do sumo do fruto foram testados individualmente em cinco estirpes de bactérias, três Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (isolado clínico) e duas Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*).

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

### 2.4.2 - Método de difusão em disco

A atividade antibacteriana foi avaliada recorrendo ao método de difusão em disco, de acordo com a adaptação do procedimento de Djihane *et al.*, (2017).

Nestes ensaios utilizou-se o meio Agar Mueller-Hinton (MHA) preparado de acordo com as indicações do fornecedor e previamente esterilizado a 121°C e uma pressão de 1 atmosfera durante 15 minutos. Após esterilização, cerca de 15 mL do meio foram vertidos em placas de Petri esterilizadas obtendo-se assim uma camada-base. Através das colónias isoladas das culturas de bactérias, com auxílio de uma ansa esterilizada, realizou-se uma suspensão para cada bactéria em solução estéril de NaCl 0,9% até atingir uma densidade ótica correspondente à turbação padrão de 0,5 na escala Mcfarland (cerca de  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL). Após a solidificação da camada-base, procedeu-se ao espalhamento de 1 mL de cada inóculo, anteriormente preparado, por toda a superfície de Muller-Hinton Agar (MHA), recorrendo a um espalhador estéril. De seguida foram colocados os discos de papel de filtro qualitativo, com 8 mm de diâmetro, esterilizados, a distâncias equitativas, na superfície do agar inoculado.

Para estudar a atividade antimicrobiana do extrato de acetona e do sumo do fruto foram utilizados dois volumes diferentes, 10 µL e 20 µL, o que nos permitiria avaliar o efeito da concentração dos componentes desses extratos. De forma a eliminar o possível efeito do solvente acetona na atividade antibacteriana do extrato do sumo, esta foi utilizada como controlo negativo. Os antibióticos Ciprofloxacina 5 µg (CIP 5), Ampicilina 10µg (AMP 10), Polimixina B 300 units (PB 300) e Colistina 10 µg (CT 10) foram utilizadas como controlo positivo permitindo-nos avaliar e quantificar os halos de inibição desenvolvidos. Por fim as placas de Petri foram incubadas a 37 °C e foram observadas após 24 e 48 horas, de forma a verificar a existência de halos de inibição do crescimento bacteriano. A avaliação do crescimento nas respetivas placas, foi realizada através de leituras visuais, através de comparação com o controlo negativo e positivo e da medição dos halos desenvolvidos. O controlo

positivo com os antibióticos foi executado em duplicado para cada estirpe e o ensaio para avaliação do efeito antibacteriano dos diferentes extratos foi efetuado em triplicado. De forma a comprovar a esterilidade do meio de Muller-Hinton Agar (MHA), mantiveram-se duas placas de Petri sem inóculo nas mesmas condições do ensaio e durante o mesmo período de tempo. Para comprovar a capacidade reprodutiva das estirpes bacterianas foram também mantidas duas placas de Petri inoculadas por espalhamento, com cada estirpe, nas condições e durante todo o período do ensaio.

## 2.5 - Teste de Viabilidade Celular

No decorrer da presente investigação, foram realizados ensaios de viabilidade celular com o intuito de avaliar a resposta das células, relativamente à sua viabilidade, à presença do sumo do fruto camarinha. De forma a avaliar o efeito do sumo nas células recorreu-se ao ensaio MTT, realizado segundo as indicações descritas no Kit No 11465001 – Sigma-aldrich, em culturas celulares tumorais CACO-2 do adenocarcinoma colorectal humano da European Collection of Cell Cultures (ECACC, UK). Estas células, CACO-2, possuem a capacidade de se diferenciarem de forma espontânea em condições de cultura, apresentando características semelhantes às de enterócitos humanos maduros. Apesar da sua origem cólica, estas células expressam uma morfologia e funcionalidade semelhante às células do intestino delgado. A monocamada CACO-2 apresenta vários recetores, enzimas metabólicas e transportadores (Kamiloglu *et al.*, 2015) .

O ensaio MTT é um método colorimétrico comumente utilizado com a finalidade de avaliar a proliferação celular e a citotoxicidade. O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]) é um corante que através da redução dos seus sais tetrazólicos origina cristais formazan, que são caracterizados pela sua cor roxa e por serem insolúveis em água. Esta redução, é efetuada por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis). Os cristais são dissolvidos num solvente orgânico, originando assim uma solução de cor roxa, com menor ou maior intensidade, dependendo da quantidade de cristais formados e conseqüentemente da quantidade de células viáveis (Sigma-Aldrich, 2016). O procedimento utilizado no presente ensaio foi adaptado do método realizado por Nunes *et al.*, (2014) e desenvolvido em parceria com investigadores da Universidade de Coimbra – Departamento de Química.

### 2.5.1 - Cultura das células

O modelo celular proveniente do adenocarcinoma colorectal humano (células CACO-2) utilizado neste estudo foi cedido pelos colaboradores da Universidade de Coimbra. As células foram mantidas em frasco de 75,0 cm<sup>2</sup> no meio de cultura, em incubadora Thermo Scientific BB 15, a 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidade, 37 °C. O meio de crescimento utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma- Aldrich) com 4500 mg/L glucose e 2mM L-glutamina, sem bicarbonato de sódio), suplementado a 10% de soro fetal bovino inativado termicamente (FBS, Gibco), 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA, Sigma- Aldrich) e 1% penicilina (100units/mL) – estreptomina (10mg/mL) (Sigma-Aldrich). O crescimento decorreu sob condições controladas durante aproximadamente 7 dias. Realizou-se a mudança de meio de cultura de três em três dias de forma a garantir a reposição dos nutrientes necessários ao crescimento celular.

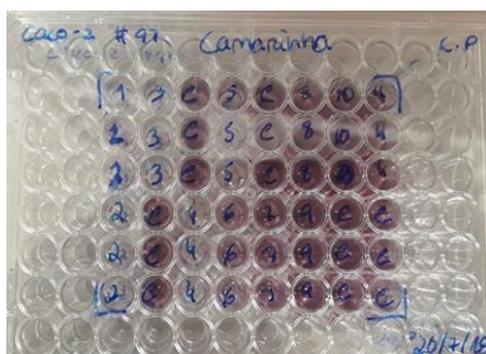
### 2.5.2 - Ensaio MTT

Após 7 dias de desenvolvimento celular procedeu-se ao levantamento das células com solução a 2.5% (m/V) tripsina-EDTA (10x solution, Sigma- Aldrich). Realizou-se a contagem das células, com recurso ao corante Azul de Tripán, em câmara de contagem de Neubauer. De seguida, procedeu-se ao plaqueamento das células em placas de 96 poços, com uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em 300  $\mu$ l de meio e incubou-se numa incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific BB 15) com 5% CO<sub>2</sub>, 95% de humidade e temperatura constante, 37 °C, durante aproximadamente 5 dias, até se atingir confluência celular total, com renovação de meio de cultura ao fim de 3 dias.

Após incubação, o meio foi retirado das placas e substituído pelas amostras de extrato de camarinha previamente preparadas e diluídas em meio, a diferentes concentrações (Tabela 2.1), tal como é descrito na secção 2.5.3. As placas foram colocadas na incubadora durante aproximadamente 6 horas e de seguida removeu-se o meio e o extrato das placas e lavou-se com solução de lavagem, tampão PBS (*phosphate buffer saline*). Após este procedimento, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de solução 0,5 mg/mL MTT, previamente preparada. As placas foram novamente colocadas na incubadora durante aproximadamente 3 horas. Após este período, verificou-se a formação de cristais, sujeitos a solubilização (Figura 2.5) para efeito de quantificação. As soluções resultantes foram quantificadas espectrofotometricamente a 570 nm com recurso a leitor de placas Elisa (BioTek), com vista ao cálculo da viabilidade celular (equação 14). O ensaio foi realizado em duplicado, com triplicados de cada concentração. As amostras controlo correspondiam a poços que continham apenas o meio DMEM.

$$\text{Viabilidade celular (\% do controlo)} = \frac{\text{Abs amostra a testar}}{\text{Abs controlo}} \times 100$$

Equação 14



**Figura 2.5** - Estudo de viabilidade celular de células CACO-2 na presença de extrato de camarinha, com recurso ao ensaio MTT realizado em placa ELISA de 96 poços.

### 2.5.3 – Preparação de amostras

O de sumo de camarinha foi obtido por pressão manual mecânica, com recurso a almofariz com pilão, seguido de filtração simples em papel de filtro qualitativo, com 90 mm de diâmetro e congelada a -20 °C. De seguida procedeu-se à liofilização do sumo em liofilizador Kinetics Ez-Dry, modelo EZ550R, acoplado a bomba de vácuo Edwards 12, à temperatura constante de -42 °C, e pressão de 100 mT. Com o objetivo de testar diferentes concentrações de sumo, foram preparadas 11 amostras,

representadas na Tabela 2.1. Para preparação destas amostras, a amostra liofilizada foi ressuspensa em meio de cultura DMEM, dependendo da concentração preparar. A Tabela 2.1 lista as concentrações de extrato de camarinha testadas no ensaio de viabilidade celular.

**Tabela 2.1** - Concentrações testadas de extrato liofilizado de camarinha no ensaio de viabilidade celular em células CACO-2.

Concentração (%)	Concentração (mg/mL)
759	446
506	297
338	198
225	132
150	88
100	59
67	39
44	26
30	17
20	12
13	8

## 2.6 - Estudo da viabilidade de incorporação do fruto camarinha em produtos alimentares

Sendo a camarinha um fruto que apresenta uma baixa notoriedade é, no entanto, muito conhecido junto da população nativa das zonas da sua proliferação. Desta forma e após realizado o estudo às suas propriedades físico-químicas, torna-se necessário obter um maior entendimento acerca da sua aceitabilidade por parte da população em geral.

### 2.6.1 - Desenvolvimento de uma formulação de chocolate com incorporação de camarinha

Uma grande parte da população mundial é apreciadora de chocolate, sendo que a Europa é detentora de uma das taxas mais elevadas de consumo deste produto (FAO, 2009). O desenvolvimento de uma formulação de chocolate com incorporação de camarinha é deste modo pertinente.

#### 2.6.1.1 - Formulação do produto

Em primeiro lugar realizou-se o processamento da matéria-prima. Efetuou-se a higienização dos frutos com água destilada, de seguida extraiu-se o sumo das bagas com recurso a uma máquina de sumos (Moulinex). Procedeu-se assim a uma desidratação do sumo extraído, no forno (Thor) à temperatura de 60°C, durante aproximadamente 10 horas, até serem formados cristais róseos. Seguidamente, derreteu-se o chocolate 70% de cacau (Pantagruel), em banho maria até uma temperatura de 45 °C. O chocolate foi colocado em formas de 5 g, onde foi adicionada também 0,03 g de cristais. Por fim as formulações foram colocadas em refrigeração a uma temperatura de -16 °C, durante aproximadamente

10 minutos para solidificação. Posteriormente os chocolates foram armazenados a uma temperatura de 5 °C. Deste modo, foi possível chegar a uma formulação final que continha 99,4 % de chocolate e 0,6 % de camarinha.

Procedeu-se também à realização de um chocolate controlo, com o mesmo procedimento, sendo a sua constituição 100% de chocolate com 70% de cacau.

#### **2.6.1.2 - Teste de consumidor**

De forma a avaliar a aceitação do produto e a intenção de compra do consumidor, relativamente ao mesmo, foram realizados testes de consumidor a um painel internacional constituído por 60 indivíduos. O teste continha 2 perguntas: uma referente à prova hedónica (escala de 1 a 9 do U.S. Army and Food Container Institute) (Wichchukit e O'Mahony, 2015), em que o número 1 correspondia ao desagrado relativamente ao produto e o 9 correspondia ao agrado total e outra referente à intenção de compra (escala de 1 a 5) (Meilgaard *et al.*, 2015), onde o número 1 correspondia à intenção de comprar o produto e o número 5 correspondia à não aquisição do produto. Os chocolates (o controlo e a formulação com camarinha), foram dispostos em pratos devidamente assinalados com códigos de identificação, acompanhados com uma bolacha de água e sal e um copo de água.

### **2.7 - Análise Estatística**

Relativamente aos resultados obtidos na caracterização físico química e na capacidade antioxidante foram sujeitos a análise estatística, ANOVA - um fator, de forma a perceber se existiam diferenças significativas entre os frutos recolhidos no pinhal e nas dunas, para um nível de significância de 95%. As análises foram efetuadas através do Excel 2016.



---

## **3 - Resultados e Discussão**

---

## Capítulo 3 - Resultados e Discussão

### 3.1 - Caracterização físico-química

#### 3.1.1 - Determinação do peso médio

A determinação do peso médio da camarinha foi realizada através da pesagem de 100 camarinhas escolhidas de forma aleatória para garantir uma amostra heterogénea. Com o objetivo de verificar a existência de frutos mais vantajosos nas dunas ou no pinhal, a análise foi realizada em ambas as amostras, 100 frutos recolhidos nas dunas e 100 frutos recolhidos no pinhal, e posteriormente comparada com recurso a análise estatística.

Os resultados obtidos nesta análise demonstram pesos semelhantes (g) entre os frutos recolhidos no pinhal ( $0,50 \pm 0,03$ ) e nas dunas ( $0,51 \pm 0,01$ ) (Tabela 3.1). Após a realização da análise estatística verificou-se que não existem diferenças significativas entre ambos os frutos ( $P > 0,05$ ), sendo que neste parâmetro nenhum se apresenta mais vantajoso.

Na comparação da amostra do presente estudo com as amostras de outros estudos é possível observar, apesar de algumas diferenças, que os frutos recolhidos para este estudo encontram-se dentro dos valores dos restantes estudos. No estudo desenvolvido por Oliveira e Dale (2012) verifica-se o peso médio dos frutos recolhidos em 7 localizações diferentes (Figura 3.1), em Portugal, distribuídos desde Sines até Aveiro, apresentando valores compreendidos entre 0,3 e 0,5 g, dependendo da localização. Das localizações contempladas no estudo de Oliveira e Dale (2012), a que se encontra mais próximo da presente investigação (Praia do Vigão), é São Pedro de Moel (Figura 3.1). Verificou-se ainda que esta localidade apresenta o valor mais próximo ( $0,49 \pm 0,06$ ) Tabela 3.1), quando comparado ao presente estudo.

Procedendo à comparação dos resultados obtidos no atual estudo e na investigação conduzida por Andrade *et al* (2015), é possível concluir que o peso médio (g) dos frutos estudados nessa investigação, recolhidos em Mira, é superior ( $0,7 \pm 0,1$ ) (Tabela 3.1) ao do presente estudo.

As diferenças verificadas na comparação dos diversos estudos, podem ser indicativos de que a localização e conseqüentemente as condições edafoclimáticas podem influenciar o peso do fruto. Outro fator que pode estar associado às diferenças existentes entre os vários resultados, é o amadurecimento do fruto. Por observação própria constatou-se que nos mesmos arbustos existem muitos frutos com diferentes graus de amadurecimento, assim, no momento da recolha da amostra não é possível garantir o mesmo grau de maturação em todos os frutos. Deste modo, a forma como é selecionada a amostra de cada estudo irá também influenciar todos os parâmetros analisados. É também possível observar esta heterogeneidade do fruto ao comparar os resultados obtidos por Oliveira e Dale (2012) e Andrade *et al.*, (2015) relativamente aos frutos recolhidos em Mira (Tabela 3.1), devido à disparidade entre os resultados. Neste estudo, como o objetivo era uma caracterização do fruto, a amostra foi recolhida de forma a obter frutos heterogéneos.



**Legenda**

1. Lagoa de Santo André
2. Pego
3. Comporta
4. Aldeia do Meco
5. São Pedro de Moel
6. Vigão
7. Quiaios
8. Mira

**Figura 3.1** - Mapa de Portugal Continental representativo das diferentes zonas da recolha de camarinha onde foram efetuados diversos estudos.

**Tabela 3.1** - Peso médio do fruto recolhido em diferentes zonas.

Localização	Peso
	Média (g) ± Desvio padrão
Praia Vigão (Presente trabalho)	Pinhal - 0,50 ± 0,03 <sup>a</sup>
	Dunas - 0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>
Lagoa de Santo Andre (Oliveira e Dale, 2012)	0,31 ± 0,08
Pego (Oliveira e Dale, 2012)	0,41 ± 0,05
Comporta (Oliveira e Dale, 2012)	0,38 ± 0,06
Aldeia do Meco (Oliveira e Dale, 2012)	0,42 ± 0,07
São Pedro de Moel (Oliveira e Dale, 2012)	0,49 ± 0,06
Quiaios (Oliveira e Dale, 2012)	0,36 ± 0,06
Mira (Oliveira e Dale, 2012)	0,40 ± 0,06
Mira (Andrade <i>et al.</i> , 2015)	0,70 ± 0,10

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes (p > 0,05).

**3.1.2 - Determinação da altura e do diâmetro médio**

A altura e o diâmetro médio do fruto foram determinados através da medição dos parâmetros em 50 camarinhas recolhidas em cada um dos habitats, nas dunas e no pinhal.

Os resultados obtidos, no que diz respeito ao valor médio do diâmetro (mm) dos frutos recolhidos no pinhal (8,03 ± 0,90) é muito semelhante ao dos frutos recolhidos nas dunas (8,22 ± 1,05). Ao comparar a altura (mm) dos frutos recolhidos em ambas as localizações, também se pode verificar semelhanças

entre o valor obtido nos frutos recolhidos no pinhal ( $7,36 \pm 0,76$ ) e nas dunas ( $7,42 \pm 0,87$ ) (Tabela 3.2). Após realização da análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

Os resultados obtidos no estudo desenvolvido por Herrera (1967), revelaram ser inferiores aos do presente estudo, tanto relativamente ao diâmetro (6,6 mm) como à altura (6,2 mm) (Tabela 3.2 e 3.3).

Os estudos conduzidos por Andrade *et al.*, (2015) ( $9,43 \pm 0,74$ ), Calviño-Cancela, (2004) ( $9,0 \pm 0,1$ ) e Calviño-Cancela, (2005) ( $9,1 \pm 0,02$ ) demonstraram valores de diâmetro (mm) semelhantes entre si e superiores aos valores obtidos no presente estudo (Tabela 3.2). Ainda referente aos valores de diâmetro do presente estudo, encontram-se de acordo com o intervalo referido no enquadramento teórico (5-8 mm) (Andrade *et al.*, 2017) (León-González *et al.*, 2013) (Oliveira e Dale, 2012).

Em relação aos valores da altura média do fruto (mm), os estudos conduzidos por Andrade *et al.*, (2015) e Calviño-Cancela, (2005) demonstraram resultados semelhantes entre si,  $8,63 \pm 0,84$  e  $8,2 \pm 0,02$  respetivamente (Tabela 3.3). Verifica-se que os valores anteriormente referidos são superiores aos resultados obtidos na presente investigação.

As diferenças de resultados verificadas entre os diversos estudos, tal como foi referido anteriormente, podem dever-se às diferentes localizações, ao grau de maturação que o fruto apresentava no momento da colheita e à forma como a amostra foi selecionada. O estudo desenvolvido por Herrera (1967) foi o que apresentou maior variação nos resultados. Este estudo decorreu em Espanha e trata-se de uma investigação mais antiga, o que também pode justificar ao longo dos anos, alterações na espécie, devido às modificações que vão acontecendo no meio envolvente.

No presente trabalho foram ainda avaliados o calibre e o volume dos frutos. Os resultados obtidos não demonstram diferenças estatisticamente significativas entre ambos os frutos ( $P > 0,05$ ). No que concerne ao calibre (cm), os frutos desenvolvidos nas dunas ( $0,78 \pm 0,05$ ) apresentaram um valor muito semelhante aos frutos desenvolvidos no pinhal ( $0,77 \pm 0,06$ ). Relativamente ao volume ( $\text{cm}^3$ ), apesar de não se verificarem diferenças significativas, os frutos das dunas ( $2,03 \pm 0,44$ ) apresentaram um volume superior comparativamente aos frutos colhidos no pinhal ( $1,94 \pm 0,49$ ).

**Tabela 3.2** - Resultados referentes ao diâmetro médio do fruto obtidos em diferentes estudos.

Estudo	Diâmetro
	Média (mm) $\pm$ Desvio padrão
Presente trabalho	Pinhal - $8,03 \pm 0,90^a$
	Dunas - $8,22 \pm 1,05^a$
Herrera (1967)	6,60
Andrade <i>et al.</i> , (2015)	$9,43 \pm 0,74$
Calviño-Cancela, (2004)	$9,0 \pm 0,1$
Calviño-Cancela, (2005)	$9,1 \pm 0,02$

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.3** - Resultados referentes à altura média do fruto obtidos em diferentes estudos.

Estudo	Altura
	Média (mm) ± Desvio padrão
Presente trabalho	Pinhal - 7,36 ± 0,76 <sup>a</sup>
	Dunas – 7,42 ± 0,87 <sup>a</sup>
Herrera (1967)	6,20
Andrade <i>et al.</i> , (2015)	8,63 ± 0,84
Calviño-Cancela, (2005)	8,2 ± 0,02

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3 - Determinação da parte edível

Na presente investigação foi calculado o teor de parte edível do fruto fresco e do fruto desidratado. Esta é uma análise que se torna relevante principalmente tendo em vista a comercialização do fruto e a sua rentabilidade, tornando-se assim pertinente averiguar a existência de vantagem entre os frutos que se desenvolvem nas dunas e no pinhal.

Relativamente ao estudo da edibilidade do fruto desidratado (%), os frutos recolhidos no pinhal apresentaram valores ligeiramente superiores ( $44,0 \pm 3,70$ ) comparativamente aos frutos recolhidos nas dunas ( $41,0 \pm 1,44$ ) (Tabela 3.4). Apesar do anteriormente descrito as diferenças encontradas não são estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ), concluindo assim que segundo o estudo atual não existe maior vantagem na utilização do fruto de qualquer uma das localizações. Sendo a camarinha um fruto sazonal e típico da Península Ibérica, a desidratação seria uma opção para a valorização deste fruto e para garantir o seu consumo durante todo o ano. A baixa edibilidade que existe deve-se ao fato deste fruto conter geralmente três sementes e ser constituído por uma elevada quantidade de água. As características organolépticas do fruto desidratado (Figura 3.2) tornam este fruto atrativo. Após a desidratação do fruto existe uma evidência no sabor ácido que aliado à crocância da epiderme e à cor, pode enaltecer o valor deste produto, principalmente em alguns nichos de mercado nomeadamente a gastronomia *gourmet*.



**Figura 3.2** - Camarinha desidratada a uma temperatura de 60°C durante aproximadamente 72 horas.

**Tabela 3.4** - Resultados referentes à parte edível do futo desidratado.

Localização	Parte edível
	Média (%) ± Desvio padrão
Pinhal	44,0 ± 3,70 <sup>a</sup>
Dunas	41,0 ± 1,44 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Na determinação da parte edível do fruto fresco (%) considerou-se que todo o fruto é consumido excetuando as sementes. Os resultados obtidos nesta análise demonstraram ser semelhantes nos frutos recolhidos no pinhal ( $93,3 \pm 0,78$ ) e nas dunas ( $92,3 \pm 0,90$ ) (Tabela 3.5), não revelando diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). A edibilidade do fruto fresco é relativamente elevada, contudo, sendo este um fruto de dimensões reduzidas, a proporção de sementes e o tamanho destas, podem tornar-se uma desvantagem e implicar uma menor adesão à compra deste fruto na eventual comercialização.

**Tabela 3.5** - Resultados referentes à parte edível do fruto fresco.

Localização	Parte edível
	Média (%) ± Desvio padrão
Pinhal	93,3 ± 0,78 <sup>a</sup>
Dunas	92,3 ± 0,90 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.4 - Determinação do teor de humidade

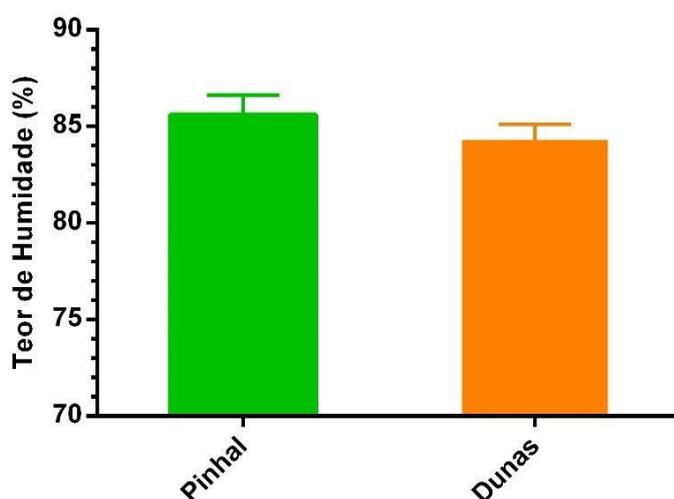
Para a determinação do teor de humidade do fruto (%) realizou-se uma desidratação do fruto até garantir a eliminação total do teor de água. Sendo este fruto uma baga carnuda e com um elevado conteúdo de água era esperado um elevado teor de humidade, tal como foi possível confirmar.

O valor médio do teor de humidade das camarinhas recolhidas no pinhal ( $85,6 \pm 0,98$ ) verificou-se ser mais elevado que o resultado obtido nos frutos desenvolvidos nas dunas ( $84,3 \pm 0,76$ ) (Tabela 3.6). Após realização de análise estatística verificou-se que a diferença existente é estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (Figura 3.3). As diferenças verificadas entre os frutos desenvolvidos nas diferentes localizações podem ser explicadas pela elevada exposição solar a que os frutos das dunas estiveram sujeitos comparativamente com os frutos provenientes do pinhal. O meio envolvente, as condições climáticas e o solo têm uma grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo muitas vezes determinante na sua composição físico-química. A temperatura, a humidade e a luminosidade, são alguns dos fatores ambientais que alteram tanto o crescimento da planta, como a produção de metabolitos secundários (Ramakrishna *et al.*, 2011). Considerando o supracitado e tendo em conta que o ano de 2017 foi um ano em que se verificaram valores de precipitação muito inferiores ao normal e temperaturas muito acima do normal, seria expectável uma

diminuição no teor de humidade dos frutos, principalmente nos frutos provenientes das dunas sem áreas de sombreamento (IPMA, 2017). Os frutos que se encontram mais expostos à radiação UV estão sujeitos a condições mais adversas, desenvolvendo assim mecanismos de defesa como um aumento da transpiração. A transpiração traduz-se na evaporação da água dos tecidos e é influenciada pela temperatura, humidade relativa e circulação do ar (Pinto *et al.*, 2000).

Através da comparação dos resultados deste estudo com outras investigações, verifica-se que relativamente ao teor de humidade referido na investigação conduzida por León-González *et al.*, (2013) confirmam-se valores médios ligeiramente menores (83,4%), em contrapartida, o estudo conduzido por Andrade *et al.*, (2015) revela um teor de humidade superior (87,89%) (Tabela 3.6).

Considerando os resultados obtidos na presente análise, conclui-se que existe uma vantagem nos frutos colhidos no pinhal ou em áreas que estejam mais protegidas do sol relativamente ao teor de humidade.



**Figura 3.3** - Representação gráfica da comparação entre os resultados, referente ao teor de humidade, dos frutos desenvolvidos no pinhal e nas dunas ( $P < 0,05$ ). Os frutos foram desidratados a uma temperatura de 60°C durante aproximadamente 72 horas.

**Tabela 3.6** - Resultados referentes ao teor de humidade do fruto obtidos em diferentes estudos.

Estudo	Altura
	Média (mm) ± Desvio padrão
Presente trabalho	Pinhal - 85,6 ± 0,98 <sup>a</sup>
	Dunas - 84,3 ± 0,76 <sup>b</sup>
León-González <i>et al.</i> , (2013)	83,4
Andrade <i>et al.</i> , (2015)	87,89

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.5 - Determinação do pH do sumo

A maioria dos frutos apresentam uma concentração considerável de ácidos orgânicos o que consequentemente provoca um valor de pH baixo. No fruto camarinha os ácidos fenólicos são os compostos que se encontram em maior proporção, sendo assim possível justificar um valor baixo de pH do sumo (León-González *et al.*, 2013).

O pH do sumo de camarinha foi medido diretamente no sumo sem recorrer a diluição do mesmo. Os resultados obtidos relativamente aos frutos recolhidos nas dunas ( $2,73 \pm 0,08$ ) e no pinhal ( $2,52 \pm 0,41$ ) demonstraram ser semelhantes (Tabela 3.7). Após análise estatística confirmou-se que não há diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), sugerindo assim, e tendo em consideração os resultados deste estudo, que a localização (dunas ou pinhal) não apresenta influência no valor de pH. Apesar dos resultados obtidos e por se tratar de uma amostra que apresenta variabilidade, é necessário considerar que o tipo de amostra pode influenciar os resultados, não sendo possível garantir que todos os frutos analisados apresentassem o mesmo grau de maturação.

Em paralelo, foi também realizada a medição do pH de sumo de uva branca comercial, feita sob as mesmas condições do sumo de camarinha tornando assim possível obter uma análise de comparação entre ambos os sumos. O valor observado do sumo de uva no presente estudo ( $3,66 \pm 0,05$ ) é semelhante ao descrito na bibliografia ( $3,37 \pm 0,19$ ) e mais elevado que o sumo de camarinha. Através da comparação do sumo de camarinha com os restantes sumos verifica-se que este possui um pH mais baixo que os restantes frutos excetuando o sumo de limão que apresenta um valor ligeiramente inferior (2,2) (Tabela 3.7).

**Tabela 3.7** - Valores de pH de diversos frutos.

Fruto	pH
	Média $\pm$ desvio padrão
Camarinha (presente estudo)	Dunas - $2,73 \pm 0,08^a$
	Pinhal - $2,52 \pm 0,41^a$
Sumo de uva (presente estudo)	$3,66 \pm 0,05$
Sumo de uva (Lopes <i>et al.</i> , 2016)	$3,37 \pm 0,19$
Mirtilo (Sousa, 2007)	3,50-3,80
Groselha (Arena, 2008)	3,20
Limão (Jie <i>et al.</i> , 2013)	2,23

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.6 - Determinação dos sólidos solúveis do fruto

A determinação dos sólidos solúveis de sumos de frutas são expressos em termos do seu teor em açúcar, ° Brix (%). Os hidratos de carbono presentes nos frutos, conferindo assim o sabor doce são

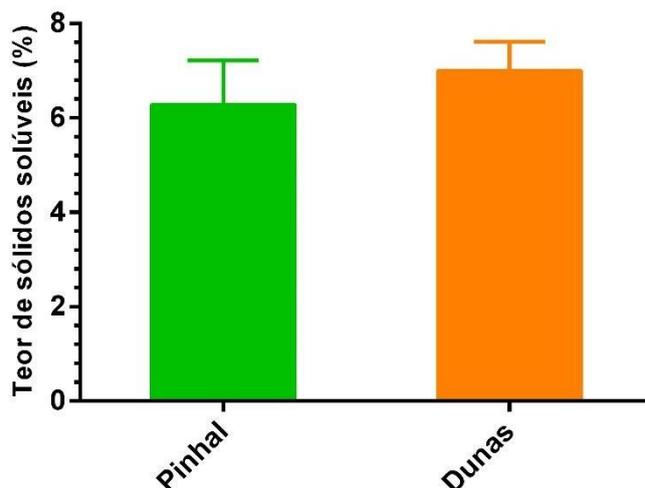
maioritariamente a glicose, frutose e sacarose (Rambla *et al.*, 1997). Durante a fase de amadurecimento ocorrem as reações que irão influenciar os aspetos sensoriais como a diminuição de ácidos, o aumento de açúcares e as alterações de cor e textura. Nesta etapa, verifica-se a ocorrência da quebra dos hidratos de carbono de reserva em açúcares simples (mono e dissacarídeos) o que confere à fruta o sabor doce (Pinto *et al.*, 2000).

Para a determinação dos sólidos solúveis totais no presente trabalho foi utilizado sumo puro sem recorrer a diluição.

Os resultados demonstraram um valor mais elevado nos frutos colhidos nas dunas ( $7,00 \pm 0,61$ ) correspondente a 7g de sólidos solúveis em 100 g de sumo) comparativamente aos colhidos no pinhal ( $6,28 \pm 0,93$ , correspondente a 6,28g de sólidos solúveis em 100 g de solução) (Tabela 3.8), sendo que esta diferença se demonstrou estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (Figura 3.4). A quantidade, a duração e a intensidade da luz são fatores que exercem uma grande influência na qualidade do produto final. Esta influência depende do fruto, contudo para uma grande parte dos frutos o aumento da temperatura incrementa o amadurecimento. Estudos realizados a laranjas demonstraram que aquelas que se encontravam expostas ao sol continham um teor mais elevado de sólidos solúveis e uma acidez menor comparativamente às que se encontravam em áreas de sombreamento (Senhor *et al.*, 2009). Este estudo sugere assim, que o amadurecimento do fruto camarinha pode ser influenciado pela exposição solar e temperatura, sendo que os frutos mais expostos a estes fatores apresentaram um teor de sólidos solúveis maiores. De forma a estudar esta relação entre a temperatura e a exposição solar e o amadurecimento da camarinha serão necessários mais estudos.

Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se de acordo com os demonstrados por Andrade *et al.*, (2015) e por (Pimpão *et al.*, 2013) com valores de ° Brix semelhantes ( $6,20 \pm 0,03$ ) ( $6,8 \pm 0$ ) respetivamente (Tabela 3.8).

Em paralelo, nesta investigação, foi também realizada a medição do teor total de sólidos solúveis no sumo de uva branca comercial, realizado sob as mesmas condições do sumo de camarinha. Este apresentou um ° Brix mais elevado ( $16,9 \pm 0,00$ ) que a camarinha tal como era esperado, apresentando-se semelhante ao descrito na bibliografia ( $17,7 \pm 0,40$ ) o que contribui assim para a validação do método de leitura. Relativamente à comparação do sumo de camarinha com outros frutos, o sumo de mirtilo e de groselha apresentaram um teor de sólidos solúveis muito mais elevado, sendo que o limão apresenta um ° Brix mais semelhante (Tabela 3.8).



**Figura 3.4** - Representação gráfica da comparação entre os resultados, referente ao teor de sólidos solúveis, do sumo dos frutos desenvolvidos no pinhal e nas dunas ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.8** - Teor de sólidos solúveis de diferentes frutos.

Fruto	Teor de sólidos solúveis totais
	Média (%) ± desvio padrão
Camarinha (presente estudo)	Dunas – 7,00 ± 0,61 <sup>a</sup>
	Pinhal - 6,28 ± 0,93 <sup>b</sup>
Camarinha (Andrade <i>et al.</i> , 2015)	6,20 ± 0,03
Camarinha (Pimpão <i>et al.</i> , 2013)	6,80 ± 0,00
Sumo de uva (presente estudo)	16,9 ± 0,00
Sumo de uva (Lopes <i>et al.</i> , 2016)	17,7 ± 0,40
Mirtilo (Jaakola <i>et al.</i> , 2004)	9,50
Groselha (Arena, 2008)	13,2
Limão (Jie <i>et al.</i> , 2013)	8,70

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.7 - Determinação do teor de minerais

A determinação do teor de minerais no fruto camarinha torna-se imprescindível para determinar a composição do mesmo. A técnica utilizada de  $\mu$ -fluorescência de raios-X, permitiu a identificação dos elementos presentes no fruto (Tabela 3.9).

Alguns minerais presentes nas plantas possuem um papel preventivo no combate de doenças, contudo, níveis elevados desses minerais podem também tornar-se tóxicos para o organismo. O cobalto, o crómio, o cobre, o ferro, o manganês, o magnésio, o molibdénio, o selénio e o zinco são alguns dos minerais cuja o seu efeito benéfico/tóxico irá depender da dose ingerida (Silva *et al.*, 2010).

Dos elementos identificados, as concentrações de manganés, ferro, rubídio e potássio apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os frutos provenientes de ambas as localizações. No que diz respeito ao manganés, ferro e potássio os frutos recolhidos no pinhal apresentaram teores mais elevados comparativamente aos frutos desenvolvidos nas dunas. Em contrapartida, os frutos provenientes das dunas apresentaram teores mais elevados de rubídio aquando comparados à amostra recolhida no pinhal. O enxofre foi apenas identificado nos frutos desenvolvidos no pinhal. Os resultados apontam para que possam existir diferenças na constituição mineral dos frutos desenvolvidos no pinhal e nas dunas, contudo, a heterogeneidade da amostra pode estar na origem de alguns resultados, por este motivo, são necessários mais estudos complementares

Considerando os resultados obtidos, tanto relativamente às camarinhas recolhidas nas dunas (91,2 mg/100g de parte edível) como no pinhal (77,6 mg/100g de parte edível) apresentaram valores elevados de cálcio, o que valorizar o seu potencial nutricional. O cálcio é essencial para o ser humano sendo que a sua grande função está relacionada com a massa óssea, isto é, formação de ossos e dentes, sendo também essencial para coagulação sanguínea, contração muscular e transmissão de impulsos nervosos. A dose diária recomendada para um adulto é, em média, 1000 mg (DGS, 2018). Procedendo à comparação da concentração de cálcio entre o fruto camarinha e outros frutos, concluiu-se que o fruto da espécie *Corema album* contém uma concentração mais elevada que a uva branca (5 variedades) (10 mg/100g) framboesa (26 mg/100g) e o morango (25 mg/100 g) (Tabela 3.10).

Relativamente à composição mineral dos alimentos, o controlo de metais pesados é cada vez mais uma preocupação, sendo que a exposição humana a metais pesados através do ar e da alimentação aumentou drasticamente devido ao aumento do uso destes metais em processos industriais (Cherfi *et al.*, 2014). A absorção destes elementos através da dieta pode ocorrer tanto nas suas formas inorgânicas, através de sais, como constituintes das moléculas orgânicas (proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e lípidos). Alguns metais pesados, nomeadamente o zinco, o cobre, o ferro e o selénio são essenciais para a saúde (Reboredo, 2012). Através da análise dos resultados da presente investigação (Tabela 3.9) identificou-se a presença de ferro, cobre e zinco.

Relativamente ao ferro o teor elevado que os frutos recolhidos nas dunas (9,98 mg/100 g de parte edível em peso fresco) e no pinhal (6,47 mg/100 g de parte edível em peso fresco) apresentaram demonstrou ser superior quando comparado à uva (12 mg/kg de parte edível em peso fresco) (INSA, 2010). A deficiência de ferro compromete a função das enzimas e proteínas sendo por isso imprescindível ao bom funcionamento do corpo humano. A dose recomendada diária para um adulto são 58,8 mg (Schumann *et al.*, 2007). A camarinha contém quantidades mais elevadas de ferro quando comparado com a uva branca (5 variedades) (1,2 mg/100 g de parte edível em peso fresco), framboesa (0,5 mg/100 g de parte edível em peso fresco) e morango (0,8 mg/100 g) (Tabela 3.10).

No que concerne ao teor de zinco, a camarinha apresentou valores semelhantes em ambas as localizações, pinhal (1,60 mg/100 g de parte edível em peso fresco) e dunas (1,81 mg/100 g de parte edível em peso fresco), comparativamente à uva branca (5 variedades) (0,1 mg/100 g de parte edível), framboesa (0,3 mg/100 g) e morango (0,1 mg/100 g). A ingestão diária recomendada (RDI) para este

mineral depende do sexo e da idade, contudo considerando um homem ou mulher adulta, o valor é 9,4 e 6,5 mg, respetivamente (Maret e Sandstead, 2006).

O cobre é um elemento essencial tanto para as plantas como para os animais estando envolvido em numerosas reações metabólicas. No que diz respeito às plantas, este elemento surge sob a forma reduzida ( $\text{Cu}^+$ ) e oxidada ( $\text{Cu}^{2+}$ ) podendo apresentar funções distintas como ativador ou componente estrutural de enzimas envolvidas em processos de oxidação/redução (Kim *et al.*, 2008). A concentração de cobre considerada adequada nos tecidos das plantas é de 6mg/kg em base de peso seco (Raven *et al.*, 2005). As fontes de contaminação dos ecossistemas podem ser distintas, desde a atividade industrial como por exemplo a exploração mineira até às práticas agrícolas onde se destaca o uso de fertilizantes. Através do estudo da concentração de metais pesados presentes nos fertilizantes inorgânicos (ureia, superfosfato de cálcio, sulfato de ferro e sulfato de cobre) evidenciou-se que o superfosfato de cálcio era aquele que continha concentrações mais elevadas de cádmio, cobalto, cobre e zinco (Gimeno-Garcia *et al.*, 1996). No estudo conduzido por Roba *et al.*, (2016) analisaram-se os teores de alguns elementos em hortaliças e frutas cultivadas ao redor de uma área de mineração na Roménia. O estudo concluiu que existiam efetivamente concentrações muito superiores às dos limites admissíveis de cádmio, cobre, chumbo e zinco, evidenciando assim que o consumo daqueles produtos deveria ser altamente restringido.

Na presente investigação foram verificadas concentrações elevadas de cobre nos frutos da espécie *Corema album*, recolhidos no pinhal (14,1 mg/100 g de peso seco) e nas dunas (14,9 mg/100 g de peso seco). O próprio pinhal está implantado em solo arenoso, sendo que esta zona dunar não aparenta estar sujeita a poluição atópica, a não ser que a deposição atmosférica do elemento seja a causa principal. O transporte de longa distância de vários elementos, como o cobre, cádmio, manganés, chumbo e zinco a partir de zonas rurais (Fergusson e Stewart, 1992) e o contributo de fogos florestais na emissão de vários elementos metálicos (Betha *et al.*, 2013), associados a material particulado (PM 2,5) com risco para a saúde pública, podem estar na origem da presente contaminação.

De acordo com Kabata-Pendias (2011), a concentração crítica de cobre em plantas apresenta valores que variam entre 1,5 e 2,0 mg/100 g em base de peso seco. Procedendo à comparação dos valores mencionados com os do presente estudo, concluiu-se que tanto os frutos provenientes das dunas como os do pinhal apresentam teores de cobre muito superiores. É de relevância mencionar que na maioria dos casos o excesso deste metal interfere com a absorção de macronutrientes, fotossíntese e consequentemente na redução da biomassa produzida (Mateos-Naranjo *et al.*, 2008; Nagajyoti *et al.*, 2010). É ainda possível verificar efeitos a nível celular que consistem na indução de danos a nível cloroplastidial com a concomitante disfunção dos fotossistemas (Reboredo e Henriques, 1991). Considerando o mencionado, existe a possibilidade da *Corema album* ser uma espécie que apresenta um elevado potencial de acumulação deste mineral, sem que o seu funcionamento fisiológico seja visivelmente afetado.

Após análise dos resultados globais, é importante o investimento na produção controlada e segura desta espécie com o intuito de assegurar a saúde de quem a consome, dado que a simples recolha no

habitat natural não garante a necessária segurança alimentar, que pode ser posta em causa pelos elevados teores de níquel ou mesmo cobre.

**Tabela 3.9** – Constituição mineral do fruto camarinha determinada com recurso à técnica de  $\mu$ -fluorescência de raios-X. As concentrações de todos os elementos encontram-se expressas em mg/100 g de fruto, excepto no potássio em que se encontram expressas em %.

Mineral	Peso Seco		Peso Fresco (*)	
	Média $\pm$ desvio			
	Pinhal	Dunas	Pinhal	Dunas
Ca (Cálcio)	539 $\pm$ 184 <sup>a</sup>	580 $\pm$ 230 <sup>a</sup>	77,6	91,2
Mn (Manganês)	17,6 $\pm$ 5,30 <sup>b</sup>	5,84 $\pm$ 4,10 <sup>a</sup>	2,53	0,92
Fe (Ferro)	45,0 $\pm$ 12,8 <sup>b</sup>	63,5 $\pm$ 30,6 <sup>a</sup>	6,47	9,98
Cu (Cobre)	14,1 $\pm$ 3,90 <sup>a</sup>	14,9 $\pm$ 5,00 <sup>a</sup>	2,03	2,34
Zn (Zinco)	11,1 $\pm$ 4,20 <sup>a</sup>	11,5 $\pm$ 3,80 <sup>a</sup>	1,60	1,81
Ni (Níquel)	2,87 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	2,22 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	0,41	0,35
Sr (Estrôncio)	6,31 $\pm$ 2,60 <sup>a</sup>	6,03 $\pm$ 2,80 <sup>a</sup>	0,91	0,95
Rb (Rubídio)	5,40 $\pm$ 2,70 <sup>a</sup>	3,17 $\pm$ 1,90 <sup>b</sup>	0,78	0,50
S (Enxofre)	4,78 $\pm$ 2,10	Não detetável	0,69	-
K (Potássio)	1,90 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,70 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,27	0,23

Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

(\*) Peso fresco de parte edível - As quantidades dos minerais em peso fresco foram calculadas por extrapolação, tendo em conta o teor de humidade (anexo 3).

**Tabela 3.10** – Concentrações (mg/100g de fruto edível) de Cálcio, Ferro e Zinco em diferentes frutos em peso fresco de parte edível.

Fruto	Cálcio	Ferro	Zinco
Uva branca ( 5 variedades) (INSA, 2010c)	10	1,2	0,1
Framboesa (INSA, 2010a)	26	0,5	0,3
Morango (INSA, 2010b)	25	0,8	0,1

## 3.2 - Capacidade antioxidante

### 3.2.1 - Quantificação dos compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais no presente trabalho foi determinada através do método de Folin–Ciocalteu. Este método foi aplicado em extratos do fruto e ainda em extratos de sumo. No decorrer da presente investigação foi também elaborada a quantificação dos compostos fenólicos totais de uma espécie de uva branca comercial, seguindo o mesmo procedimento da camarinha, de forma a obter uma validação da técnica e uma possível comparação entre ambos os frutos.

No que diz respeito à análise realizada ao fruto camarinha, após realização de análise estatística, constatou-se que não existem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre a quantificação dos compostos

fenólicos totais (mg GAE/ 100 g fruto fresco) dos frutos recolhidos no pinhal ( $104 \pm 50,2$ ) e nas dunas ( $106 \pm 26,5$ ) (Tabela 3.11). Na quantificação dos compostos fenólicos totais do sumo (mg GAE/ 100 mL de sumo) também não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), entre os frutos desenvolvidos no pinhal ( $79,1 \pm 27,4$ ) e nas dunas ( $64,9 \pm 20,7$ ). Os resultados obtidos sugerem, tal como era esperado, que o sumo apresenta um menor teor de compostos fenólicos quando comparado com o fruto inteiro, concluindo assim que também existem compostos fenólicos no restante fruto (semente e epiderme). Os resultados obtidos no trabalho conduzido por León-González *et al.*, (2013) ( $121 \pm 12$ ), revelaram ser semelhantes aos da presente investigação (Tabela 3.11).

Procedendo à comparação do teor de compostos fenólicos da camarinha e da uva, realizados no presente trabalho, concluiu-se que a camarinha possui valores mais elevados do que a uva ( $13,2 \pm 1,05$ ) (Tabela 3.11).

De acordo com a literatura, no estudo conduzido por Abe *et al.*, (2007), o teor total de compostos fenólicos (GAE/100g de fruto fresco) da uva branca moscato Embrapa, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, foi  $65,0 \pm 1,00$  concluindo assim ser superior ao do presente estudo (Tabela 3.11). A quantidade de compostos fenólicos presentes depende de diversos fatores tal como a espécie do fruto, as condições de crescimento e o grau de maturação no momento da colheita. As diferenças encontradas podem ter origem nos fatores anteriormente referidos.

No que concerne à comparação da camarinha fresca com o mirtilo, o conteúdo de compostos fenólicos é superior no mirtilo ( $348 \pm 34$ ) (Tabela 3.11) (Heinonen *et al.*, 1998; León-González *et al.*, 2013). O teor baixo de compostos fenólicos presentes na camarinha comparativamente ao do mirtilo pode ser explicado devido ao fato de ser um fruto de cor branca e conseqüentemente conter poucas antocianinas. Geralmente, as antocianinas representam uma grande porção dos compostos fenólicos presentes nos frutos que apresentem cor (León-González *et al.*, 2013). Para além da razão referida, as diferenças encontradas entre os compostos fenólicos dos diversos frutos devem-se à própria identidade e constituição de cada fruto.

**Tabela 3.11** - Comparação do teor de compostos fenólicos totais, entre diferentes frutos, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu.

Fruto	Teor total de compostos fenólicos. Média (mg GAE/ 100 g de fruto fresco) $\pm$ desvio padrão
Camarinha (presente estudo)	Pinhal – $104 \pm 50,2^a$
	Dunas – $106 \pm 26,5^a$
Uva (presente estudo)	$13,2 \pm 1,05$
Camarinha (León-González <i>et al.</i> , 2013)	$121 \pm 12$
Uva branca - Moscato Embrapa (Abe <i>et al.</i> , 2007)	$65,0 \pm 1,00$
Mirtilo (Heinonen <i>et al.</i> , 1998)	$348 \pm 34$

Médias com letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2 - Determinação da capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante do fruto foi estudada através do método de redução do radical livre ABTS recorrendo a ácido ascórbico como padrão. Este método foi utilizado relativamente ao estudo do fruto fresco inteiro e ao sumo do mesmo. Procedeu-se ainda à realização da mesma técnica, sob as mesmas condições, para determinar a capacidade antioxidante de uma uva branca comercial.

No que concerne à análise do fruto fresco, a capacidade antioxidante dos frutos (mg VCEAC/ 100 g de fruto fresco) desenvolvidos no pinhal ( $84,9 \pm 34,4$ ) foi ligeiramente superior à dos frutos desenvolvidos nas dunas ( $75,0 \pm 36,9$ ) (Tabela 3.12), contudo, não foram verificadas diferenças significativas entre ambos ( $P > 0,05$ ). Relativamente à capacidade antioxidante do sumo do fruto (mg VCEAC/ 100 mL de sumo), os resultados dão um valor ligeiramente superior nos frutos recolhidos nas dunas ( $54,8 \pm 16,9$ ) comparativamente aos do pinhal ( $45,8 \pm 17,4$ ) contudo tal como foi verificado no fruto inteiro, as diferenças não são estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

A capacidade antioxidante da camarinha, através do método ABTS, já tinha sido realizada anteriormente numa investigação conduzida por Andrade *et al.*, (2017). Neste estudo o padrão utilizado foi Trolox ( $\mu\text{mol TE/ 100 g amostra}$ ) e foram estudadas as polpas dos frutos de cor branca e dos frutos translúcidos. Os resultados demonstraram uma capacidade antioxidante mais elevada nos frutos de cor branca ( $6500 \pm 200$ ) comparativamente aos frutos translúcidos ( $5200 \pm 300$ ).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a uva analisada tem uma capacidade antioxidante inferior ( $38,7 \pm 3,21$ ) à do fruto camarinha (Tabela 3.12). Este resultado já era esperado, tendo em conta que a quantificação total de compostos fenólicos também revelou ser inferior na presente investigação. No estudo conduzido por Abe *et al.*, (2007), a capacidade antioxidante ( $\mu\text{mol TE/ 100 g amostra}$ ) da uva branca moscato Embrapa, realizada através do método de ABTS, foi  $270 \pm 1$ . É de realçar que apesar do método utilizado ser o mesmo, os valores não são comparáveis uma vez que o padrão utilizado foi diferente. Um outro estudo conduzido por Vedana *et al.*, (2008), investigou a capacidade antioxidante da uva *Vitis labrusca* (VCEAC/ 100 g de fruto), através do método de ABTS, utilizando o ácido ascórbico o padrão. Os resultados obtidos no estudo referido, apresentaram valores superiores ( $114,96 \pm 1,62$ ) comparativamente aos do presente estudo (Tabela 3.12). Sendo a *Vitis labrusca* uma uva tinta, é previsível que possua uma capacidade antioxidante superior, devido à elevada proporção de antocianinas (Vedana *et al.*, 2008).

Relativamente à comparação da atividade antioxidante da camarinha com outros pequenos frutos, nomeadamente o mirtilo ( $476,6 \pm 28,90$ ), esta apresenta uma capacidade antioxidante inferior, tal como já era esperado, tendo em conta os resultados do teor de compostos fenólicos (Floegel *et al.*, 2011) (Tabela 3.12).

**Tabela 3.12** - Comparação da capacidade antioxidante entre diferentes frutos determinada através do método de ABTS.

Fruto	Teor total de compostos fenólicos (mg VCEAC/ 100 g de fruto)
Camarinha (presente estudo)	Pinhal – 84,9 ± 34,4 <sup>a</sup>
	Dunas – 75,0 ± 36,9 <sup>a</sup>
Uva (presente estudo)	38,7 ± 3,21
Uva <i>Vitis labrusca</i> (Vedana <i>et al.</i> , 2008)	114,96 ± 1,62
Mirtilo (Floegel <i>et al.</i> , 2011)	476,6 ± 28,90

Médias com letras iguais na mesma coluna não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

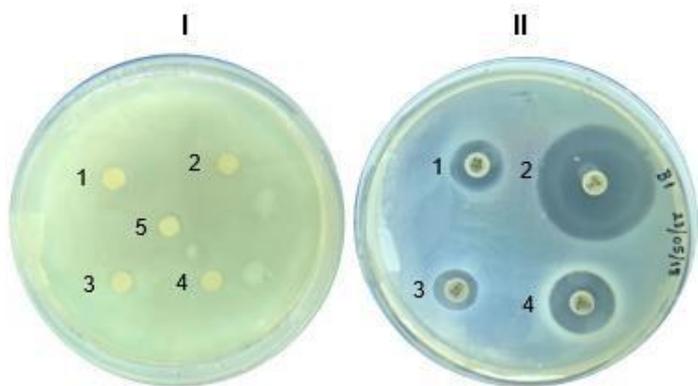
### 3.3 - Avaliação da Capacidade Antibacteriana

Os resultados obtidos permitiram verificar que o meio de cultura se manteve estéril nas placas de Petri não inoculadas e que as estirpes bacterianas se desenvolveram cobrindo a superfície das placas inoculadas. Na Tabela 3.13 encontram-se apresentados os resultados referentes à avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes selecionadas para o presente estudo.

A atividade antibacteriana do sumo de camarinha e do extrato de sumo em acetona / água (7:3) foi testada com cinco estirpes bacterianas selecionadas, pelo método de difusão em disco. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9. Através da análise destes resultados, é possível verificar que não existem quaisquer halos de inibição associados ao extrato de acetona do sumo do fruto e ao próprio sumo, sendo assim possível concluir que tendo em conta as condições em que o estudo decorreu, não foram encontrados indícios de atividade antibacteriana da camarinha nas estirpes selecionadas. Nas Figuras acima referidas, encontra-se também representado o efeito de cada antibiótico nas estirpes selecionadas, sendo que as medições dos halos de inibição, encontram-se expostos na Tabela 3.13, assim como a descrição da reação da estirpe a cada antibiótico. Relativamente ao controlo negativo (5), a acetona, pode ser observada alguma influência deste solvente apenas na estirpe *Enterococcus faecalis* (Figura 3.8), contudo, não é conclusivo, uma vez que não se observa influência nos extratos (3 e 4), podendo assim tratar-se de efeito do espalhamento da acetona.

**Tabela 3.13** - Avaliação da atividade antibacteriana dos antibióticos utilizados nas estirpes selecionadas.

	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
Ampicilina (AMP) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	17,0 ± 0,00 Susceptível	>40,0 Susceptível	8,0 ± 0,00 Resistente	22,0 ± 0,00 Susceptível	18,5 ± 0,70 Susceptível
Polimixina B (PB) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	12,0 ± 0,00 Susceptível	15,0 ± 0,00 Susceptível	9,00 ± 0,00 Intermédia	8,00 ± 0,00 Resistente	13,0 ± 1,41 Susceptível
Colistina (CT) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	11,0 ± 0,00 Susceptível	11,0 ± 0,00 Susceptível	8,00 ± 0,00 Resistente	8,00 ± 0,00 Resistente	9,50 ± 0,70 Intermédia
Ciprofloxacina (CIP) (halo de inibição (mm) ± desvio padrão)	30,0 ± 1,41 Susceptível	30,5 ± 0,71 Susceptível	26,0 ± 1,41 Susceptível	20, 0 ± 0,00 Intermédia	35,5 ± 0,70 Susceptível

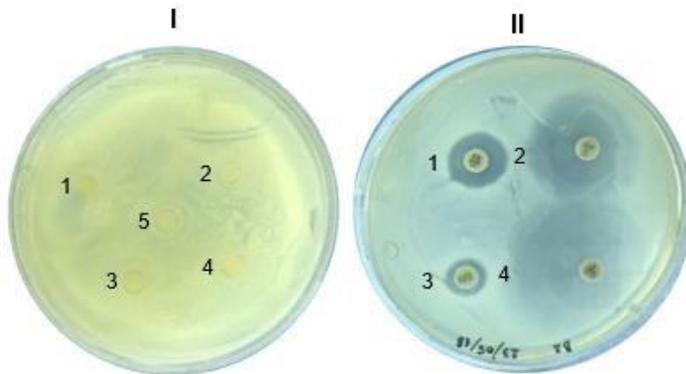


**Figura 3.5** - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe *Escherichia coli*.

1- 10 µL de sumo; 2- 20 µL de sumo; 3- 10 µL de extrato de sumo; 4- 20 µL de extrato de sumo; 5- 10 µL de acetona

II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe *Escherichia coli* (controlo positivo).

1- PB 300; 2- CIP 5; 3- CT 10; 4- AMP 10;

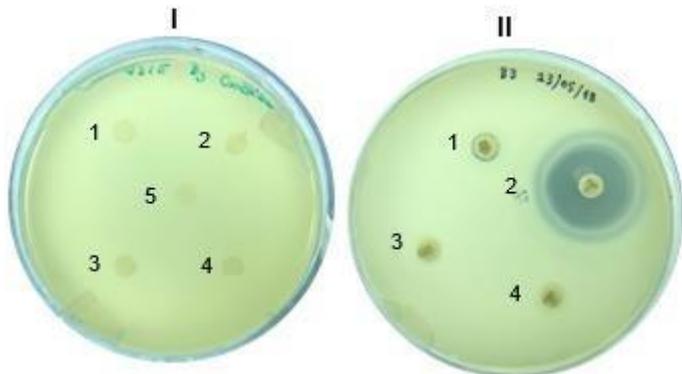


**Figura 3.6** - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe *Staphylococcus epidermidis*.

1- 10 µL de sumo; 2- 20 µL de sumo; 3- 10 µL de extrato de sumo; 4- 20 µL de extrato de sumo; 5- 10 µL de acetona

II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe *Staphylococcus epidermidis* (controlo positivo).

1- PB 300; 2- CIP 5; 3- CT 10; 4- AMP 10;

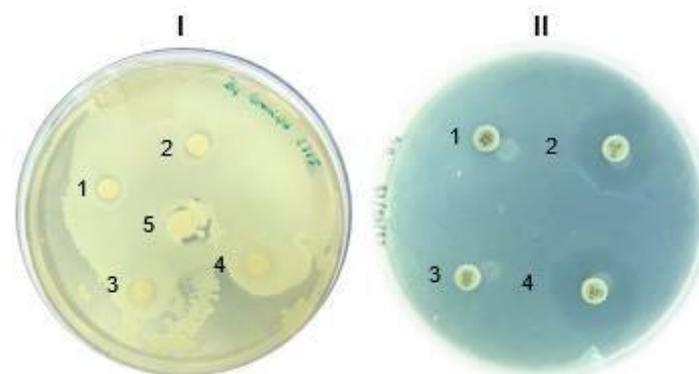


**Figura 3.7** - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe *Pseudomonas aeruginosa*.

1- 10 µL de sumo; 2- 20 µL de sumo; 3- 10 µL de extrato de sumo; 4- 20 µL de extrato de sumo; 5- 10 µL de acetona

II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe *Pseudomonas aeruginosa* (controlo positivo).

1- PB 300; 2- CIP 5; 3- CT 10; 4- AMP 10;

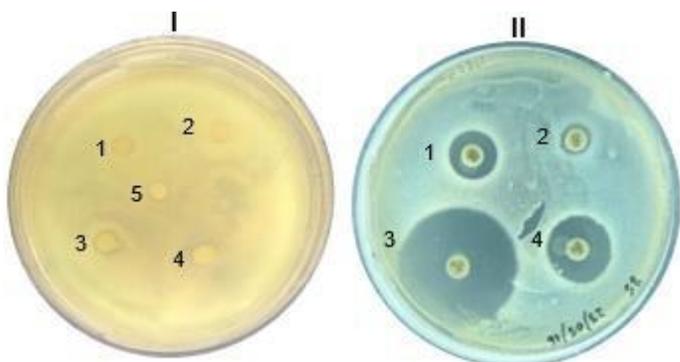


**Figura 3.8** - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe *Enterococcus faecalis*.

1- 10 µL de sumo; 2- 20 µL de sumo; 3- 10 µL de extrato de sumo; 4- 20 µL de extrato de sumo; 5- 10 µL de acetona

II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe *Enterococcus faecalis* (controlo positivo).

1- PB 300; 2- CIP 5; 3- CT 10; 4- AMP 10;



**Figura 3.9** - I. Efeito antimicrobiano do sumo do fruto e do extrato do sumo na estirpe *Staphylococcus aureus*.

1- 10 µL de sumo; 2- 20 µL de sumo; 3- 10 µL de extrato de sumo; 4- 20 µL de extrato de sumo; 5- 10 µL de acetona

II. Efeito antimicrobiano de diferentes antibióticos na estirpe *Staphylococcus aureus* (controlo positivo).

1- PB 300; 2- CIP 5; 3- CT 10; 4- AMP 10;

### 3.4 - Teste de viabilidade Celular – Ensaio de células CACO-2

A avaliação da toxicidade do extrato do sumo de camarinha sobre a viabilidade celular das células CACO-2 foi realizada. Procedeu-se à incubação das células com os extratos de camarinhas em 11 concentrações diferentes, para que fosse possível determinar a influência da concentração na viabilidade celular. Os resultados demonstraram o efeito do extrato de camarinha em diferentes concentrações na viabilidade celular das células CACO-2 após 6 horas de incubação (Tabela 3.14).

Os resultados obtidos relativamente à viabilidade celular das células CACO-2, quando expostas ao extrato de camarinha, foram analisados. De forma a obter um estudo mais detalhado, foram testadas diferentes concentrações, de 8,0 a 446, mg/mL, para avaliar a influência da concentração de extrato. Como é possível observar no gráfico da Figura 3.10, que representa a percentagem de viabilidade celular em função da concentração de extrato de camarinha, globalmente, concentrações mais elevadas do extrato conduziram a menor viabilidade celular. No que diz respeito às concentrações mais baixas, a concentração de 12,0 mg/mL demonstrou não incutir riscos a esta linha celular, resultando assim na manutenção de viabilidade elevada, tendo apresentado um valor de  $104 \pm 6,70\%$  quando comparada ao controlo, tal como se verificou com a concentração de 17,0 mg/mL, que conduziu também a uma viabilidade elevada ( $97,1 \pm 2,60\%$ ). É possível verificar na Figura 3.10 o decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração de extrato. As concentrações que apresentaram níveis de viabilidade menores foram as de 198 mg/ml ( $2,10 \pm 0,70\%$ ) e 297 mg/mL ( $4,00 \pm 0,30\%$ ). Tendo em conta o supracitado e examinando os resultados obtidos, a concentração 8,00 mg/mL deveria ser semelhante ou menor que a concentração 12,0 mg/mL, tal como, a concentração 446,0 mg/mL deveria registar valores mais baixos de viabilidade do que as concentrações 198 e 297 mg/mL. Assim, estes resultados inferem que a concentração mais baixa testada, 8,00 mg/mL não é a que apresenta menos toxicidade para as células, bem como a concentração 446 mg/mL, a mais elevada, não é a que apresenta maior toxicidade. Deste modo e de forma a clarificar estes valores e respetivo comportamento celular, seria necessário efetuar um maior número de ensaios a um maior número de concentrações, especialmente na gama de concentrações mais baixas. Adicionalmente, as soluções de maior concentração testadas, apresentavam também maior viscosidade, fator que pode ter influenciado a solubilidade de  $O_2$  e acessibilidade do  $O_2$  às células.

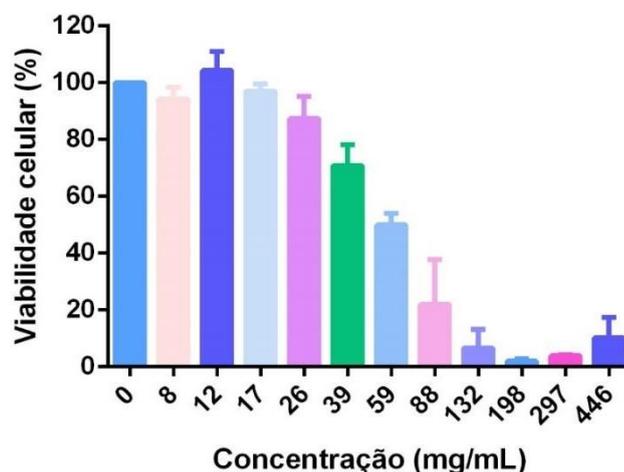
A concentração que corresponde, aproximadamente, ao sumo de camarinha é 59,0 mg/mL que apresenta um valor de viabilidade celular de  $49,9 \pm 4,16$ . Apesar deste resultado não ser muito elevado é necessário considerar alguns fatores. No caso da ingestão do sumo este não irá permanecer em contacto 6 horas com as células, podendo assim, verificar-se uma viabilidade celular mais elevada (Nunes *et al.*, 2014). Outro fator que pode contribuir para a baixa viabilidade celular verificada pode ser devido a alguns compostos contaminantes que se encontrem presentes e não devido aos compostos bioativos do fruto.

Os resultados assim obtidos sugerem que as concentrações que se apresentaram mais benéficas para as células (> 90% de viabilidade celular) são as concentrações de extrato mais baixas, pelo que devem

ser tidas em consideração em investigações futuras e na eventual elaboração de produtos a introduzir na dieta humana.

**Tabela 3.14** - Resultados de viabilidade celular das células CACO-2, avaliada pelo teste MTT, quando submetidas à presença (6 horas de incubação) de diferentes concentrações de sumo de camarinha.

Concentração (mg/mL)	Viabilidade Celular (% controlo)
0,00	100
8,00	94,2 ± 4,15
12,0	104 ± 6,70
17,0	97,1 ± 2,60
26,0	87,3 ± 7,77
39,0	70,8 ± 7,38
59,0	49,9 ± 4,16
88,0	21,9 ± 15,8
132	6,7 ± 6,5
198	2,06 ± 0,74
297	3,95 ± 0,32
446	10,3 ± 7,09



**Figura 3.10** - Gráfico de resultados de viabilidade celular das células CACO-2, avaliada pelo teste MTT, quando submetidas à presença (6 horas de incubação) de diferentes concentrações de sumo de camarinha.

### 3.5 - Incorporação da camarinha na dieta humana

#### 3.5.1 - Chocolate com incorporação do fruto camarinha

A inovação na tecnologia alimentar com recurso à incorporação de plantas silvestres comestíveis em diferentes produtos alimentares, pode assim ser uma das respostas para o problema de biodiversidade, sustentabilidade e nutrição. De forma a estudar a incorporação do fruto em produtos alimentares, foi realizada uma formulação de um chocolate com incorporação de camarinha (Figura 3.11). O produto final continha na sua constituição 99,4 % de chocolate e 0,6 % de camarinha. Sendo a aceitabilidade por parte do consumidor o parâmetro mais importante para estudar a viabilidade do produto, foi realizado um teste de consumidor a um painel internacional de consumidores, constituído por 60 indivíduos. Este teste era constituído por duas questões sendo uma referente à prova hedónica e a outra relacionada com a intenção de compra do produto.



Figura 3.11 - Chocolate com incorporação de sumo desidratado de camarinha.

### 3.5.1.1 - Teste de consumidor

#### Caracterização da amostra

A amostra da presente investigação foi constituída por 60 indivíduos, com idades compreendidas entre os 19 e 63 anos, com uma média de idades de 43 anos. A amostra teve como base 47 indivíduos do sexo feminino (87,5%) e 13 indivíduos do sexo masculino (12,5%), provenientes dos seguintes países: Alemanha (5,00%), Bósnia-Herzegovina (1,70%), Brasil (3,30%), Bulgária (6,70%), Croácia (3,30%), Eslováquia (6,75), Eslovénia (3,30%), Finlândia (11,7%), França (1,70%), Itália (3,30%), Letónia (3,30%), Lituânia (5,00%), Polónia (8,30%), Portugal (20,0%), República Checa (5,00%), Roménia (3,30%), Turquia (8,30%).

#### Prova Hedónica

Relativamente à questão da prova hedónica, os consumidores avaliaram o chocolate com recurso a uma escala de 1-9 em que o número 1 correspondia ao desagrado perante o produto e o 9 ao agrado. Deste modo, o chocolate controlo ( $6,87 \pm 1,72$ ) e de camarinha ( $6,68 \pm 1,88$ ) obtiveram notas semelhantes, não apresentando entre eles diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Assim os consumidores avaliaram ambos os chocolates como “gosto moderadamente”. Verifica-se que os consumidores que realizaram o inquérito, não eram muito apreciadores de chocolate com 70% cacau, o controlo, visto que não obteve uma boa classificação. Nos comentários realizados pelos mesmos, em alguns casos demonstraram muito interesse no produto devido à ligação ácida do fruto com o chocolate, sendo assim um produto dirigido a um nicho de mercado. Houve alguns consumidores que demonstraram não terem notado a diferença entre os dois produtos, sendo que futuramente deveria realizar-se outro teste de consumidor que contivesse várias formulações de chocolate com diferentes quantidades de fruto.

#### Intenção de Compra

No que concerne à pergunta de intenção de compra, os consumidores avaliaram a sua intenção de comprar o produto com recurso a uma escala de 1-5, onde 1 corresponde à intenção de comprar e 5 corresponde à intenção de não comprar. Os resultados verificados em ambos os produtos não apresentam diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) sendo que os consumidores demonstraram maior interesse na compra do controlo ( $2,33 \pm 1,17$ ) do que no chocolate com camarinha ( $2,65 \pm 1,40$ ). A intenção de compra dos chocolates controlo correspondeu à resposta “Provavelmente iria comprar” enquanto a intenção de compra dos chocolates com o fruto foi “talvez comprasse, talvez não”. Os resultados obtidos são justificados pelas razões mencionadas na análise das provas hedónicas. É

possível verificar ao longo dos anos uma maior curiosidade por parte dos consumidores em provar novos produtos alimentares e conseqüentemente em adquirir os mesmos, contudo, ainda existe alguma relutância, sendo necessário um tempo para habituação da população.

---

## **4 - Considerações Finais**

---

## Capítulo 4 - Considerações finais

A camarinha é um fruto sazonal que provém da espécie *Corema album*, que se distribui ao longo da costa da Península Ibérica. Este é um fruto com alguma história, contudo foi perdendo a notoriedade ao longo dos anos. Caracteriza-se por ser uma pequena baga geralmente com 3 sementes, de cor branca e com uma acidez típica, características essas que confere a este fruto potencial para ser introduzido no mercado dos pequenos frutos. As características anteriormente mencionadas são apetecíveis para alguns nichos de mercado, nomeadamente a gastronomia *gourmet*, o que pode enaltecer o valor deste fruto tanto a nível nacional como internacional. De forma a ser possível um maior reconhecimento deste fruto é importante o estudo desta planta de forma a avaliar o seu real potencial nutricional e gastronómico bem como as diversas formas de utilização. Para além das vantagens supracitadas é de realçar que esta é uma espécie que se desenvolve espontaneamente nos seus habitats, contribuindo assim para a sustentabilidade dos ecossistemas onde se insere, nomeadamente sistemas dunares e matas de pinheiro (*Pinus spp.*), sendo também nova fonte económica para as populações destas áreas. Sendo esta uma espécie que se desenvolve ao longo de toda a costa portuguesa, classificada como planta silvestre comestível, o seu não aproveitamento é um desperdício de um recurso natural e sustentável. É de salientar que esta espécie encontra algumas ameaças à sua propagação. Os incêndios florestais que deflagraram a 15 de outubro de 2017 no norte e centro de Portugal, destruíram uma parte da população, que existia na faixa Atlântica situada entre a Nazaré e Ovar. As plantas de onde foram retiradas as amostras para o presente trabalho, em Coimbra, desapareceram com a propagação do fogo. Devido ao aumento dos fatores que ameaçam esta espécie, torna-se cada vez mais urgente a aposta no estudo desta planta bem como na sua preservação. e propagação para restabelecimento do ecossistema afectado

O presente estudo constituiu assim um avanço para o conhecimento desta espécie da flora endémica e um incentivo para futuras investigações. No que concerne ao teor de humidade foi possível concluir que a camarinha é um fruto que possui um elevado teor de humidade, característica esta que se torna muito interessante tendo em conta a área em que se desenvolve, áreas costeiras. O pH baixo associado ao grau Brix baixo, que se traduzem na percepção ao consumidor como um fruto ácido, são também características próprias deste fruto e estão associados ao seu elevado teor de ácidos fenólicos. A análise elementar realizada ao fruto demonstrou um teor elevado de cálcio, ferro, zinco e cobre. Relativamente ao ferro, ao cálcio e ao zinco os resultados obtidos indicam um grande potencial nutricional deste fruto como fonte destes elementos, contudo, tendo sempre em atenção as doses ingeridas. A elevada quantidade de cobre presente nos frutos é um dado extremamente importante e que requer uma investigação mais aprofundada de forma a perceber as fontes de contaminação e os riscos para a saúde pública. O fato de ser uma planta que cresce de forma selvagem e em solos não controlados, possivelmente poluídos, pode ser a causa da provável prevalência do elevado teor destes minerais. A capacidade antioxidante do fruto foi também avaliada através da quantificação dos compostos fenólicos totais e da determinação da capacidade antioxidante. Os resultados demonstraram que o fruto possui alguns compostos fenólicos que detêm alguma capacidade antioxidante, que segundo estudos anteriormente realizados apresentam um grande potencial no

combate a doenças que tenham como causa ou como contributo o stress oxidativo, devido ao seu perfil de compostos fenólicos.

A caracterização da camarinha do ecossistema pinhal-dunas da região de Leiria permitiu perceber se o fruto de alguma das localizações, dunas ou pinhal, seria mais vantajoso relativamente ao perfil nutricional e à sua rentabilidade, atendendo à sua possível ingestão em fresco e à utilização em produtos alimentares. Os dados obtidos mostram que a qualidade dos frutos colhidos nas dunas (sem sombreamento) é semelhante à dos frutos colhidos no pinhal, apresentando como vantagem um maior teor de sólidos solúveis associados a um possível actividade metabólica mais elevada pela sua exposição solar. Em contrapartida, os frutos colhidos no pinhal, comparativamente aos frutos desenvolvidos nas dunas, têm a vantagem de apresentarem um teor de humidade mais elevado, o que poderá ser devido à menor exposição solar que estão sujeitos e à proteção pelas copas dos pinheiros. Desta forma é possível concluir que apesar de semelhantes, dependendo do uso final do fruto, tanto o pinhal como as dunas podem ser locais com muito interesse para o seu cultivo. A área ardida do pinhal de Leiria, torna-se agora um local sem sombreamento, apresentando assim uma exposição solar semelhante à das dunas, podendo desta forma constituir um local de elevado interesse para a plantação da espécie *Corema album*.

Nos resultados obtidos referentes ao estudo da actividade antimicrobiana do sumo do fruto e do extrato do sumo não foram encontrados indícios da existência de atividade antimicrobiana contra as estirpes selecionadas. O estudo realizado no presente trabalho, relativamente à atividade antimicrobiana do fruto, é pioneiro, sendo que não foram encontradas outras investigações neste âmbito. Os resultados obtidos na presente investigação induzem à necessidade de desenvolver estudos futuros nomeadamente na optimização da produção de extratos, do estudo dose/efeito e na utilização de outras estirpes de microrganismos (essencialmente bactérias e fungos) de forma a atingir resultados mais completos e robustos.

Após a caracterização físico-química do fruto e a caracterização do seu possível potencial antimicrobiano, houve ainda a necessidade de avaliar a toxicidade do extrato do sumo de camarinha sobre a viabilidade celular das células CACO-2, com o intuito de perceber em que concentrações o sumo poderá apresentar riscos à viabilidade celular. Estes estudos realizados foram preliminares e os resultados revelaram que as células continuam com viabilidade celular muito elevada, quando na presença de baixas concentrações de extratos, ou seja, nas concentrações em que ocorrem na natureza e em que podem ser absorvidos a nível gastrointestinal. Deste modo e para ser possível consolidar os resultados obtidos, serão necessários mais estudos futuramente.

Todas as análises realizadas ao longo do trabalho experimental contribuem para um maior conhecimento acerca do fruto e dos possíveis benefícios que pode acarretar quer a nível económico quer na saúde e diversidade alimentar. Quando se perspetiva a introdução no mercado de um novo produto alimentar, o conhecimento do produto e a divulgação das suas características são sempre factores impulsionadores para o consumo dos mesmos, contudo, é necessário estimular e informar os consumidores para a aquisição do produto em fresco ou de novos produtos alimentares em que se encontre. Este é todo um processo que passa pela inovação alimentar e pela necessidade que existe

na diversificação da dieta em benefício da saúde. Na tentativa de abordar a utilização do fruto num produto alimentar *gourmet*, neste estudo foi ainda desenvolvido um chocolate com incorporação de camarinha e realizado um teste de consumidor. Este produto de um modo geral, apresentou bons resultados na prova hedónica, sendo a acidez, conferida pelo fruto ao chocolate final, referida como uma vantagem e desvantagem, o que demonstra as particularidades associadas ao gosto individual dos diferentes consumidores.

---

## **5 - Perspetivas Futuras**

---

## Capítulo 5 - Perspetivas futuras

Através da realização do presente trabalho e da avaliação dos trabalhos anteriormente realizados foi possível concluir que a espécie *Corema album* apresenta um potencial que atualmente não se encontra explorado. De forma a perceber a real proporção deste potencial e colmatar as lacunas existentes é imprescindível o investimento na caracterização, no conhecimento e produção desta espécie.

A presente investigação deu origem à necessidade de desenvolvimento de novos projetos como intuito de alargar o conhecimento desta planta e do seu fruto bem como da sua utilização alimentar.

Relativamente ao teor de minerais e tendo em conta os resultados obtidos torna-se prioritário esclarecer de onde provém o elevado teor de minerais encontrados. A área geográfica do local de recolha de amostra pode também estar a influenciar os resultados da análise elementar. A realização de análises à água e ao solo poderão constituir uma investigação futura de forma a esclarecer a presente questão. Deverão ainda ser analisados frutos de diferentes áreas geográficas bem como os respetivos solos com o intuito de investigar possíveis diferenças relativamente ao teor de minerais. Concomitantemente devem ser realizadas análises às diferentes partes do fruto (epiderme e semente) com o intuito de averiguar se existe alguma zona com maior acumulação do mineral. Interessa também futuramente confirmar, se a restante flora da área em estudo apresenta igualmente concentrações elevadas de Cu nos diferentes órgãos ou se se trata de uma singularidade específica desta espécie.

No que diz respeito à atividade antimicrobiana, como trabalho futuro seria interessante testar novos extratos que incluam o fruto inteiro e outras partes da planta, nomeadamente as folhas, bem como realizar testes com outras estirpes bacterianas e outros microrganismos, como fungos. Para realização destes extratos poderão ser testados diferentes solventes, sendo que estes constituem um passo determinante na extração dos compostos fenólicos. Na presente investigação foi ainda testado o sumo do fruto, futuramente será interessante testar o sumo concentrado, através da remoção do teor aquoso, tendo como finalidade perceber se uma concentração mais elevada dos compostos se traduz em resultados diferentes.

No que concerne às análises realizadas com as células CACO-2, torna-se pertinente, futuramente, a realização de ensaios em monocamada permitindo assim o cálculo dos índices de perfusão, com o intuito de determinar a quantidade de cada composto absorvido a nível gastrointestinal e qual a respetiva velocidade de absorção. Estes estudos poderão ajudar a compreender a real utilização e mais-valia da ingestão do fruto e/ou seus transformados.

Sendo a camarinha um fruto com história e que antigamente era utilizado como planta medicinal, torna-se adequado a realização de um estudo etnobotânico junto das populações dos locais de desenvolvimento da planta, de onde poderá surgir mais conhecimento e a necessidade de planeamento de estudos futuros de forma a atingir um conhecimento fundamentado cientificamente (Gonzalez, 2001; Oliveira e Dale, 2012).

Paralelamente a toda esta investigação, a produção certificada desta espécie é o passo necessário para que a comercialização e a introdução deste fruto na alimentação se tornem possíveis. Existe ainda

a necessidade de muita investigação e projetos que incentivem o estudo da produção e rentabilização agrícola da espécie.

Relativamente à comercialização desta espécie torna-se necessário perceber as razões da diferente coloração (branca ou rosa), que os frutos podem adquirir. Os fatores implicados nesta temática são ainda muito discutidos entre os diversos estudos, tendo sido apontadas como possibilidades o grau de maturação e a diferença entre génotipos (Andrade *et al.*, 2017; León-González *et al.*, 2013; Oliveira e Dale, 2012). No presente trabalho a recolha dos frutos foi realizada de forma heterogénea de modo a atingir uma ampla caracterização do fruto, pelo que estudos futuros poderão estar focados na colheita de frutos que apresentem graus de maturação semelhantes, procedendo-se de seguida ao seu armazenamento a diferentes temperaturas durante diferentes intervalos de tempo. Os resultados obtidos poderão contribuir para o esclarecimento de algumas dúvidas relativamente à relação entre a cor e o grau de maturação e condições de armazenamento.

Outro fator que pode dificultar a adesão ao consumo do fruto, por parte do consumidor, podendo ser evidenciadas outras características/benefícios é a relação entre o seu tamanho e a existência de três sementes. A semente, tal como foi visto anteriormente, diminui a edibilidade do fruto tanto no seu consumo fresco como desidratado. Para haver uma comercialização e uma exportação com sucesso deste produto, seria necessário a implementação de investigações para a remoção da semente da camarinha. Neste contexto, temos vindo a assistir a um aumento no consumo e na exportação da uva de mesa sem grainha em detrimento da uva com grainha (Guerreiro, 2014). Esta é uma realidade que cada vez está mais presente, o consumidor é mais exigente e simplista e os mercados têm de o acompanhar para ser possível um comércio rentável.

O futuro cultivo de *Corema album* nas dunas adjacentes ao antigo pinhal e no antigo pinhal de Leiria, na região onde foram colhidas as amostras (100% de área ardida nos incêndios de outubro de 2017), pode revitalizar a região, para que exista produção de frutos para o consumo humano e para a produção de produtos alimentares diferenciadores. Atualmente em algumas feiras de produtos alimentares artesanais, verifica-se a venda de geleias de camarinha, produzidas por habitantes das áreas em que a planta se desenvolve. De forma a captar o interesse da população, nomeadamente o consumidor e o produtor, é importante realçar o potencial deste fruto, através da demonstração de alguns produtos que poderão surgir em que a camarinha se destaca como ingrediente principal. A criação de uma rede de produtores associada à transformação industrial de pequena escala poderá ser uma oportunidade de negócio para as populações rurais das zonas onde o fruto se desenvolve.

Na Figura 5.1 encontram-se esquematizados alguns dos produtos que podem surgir através da utilização deste fruto fresco ou desidratado. A variabilidade alimentar é uma característica da roda dos alimentos e constitui a indicação de que a utilização da camarinha poderá contribuir para uma alimentação diversificada. Devido às suas características físico-químicas, o seu uso no empratamento, como tempero, nomeadamente nas marinadas de carne e na preparação de bebidas alcoólicas, como gins e sangria, constitui também opções de utilização. Relativamente ao fruto desidratado sendo este um pequeno fruto de cor branca e elevada acidez, torna-se propício e apelativo o seu consumo como

fruto desidratado ou mesmo a sua inserção em chocolates e biscoitos. Este é um fruto que apresenta um elevado teor de humidade, sendo assim possível a sua utilização na produção de sumos.

O sumo de camarinha apresenta um grande potencial devido à sua elevada acidez e ao sabor característico. Tal como é possível observar na Figura 5.1, a incorporação do fruto em sumos pode tornar-se uma vantagem devido ao sabor característico que irá conferir ao produto e também devido ao potencial que apresenta como protetor contra a oxidação. O pH baixo que o sumo do fruto apresenta pode tornar-se determinante no sucesso de alguns produtos tais como temperos para saladas, marinadas e queijo tipo *cottage* (com a utilização do sumo de camarinha como fator determinante no início da coagulação da proteína láctica). Existem muitos mais produtos que podem surgir aliando a frescura e as propriedades deste fruto à inovação alimentar e ao desenvolvimento de novos produtos. Apenas desta forma estaremos a apelar ao conhecimento das nossas espécies, à sustentabilidade e à preservação das mesmas

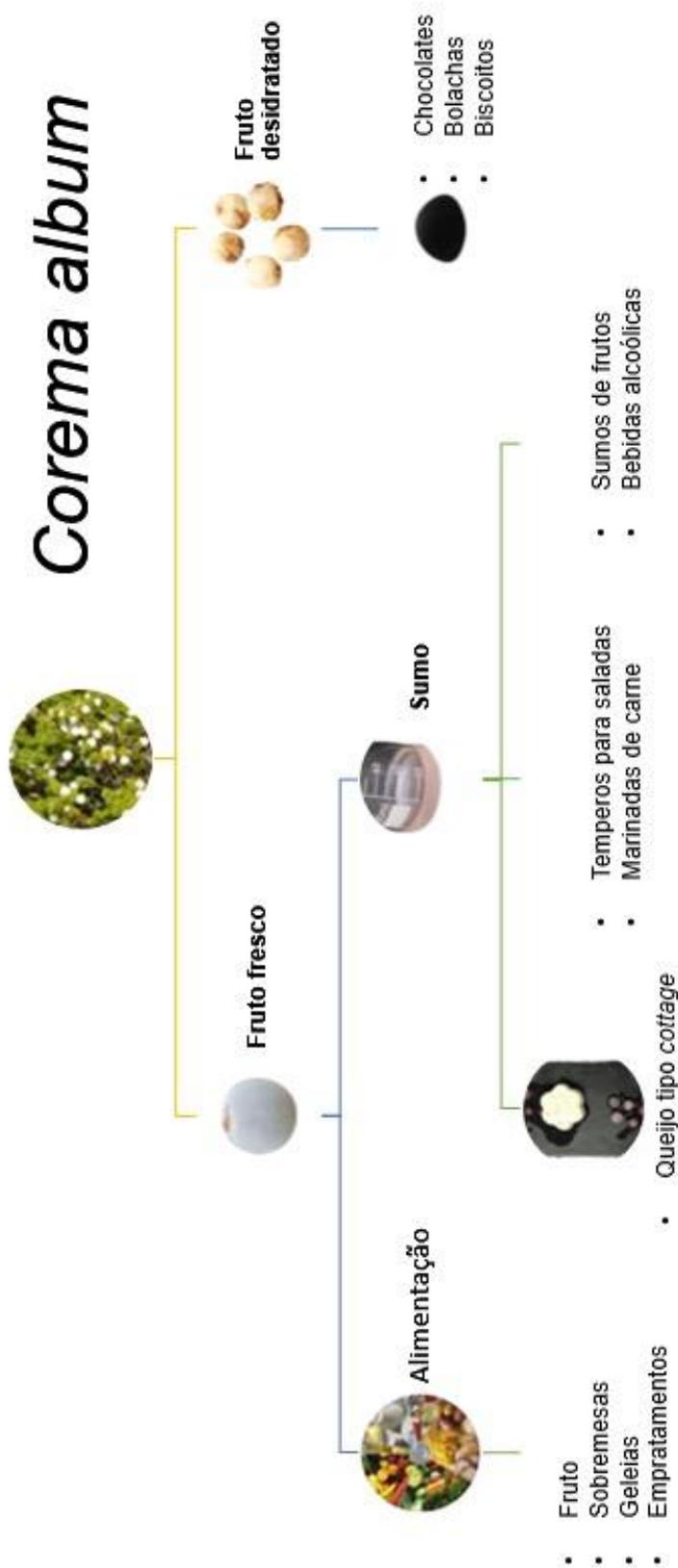


Figura 5.1 – Potenciais produtos para introdução de camarinha na dieta humana.



---

## **6 - Referências Bibliográficas**

---

## Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

- Abe, L.T., Mota, R.V., Lajolo, F.M., Genovese, M.I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), 394-400.
- Alothman, M., Rajeev, B., Karim, A.A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-768.
- 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(6), 989-998.
- Andrade, S.C., Gonçalves, F.J.A., Guiné, R.P.F. (2015). Physical-chemical properties of *Corema album* (white crowsberry or camarinha). Apresentado in Proceedings of ICEUBI2015 – International Conference of Engineering: Engineering for Society, Covilhã, Portugal, pp. 8.
- Andrade, S.C., Guiné, R.P.F., Gonçalves, F.J.A. (2017). Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in white crowsberry (*Corema album*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1936-1946.
- Araújo, P., Carapeto, A., Clamote, F., Porto, M., Gomes, C., Holyoak, D., Pereira, A., Almeida, J. (2018). *Corema album* (L.) D.Don - mapa de distribuição. Flora-On: Flora de Portugal Interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://flora-on.pt/#/1corema+album>. [Acedido em junho, 2018].
- Arena, M.E. (2008). Fruit growth and composition of two *Ribes rubrum* varieties growing in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6(1), 114-118.
- Balasundram, N. (2006). Food Chemistry Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Barrena, R., García, T., Sánchez, M. (2015). Analysis of personal and cultural values as key determinants of novel food acceptance. Application to an ethnic product. *Appetite*, 87, 205-214.
- Bednarczyk-Cwynar, B., Ruszkowski, P., Bobkiewicz-Kozłowska, T., Zaprutko, L. (2016). Oleanolic Acid A-lactams Inhibit the Growth of HeLa, KB, MCF-7 and Hep-G2 Cancer Cell Lines at Micromolar Concentrations. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(5), 579-592.
- Benito, P., Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability an updated review. *Nutrition Research*, 18(3), 581-603.
- Betha, R., Pradani, M., Lestari, P., Joshi, U.M., Reid, J.S., Balasubramanian, R. (2013). Chemical speciation of trace metals emitted from Indonesian peat fires for health risk assessment. *Atmospheric Research*, 122, 571-578.
- Bicho, R.C. (2015). Regulamentação Europeia sobre Novel Food. Identificação de plantas silvestres comestíveis nacionais como não novo alimento. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar - Qualidade e Segurança Alimentar - Instituto Superior Agronomia, Lisboa, Portugal, pp. 118.

Brenna, O.V., Pagliarini, E. (2001). Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4841-4844.

Bruker. (2018). Espectrometria Micro-FRX com máxima velocidade e exatidão. <https://www.bruker.com/pt/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/overview.html>. [Acedido em setembro, 2018].

Bugalhão, J., Queiroz, P.F. (2005). Testemunhos do consumo de frutos no período islâmico, em Lisboa. In: Al-Ándalus Espaço de Mudança. Balanço de 25 anos de História e Arqueologia Medievais. Seminário internacional, Campo Arqueológico de Mértola, Mértola, Portugal, pp.18.

Calviño-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(5), 775-784.

Calviño-Cancela, M. (2004). Ingestion and dispersal: Direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae). *Acta Oecologica*, 26(1), 55-64.

Calviño-Cancela, M. (2005). Fruit consumers and seed dispersers of the rare shrub *Corema album*, Empetraceae in coastal sand dunes. *Revue d'Ecologie*, 60(2), 97-106.

Chen, Y., Hu, W., Huang, B., Weindorf, D.C., Rajan, N., Liu, X., Niedermann, S. (2013). Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 324-330.

Cherfi, A., Abdoun, S., Gaci, O. (2014). Food survey: Levels and potential health risks of chromium, lead, zinc and copper content in fruits and vegetables consumed in Algeria. *Food and Chemical Toxicology*, 70, 48-53.

Clavijo, A., Diaz Barradas, M.C., 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 de Biologia (Lisboa)*, 20, 109-120.

Conceição, F. (2016). Síntese de derivados semi-sintéticos do ácido oleanólico com vista à atividade antitumoral. Tese de mestrado em Química Medicinal, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, pp. 91.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.

Cunha, A. P. (2014). Farmacognosia e fitoquímica 4.<sup>a</sup> edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, pp.674.

DGS. (2018). Cálcio. <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/nutriente/calcio/>. [Acedido em setembro, 2018].

- Díaz-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, 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(5), 780-787.
- Drausal, B.S., Rapoport, E.H. (2001). Edible plants. In: Encyclopedia of biodiversity. Levin S. (ed.) Academic Press, Nova Iorque, Estados Unidos, pp. 375-382.
- FAO. (1992). Productos forestales no madereros; posibilidades futuras. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Roma, Itália, pp.45.
- FAO. (2009). The market for organic and fair-trade cocoa. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/organicexports/docs/Market\\_Organic\\_FT\\_Cocoa.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/organicexports/docs/Market_Organic_FT_Cocoa.pdf). [Acedido em junho, 2018]
- Fedriani, J. M., Delibes, M. (2009). Functional diversity in fruit-frugivore interactions: A field experiment with Mediterranean mammals. *Ecography*, 32(6), 983-992.
- Fergusson, J.E., Stewart, C. (1992). The transport of airborne trace elements, copper, lead, cadmium, zinc and manganese from a city into rural areas. *Science of the Total Environment*, 121, 247-269.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751-760.
- Ferreira, A., Candeias, M. (2005). Secagem solar de frutos e plantas aromáticas. *Revista de Ciências Agrárias*, 28, 363-369.
- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 32-39.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S.I., Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS / DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Fonseca, M.S., Santos, V.Q., Cunha, M.A.A. (2015). Determinação de Compostos Fenólicos, Antocianinas e Atividade Antioxidante de Mirtilos em Protocolos com Diferentes Agentes Extratores. V simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - Universidade Estadual de Londrina, Brasil.
- Fu, S., Davies, M.J., Stocker, R., Dean, R.T. (1998). Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advance human atherosclerotic plaque. *Biochemical Journal*, 333(3), 519-525.
- Giao, M.S., Gonzalez-Sanjosé, M.L., Rivero-Perez, M.D., Pereira, C.I., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2638-2647.

- Gimeno-García, E., Andreu, V., Boluda, R. (1996). Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental Pollution*, 92(1), 19-25.
- Gonzalez, G. (2001). Guia de Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. *Mundi-Prensa*, Madrid, Espanha. pp. 1727.
- Granado-Serrano, A.B., Martín, M.A., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., Ramos, S. (2007). Molecular Mechanisms of (-)-Epicatechin and Chlorogenic Acid on the Regulation of the Apoptotic and Survival/Proliferation Pathways in a Human Hepatoma Cell Line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 2020-2027.
- Guerreiro, P. (2014). A internacionalização da herdade Vale da Rosa: Estudo de caso. Tese de mestrado em gestão - ISCTE Business School, Lisboa, Portugal. pp. 95.
- Guiné, R.P.F., Lima, M.J.R., Pato, L., Correia, A.C., Gonçalves, F., Costa, E., Santos, S. (2010). Consumer study and sensorial evaluation of a newly developed spicy strawberry syrup. *International Journal of Academic Research*, 2, 173-178.
- 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(1), 119-128.
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F. Z., Benmansour, A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 415-422.
- Hancock, J.F. (1999). Strawberries. *Cabi Publishing*, Wallingford, Reino Unido. pp. 237.
- Harrill, R. (1998). Using a refractometer to test the quality of fruits & vegetables. <http://www.nutritionsecurity.org/PDF/Brix.pdf>. [Acedido em junho, 2018].
- Heinonen, I.M., Lehtonen, P.J., Hopia, A.I. (1998). Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 25-31.
- Herrera, C.M. (1967). Vertebrate-Dispersed Plants of the Iberian Peninsula: A Study of Fruit Characteristics. *Ecological Monographs*, 57(4), 305-331.
- INSA. (2010a). Detalhe do alimento - framboesa. <http://www2.insa.pt/SITES/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS653>. [Acedido em setembro, 2018].
- INSA. (2010b). Detalhe do alimento – morango. <http://www2.insa.pt/SITES/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS676>. [Acedido em setembro, 2018].

- INSA. (2010c). Detalhe do alimento - uva branca (5 variedades). <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetailAlimento.aspx?ID=IS693>. [Acedido em setembro, 2018].
- INSA. (2016). Parte edível. <http://portfir.insa.pt/foodcomp/ediblepart>. [Acedido em maio, 2018].
- IPMA. (2017). Balanço Climático Preliminar do Ano 2017 - Portugal Continental. [http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20171229/fVhUCTqvyGjAJEZ EUlwS/cli\\_20170101\\_20171229\\_pcl\\_aa\\_co\\_pt.pdf](http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20171229/fVhUCTqvyGjAJEZ EUlwS/cli_20170101_20171229_pcl_aa_co_pt.pdf). [Acedido em julho, 2018].
- IUPAC. (2018). pH. <https://goldbook.iupac.org/html/P/P04524.html>. [Acedido em maio, 2018].
- Jaakola, L., Maatta-Riihinen, K., Karenlampi, S., Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218(5), 721-728.
- Jie, L., Xiao-ding, L., Yun, Z., Zheng-dong, Z., Zhi-ya, Q., Meng, L., Shao-hua, Z., Shuo, L., Meng, W., Lu, Q. (2013). Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1429-1434.
- Kabata-Pendias, A. (2011). Trace elements in soils and plants 4<sup>o</sup> edição. *CRC Press*, Boca Raton, Flórida, pp. 403.
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., Camp, J. (2015). Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal CACO-2 Cells - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21555-21574.
- Khalifa, I., Zhu, W., Kai-kai, L., Chun-mei, L. (2018). Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: Compositions, metabolism, health benefits, and stability - A structural review. *Journal of Functional Foods*, 40 (1), 28-43.
- Kim, E., Nevitt, T., Thiele, D.J. (2008). Mechanisms of copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, 4, 176-185.
- King, A., Young, G. (1993). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99 (2), 213-218.
- Konovalchuk, V. (2009). White fruited European Lowbush blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in natural habitat in Ukraine. *Acta Horticulturae*, 810, 217-222.
- Lachance, P.A., Nakat, Z., Jeong, W.S. (2001). Antioxidants: *An Intergative Approach*. *Nutrition*, 17(10), 835-838.
- Larrinaga, A. R., Guitián, P. (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*, 118(4), 940-950.
- Leal, M.L., Alves, R.P., Hanazaki, N. (2018). Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 14(1), 6.

León-gonzález, A. J., Mateos, R., Ramos, S., Martín, M. A., Sarriá, B., Martín-cordero, C., López-Lazaro, M., Goya, L. (2012). Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*. *Food Research International*, 49(2), 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(1), 58-63.

Leonti, M. (2012). The co-evolutionary perspective of the food-medicine continuum and wild gathered and cultivated vegetables. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(7), 1295-1302.

Liobikas, J., Majiene, D., Trumbeckaite, S., Kursvietiene, L., Masteikova, R., Kopustinskiene, D. M., Savickas, A., Bernatoniene, J. (2011). Uncoupling and antioxidant effects of ursolic acid in isolated rat heart mitochondria. *Journal of Natural Products*, 74 (7), 1640-1644.

Lopes, M.L.M., Miguel, M.A.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L. (2016). Grape juice obtained using steam extraction and other small-scale extraction methods: phenolic content, antioxidant capacity and stability during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(7), 1696-1702.

Maatta-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P.H., González-Paramás, A.M., Torronen, A.R. (2004). Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4477-4486.

Macedo, D. (2015). Investigating the neuroprotective effect of plant (poly)phenols in models of Parkinson's disease. Tese de doutoramento em Bioquímica - Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. pp. 231.

Maina, J. (2018). Analysis of the factors that determine food acceptability. *The Pharma Innovation Journal*, 7(5), 253-257.

Marchante, H., Marchante, E., Freitas, H. (2003). Invasion of the Portuguese dune ecosystems by the exotic species *Acacia longifolia* (Andrews) Willd.: effects at the community level. In: *Plant Invasion: Ecological Threats and Management Solutions*. Child, J.H., Brock, J.H., Brundu, G., Prach, K., Pyšek, P., Wade, P.M., Williamson, M (eds). *Backhuys Publishers*, Holanda, pp. 75-85.

Maret, W., Sandstead, H.H. (2006). Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(1), 3-18.

Marques, E.M.M.S. (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. pp. 79.

Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T. (2015). *Sensory Evaluation Techniques 5.ª edição*. *CRC Press*, Boca Raton, Flórida, pp.620.

Mennen, L.I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 326-329.

Mlcek, J., Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22(10), 561-569.

Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., Figueroa, M.E. (2008). Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research*, 66, 459-465.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental and Chemical Letters*, 8, 199-216.

Nascimento, G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 24-256.

Neves, L. C., Alencar, S. M., Carpes, S.T. (2009). Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 107-110.

Nunes, R., Rodrigues, S., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Grenha, A., Carvalho, I. (2014). Effect of *Erica australis* extract on CACO-2 cells, fibroblasts and selected pathogenic bacteria responsible for wound infection. *Industrial Crops and Products*, 52, 99-104.

Oliveira, P. B., Valdivieso, T., Trindade, S.C., Evaristo, I., Nóbrega, F., Lima, A.L., Silva, R.S., Santos, M., Magalhães, T., Lisboa, A., Oliveira, C.M. (2016). Os primeiros passos na investigação em *Corema album* (camarinha). *Vida Rural*, 29-31.

Oliveira, P.B., Dale, A. (2012). *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry—a new crop. *Journal of Berry Research*, 2(3), 123-133.

Olthof, M. R., Hollman, P.C., Katan, M.B. (2018). Human Nutrition and Metabolism Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*, 131(1), 66-71.

Parada, J., Aguilera, J.M. (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21-32.

Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., Miguel, E.S., Morales, R. (2007). Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(27).

Parikh, N.R., Mandal, A., Bhatia, D., Siveen, K.S., Sethi, G., Bishayee, A. (2014). Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochemistry Reviews*, 13(4), 793-810.

Pereira, R.J., Cardoso, M.G. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4), 146-152.

- Pimpão, R.C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R.B., Santos, C.N. (2013). Analysis of Phenolic Compounds in Portuguese Wild and Commercial Berries after Multienzyme Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4053-4062.
- Pinela, J., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2017). Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 165–188.
- Pinto, P.M.Z., Morais, A.M.M.B (2000). Boas Práticas para Conservação de Produtos Hortofrutícolas - Associação para a escola superior de biotecnologia da universidade católica. Serviços de Edição da ESB/UCP, Porto, Portugal. pp. 32.
- Pollier, J., Goossens, A. (2012). Oleanolic acid. *Phytochemistry*, 77, 10-15.
- Pubchem. (2018). Phenol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenol#section=Top>. [Acedido em abril, 2018].
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Rambla, F.J., Garrigues, S., de la Guardia, M. (1997). PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, 344(1-2), 41-53.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2005). Biology of Plants 7ª edição. *W.H. Freeman and Company Publishers*, Nova Iorque, Estados Unidos, pp. 686.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.
- Reboredo, F., Henriques, F. (1991). Some observations on the leaf ultrastructure of *Halimione portulacoides* (L.) Aellen grown in a medium containing copper. *Journal of Plant Physiology*, 137, 717-722.
- Reboredo, F. (2012). Zinc compartmentation in *Halimione portulacoides* (L.) Aellen and some effects on leaf ultrastructure. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2644-2657.
- Rederural. (2014). O mercado dos pequenos frutos. <http://www.rederural.gov.pt/centro-de-recursos/send/2-agricultura-agroindustria/152-o-mercado-dos-pequenos-frutos>. [Acedido em maio, 2018].
- Ribeiro, V.S., Leitão, E.A., 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, 39–47.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(4), 375-383.

- Roba, C., Rosu, C., Pisteu, I., Ozunu, A., Baciuc, C. (2016). Heavy metal content in vegetables and fruits cultivated in Baia Mare mining area (Romania) and health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 6062-6073.
- Romano, A., Gonçalves, S. (2015). *Corema album* (L.) D. Don. In: Plantas silvestres comestíveis do Algarve, Universidade do Algarve, Faro, pp. 46-47.
- Romajaro, A., Botella, M.Á., Obón, C., Pretel, M.T. (2013). Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 944-952.
- Sajdakowska, M., Jankowski, P., Gutkowska, K., Guzek, D., Żakowska-Biemans, S., Ozimek, I. (2018). Consumer acceptance of innovations in food: A survey among Polish consumers. *Journal of Consumer Behaviour*, 17(3), 1-15.
- Sánchez-Pico, Á., León-González, A., Martín-Cordero, C., Daga, R. (2014). Screening for natural anticancer agents using fission yeast bioassay. *Phytochemistry Letters*, 8(1), 184-189.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403 (1-2), 136-138.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schumann, K., Ertle, T., Szegner, B., Elsenhans, B., Solomons, N.W. (2007). On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(3), 147-168.
- Sehgal, S. (2018). Role of Consumers in Innovation of Novel Food and Beverages. In: Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries. *Springer*, 289-296.
- Senhor, R.F., Souza, P.A., Carvalho, J.N., Silval, F.L., Maryellencampos, S. (2009). Fatores de pré e pós-colheita que afetam os frutos e hortaliças em pós-colheita. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 4(3), 13-21.
- Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., Aggarwal, B.B. (2003). Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Research*, 63(15), 4375-4383.
- Sigma-Aldrich. (2016). Cell Proliferation Kit I (MTT). <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=pt&region=PT>. [Acedido em agosto, 2018].
- Sigma-Aldrich. (2018a). Caffeic acid. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/caffeicacid1801633139511?lang=pt&region=PT>. [Acedido em agosto, 2018].

Sigma-Aldrich. (2018b). Chlorogenic acid. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/chlorogenicacid3543132797911?lang=pt&region=PT>. [Acedido em abril, 2018].

Silva, C.S., Nunes, P.O., Mescouto, C.S.T., Muller, R.C.S., Palheta, D.C., Fernandes, K.G. (2010). Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea Martius* como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 751-754.

Silva, M.L.C., Costa, R.S., Santana, A.S., Koblitz, M.G.B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-682.

Sousa, M.B. (2007). Mirtilo - Qualidade pós-colheita. Edição no âmbito do Projecto PO Agro DE&D nº 556 "Diversificação da produção frutícola com novas espécies e tecnologias que assegurem a qualidade agro-alimentar". *Agro*, 8.

Stevens, P. F. (2017). Angiosperm Phylogeny Website - ERICALES. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. [Acedido em março, 2018].

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.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., e Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-48.

Vedana, M.I.S., Ziemer, C., Miguel, O.G., Portella, A., Candido, L.M.B. (2008). Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. *Alimentos e Nutrição*, 19(2), 159-165.

Wang, C., Zuo, Y. (2011). Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry*, 128(2), 562-568.

Wichchukit, S., O'Mahony, M. (2015). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2167-2178.

World Health Organization (WHO). (2018). Antimicrobial resistance. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. [Acedido em junho, 2018].

Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., Aggarwal, B.B. (2010). Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins*, 10(2), 2428-2466.

Zunzunegui, M., Díaz Barradas, M.C.D., Clavijo, A., Alvarez Cansino, L., Ain Lhout, F., García Novo, F. (2006). Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae). *Plant Ecology*, 183(1), 35-46.



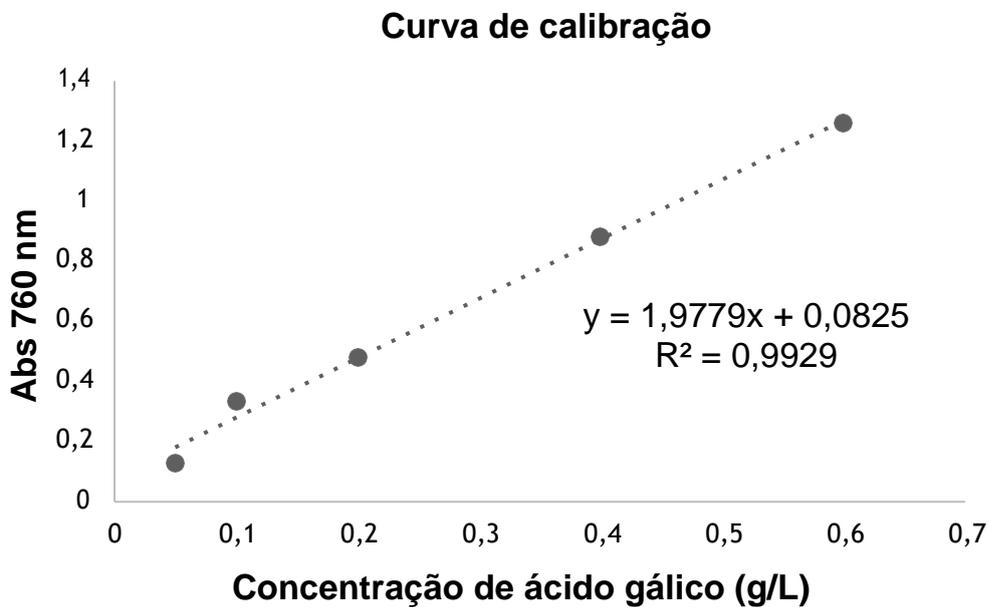
---

## **7 - Anexos**

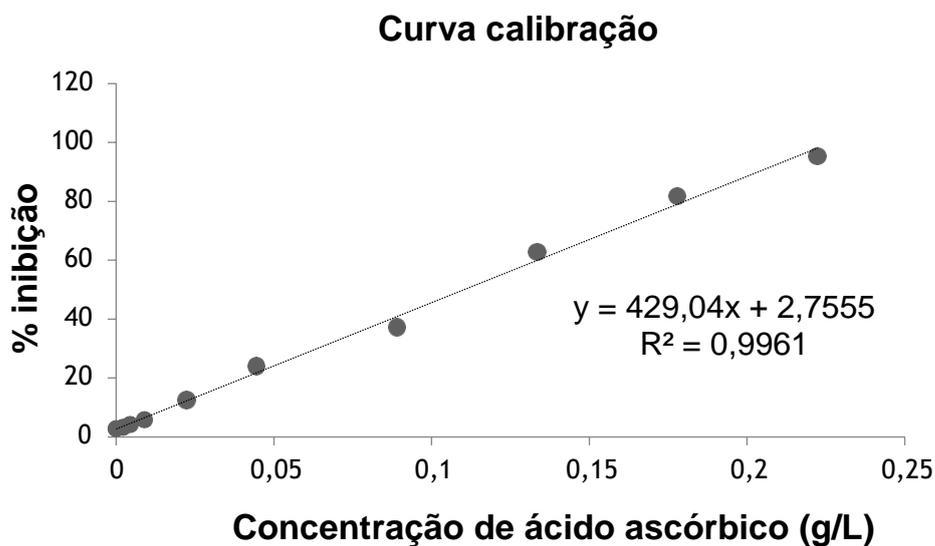
---

## Anexo

### Anexo 1. Curva de calibração do ácido gálico



### Anexo 2. Curva de calibração do ácido ascórbico



Anexo 3. Tabela de valores de constituição da camarinha

	<b>Pinhal</b>	<b>Dunas</b>
Teor de humidade	85,90%	83,79%
Epiderme e outros	7,43%	8,52%
Sementes	6,67%	7,74%