



**Extratos fenólicos de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench:
caracterização química, atividade antioxidante e
encapsulação para utilização em dermocosmética**

Marisa Ramos Barroso

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e
à Universidade de Salamanca, para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais.*

Orientado por
Isabel Cristina F.R. Ferreira
Maria Filomena Barreiro
Ana Maria Pinto Carvalho

Bragança
2013

À minha avó...(10/07/1940 a 26/06/2010)

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Isabel Ferreira, pela presença constante, por dar sempre uma resposta rápida às minhas dúvidas apesar do seu extremo trabalho, por nunca me desmotivar quando me alertava de falhas, pela humildade nas palavras que nunca me subestimaram ou fizeram desistir; Professora Doutora Filomena Barreiro, pela orientação dedicada; e Professora Doutora Ana M^a Carvalho, pela orientação e sorriso “maternal” carinhoso que sempre me transmitiu, pelos “raspanetes” que me fizeram refletir e olhar para a frente.

Fico grata às três por tudo, pela força e conhecimento que sempre me transmitiram, pela disponibilidade, pela confiança, que sempre depositaram em mim, por me fazerem crescer como profissional e sobretudo pela amizade. Considero-me uma privilegiada em tê-las tido como orientadoras no desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada a todos que trabalham no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, em especial à Lillian, à Ângela, à Carla e à Eliana.

Ao Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE), obrigada Isabel e Mariana.

Aos meus amigos de sempre e aos mais recentes, aos que presenciaram de perto esta etapa da minha vida, e que sempre tiveram uma palavra de encorajamento a dar.

À minha “família” de licenciatura que embora tivessem deixado esta cidade, continuam presentes na minha vida. Obrigada por acreditarem em mim! Pela força e por nunca me deixarem sentir só.

Obrigada à minha família por tudo, por acreditarem em mim, e pelo orgulho que manifestam quando me nomeiam. Como diz o ditado: *Deus escreve direito por linhas tortas*. Eu caí mas levantei-me e recuperei a minha vida, os meus estudos, os meus sonhos, recebendo o melhor que a vida me deu...o meu filho.

Ao meu filho, o meu grande amor. É a ti que eu devo acima de tudo esta vitória, porque foste tu que “aturaste” os meus stresses, as minhas dificuldades e soubeste ouvir,

entender e apoiar. Foste tu que nunca me falhaste e tiveste sempre um sorriso, uma palavra, uma mão para me dar, um abraço, um carinho, um beijinho...tudo o que foi preciso para eu me levantar e seguir. Porque foste tu que viste o sorriso e a lágrima. Obrigada meu amor...

E a **ti**, que durante esta etapa vincaste o apoio, a dedicação, o abraço, o carinho, o tudo... que eu precisava para me sentir completa e feliz. Os sorrisos dizem tudo, tu vieste carregado deles. A cumplicidade fala por si, por isso deixamos de lado as palavras e falamos ao som do silêncio.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo explorar o potencial antioxidante dos compostos fenólicos das sumidades floridas (capítulos e brácteas e os 15 cm terminais dos caules com folhas que suportam as inflorescências) de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench para aplicações cosméticas e envolveu as seguintes etapas: caracterização química, microencapsulação e incorporação num hidratante.

As propriedades antioxidantes do extrato hidroalcoólico e da decocção foram avaliadas por métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais). A composição fenólica foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a deteção de díodos e espetrometria de massa com ionização por spray de eletrões (HPLC-DAD-ESI/MS).

Foram identificados dezoito compostos fenólicos diferentes, sendo o ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico e a miricetina 7-*O*-acetil-hexósido o ácido fenólico e o flavonoide mais abundante, respetivamente. Comparativamente à decocção, o extrato hidroalcoólico apresentou maior atividade antioxidante e conteúdo fenólico, tendo-se optado pela sua forma liofilizada para prosseguir os estudos de microencapsulação. Para a microencapsulação utilizou-se a técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente, produzindo-se microesferas de base policaprolactona (PCL) com o respetivo conteúdo (extrato hidroalcoólico de *H. stoechas*). Estas foram incorporadas com sucesso num creme hidratante.

Os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *H. stoechas* e a viabilidade da sua microencapsulação, abrindo novas possibilidades de exploração e aplicação destes extratos fenólicos naturais, nomeadamente na indústria de cosméticos.

ABSTRACT

The present work explores the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications involving the following steps: chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer.

The antioxidant properties of hydroalcoholic extract and decoction were evaluated by chemical (determination of reducing power and scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, radicals) and biochemical (inhibition of β -carotene bleaching in the presence of linoleate free radicals and inhibition of reactive substances of thiobarbituric acid, TBARS, in brain homogenates) assays. The phenolic composition was analysed by high performance liquid chromatography in reverse phase coupled to diode array detection and mass spectrometry with electron spray ionization (HPLC-DAD-ESI/MS).

Eighteen different phenolic compounds were identified in flowering aerial parts (decoction and hydroalcoholic extract), being 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acids and myricetin7-*O*-acylhexoside the most abundant phenolic acid and flavonoid, respectively. Comparatively to the decoction form, the hydroalcoholic extract presented both higher antioxidant activity and higher phenolic content, being its lyophilized form chosen to proceed with microencapsulation studies. Therefore, double emulsion/evaporation microencapsulation technique was applied to produce PCL based microspheres containing *H. stoechas* hydroalcoholic extract, which were then successfully incorporated into a moisturizer.

The results obtained demonstrated the antioxidant potential *H. stoechas* hydroalcoholic extract and the viability of its microencapsulation, thus opening new perspectives for the exploitation of these natural phenolic extracts in applications such as the cosmetic industry.

ÍNDICE GERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	V
ABREVIATURAS	VI
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Stresse oxidativo e envelhecimento	1
1.2. Defesas antioxidantes e fitoquímicos	3
1.3. Caracterização morfológica e química da espécie em estudo	6
1.3.1. A família Asteraceae e a sua importância etnobotânica e etnofarmacológica	6
1.3.2. Descrição botânica da espécie em estudo	11
1.3.3. Caracterização química da espécie em estudo	13
1.4. Microencapsulação	15
1.4.1. Definição	15
1.4.2. Métodos	17
1.4.3. Materiais de revestimento: Polímeros biodegradáveis	18
1.4.4. Técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente	19
1.5. Objetivos	20
II. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Material vegetal	22
2.2. Solventes, reagentes e padrões	22
2.3. Procedimento de extração de compostos fenólicos	23
2.3.1. Decocção	23
2.3.2. Maceração numa mistura hidroalcoólica	23
2.4. Caracterização da composição dos extratos em compostos fenólicos	23
2.5. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	25
2.5.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH	25
2.5.1.1. Fundamento teórico	25
2.5.1.2. Metodologia	26
2.5.2. Poder redutor	26
2.5.2.1. Fundamento teórico	26

2.5.2.2. Metodologia	27
2.5.3. Inibição da descoloração do β -caroteno	27
2.5.3.1. Fundamento teórico	27
2.5.3.2. Metodologia	28
2.5.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobartitúrico (TBARS)	29
2.5.4.1. Fundamento teórico	29
2.5.4.2. Metodologia	29
2.6. Microencapsulação do extrato hidroalcoólico	30
2.7. Caracterização das microesferas	31
2.8. Incorporação das microesferas num hidratante	31
2.9. Análise estatística	32
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico e da decocção	34
3.2. Propriedades antioxidantes <i>in vitro</i>	40
3.3. Preparação e incorporação das microesferas em hidratantes	41
IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO	45
V. BIBLIOGRAFIA	48
VI. ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** As principais causas do excesso de formação de radicais livres (stresse oxidativo), possíveis alvos celulares e consequências associadas ao stresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2009). **2**
- Figura 2.** Antioxidantes naturais separados em diferentes classes. Palavras verdes representam antioxidantes exógenos, enquanto as amarelos representam antioxidantes endógenos. Adaptado de Carochó & Ferreira (2013). **4**
- Figura 3.** Asteraceae 1) Capítulo e 2) flor tubulosa (representada sem papilho) *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus*; 3) Capítulos, 4) flor ligulada e 5) flor tubulosa de *Anthemis arvensis*, 6) Planta completa e 7) flor de *Taraxacum* sp (Aguiar, 2012). **7**
- Figura 4.** Imagens da espécie em estudo: *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (Flora-On, 2013). **11**
- Figura 5.** Estruturas químicas de compostos fenólicos encontrados em *Helichrysum stoechas* (Carini *et al.*, 2001). **13**
- Figura 6.** Estrutura química do β -caroteno. a) 2Dimensões; b) 3Dimensões (PubChem, 2013). **14**
- Figura 7.** Representação do núcleo/revestimento de uma microcápsula (Martins, 2012). **16**
- Figura 8.** Morfologia das microcápsulas (Ghosh, 2006). **16**
- Figura 9.** Estrutura do Poli(ácido) láctico (Setti *et al.*, 2013). **18**
- Figura 10.** Esquema representativo da preparação de microcápsulas pela técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente (Giri *et al.*, 2012). **20**

- Figura 11.** Esquema representativo do processo de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). **25**
- Figura 12.** Reações que ocorrem no ensaio de determinação do poder redutor. **27**
- Figura 13.** Reações que ocorrem no ensaio da inibição da descoloração do β -caroteno. **28**
- Figura 14.** Reação que ocorre no ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). **29**
- Figura 15.** Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico de *Helichrysum stoechas*, obtido por HPLC, registado a 370 nm. **34**
- Figura 16.** Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico de *Helichrysum stoechas*, obtido por HPLC, registado a 280 nm. **34**
- Figura 17.** Análise em microscopia ótica com a ampliação de 400X da: emulsão A/O (A), emulsão A/O/A logo após a preparação (B) depois de 10 minutos, sob agitação a 400 rpm (C). **41**
- Figura 18.** Evolução da morfologia das microesferas durante o processo de evaporação do solvente (ampliação de 100X): (A) após uma hora sob evaporação a 40 °C e à pressão atmosférica, (B), depois de duas horas, sob evaporação, a 40 °C e à pressão atmosférica, e (C) depois de uma hora adicional a 40 °C, sob pressão reduzida. **42**
- Figura 19.** Os espectros FTIR da policaprolactona (PCL), do extrato de *Helichrysum stoechas* e das microesferas produzidas liofilizadas. **42**
- Figura 20.** Microesferas incorporadas num hidratante. (A) Hidratante-base (B) Hidratante com microesferas incorporadas numa ampliação de 100X e (C) Hidratante com microesferas incorporadas numa ampliação de 400X. A seta em branco põe em evidência as microesferas incorporadas. **43**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Alguns usos, preparações e vias de administração de espécies de plantas da família Asteraceae (Bonet <i>et al.</i> , 1999; Montse <i>et al.</i> , 2007).	9
Tabela 2. Breve registo etnobotânico e etnofarmacológico da espécie em estudo, <i>Helichrysum stoechas</i> .	12
Tabela 3. Métodos químicos, físico-químicos e físico-mecânicos, usados em microencapsulação (Martins, 2012).	17
Tabela 4. Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de absorção máxima na zona do visível ($\lambda_{\text{máx}}$), dados do espetro de massa e tentativa de identificação dos ácidos fenólicos e dos flavonoides em <i>Helichrysum stoechas</i> .	35
Tabela 5. Quantificação dos compostos fenólicos totais (mg/g de extrato ou decocção) no extrato hidroalcoólico e na decocção de <i>Helichrysum stoechas</i> .	39
Tabela 6. Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e da decocção de <i>Helichrysum stoechas</i> .	40

ABREVIATURAS

A[•]	Radical livre
Abs	Absorvância
ACR	Atividade captadora de radicais
ANOVA	Análise de Variância
AH	Molécula antioxidante
°C	Graus Celsius
CAT	Catalase
CE	Energia de colisão
CES	Dissipação da energia da colisão
DAD	Detetor de díodos
DCM	Diclorometano
DPPH	Radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
EC₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no caso do ensaio do poder redutor
ED	Potencial de entrada
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
GPx	Glutationa peroxidases
Gred	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
HLB	Balanço hidrofílico-lipofílico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LOH	Hidroperóxidos lipídicos

MDA	Malondialdeído
MO	Microscopia ótica
MS	Espectrometria de massa
mu	Unidades de massa
nd	Não detetado
o/w	Relação óleo/água
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.a	Princípio ativo
p.ex.	Por exemplo
PVA	Álcool polivinílico
PCL	Policaprolactonas
R²	Coefficiente de correlação
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
ROO[·]	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
RS	Espécies reativas
RSS	Espécies reativas de enxofre
Rt	Tempo de retenção
SD	Desvio padrão
sh	Ombro
SOD	Ácidos gordos saturados
SPSS	Programa estatístico para as ciências sociais
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

UV	Ultravioleta
w/o	Relação água/óleo
w/w	Relação água/água
w/o/w	Relação água/óleo/água
w/v	Relação água/volume
v/v	Relação volume/volume
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda de absorvância máxima na zona do visível

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1.1. Stresse oxidativo e envelhecimento

A esperança média de vida, assim como a proporção da população idosa tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos últimos anos e, em contrapartida, o número de nascimentos tem diminuído. Na terceira idade, como consequência do envelhecimento, o nosso organismo sofre muitas alterações físicas e químicas, ficando debilitado e mais suscetível a doenças crónicas, tais como o cancro, diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, entre outras (Quiles *et al.*, 2010; Carochó & Ferreira, 2013). Cerca de 95% das patologias observadas em pessoas acima dos 35 anos de idade estão associados a produção e acumulação de radicais livres (Silva *et al.*, 2005). Estes problemas de saúde pública, além de causarem sofrimento aos pacientes, aumentam consideravelmente os custos sociais. No entanto, a fim de reduzir todos estes transtornos, é importante estudar e conhecer as reações bioquímicas que ocorrem nas células e organelos do nosso corpo, que são a força motriz que sustenta a vida (Quiles *et al.*, 2010; Carochó & Ferreira, 2013).

Hoje em dia, é do conhecimento geral que o stresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos no envelhecimento e em determinadas alterações dermatológicas nomeadamente, a acumulação de proteínas danificadas e inflamações (Malinin *et al.*, 2011).

Os responsáveis pelos processos reativos do envelhecimento designam-se de espécies reativas (RS), sendo estas as que causam as transformações moleculares e mutações genéticas, em muitos tipos de organismos. Embora o oxigénio seja um elemento essencial à vida aeróbia, os derivados resultantes de reações do metabolismo do oxigénio podem ser altamente tóxicos (Barreira *et al.*, 2008).

As espécies reativas são átomos, moléculas ou iões com eletrões desemparelhados altamente instáveis e ativos, que reagem quimicamente com outras moléculas. Estas derivam de três elementos: azoto, oxigénio e enxofre, criando assim as espécies reativas de oxigénio (ROS), espécies reativas de azoto (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (Carochó & Ferreira, 2013).

As ROS representam a classe mais importante de espécies reativas geradas pelo organismo. Em organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal da célula, a maior parte sob a forma de ROS e de RNS. Depois de produzidas, a maior parte destas espécies são removidas pelas defesas antioxidantes. Para um funcionamento normal do organismo é necessário que haja um equilíbrio entre a produção de espécies reativas (incluindo radicais livres) e as defesas antioxidantes. Quando este equilíbrio não é verificado, devido a uma produção excessiva de radicais livres ou a uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula, diz-se que o organismo está em stresse oxidativo (Ferreira & Abreu, 2007).

O stresse oxidativo pode resultar de causas naturais, como a extrema realização de exercício físico, ou processos de inflamação, ou não naturais tais como a presença de xenobióticos no organismo ou situações relacionadas com diversas doenças (**Figura 1**) (Ferreira *et al.*, 2009).

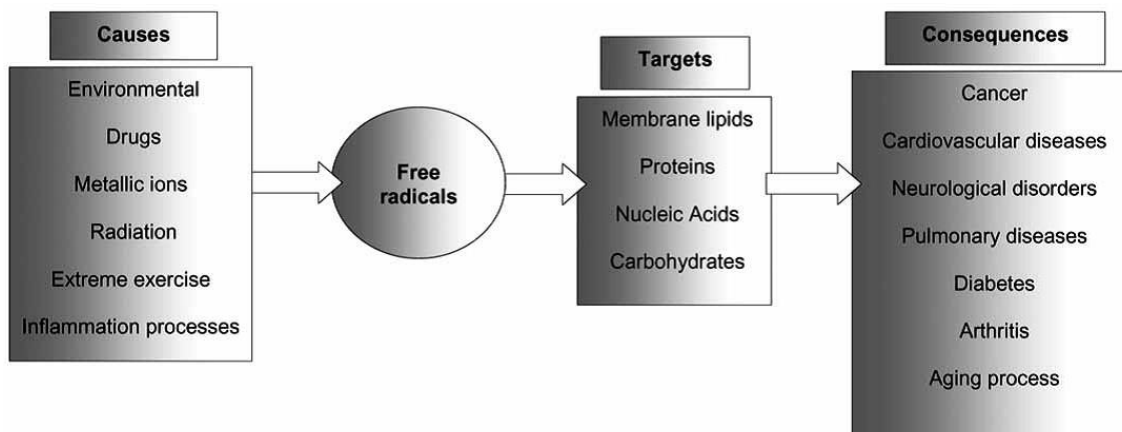


Figura 1. As principais causas do excesso de formação de radicais livres (stresse oxidativo), possíveis alvos celulares e consequências associadas ao stresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2009).

A pele humana está constantemente exposta ao ar, à radiação solar, aos poluentes ambientais, que são capazes de induzir a produção de espécies reativas pelo nosso organismo. Os danos provocados na pele extrínseca resultam da radiação ionizante, stresse físico e psicológico grave, consumo de álcool, má alimentação, comida em excesso, poluição ambiental e exposição à radiação UV (ultravioleta). Estima-se que entre todos estes fatores ambientais, a exposição à radiação UV é o fator maioritário, contribuindo como uma percentagem de 80%. Esta desenvolve a condição de stresse oxidativo, quando a formação de RS ultrapassa a capacidade de resposta das defesas antioxidantes da célula alvo (Poljsak & Dahmane, 2012).

Vários fitoquímicos têm demonstrado atividade antioxidante comprovada no tratamento de várias perturbações dermatológicas, assim como na prevenção do envelhecimento da pele (Singh & Agarwal, 2009; Malinin *et al.*, 2011).

1.2. Defesas antioxidantes e fitoquímicos

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são neutralizados por defesas antioxidantes celulares (moléculas enzimáticas e não enzimáticas) (Ferreira *et al.*, 2009). Estas, enzimáticas ou não, são consideradas de igual modo defesas endógenas. As defesas antioxidantes enzimáticas existem em grande número e encontram-se espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular, de forma a garantir a manutenção do equilíbrio entre radicais livres e defesas endógenas, diminuindo a condição de stresse oxidativo (Valko *et al.*, 2007; Caroch & Ferreira, 2013). A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as glutaciona peroxidases (GPx) e a glutaciona redutase (Gred) são alguns exemplos de defesas enzimáticas existentes no nosso organismo. A glutaciona (GSH), α -tocoferol (vitamina E), ascórbico ácido (vitamina C), ácido lipoico, e outros antioxidantes, são defesas antioxidantes endógenas de natureza não-enzimática. A SOD converte o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), seguindo-se a intervenção da CAT que *à posteriori* transforma o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) formado em água e oxigénio molecular nos lisossomas, ou das GPx nas mitocôndrias, no citosol ou no núcleo. As GPx são um grupo de selenoenzimas que necessitam de selénio para a sua biossíntese. A ingestão de alimentos ou suplementos dietéticos de selénio é crucial para a atividade antioxidante destas defesas enzimáticas. Outra enzima importante é Gred, que regenera a GSH, usando um hidrogénio cedido pelas GPx. As GPx também podem transformar hidroperóxidos lipídicos (LOH) em álcoois (Ferreira *et al.*, 2009). A sua atividade antioxidante pode ser eficaz, podendo realizar distintos processos: tais como a inibição da reação de oxidação de radicais livres, por inibição da formação de radicais livres nos lípidos; interrompendo a auto-oxidação e a propagação da reação em cadeia; podem atuar como supressores do oxigénio singleto, realizando sinergismo com outros antioxidantes, assim como atuar como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis, como agentes quelantes de metais que podem ser transformados em metais pró-oxidantes (ferro e derivados de cobre), em produtos estáveis; e,

finalmente, como inibidores de enzimas pro-oxidantes (lipooxigenases) (Carocho & Ferreira, 2013).

Além das defesas endógenas, atualmente já se conhecem produtos naturais com atividade antioxidante, que podem ser úteis no auxílio ao sistema protetor endógeno, na forma de nutracêuticos (Kanter, 1998). Estes compostos bioativos, denominados de fitoquímicos, incluem carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno), compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides), estibenos, cumarinas e taninos, alcaloides, compostos azotados (derivados da clorofila, aminoácidos e aminas) e compostos organossulfurados (isotiocianatos, indolas, compostos de enxofre alílicos) (Ferreira & Abreu, 2007; Carocho & Ferreira, 2013) (**Figura 2**).

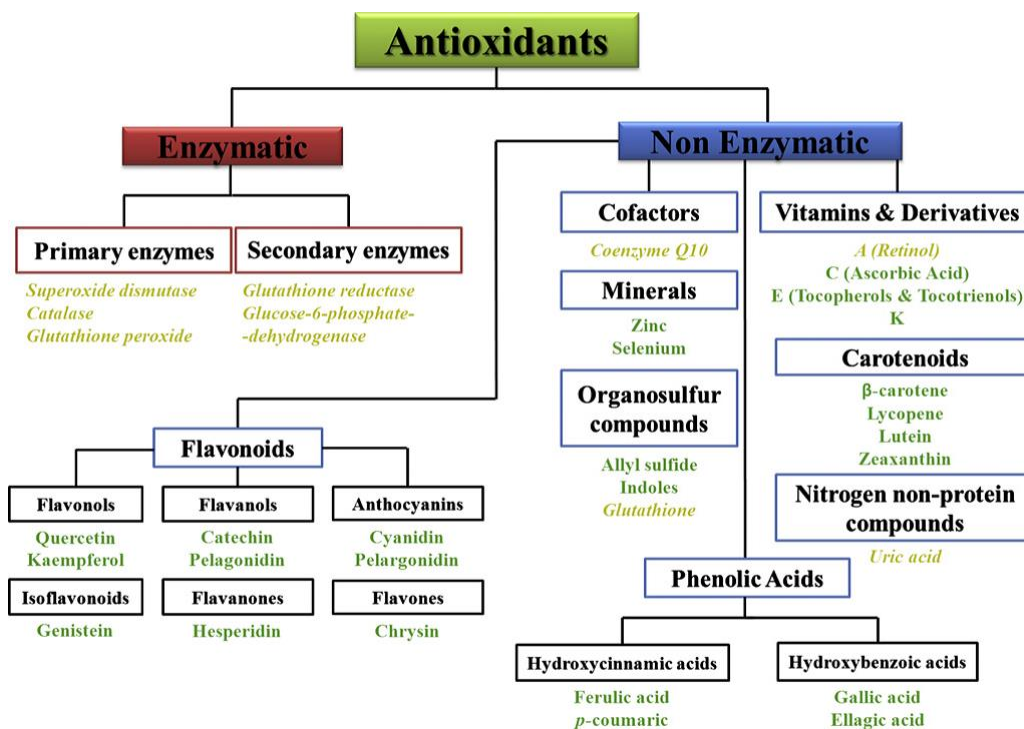


Figura 2. Antioxidantes naturais separados em diferentes classes. Palavras verdes representam antioxidantes exógenos, enquanto as amarelos representam antioxidantes endógenos. Adaptado de (Carocho & Ferreira, 2013).

Como já mencionado anteriormente, a pele é a barreira de proteção mais importante que o nosso corpo tem. Está diretamente exposta ao meio ambiente, sendo este hoje em dia, cada vez mais agressivo (Singh & Agarwal, 2009). A única proteção da pele são as suas defesas endógenas tais como a melanina e antioxidantes enzimáticos. No entanto, podem obter-se antioxidantes exógenos mediante o consumo de alimentos que incluam vitamina A, C, E, entre outros antioxidantes) (Poljsak & Dahmane, 2012).

A pele também desempenha várias funções no organismo e serve como via de administração de fármacos, possibilitando a permeabilidade e facilitando o acesso à circulação sanguínea (Lopes *et al.*, 2006). Como combate às manifestações de envelhecimento, são utilizados agentes anti-envelhecimento em cosméticos, administrados tanto por via oral como por via tópica, melhorando as condições da pele (Singh & Agarwal, 2009). As formas farmacêuticas de aplicação tópica têm vantagens em relação a outras vias de administração, tais como menor irritação e toxicidade sistémica, permitem uma absorção controlada, proporcionam uma seleção mais diversificada do local a aplicar e aumentam a biodisponibilidade do fármaco na corrente sanguínea. A indústria farmacêutica tem investido no desenvolvimento de fitocosméticos à base de plantas medicinais visando um mercado mais promissor, de forma a promover um organismo saudável e, simultaneamente, desenvolver produtos de alta qualidade (Lopes *et al.*, 2006).

Os cosméticos baseados nas propriedades bioativas das plantas são cada vez mais utilizados em comparação com os cosméticos convencionais. Devido à sua crescente popularidade, os cosméticos são especificamente fabricados e comercializados para diferentes categorias, tais como cuidados corporais, faciais, capilares, assim como cosméticos de proteção solar. Estas preparações contêm ingredientes que previnem ou revertem o envelhecimento cutâneo, provocado pelas designadas ROS, que danificam as estruturas da pele. Como tal, os fitoquímicos têm sido encarados com especial atenção, perante as evidências do seu potencial antioxidante. Assim, têm aumentado significativamente os estudos em torno destes, originando novas descobertas eficazes no combate ao stresse oxidativo, a fim de proteger a pele dos danos oxidativos (Singh & Agarwal, 2009).

Nos últimos anos, como profilaxia das doenças crónicas e degenerativas acima mencionadas, tem também aumentado o aconselhamento da ingestão de frutos, legumes ou “chás” ricos em antioxidantes naturais (Silva *et al.*, 2005).

Estima-se que o número de fitoquímicos individuais identificados em frutos e verduras é superior a 5000. No entanto, a maioria ainda permanece desconhecida e requer identificação, para que se possa compreender os seus benefícios na saúde (Guimarães *et al.*, 2009). Nos últimos anos, as plantas medicinais têm sido alvo de estudos exaustivos focalizados na procura de novas fontes de antioxidantes (Silva *et al.*, 2005), já que existem cada vez mais provas convincentes que sugerem que os fitoquímicos podem ter inúmeros benefícios (Guimarães *et al.*, 2009).

1.3. Caracterização morfológica e química da espécie em estudo

1.3.1. A família Asteraceae e a sua importância etnobotânica e etnofarmacológica

A família Asteraceae, também conhecida por Compositae, é normalmente reconhecida como uma das famílias mais importantes e evoluídas das plantas com flor (Gonzalez, 1993; Ingrouille & Eddie, 2006). Integram-na cerca de 1.100 géneros e aproximadamente 25.000 espécies, e está distribuída por todo o globo, desde as selvas tropicais até às altas montanhas árticas, porém são mais abundantes nas regiões áridas ou semiáridas (Gonzalez, 1993). É a maior família de plantas com flor de Portugal, com aproximadamente 112 géneros, maioritariamente representada por plantas herbáceas (Aguiar, 2012).

É característico da família as flores organizadas em capítulos, côncavos, planos ou convexos, que agrupam um grande número de flores num receptáculo comum, geralmente achatado, revestido no exterior por brácteas involucrais (Aguiar, 2012). O involúcro é particularmente evidente em flores de perianto persistente como acontece no género *Helichrysum* (Ingrouille & Eddie, 2006). As flores, em geral pentâmeras, são formadas por uma corola tubular com cinco dentes ou ligulada (em forma de língua) com três ou cinco dentes; têm cinco estames cujas anteras unidas formam um tubo alongado; gineceu ínfero, encimado por um cálice modificado, com escamas, e rematado por uma coroa de pêlos (papilho) (Gonzalez, 1993; Aguiar, 2012). Na **Figura 3** estão representadas algumas características morfológicas desta família.



Figura 3. Asteraceae 1) Capítulo e 2) flor tubulosa (representada sem papilho) *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus*; 3) Capítulos, 4) flor ligulada e 5) flor tubulosa de *Anthemis arvensis*, 6) Planta completa e 7) flor de *Taraxacum* sp (Aguiar, 2012).

Entre as espécies de interesse para o Homem, a família Asteraceae tem algumas plantas usadas na alimentação, como por exemplo o girassol (*Helianthus annuus* L.) e a alcachofra ou cardo-coalheiro (*Cynara cardunculus* L.). Desta espécie, usam-se os estiletes das flores que servem para coalhar o leite no fabrico do Queijo da Serra (entre outros queijos tradicionais). Outro exemplo da utilização das Asteraceae é o piretro *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Schultz-Bip, do qual se extrai um inseticida.

Em termos medicinais esta família possui um grande número de espécies importantes, tais como a camomila (*Matricaria recutita* L.) e a arnica (*Arnica montana* L.) (Gonzalez, 1993; Aguiar, 2012).

As plantas medicinais têm sido utilizadas na medicina tradicional, desde a pré-história e ainda hoje, são a única fonte de cuidados de saúde primários, para a grande maioria da população mundial (Uprety *et al.*, 2012). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO), 80% de toda a população mundial continua a tratar problemas de saúde com medicamentos tradicionais, baseando-se principalmente na fitoterapia (Novais *et al.*, 2004).

A nível nacional, em zonas rurais, nomeadamente na região nordeste de Portugal, a medicina popular e as práticas tradicionais de cura coexistem frequentemente com sistemas de medicina convencional (Barros *et al.*, 2010).

Nos últimos anos em Portugal e Espanha, os estudos etnobotânicos têm aumentado consideravelmente (Montse *et al.*, 2007). Assim como, os estudos etnofarmacológicos,

que se focam essencialmente no registo e difusão do património cultural regional, nacional e internacional, e se direcionam também para a descoberta de novas fontes uteis de fármacos de origem vegetal e fitoquímicos (Bonet *et al.*, 1999). Esses estudos partem de uma abordagem utilitarista tendo como objetivo a investigação experimental e a validação científica de plantas medicinais e medicamentos à base de plantas (Leonti, 2011). Nesta perspetiva, a etnobotânica e a etnofarmacologia são vistas como uma ferramenta fundamental na descoberta de novos medicamentos (Heinrich *et al.*, 2006). Na **Tabela 1** estão descritas algumas plantas da família Asteraceae, sistematicamente citadas em alguns estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos.

Tabela 1. Alguns usos, preparações e vias de administração de espécies de plantas da família Asteraceae (Bonet *et al.*, 1999; Montse *et al.*, 2007).

Nome Científico	Nome vernáculo	Parte da planta utilizada	Uso popular	Preparação	Via de Administração
<i>Arnica montana</i> L.	Arnica	Inflorescências	Anti-inflamatório; Analgésico; Anti-histamínico; Vasotónico; Cicatrizante;	Loções; Tinturas; Decocções	Oral; Tópica
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Absinto	Inflorescências	Emético	Infusão	Oral
<i>Artemisia campestris</i> L.	Erva-lombrigueira	Capítulos florais	Protetor hepático	Infusão	Oral
<i>Carlina acaulis</i> L.	Carlina	Planta inteira	Abortiva	Infusão	Oral
<i>Centaurea aspera</i>	Lóios-asperos	Capítulos florais	Hipoglicémica	Infusão	Oral
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop	Cardo; Cardo das vinhas	Parte aérea	Vasotónico	Decocção	Oral
<i>Matricaria recutita</i> L.	Camomila	Capítulos florais	Antissético; Anti-inflamatório; Antibacteriano; Antifúngico.	Infusão	Oral; Tópica
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	Abrótano-fêmea	Capítulos florais	Anti-inflamatório oftálmico; Antissético oftálmico; Emético; Laxativo; Sedativo	Infusão	Oral; Tópica

A família Asteraceae contém vários compostos fisiologicamente ativos que justificam a sua utilização na medicina tradicional (Campbell *et al.*, 1982).

A atividade anti-inflamatória de algumas plantas medicinais tem sido atribuída a lactonas sesquiterpénicas, predominantemente encontradas na família Asteraceae, da qual têm sido isoladas, particularmente em espécies do género *Centaurea* (Al-Saghir *et al.*, 2009). Durante as duas últimas décadas, foram identificados muitos novos compostos a partir de plantas desta família, como por exemplo, poliacetilenose e derivados de tiofeno. No entanto, algumas dessas substâncias são tóxicas (Campbell *et al.*, 1982).

1.3.2. Descrição botânica da espécie em estudo

O género *Helichrysum* apresenta cerca de 600 espécies que e têm sido utilizadas na medicina popular desde há milhares de anos em todo o mundo (Eroglu *et al.*, 2009).

Helichrysum stoechas (L.) Moech. (**Figura 4**), a espécie em estudo, é uma planta sub-herbácea, lenhificada na base característica da zona Mediterrânica, vulgarmente designada por perpétua-das-areias, douradinha, jónias, erva-espanta-diabos, alecrim das paredes, e perpétua-sol-de-ouro. Tem tendência a desenvolver-se em colinas e encostas marítimas, assim como, em terrenos áridos, estéreis e pedregosos de quase toda a Espanha e Portugal (Quesada, 1972; Pio Font Quer, 2000; Cunha *et al.*, 2009).

Botanicamente, é um subarbusto lenhoso (caméfito) aromático, de caules que podem atingir cerca de 70 cm de altura, densamente tomentoso; folhas lineares, verde-acinzentadas, geralmente glabrescentes na página superior e acinzentado tomentosas na inferior, com ápice do limbo agudo; inflorescência composta, corimbo de capítulos com 3 a 6 cm de diâmetro, involúcros dos capítulos de 4 a 6 mm, globosos, de brácteas frouxamente imbricadas, citrinas, pouco glandulosas, as médias mais estreitas e coriáceas e as internas subtruncadas; flores amarelas, todas tubulosas, as marginais femininas e as do disco, hermafroditas (bissexuadas) e mais numerosas; frutos (cípselas) castanho-escuros, com numerosas glândulas brancas e brilhantes e papilho de pêlos ásperos curtamente plumosos (Cunha *et al.*, 2009).



Utiliza-se a parte aérea da planta, mais concretamente os seus capítulos florais, no começo da floração que se dá a partir do mês de Maio. É uma planta de curta duração, que floresce desde o primeiro ano, mas que apenas dura entre 4 a 5 anos no máximo (Pio Font Quer, 2000; Martin & Puech, 2001; Cunha *et al.*, 2009).

Figura 4. Imagens da espécie em estudo: esq. *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (Flora-On, 2013).

Na tabela seguinte apresentam-se alguns dos usos tradicionais terapêuticos desta espécie.

Tabela 2. Breve registo etnobotânico e etnofarmacológico da espécie em estudo, *Helichrysum stoechas*.

Nome científico	Nome vernáculo	Partes da planta utilizada	Usos tradicionais	Indicações terapêuticas	Via de administração e preparação	Referências Bibliográficas
<i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench	Perpétua das areias; douradinha	Capítulos florais.	Gripe e resfriado, febre; Nervosismo; Diurético; Problemas do trato urinário; Problemas pancreáticos e de vesícula biliar; obstipação.	Antipirético; Ansiolíticos; colagogo; Diurético, doenças do trato urinário; Laxante; Antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, antipruriginoso e cicatrizante.	Interna; Externa; Decocções; Infusões.	(Bonet <i>et al.</i> , 1999; Pio Font Quer, 2000; Carvalho, 2010; Cunha <i>et al.</i> , 2008; Cunha <i>et al.</i> , 2009; Neves <i>et al.</i> , 2009).

1.3.3. Caracterização química da espécie em estudo

As partes aéreas de *H. stoechas* contêm lactonas sesquiterpénicas; chalconas; derivados da α -pirona e do floroglucinol; derivados da acetofenona; triterpenos, tais como ácido ursólico e oleanólico, uvaol e eritrodíol, os esteróis β -sitosterol e estigmasterol; ácidos gordos como o linoleico, palmítico, linoleico, ácido oleico; ácido cafeico e flavonoides (na sua forma livre e sob a forma de heterósidos) nomeadamente, apigenina, naringenina, kaempferol, luteolina, quercetina, helicrisina, apigenina-7-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-glucósido, luteolina-7-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-glucósido. (Quesada, 1972; Cunha *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2009).

A **Figura 5** mostra alguns dos compostos fenólicos encontrados na espécie *H. stoechas* (Carini *et al.*, 2001; Lavault & Richomme, 2004).

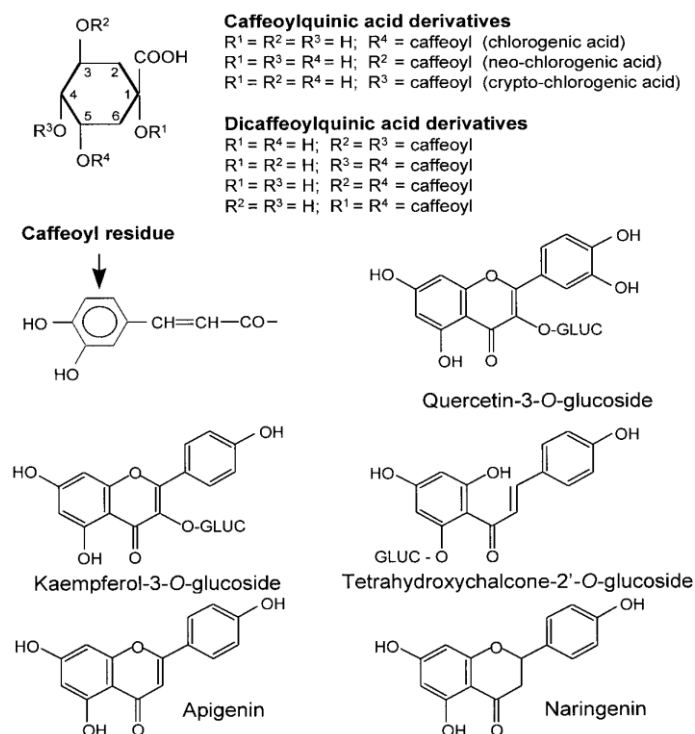


Figura 5. Estruturas químicas de compostos fenólicos encontrados em *Helichrysum stoechas* (Carini *et al.*, 2001).

No seu óleo essencial, predomina o α -pineno, o limoneno e o acetato de nerilo (30 a 50 %) e, em menores concentrações, nerol, cetonas (italidionas), biturato de nerilo, β -cariofileno e outros sesquiterpenos (Cunha *et al.*, 2008).

Alguns estudos também mencionam altas concentrações de β -caroteno (Quesada, 1972; Adams *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2009).

A **Figura 6** apresenta a estrutura química do β -caroteno, que foi encontrado em altas concentrações, pelo grupo de investigação em que se insere este projeto, nas partes aéreas de *H. stoechas* (Barros *et al.*, 2010).

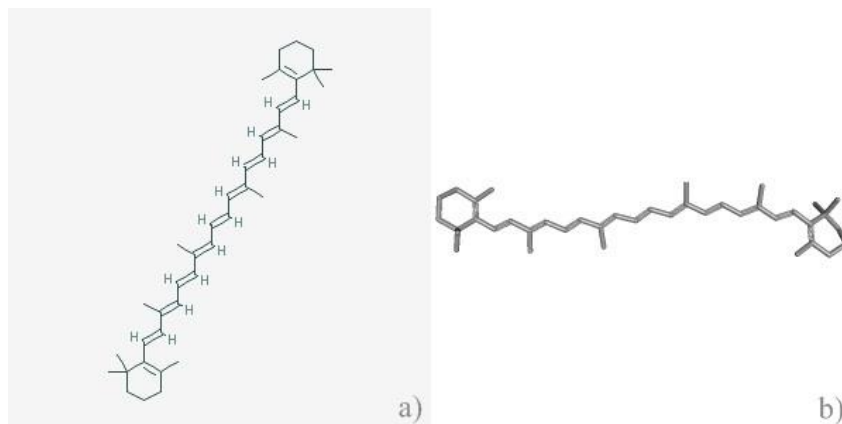


Figura 6. Estrutura química do β -caroteno. a) 2Dimensões; b) 3Dimensões (PubChem, 2013).

O β -caroteno é um carotenoide, provitamina A, que ajuda a reduzir os efeitos do envelhecimento e do stresse oxidativo, e atua como profilático em patologias cancerígenas e coronárias. Em consequência das suas propriedades antioxidantes, tem sido incluído em produtos cosméticos, tais como cremes, loções e protetores solares. O seu efeito benéfico tem sido comprovado em pacientes com psoríase, infeções tópicas e outras patologias da pele (Vílchez *et al.*, 2011).

A espécie *H. stoechas* parece desempenhar ações antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, particularmente associadas ao seu óleo essencial (Cunha *et al.*, 2009).

O óleo essencial é também usado em perfumaria devido ao seu aroma peculiar a caril e é aplicado na cosmética, por possuir ações antialérgicas, antifúngicas, anti-inflamatórias, cicatrizantes e antipruriginosas. Os flavonoides e ácidos aromáticos têm também sido relacionados com uma ação protetora e regeneradora da pele. O extrato glicólico contido nas partes floridas é utilizado no tratamento da psoríase e eczema, e o seu leite é utilizado como protetor solar. É importante salientar que mais de 80% da população mundial ainda depende de medicamentos tradicionais para tratamento de várias doenças de pele. As decocções e infusões das suas inflorescências combatem a febre, problemas do trato respiratório, digestivo, infeções orofaríngeas, e cistites (Pio Font Quer, 2000; Lavault & Richomme, 2004; Steenkampa *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2008).

1.4. Microencapsulação

1.4.1. Definição

A tecnologia de microencapsulação iniciou o seu desenvolvimento há aproximadamente 60 anos, definindo-se como uma técnica de proteção de materiais sólidos, líquidos, ou gasosos miniaturizados, isto é, sob a forma de pequenas partículas/gotículas. Originam-se assim pequenas cápsulas seladas que podem libertar o seu conteúdo de maneira controlada sob condições específicas (Fanga & Bhandari, 2010). No entanto, o que torna o processo da microencapsulação único é o tamanho das partículas revestidas, que varia entre 1 e 1000 μm (Lachman, *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003). Com o desenvolvimento desta tecnologia diversas indústrias, nomeadamente a farmacêutica e cosmética, adquiriram uma nova ferramenta de trabalho (Lachman, *et al.*, 2001).

As microcápsulas podem servir para modificar a libertação de um princípio ativo (fármaco, óleo essencial, vitamina, etc.) e mascarar um sabor desagradável. Permite ainda que um único produto (comprimido, alimento, etc.) incorpore ingredientes quimicamente incompatíveis, facilitando desta forma a introdução de certos princípios ativos na preparação de cremes, pomadas, alimentos, injetáveis ou emplastos (Lachman *et al.*, 2001). Outras aplicações que tiram partido da microencapsulação são o papel químico, alimentos funcionais, têxteis inteligentes, pesticidas e os produtos *scratch and sniff* (esfrega e cheira) (Schrooyen *et al.*, 2001).

Para que se entenda o potencial da tecnologia de microencapsulação é necessário conhecer as propriedades das microcápsulas, tais como, a natureza do núcleo e dos materiais de revestimento, a sua estabilidade e mecanismo de libertação do princípio ativo, bem como conhecer o potencial dos diversos processos de microencapsulação (Lachman *et al.*, 2001).

As microcápsulas são compostas por duas partes, o núcleo e o revestimento, tal como representado esquematicamente na **Figura 7**. O núcleo (a parte interna) contém o princípio ativo (p.a), ao passo que o revestimento (parte externa) tem como função proteger o núcleo do ambiente externo e é normalmente formado por um material polimérico (Martins, 2012).

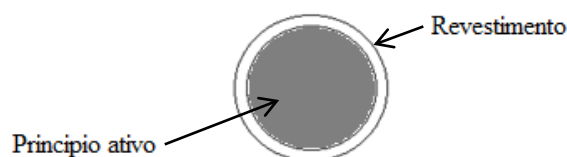


Figura 7. Representação do núcleo/revestimento de uma microcápsula (Martins, 2012).

O material do núcleo, definido como o material específico a ser revestido pode ser de natureza sólida, líquida ou gasosa. A composição do material do núcleo pode variar podendo este corresponder a material disperso ou dissolvido, o que proporciona uma maior versatilidade possibilitando obter várias conceções de produtos, isto é, microcápsulas com propriedades diferentes (Lachman *et al.*, 2001).

A seleção do material de revestimento adequado é de grande importância pois influencia as propriedades físicas e químicas das micropartículas resultantes (Lachman *et al.*, 2001). O material de revestimento deve ser capaz de formar um filme coesivo com o material do núcleo, ser quimicamente compatível e não reativo com o material a encapsular, apresentar propriedades adequadas, tais como resistência, flexibilidade, impermeabilidade, e estabilidade (Lachman *et al.*, 2001).

A morfologia das microcápsulas depende essencialmente do material do núcleo e do processo de deposição do revestimento. As microcápsulas podem ter formas regulares ou irregulares e, com base na sua morfologia, podem ser classificadas como partículas mononucleares, polinucleares, e do tipo matriz (**Figura 8**) (Ghosh, 2006).

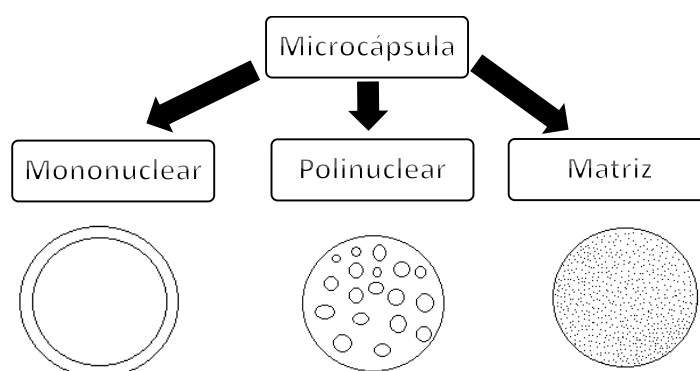


Figura 8. Morfologia das microcápsulas (Ghosh, 2006).

1.4.2. Métodos

A escolha do material e técnica de revestimento depende da aplicação final do produto, tendo em conta a sua estabilidade física e química, a concentração, o tamanho de partícula desejado, o mecanismo de libertação e os custos de produção. Geralmente as técnicas utilizadas para a microencapsulação podem ser divididas em duas categorias principais: métodos químicos e físicos. Este último grupo pode subdividir-se em métodos físico-químicos e físico-mecânicos (Martins, 2012). A **Tabela 3** faz uma breve descrição de alguns dos métodos/técnicas utilizadas.

Tabela. 3. Métodos químicos, físico-químicos e físico-mecânicos, usados em microencapsulação (Martins, 2012).

	Químicos	Físico-Químicos	Físico-Mecânicos
Métodos de Microencapsulação	Polimerização interfacial	Coacervação	Atomização
			Secagem por spray (<i>Spray Drying</i>)
	Polimerização “ <i>in situ</i> ”	Encapsulação sol-gel	
		Microencapsulação utilizando CO ₂ supercrítico	Revestimento por leito fluidizado (<i>Fluid-Bed Coating</i>)
			Evaporação de solvente

A utilização de microcápsulas/micropartículas tem inúmeras vantagens, sendo as principais:

- Proteger materiais sensíveis e evitar a instabilidade decorrente da exposição ao meio envolvente antes do seu uso.
- Melhorar a solubilidade, e a dispersão dos fluídos.
- Aumentar o tempo de vida, evitando reações de degradação (p. ex. oxidação e, desidratação).

- Promover uma libertação controlada e sustentada, ou temporizada.
- Proporcionar uma manipulação segura e conveniente de materiais tóxicos.
- Mascaram odores e sabores.
- Possibilitar a imobilização enzimática de microrganismos.
- Proporcionar a manipulação tanto de líquidos como sólidos (Ghosh, 2006).

1.4.3. Materiais de revestimento: Polímeros biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis são polímeros que podem ser degradados pela ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podendo ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação.

Podem provir de fontes naturais renováveis como o milho, madeira, batata, cana-de-açúcar, ou serem sintetizados por bactérias. Existem também exemplos de polímeros biodegradáveis obtidos a partir de fontes fósseis (Brito *et al.*, 2011).

Um dos polímeros biodegradáveis provenientes do petróleo mais conhecido é a policaprolactona – PCL (Brito *et al.*, 2011). Este consiste num poliéster alifático cuja aplicação está sendo investigada particularmente no contexto de sistemas de libertação controlada de drogas (Derval *et al.*, 2000). A estrutura molecular da PCL é a mostrada na **Figura 9**.

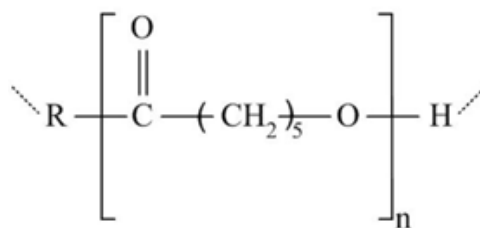


Figura 9. Estrutura da Policaprolactona (Setti *et al.*, 2013).

Dos vários polímeros biodegradáveis que existem, os que se têm destacado mais são os obtidos a partir de fontes renováveis, devido ao menor impacto ambiental causado com relação à sua origem (Brito *et al.*, 2011).

1.4.4. Técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente

A introdução de princípios ativos, protegidos por um “invólucro” que permita o seu isolamento, dispersão, fixação, incremento de atividade e transporte ao longo de diferentes meios constitui uma ferramenta de grande utilidade para a indústria da cosmética.

A produção de microesferas utilizando a técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente assim como as outras técnicas de microencapsulação utiliza materiais de revestimento, como por exemplo o polímero biodegradável policaprolactona (PCL) assim como solventes orgânicos voláteis de forma a possibilitar o processo.

O sistema de produção de microesferas a partir da técnica de dupla emulsão/evaporação de solvente consiste em obter duas fases na emulsão inicial (A/O) utilizando um HLB baixo, seguindo-se da utilização de um HLB alto para poder obter a emulsão secundária (A/O/A). Este tipo de emulsões (A/O/A) são menos viscosas, tornando-as excelentes candidatas para a libertação controlada de drogas hidrofílicas, devido à existência de uma camada de óleo no meio, que atua como uma membrana líquida (Giri *et al.*, 2012).

A remoção do solvente orgânico volátil conduz à formação de micropartículas sólidas (**Figura 10**). Por fim as microesferas são separadas por filtração ou centrifugação, e consecutivamente lavadas, a fim de eliminar o emulsionante residual. Por fim secasse sob vácuo ou são liofilizadas. O solvente orgânico utilizado na preparação das micropartículas pela técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente deve possuir um ponto de ebulição baixo, a fim de facilitar a remoção do solvente residual (Giri *et al.*, 2012).

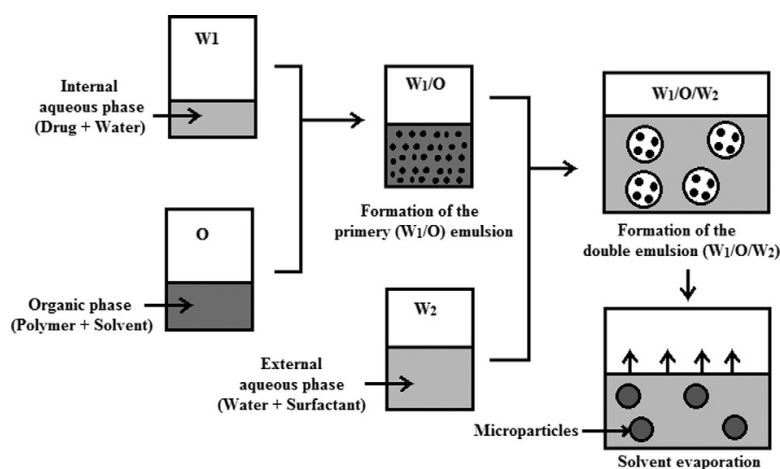


Figura 10. Esquema representativo da preparação de microcápsulas pela técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente (Giri *et al.*, 2012).

1.5. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- Obter extratos fenólicos a partir de sumidades floridas de uma espécie silvestre da família Asteraceae, tradicionalmente usada na medicina popular Transmontana: *Helichrysum stoechas* (L.) Moench.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos e caracterizá-los em termos da composição em compostos fenólicos;
- Processar os extratos através de encapsulação e testar a sua incorporação num hidratante visando a sua utilização em dermocosmética;
- Contribuir para a valorização da flora medicinal silvestre e validação das práticas e saberes tradicionais.

Material e
Métodos

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O material vegetal foi colhido no ano de 2009, a partir de populações silvestres localizadas no território do Parque Natural de Montesinho, Trás-os-Montes, Nordeste de Portugal, A época de colheita das sumidades floridas teve em conta a fase fenológica mais favorável de acordo com o conhecimento empírico e os usos medicinais locais, citados por curandeiros e consumidores selecionados. As partes aéreas da espécie em estudo florescem no final da primavera e início do verão, atingindo cerca de 15 cm de comprimento (Barros *et al.*, 2010; Carvalho, 2010). A identificação botânica da espécie foi confirmada pelos caracteres morfológicos definidos pela Nova Flora de Portugal (Franco, 1994). A nomenclatura foi baseada na base de dados The Plant List (2013). Um exemplar da espécie estudada encontra-se prensado, montado e acondicionado no Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança (BRESA).

A amostra foi liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, EUA), reduzida a pó (~20 mesh) e mantida nas melhores condições, até ao seu uso subsequente.

2.2. Solventes, reagentes e padrões

O solvente acetonitrilo, grau HPLC, foi adquirido à Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico e o ácido acético foram adquiridos à Prolabo (VWR International, França). Os padrões utilizados nos ensaios da atividade antioxidante Trolox (6-hidroxi-2, ácido 5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), foi adquirido a partir de Matreya (Pleasant Gap, PA, EUA). 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) foi obtido a partir de Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Os padrões de compostos fenólicos foram fornecidos por Extrasynthèse (Genay, França). Todos os outros químicos eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fornecedores de produtos químicos. A água foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (TGI sistemas de água pura, EUA).

A Policaprolactona diol (Mw 3000) (PCL) foi fornecida pela Solvay Caprolactones, Solvay Interlox, Ltd (Reino Unido) e o Tergitol 61E foi fornecido por surfactantes Dow (The Dow Chemical Company, EUA). O diclorometano (DCM) foi

adquirido a partir da Sigma-Aldrich (EUA) e o Álcool polivinílico (PVA, nome comercial Celvol 840) foi fornecido por Celanese Chemicals (EUA).

2.3. Procedimentos de extração de compostos fenólicos

2.3.1. Decocção

A amostra (1g) foi adicionada a 200 ml de água destilada e aquecida (placa de aquecimento VELP Scientific) até atingir a temperatura de ebulição, mantendo-se nessas condições durante 5 min. Após esse período, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min e filtrou-se, sob pressão reduzida. A decocção obtida foi congelada, liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, USA) e redissolvida em água destilada de modo a obter uma concentração final de 2,5 mg/mL.

2.3.2. Maceração numa mistura hidroalcoólica

A amostra (1 g) foi adicionada a 30 ml de metanol:água 80:20 (v/v), seguindo-se uma maceração a 25°C em agitação a 150 rpm, durante 1h. Filtrou-se através de papel Whatman nº 4 e re-extraiu-se o resíduo novamente com 30 ml de metanol:água 80:20 (v/v). Os filtrados foram evaporados (Büchi R-210, Flawil, Suíça) a 35°C até remoção completa do metanol. A fase aquosa foi, então, liofilizada e o extrato obtido foi redissolvido em metanol aquoso, de modo a obter uma concentração final de 2,5 mg/mL.

2.4. Caracterização da composição dos extratos em compostos fenólicos

As soluções preparadas foram filtradas através de discos descartáveis LC de 0,22- μ m e analisadas num cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) com uma bomba quaternária e um detetor de díodos (DAD) acoplado com uma estação de processamento de dados HP Chem Station (rev. A.05.04). Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, 3 μ m (4,6 mm \times 150 mm) termostaticada a 35°C. A fase móvel foi (A) 0,1% de ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi de 15% durante 5 min, 15% B até 20% B durante mais 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B mais 10 min, isocrático 35-50% mais 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. Realizou-se uma

deteção dupla online DAD a 280 nm e 370 nm como comprimentos de onda preferenciais e no espectrómetro de massa (MS) ligado ao sistema de HPLC.

A deteção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte ESI num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1. Usou-se ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400°C, 40 psi). O azoto serviu como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). Os quadrupolos foram fixados numa unidade de resolução. A tensão de *spray* dos iões foi definida a -4500V em modo negativo. O detetor MS foi programado para executar, em série, dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do ião produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espectros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os iões na amostra. As configurações usadas foram: potencial de não-*cluster* (DP) -450V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos iões obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros: DP -50 V, EP -6 V, CE -25V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre m/z 100 e 1500.

Os compostos fenólicos presentes nos extratos foram caracterizados de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção em comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se 5 níveis de curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL): ácido cafeico ($y=617,91x-691,51$; $R^2=0,9991$); ácido clorogénico ($y=600,27x-763,62$; $R^2=0,9998$); ácido *p*-cumárico ($y=884,6x+184,49$; $R^2=0,9999$); 3-*O*-glucósido de isoramnetina ($y=262,31x-9,8958$; $R^2=1,000$); 3-*O*-rutinósido de isoramnetina ($y=327,42x+313,78$; $R^2=0,9991$); ácido ferúlico ($y=505,97x-64,578$; $R^2=0,9999$); 3-*O*-glucósido de kaempferol ($y=190,75x-36,158$; $R^2=1,000$); 3-*O*-rutinósido de kaempferol ($y=175,02x-43,877$; $R^2=0,9999$); miricetina ($y=741,41x-221,6$; $R^2=0,9999$); 3-*O*-glucósido de quercetina ($y=316,48x-2,9142$; $R^2=1,000$) e 3-*O*-rutinósido de quercetina ($y=222,79x-243,11$; $R^2=0,9998$). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.5. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

2.5.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH

2.5.1.1. Fundamento teórico

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de azoto, sintético e muito estável devido à deslocalização do eletrão livre. Esta deslocalização origina a cor púrpura intensa característica desta molécula. Reage facilmente com compostos que têm capacidade de doar um átomo de hidrogénio reduzindo-o e levando à formação de um composto (hidrazina) amarelo-pálido (Antolovich *et al.* 2001; Amarowicz *et al.*, 2004) (Figura 11).

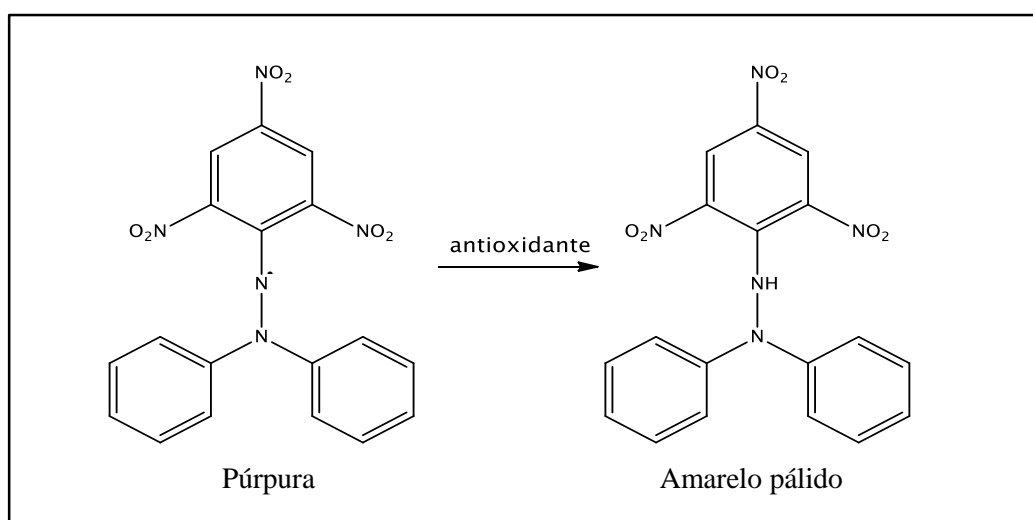
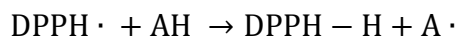


Figura 11. Esquema representativo do processo de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

A reação do DPPH com um antioxidante pode ainda ser descrita pela seguinte equação:



Em que AH representa um composto antioxidante e A[·] representa o radical formado (Brand-Williams, 1995). Recentemente tem-se utilizado o valor de EC₅₀ como parâmetro de análise de resultados deste método, definido como a concentração de extrato necessária para provocar a perda de 50% da atividade do radical DPPH (Molyneux, 2004).

2.5.1.2. Metodologia

A atividade captadora de radicais livres DPPH foi realizada utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Bedfordshire, UK) seguindo o método espectrofotométrico descrito por Hatano *et al.* (1988) e otimizado para microplacas pelo nosso grupo de investigação.

Efetuuou-se uma mistura de reação, em cada um dos 96 poços da placa, constituída pelas várias concentrações dos extratos (30 μL) e uma solução metanólica de DPPH 6×10^{-5} M, (270 μL). Em seguida, deixou-se a mistura em repouso no escuro durante 30 minutos. A redução de DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais DPPH (ACR) foi calculada tendo em conta a percentagem de descoloração da solução de DPPH utilizando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

sendo, A_{DPPH} a absorvância do branco (solução de DPPH mais solvente de extração, em substituição do extrato), e A_{S} a absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato. A concentração de extrato que confirma 50% da atividade captadora de radicais DPPH (EC_{50}) foi calculada segundo o gráfico de percentagem ACR em função da concentração de extrato. Utilizou-se trolox como controlo positivo.

2.5.2. Poder redutor

2.5.2.1. Fundamento Teórico

Este ensaio permite medir a capacidade de um dado antioxidante reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a Fe(II), a sua forma ferrosa (Berker, 2007). Deste modo, a cor amarela da solução é alterada para azul da Prússia, dependendo da concentração do antioxidante presente na solução. A reação de redução processa-se de acordo com as seguintes equações (**Figura 12**):

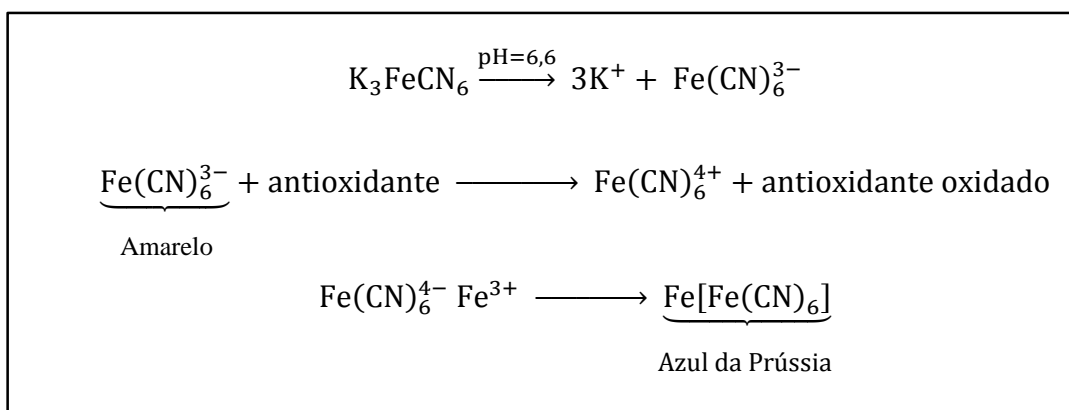


Figura 12. Reações que ocorrem no ensaio de determinação do poder redutor.

2.5.2.2. Metodologia

Utilizou-se o Leitor de Microplacas acima descrito, segundo o método de Oyaizu (1986). As diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Finalizado esse período adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada em microplacas de 48 poços junto com a água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v, 0,16 mL), e a absorvância foi medida a 690 nm. Foi juntamente preparado um branco com o solvente de extração em substituição da solução de extrato. A concentração de extrato que fornece 0,5 de absorvância (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Utilizou-se trolox como controlo positivo.

2.5.3. Inibição da descoloração do β-caroteno

2.5.3.1. Fundamento teórico

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo sistema β-caroteno linoleato (Mi-Yae *et al.*, 2003). Este ensaio baseia-se em medições espectrofotométricas da descoloração do β-caroteno, avaliando a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O ensaio ocorre segundo as seguintes equações (**Figura 13**):

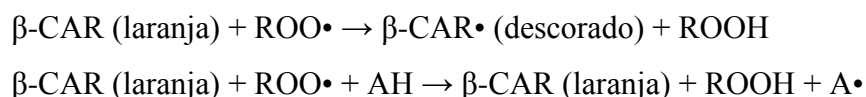


Figura 13. Reações que ocorrem no ensaio de inibição da descoloração do β -caroteno.

Este mecanismo está envolvido na descoloração dos carotenoides através de uma oxidação térmica, que pode ser diminuída pela ação dos antioxidantes existentes na amostra (Amarowicz *et al.*, 2004; Kaur & Geetha, 2006). Assim, a diminuição da coloração alaranjada do β -caroteno é inversamente proporcional à quantidade de antioxidantes presentes nos extratos.

2.5.3.2. Metodologia

Este ensaio que avaliou a atividade antioxidante dos extratos a partir da inibição da descoloração do β -caroteno, por neutralização de radicais linoleato, seguiu o método descrito por Mi-Yae *et al.* (2003).

Preparou-se uma solução por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se (2 mL) desta solução para um balão periforme de 100 mL, e removeu-se o clorofórmio a 40 °C, sob vácuo. Adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween® 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), agitando-se vigorosamente. Transferiu-se uma alíquota (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,2 mL). A seguir à adição da emulsão a cada tubo, agitou-se e determinou-se o tempo zero de absorvância a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena, Jena, Alemanha). Seguidamente foram incubados num banho a 50 °C durante 2 h. Passado esse tempo determinou-se novamente a absorvância a 470 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração em vez da solução de extrato. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

% Descoloração = $[(A_{470} \text{ após } 2\text{h}/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$. Utilizou-se trolox como controlo positivo.

2.5.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

2.5.4.1. Fundamento teórico

O ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) costumam ser utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser determinada pela medição dos produtos de oxidação que reagem com o TBA para formar compostos de cor rosa, genericamente designados como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (**Figura 14**), que são medidas por espectrofotometria a 532 nm (Ng *et al.*, 2000; Kaur & Geetha, 2006).

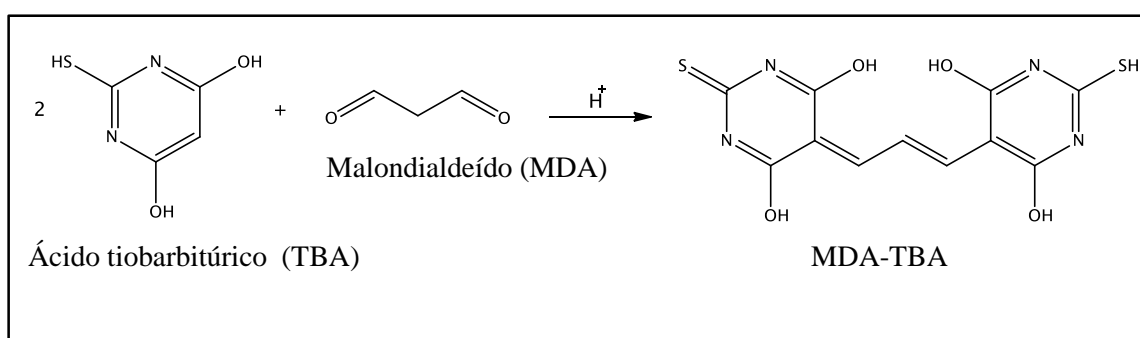


Figura 14. Reação que ocorre no ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O TBA em associação com o MDA, na presença de iões H⁺, forma um cromogéneo (MDA-TBA). Existem dois passos essenciais nesta reação, em primeiro lugar, a solução contendo o antioxidante é oxidada devido à adição de um ião metálico, tal como o ferro ou o cobre; posteriormente, a extensão desta oxidação é ditada pelo ácido tiobarbitúrico, sendo que uma solução contendo um antioxidante irá travar a oxidação (Antolovich *et al.*, 2001).

2.5.4.2. Metodologia

O ensaio baseou-se nos trabalhos descritos por Ohkawa *et al.* (1979) e Bird & Draper (1984). Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*), dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCL (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (m/v) após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações das soluções dos extratos (0,2 mL),

FeSO₄ (10 µM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 5 min para remoção de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. Foi preparado um branco com o tampão tris-HCl em vez da solução de extrato. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B)/A] \times 100\%$$

sendo, A e B referentes à absorvância do branco e à solução com o extrato, respetivamente. Utilizou-se trolox como controlo positivo.

2.6. Microencapsulação do extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico liofilizado de *H. stoechas* foi incorporado em microesferas preparadas pela técnica de dupla emulsão/evaporação de solvente, seguindo o procedimento geral adaptado do trabalho Giri *et al.* (2012).

Resumidamente, a PCL foi utilizado como material de matriz, o Tergitol 61E (HLB=3) como agente tensioativo para a preparação da emulsão primária óleo em água (O/A), e o DCM como a fase óleo tendo sido escolhido por solubilizar a PCL. O PVA serviu como coloide de proteção, para a estabilização da emulsão secundária água em óleo (A/O) obtida. Para a emulsão primária, foi preparada uma solução aquosa por dissolução de 70 mg do extrato liofilizado em 4 mL de água destilada Esta foi mantida sob agitação e em seguida filtrada, procedendo-se depois à adição de 1,5% de Tergitol 61E (m/m). A fase óleo foi preparada por dissolução de 800 mg de PCL em 20 mL de DMC. A emulsão A/O foi preparada por adição da solução aquosa acima mencionada à fase de óleo, tendo sido posteriormente homogeneizada a 11000 rpm durante 2 minutos no homogeneizador Cat Unidrive X 1000. Para finalizar, a emulsão A/O/A foi preparada através da adição da emulsão anteriormente preparada (A/O) a 200 mL de uma solução aquosa de PVA (1%, m/v), sob agitação contínua (400 rpm) durante 10 minutos. As microesferas foram posteriormente consolidadas por evaporação do DCM

usando um evaporador rotativo Buchi R-114 num processo em duas etapas: 2 horas a 40° C e à pressão atmosférica, seguida de uma hora sob pressão reduzida (600 mbar, 40 °C). As microesferas resultantes foram recolhidas por sedimentação, lavadas duas vezes com água destilada e, subsequentemente recuperadas através de filtração. As microesferas foram liofilizadas e armazenadas em ambiente protegido da luz a 4 ° C.

2.7 Caracterização das microesferas

As microesferas foram analisadas sob a forma de solução por microscopia ótica (MO), utilizando um microscópio Nikon Eclipse 50i equipado com uma câmara Nikon Visão Digital e o *software* NIS Elements para a aquisição de dados. A MO foi aplicada para obter o tamanho e a morfologia das emulsões primária e secundária, assim como nas microesferas consolidadas. Foi possível verificar que o extrato se encontrava incorporado na matriz de PCL através da análise por FTIR (FTIR Bomen modelo MB 104). Para o efeito, foram efetuados espectros para a PCL pura, extrato hidroalcoólico e para as correspondentes microesferas, preparando pastilhas de KBr com uma concentração de amostra de 1% (m/m). Os espectros foram registados numa resolução de 4 cm⁻¹, entre 650 e 4000 cm⁻¹, utilizando 48 varrimentos.

2.8 Incorporação das microsferas num hidratante

As microesferas liofilizadas foram incorporadas num creme hidratante-base preparado pela técnica da emulsão (emulsão O/A). A fase aquosa (FA) continha 15 mL de água (não se utilizou espessante), e a fase óleo (FO) continha 2,0 mL de óleo de amêndoas doces aditivadas com 0,5 g de OLIVEM 1000 (emulsionante), 0,2 g de OLIVEM 300 (emoliente e co-emulsionante) e 0,25 g de Olivax (agente hidratante). As marcas Olivem e Olivax são marcas comerciais da BT Company (Milão, Itália). A FA e FO foram aquecidas separadamente a 70-75 ° C até completa homogeneização. Seguidamente estas foram deixadas arrefecer até 40° C antes da adição de 100 mg de microesferas à fase óleo. Finalmente, a FA foi adicionada à FO e misturadas vigorosamente. Adicionalmente, e para efeito de controlo, preparou-se uma amostra de

creme hidratante sem a adição de microesferas. As amostras com e sem microesferas foram analisadas por OM e comparadas.

2.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos em valores médios e respetivos desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando uma análise de variância (ANOVA) seguido do teste de *Tukey's HSD* com $\alpha = 0,05$, realizado com o programa SPSS v 18.0.

Resultados e Discussão

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico e da decocção

O perfil fenólico do extrato hidroalcoólico de *Helichrysum stoechas*, foi obtido por HPLC e registado a 370 nm (**Figura 15**) e a 280 nm (**Figura 16**).

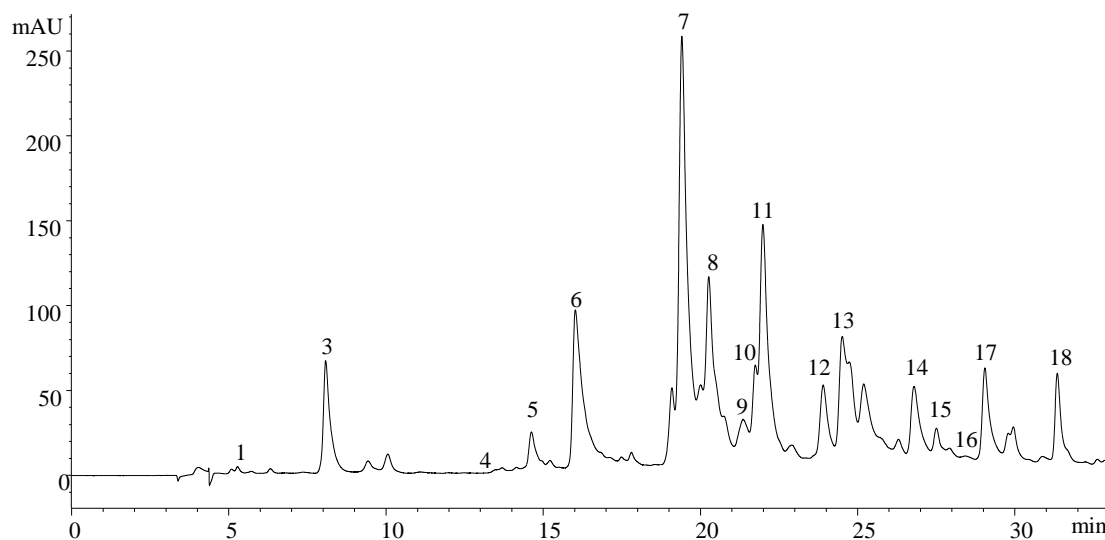


Figura 15. Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico de *Helichrysum stoechas*, obtido por HPLC, registado a 370 nm.

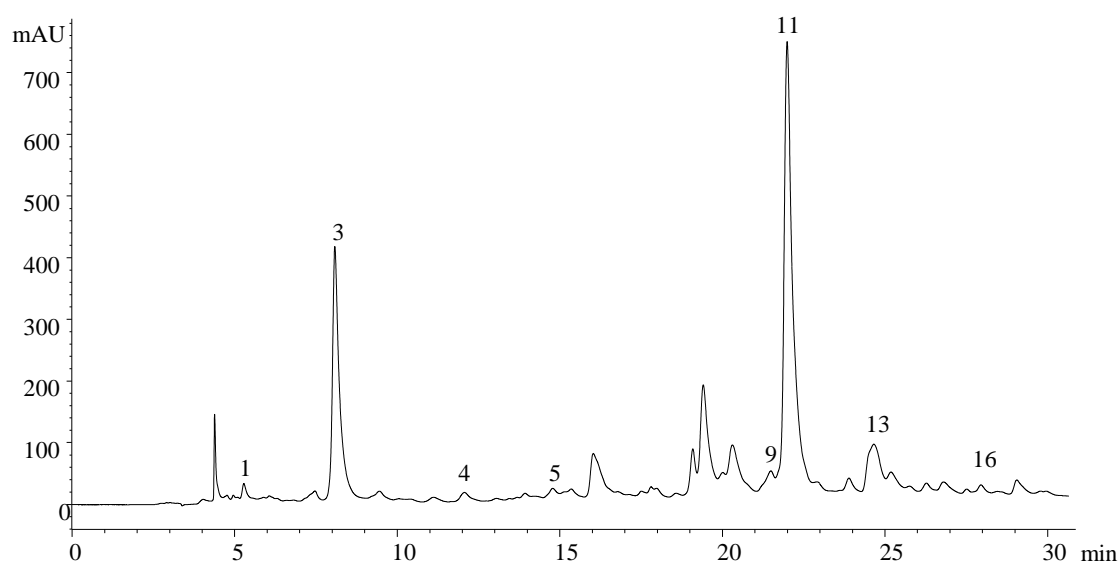


Figura 16. Perfil fenólico do extrato hidroalcoólico de *Helichrysum stoechas*, obtido por HPLC, registado a 280 nm.

As características dos picos e as tentativas de identificação são apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de absorção máxima na zona do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massa, tentativa de identificação dos ácidos fenólicos e dos flavonoides em *Helichrysum stoechas*.

Pico	Rt(min)	λ_{\max} (nm)	Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação
1	5,26	326	353	191(100),179(73),173(7),135(55)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
2	6,14	260,sh296	163	109(100)	Ácido protocatéquico
3	8,03	326	353	191(100),179(17),173(17),135(9)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
4	13,09	310	337	191(100),173(7),163(9),119(3)	Ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico
5	14,81	330	367	191(100),173(10),134(7)	Ácido 5- <i>O</i> -feruloilquínico
6	16,23	354	479	317(100)	Miricetina 3- <i>O</i> -glucósido
7	19,67	366	521	317(100)	Miricetina 7- <i>O</i> -acil-hexósido
8	20,64	344	463	301(100)	Quecetina 3- <i>O</i> -glucósido
9	21,78	326	515	353(100),335(13),203(3),191(73),179(69),173(22),161(5),135(22)	Ácido <i>cis</i> 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico
10	22,19	354	505	301(100)	Quercetina <i>O</i> -acil-hexósido
11	22,22	328	515	353(100),335(5),191(97),179(79),173(9),161(5),135(37)	Ácido <i>trans</i> 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico
12	24,33	361	505	301(100)	Quercetina 7- <i>O</i> -acil-hexósido
13	24,91	330	515	353(97),335(3),299(4),255(5),203(16),191(30),179(75),173(100),161(4),135(27)	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico
14	27,21	370	463	301(100)	Quercetina 7- <i>O</i> -hexósido
15	27,91	354	519	315(100)	Isoramnetina <i>O</i> -acil-hexósido
16	28,31	326	529	367(96),353(8),335(6),193(100),191(15),179(6),173(22),134(4)	Ácido cafeoil- <i>O</i> -feruloilquínico
17	29,41	366	489	327(57),285(100)	Kaempferol <i>O</i> -acil-hexósido
18	31,77	315,sh360	609	463(70),301(40)	Quercetina <i>O</i> -[<i>p</i> -cumaroil]-hexósido

Foram detetados dezoito compostos, nove dos quais são derivados de ácidos fenólicos. De acordo com os espectros de UV e os iões pseudomoleculares apresentados, seis dos compostos identificados são derivados do ácido cafeoilquínico (**picos 1, 3, 9, 11, 13 e 16**). O **pico 1** apresentou um ião pseudomolecular $[MH]^-$ a m/z 353 o qual foi identificado como o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, obtendo-se fragmentos a m/z 191 com uma intensidade superior a 73% e o ião a m/z 179, característica que coincide com a do ácido 3-acilclorogénico, segundo os registos de Clifford *et al.* (2003 e 2005). O **pico 3** foi identificado como sendo o ácido 5-*O*-cafeoilquínico por comparação dos valores de UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 326 nm) e do respetivo tempo de retenção aos valores de padrões comerciais. Os **picos 4 e 5** foram identificados por tentativa como sendo o 5-*O*-cumaroilquínico e o ácido 5-*O*-feruloilquínico, respetivamente, tendo em conta as intensidades relativas e os padrões de fragmentação semelhantes aos do ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

Os **picos 9, 11 e 13** $[MH]^-$ a m/z 515 correspondem a ácidos dicafeoilquínicos e foram atribuídos aos ácidos 3,5-*O*- (**picos 9 e 11**) e 4,5-*O*-dicafeoilquínicos (**pico 13**), respetivamente, com base na sua ordem de eluição e padrões de fragmentação (Clifford *et al.*, 2003 e 2005). Os padrões de fragmentação dos **picos 9 e 11** são semelhantes aos anteriormente descritos por Clifford *et al.* (2005) para o ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico. O fragmento MS^2 a m/z 353, produzido pela perda de um fragmento cafeoil $[MH-\text{cafeoil}]^-$, libertou fragmentos como o ácido 5-cafeoilquínico a m/z 191, 179 e 135, embora, neste caso, com um sinal mais intenso comparativamente a m/z 179 [ácido cafeico -H] $^-$ (~ 70 % de pico de base). Estes **picos 9 e 11** foram identificados como sendo os isómeros *cis* e *trans* do ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, respetivamente, com base na ordem de eluição descrita num estudo anterior (Barros *et al.*, 2012). O **pico 13** apresenta uma fragmentação idêntica ao ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico, descrita na literatura por Clifford *et al.* (2005). Neste caso, o sinal a m/z 335 foi detetado com dificuldade (<3% pico de base) e um sinal intenso a m/z 173, característico de um isómero substituído na posição 4, o que indicou a perda de uma porção de cafeoil na posição 5. O **pico 16** apresenta um ião pseudomolecular a m/z 529 que produziu fragmentos de m/z 367 ([*O*-ácido-feruloilquínicos-H] $^-$), 353 ([ácido-cafeoilquínico-H] $^-$), e 179 e 193, correspondendo ao ácido cafeico desprotonado e ao ácido ferúlico desprotonado, respetivamente, o que permitiu a identificação dos mesmos como sendo o cafeoil-*O*-feruloilquínicos.

O **pico 2** foi identificado como ácido protocatéquico por comparação do seu espectro de UV ($\lambda_{\text{máx}}$ 260, sh296 nm) e com o tempo de retenção relativamente ao padrão comercial.

Os compostos fenólicos restantes correspondem a derivados de flavonoides (**Tabela 4**). A miricetina 3-*O*-glucósido (**pico 6**) e a quercetina 3-*O*-glucósido (**pico 8**) foram positivamente identificadas de acordo com as suas características de retenção, de massa e UV-vis por comparação com um padrão comercial. O ião pseudomolecular ($[M-H]^-$ a m/z 463) e os produtos (m/z a 301, quercetina) do ião do **pico 14** permitiram a identificação do mesmo, como sendo um hexósido de quercetina. Este pico mostrou um maior comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ (370 nm) do que a quercetina 3-*O*-glucósido (344 nm), mas semelhante à aglicona de quercetina. De acordo com Mabry *et al.* (1970), a introdução de um glucósido nos hidroxilos das posições 7, 3' ou 4' não deveria ter efeito sobre o comprimento de onda máximo nem na forma do espectro em relação à aglicona. Assim, o **pico 14** foi por tentativamente identificado como quercetina-7-*O*-hexósido.

Os **picos de 10 a 12** ($[M-H]^-$ at m/z 505) correspondem a quercetina *O*-acetil-hexósido de acordo com o seu ião pseudomolecular e fragmento MS^2 libertado em m/z 301 (quercetina; $[M-H-42-162]^-$, a perda de uma porção de acetil-hexósido). Do mesmo modo, os **picos 7, 15 e 17**, foram designados como acetil-hexósidos de miricetina, isoramnetina e kampferol, respetivamente, com base no seu ião pseudomolecular e iões dos produtos. O deslocamento batocrómico do $\lambda_{\text{máx}}$ observado no **pico 7** (366 nm) em relação à miricetina 3-*O*-glucósido (**pico 6**; 354 nm) permitiu a identificação como mericitina 7-*O*-acetil-hexósido.

Finalmente, o **pico 18** apresenta um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ em m/z 609, originando dois fragmentos MS^2 em m/z 463 ($[M-H-146]$, a perda de uma porção de *p*-cumaroil) e em m/z 301 ($[M-H-162]$, perda de uma porção hexosil), embora a perda de 146 mu possa também corresponder a um resíduo de ramnosil; o máximo a 315 nm no espectro de UV do pico apontou para um substituinte cumaroil. Assim, o composto corresponde a uma quercetina 3-*O*-[*p*-cumaroil]-glucósido. Lavault & Richomme (2004), identificaram um composto semelhante, quercetina 3-*O*-[6-*trans-p*-coumaroil]- β -*D*-glucósido (*helichrisosido*), apresentando o mesmo MS e espectros UV; portanto, o **pico 18** foi atribuído a este composto.

O isómero *trans* do ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico foi o ácido fenólico mais abundante (43,31 e 15,65 mg/g de extrato e decocção, respetivamente) (**Tabela 5**), enquanto que a miricetina 7-*O*-acetil-hexósido foi o flavonoide mais abundante

encontrado nas amostras (21,76 e 9,54 mg/g de extrato e decocção, respetivamente). O extrato hidroalcoólico apresentou maior concentração de compostos fenólicos (135,61 mg/g de extrato) do que a decocção (60,37 mg/g de decocção). O ácido protocatéquico foi encontrado apenas na decocção (**Tabela 5**), podendo ser formado como um produto de degradação da quercetina, devido à elevada temperatura aplicada nesta preparação.

Há algumas semelhanças no perfil de compostos fenólicos identificados nas flores de *H. stoechas* de Portugal, e em amostras de Itália (Carini *et al.*, 2001) e França (Lavault & Richomme, 2004). No entanto, uma amostra da Turquia (Albayrak *et al.*, 2010) apresentou um perfil muito diferente, sendo o ácido clorogénico o único composto encontrado em comum. Lavault & Richomme (2004) identificou dezoito compostos fenólicos (α -pironas, cloroglucínóis, ácidos fenólicos, flavonoides e cumarina), sendo identificados quatro ácidos fenólicos e flavonoides; quercetina-3-O- β -D-glucósido, *helichrisosido* (quercetina 3-O-[6-*trans-p*-coumaroil]- β -D-glucósido), quercetina 7-O- β -D-glucósido, ácido 5-cafeoilquínico e ácido 3,5-dicafeoilquínico foram também identificados. Carini *et al.* (2001) identificaram cinco ácidos fenólicos e sete flavonoides, sendo o perfil de ácidos fenólicos semelhante à amostra portuguesa, enquanto que nos flavonoides foram encontradas algumas diferenças. Estes autores identificaram flavonas, assim como derivados de apigenina e naringenina. Lavault & Richomme (2004) e Carini *et al.* (2001) não apresentaram dados sobre a quantificação destes compostos. Albayrak *et al.* (2010) foram os únicos autores que apresentaram dados de quantificação, sendo o principal composto o ácido clorogénico, seguido de apigenina 7-glucósido, embora, as quantidades encontradas tenham sido inferiores às obtidas neste trabalho.

Tabela 5. Quantificação dos compostos fenólicos (mg/g de extrato ou decocção) no extrato hidroalcoólico e na decocção de *Helichrysum stoechas* (média± SD).

Compostos Fenólicos	Extrato Hidroalcoólico	Decocção
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,68 ± 0,01	0,99 ± 0,22
Ácido protocatéquico	nd*	1,14 ± 0,05
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	21,94 ± 0,28	12,12 ± 0,12
Ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,29 ± 0,29	0,26 ± 0,03
Ácido 5- <i>O</i> -feruloilquínico	0,55 ± 0,55	0,52 ± 0,06
Miricetina 3- <i>O</i> -glucósido	9,37 ± 0,08	3,08 ± 0,19
Miricetina 7- <i>O</i> -acetil-hexósido	21,76 ± 0,52	9,54 ± 0,05
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido	9,28 ± 0,43	3,80 ± 0,19
Ácido <i>cis</i> 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	2,00 ± 0,01	0,79 ± 0,08
Quercetina <i>O</i> -acetil-hexósido	2,63 ± 0,36	1,36 ± 0,06
Ácido <i>trans</i> 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	43,31 ± 0,15	15,65 ± 0,11
Quercetina 7- <i>O</i> -acetyl-hexósido	4,49 ± 0,16	2,18 ± 0,01
Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	4,94 ± 0,24	2,97 ± 0,11
Quercetina 7- <i>O</i> -hexósido	4,93 ± 0,27	1,73 ± 0,05
Isoramnetina <i>O</i> -acetil-hexósido	0,97 ± 0,04	0,35 ± 0,01
Ácido cafeoil- <i>O</i> -feruloilquínico	0,45 ± 0,02	0,20 ± 0,02
Kaempferol <i>O</i> -acetil-hexósido	4,61 ± 0,10	2,16 ± 0,02
Quercetina 3- <i>O</i> -[<i>p</i> -cumaroil]-glucósido	3,43 ± 0,11	1,51 ± 0,09
Ácidos fenólicos totais	74,16 ± 0,44 ^a	34,64 ± 0,16 ^b
Flavonoides totais	61,45 ± 1,67 ^a	25,72 ± 0,02 ^b
Compostos fenólicos totais	135,61 ± 2,10 ^a	60,37 ± 0,14 ^b

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

nd* não detetado.

3.2. Propriedades antioxidantes *in vitro*

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e da decocção de *H. stoechas* são apresentados na **Tabela 6**. O extrato hidroalcoólico apresentou maior atividade antioxidante, ou seja, menores valores de EC₅₀ em todos os ensaios *in vitro* (valores de EC₅₀ entre 79,84 e 36,62 µg/mL) em relação à decocção (com valores de EC₅₀ variando entre 435,20 e 147,03 µg/mL). Isto está de acordo com a maior concentração de compostos fenólicos (135,61 mg/g) encontrado no extrato hidroalcoólico, em comparação com a decocção (60,37 mg/g).

Em relação à atividade de captação de radicais DPPH, o extrato hidroalcoólico mostrou menor capacidade do que um extrato metanólico obtido a partir de uma amostra de *H. stoechas* da Turquia (valor de EC₅₀ 7,95 µg/mL, Albayrak *et al.*, 2010). O extrato metanólico, anteriormente estudado por Barros *et al.* (2010), e obtido a partir da mesma amostra que a utilizada no presente trabalho, apresentou valores de EC₅₀ superiores (≤ 520 µg/mL) e, portanto, atividade antioxidante menor. Segundo o nosso conhecimento, não há estudos publicados relativos à decocção da planta estudada.

Tabela 6. Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e da decocção de *Helichrysum stoechas*.

Atividade antioxidante	Extrato hidroalcoólico	Decocção
Atividade captadora de radicais livres DPPH (EC ₅₀ , µg/mL)	36,62 ± 0,39 ^b	435,20 ± 2,66 ^a
Poder redutor (EC ₅₀ , µg/mL)	75,14 ± 3,77 ^b	187,57 ± 1,98 ^a
Inibição da descoloração do β-caroteno (EC ₅₀ , µg/mL)	79,84 ± 1,45 ^b	171,08 ± 1,71 ^a
Inibição de TBARS (EC ₅₀ , µg/mL)	51,62 ± 1,27 ^b	147,03 ± 7,03 ^a

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05).

3.3. Preparação de microesferas e incorporação em hidratantes

As microesferas em matriz de PCL contendo o extrato hidroalcoólico de *H. stoechas* liofilizado foram preparadas pela técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente. O processo de encapsulação foi monitorizado por OM, verificando os vários pontos-chave do processo. A **Figura 17A** mostra a emulsão A/O evidenciando as gotículas aquosas esféricas e individualizadas, com um tamanho estimado de 10 μm , dispersas no meio orgânico. A **Figura 17B** e a **Figura 17C** mostram a emulsão final A/O/A logo após a preparação e após 10 minutos sob agitação a 400 rpm, respetivamente. As microesferas apresentam uma estrutura esférica e verifica-se a presença de gotículas no seu interior (gotículas de água contendo o extrato). Adicionalmente, e tal como previsto, foi observada uma redução de tamanho, como consequência da agitação, obtendo-se microesferas com um tamanho final estimado entre 40 e 170 μm .

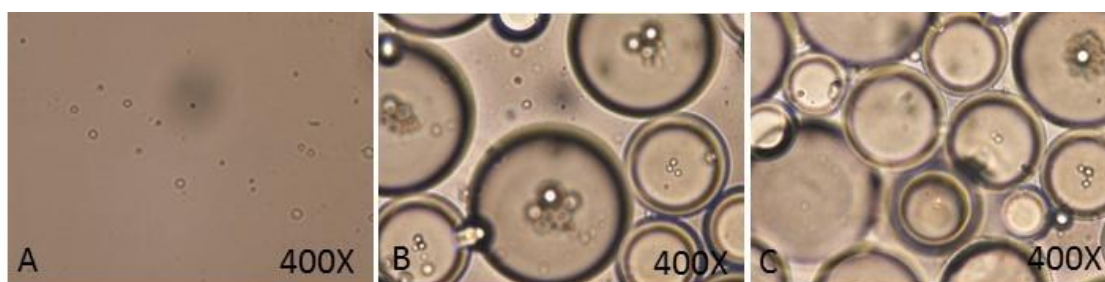


Figura 17. Análise em microscopia ótica com a ampliação de 400X da: emulsão A/O (A), emulsão A/O/A logo após a preparação (B) depois de 10 minutos, sob agitação a 400 rpm (C).

A **Figura 18** mostra o processo de consolidação das microesferas. Durante este processo, o tamanho das microesferas obtidas diminuiu à medida que decorre a evaporação do DCM. Como pode ser observado na **Figura 18A** (imagem após uma hora de evaporação a 40 °C e à pressão atmosférica), a consolidação foi insignificante, tornando-se evidente apenas após duas horas sob evaporação nas mesmas condições (**Figura 18B**). Para garantir a remoção total de DCM, e, conseqüentemente, a consolidação total das microesferas, a evaporação prosseguiu sob pressão reduzida durante uma hora adicional (**Figura 18C**). O tamanho final obtido das microesferas foi estimado entre 30 e 100 μm .

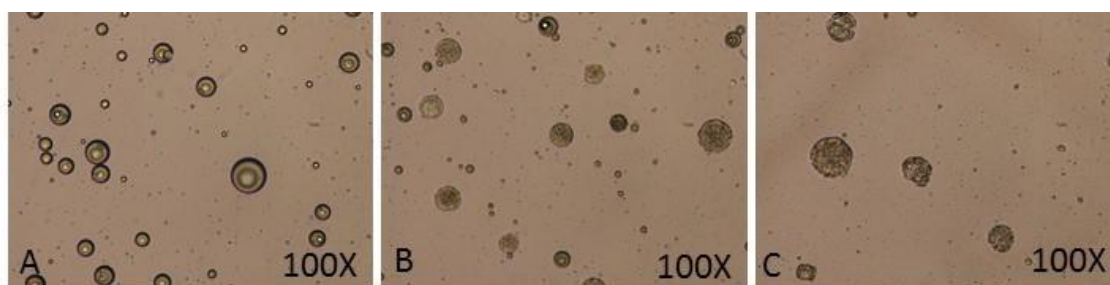


Figura 18. Evolução da morfologia das microesferas durante o processo de evaporação do solvente (ampliação de 100X): (A) após uma hora sob evaporação a 40 °C e à pressão atmosférica, (B), depois de duas horas, sob evaporação, a 40 °C e à pressão atmosférica, e (C) depois de uma hora adicional a 40 °C, sob pressão reduzida.

A análise FTIR da PCL, do extrato e das microesferas liofilizadas encontra-se representada na **Figura 19**. Como era previsto, o espectro das microesferas é marcado pela presença da PCL (foi usada uma razão de extrato/PCL de 70/800 (m/m)). Não obstante, e comparativamente com o espectro da PCL, as microesferas apresentam, para ambas as vibrações devidas aos grupos OH e C=O, uma maior proeminência relativamente à zona dos estiramentos dos CHs. Isto pode ser explicado pela incorporação efetiva do extrato, composto rico em OHs e C=Os.

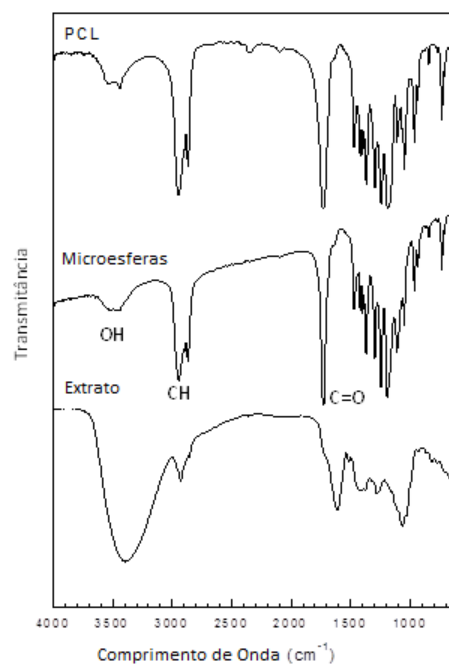


Figura 19. Os espectros FTIR da policaprolactona (PCL), do extrato de *Helichrysum stoechas* e das microesferas produzidas liofilizadas.

As microesferas liofilizadas obtidas foram facilmente dispersas na fase óleo, ao contrário da fase aquosa, onde apresentaram aglomeração. Por esta razão, a fase óleo foi a escolhida como meio adequado à incorporação das microesferas no hidratante para prosseguimento do processo de produção do hidratante (processo baseado na preparação de uma emulsão O/A). A **Figura 20** apresenta as imagens do hidratante-base produzido (**Figura 20A**), bem como do hidratante incorporando as microesferas liofilizadas (ampliação de 100X (**Figura 20B**) e 400X (**Figura 20C**)). Como pode ser observado, as microesferas são claramente visíveis na matriz do hidratante na forma de partículas individualizadas.

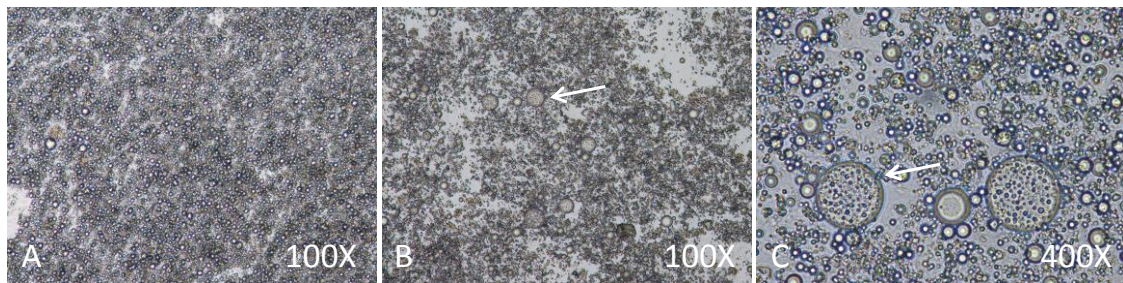


Figura 20. Microesferas incorporadas num hidratante. (A) Hidratante-base (B) Hidratante com microesferas incorporadas numa ampliação de 100X e (C) Hidratante com microesferas incorporadas numa ampliação de 400X. A seta em branco põe em evidência as microesferas incorporadas.

Conclusões e Perspetivas de Trabalho Futuro

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como objetivo explorar o potencial antioxidante dos compostos fenólicos das sumidades floridas (capítulos e brácteas e os 15 cm terminais dos caules com folhas que suportam as inflorescências) de *Helichrysum stoechas* para aplicações cosméticas e envolveu as seguintes etapas: (i) avaliação da atividade antioxidante e caracterização química dos compostos fenólicos obtidos por extração hidroalcoólica e decocção; (ii) microencapsulação do extrato hidroalcoólico na sua forma liofilizada numa matriz de PCL e (iii) estudos preliminares de incorporação das microesferas num hidratante-base.

No que respeita à caracterização química foram identificados dezoito compostos fenólicos diferentes, sendo o ácido 3,5-*O* dicafeoilquínico, o ácido fenólico mais abundante e a mericetina *O*-acetil-hexósido, o flavonoide mais abundante. Em termos de atividade biológica, e comparativamente com a decocção, o extrato hidroalcoólico apresentou a maior atividade antioxidante, o que pode ser correlacionado com o seu maior teor de compostos fenólicos. O estudo comparativo da decocção e do extrato hidroalcoólico de *H. stoechas* assume relevo no contexto da documentação científica da sua utilização ancestral, permitindo tirar partido dos seus efeitos terapêuticos de forma mais eficaz, procedendo a preparações que apresentem o maior potencial antioxidante. Por outro lado, a identificação dos compostos bioativos presentes nas preparações utilizadas suporta de forma mais segura sua utilização medicinal e permite um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de ação envolvidos. Na verdade, as plantas são utilizadas há milhares de anos no tratamento de várias patologias, sem bases científicas que comprovem a sua bioatividade e, sobretudo, sem conhecer os compostos químicos que lhes conferem o seu efeito terapêutico. Assim, este tipo de estudo contribuiu para a valorização da flora medicinal silvestre e para a validação de práticas tradicionais de utilização de plantas com finalidades terapêuticas.

No que concerne à microencapsulação dos compostos fenólicos caracterizados optou-se por utilizar o extrato hidroalcoólico dado ter revelado uma capacidade antioxidante superior. Este foi utilizado na sua forma liofilizada tendo-se escolhido para material de encapsulação a PCL, um poliéster que não obstante ser de origem petroquímica é referenciado na literatura como tendo características de

biodegradabilidade, uma propriedade importante para a aplicação em desenvolvimento. Para a microencapsulação utilizou-se a técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente tendo sido obtidas microesferas com forma esférica e perfeitamente individualizadas, tendo o seu tamanho sido estimado entre 30 e 100 μm .

Quanto aos ensaios de incorporação das microesferas no hidratante (preparado pela técnica da emulsão óleo-em-água (O/A)) optou-se por fazer a sua introdução na fase óleo. Por MO foi possível observar claramente as microesferas na matriz do hidratante tendo-se também comprovado sua estabilidade com o tempo.

Em síntese, os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *H. stoechas* e a viabilidade da sua microencapsulação, abrindo novas possibilidades de exploração e aplicação destes extratos fenólicos naturais, nomeadamente na indústria de cosméticos. A procura deste tipo de produtos tem aumentado significativamente nos últimos anos dado que as matrizes naturais podem ser fontes de antioxidantes importantes no combate ao stresse oxidativo envolvido, entre outros processos, no do envelhecimento.

Em termos de trabalho futuro seria interessante comprovar a atividade antioxidante do creme hidratante contendo o extrato microencapsulado e a sua preservação com o tempo, nomeadamente por comparação com a incorporação direta do extrato livre. Adicionalmente, o método de microencapsulação utilizado poderia ser melhorado tentando uma abordagem mais “verde” mediante a utilização de outras matrizes poliéster de origem natural (por exemplo, utilização do poli-ácido láctico (PLA)) e a substituição do solvente utilizado (diclorometano).

Bibliografía

V. BIBLIOGRAFIA

- Adams M., Berset C., Kessler M., Hamburger M.. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 121, 343-359.
- Aguiar, C. Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente. Vol. III, Sistemática. Instituto Politécnico de Bragança, 2012, 89-90.
- Al-Saghir J., Al-Ashi R., Salloum R., Saliba N. A. Talhouk R. S., Homaidan F. R..Anti-Inflammatory properties of Salograviolide A purified from Lebanese plant *Centaurea ainetensis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2009, 9, 1-10.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Hamzaoglu, E.. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 2010, 119, 114-122.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A.. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 2004, 84, 551 – 562.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K.. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127, 183–198.
- Barreira J.C.M., Ferreira I.C.F.R., Oliveira M.B.P.P., Pereira J.P.. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, 2008, 107, 1106-1113.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., Santos-Buelga C.. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 1576-1582.

- Barros, L., Oliveira, O., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R.. In *vitro* antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 2010, 32, 572-579.
- Berker, K.I., Güclü, K., Tor, I., Apak, R.. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 2007, 72, 1157-1165.
- Bird, R.P., Draper, H.H.. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, 1984, 105, 299-305.
- Bonet M. A., Parada M., Selga A., Valle`s J.. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda` and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 145-168.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1995, 28, 25 – 30.
- Brito G.F., Agrawal P., Araújo E. M., Mélo T.J.A.. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2011, 6.2, 127-139.
- Campbell G., Lambert J. D.H., Arnason T., Towers G.H.N.. Allelopathic properties of terthienyl and phenylheptatriyne, naturally occurring compounds from species of Asteraceae. *Journal of Chemical Ecology*, 1982, 8, 961-972.
- Carini M., Aldini G., Furlanetto S., Stefani R., Facino, R. M.. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24, 517-526.

- Carocho M., Ferreira I.C.F.R.. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 51, 15-25.
- Carvalho, A.M.. Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. *Biblioteca de Ciências 35*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2010.
- Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) [base de dados na Internet]. The database and ontology of Chemical Entities of Biological Interest [30 de Setembro de 2013]. Acesso em: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:15767>
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N.A.. A hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N.A.. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 3821-3832.
- Cunha, A.P., Ribeiro, J.A., Roque, O.R.. Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações. 2ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009, 193, 194.
- Cunha, A.P., Silva, A., Roque, O.R., Cunha, E.. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia, 2ª ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian, 2008, 219.
- Derval S.R., Denise F.P., Maria R.C.. Thermal properties and biodegradability of PCL and PHB submitted in fungi pool. *Revista de Ciência & Tecnologia*, 2000, 15, 75-80.
- Eroglu, H.E., Aksoy, A., Hamzaoglu, E., Budak, U., Albayrak, S.. Cytogenetic effects of nine *Helichrysum taxain* human lymphocytes culture. *Cytotechnology*, 2009, 59, 65-72.

- Fanga Z., Bhandari B.. Encapsulation of polyphenols – a review. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21, 510-523.
- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V.. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. Bioanálise -Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde, 2007, Ano IV, n.º 2, Julho/Dezembro.
- Ferreira I.C.F.R., Barros L., Abreu R.M V.. Antioxidants in wild mushrooms. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16, 1543-1560.
- Flora-On. Sociedade Portuguesa de Botânica (SPBotânica). [16 de Fevereiro de 2013]. Acesso em: <http://www.flora-on.pt>
- Franco, J.A. Nova Flora de Portugal. Continente e Açores-Clethraceae (Compositae). Vol. III. Lisboa. 1984.
- Giri, T.K., Choudhary, C., Ajazuddin, A.A., Badwaik, H., Tripathi, D.K.. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. Saudi Pharmaceutical Journal, 2012, 21, 125-141.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A.M., Sousa, M.J., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R.. Aromatic plants as a source of important phytochemicals: Vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. Industrial Crops and Products, 2009, 30, 427-430.
- Ghosh, S.K. Functional coatings and microencapsulation: A general perspective Functional coatings, 2006, 1-28.
- Gonzalez, G.L. del Jardin Botánico CSIC. La Guia de incafo de los árboles y arbustos de la Península Ibérica. 4ª ed., 1993, 787-788.

- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T.. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1988, 36, 2090-2097.
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M.. Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 107, 157–160.
- Ingrouille, M.J., Eddie, B. *Plants Diversity and Evolution*. 1ª ed..Cambridge University Press, 2006, 249-250.
- Kanter M.. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of Nutrition Society*, 1998, 57, 9-13.
- Kaur I.P., Geetha T.. Screening methods for antioxidants-A review. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 2006, 6, 305-312.
- Lachman, L., Lieberman, H.A., Kaning, J.L. *Teoria e prática na Indústria Farmacêutica*, vols. I e II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, 707-711.
- Lavault, M., Richomme, P.. Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olonnense. *Chemistry of Natural Compounds*, 2004, 40, 118-121.
- Leonti, M.. The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 134, 542-555.
- Lopes, A.R.A., Vargas, M.L.S., Cavalcanti, A.S.S., Silva, A.G. Plantas e seus extratos – administração e biodisponibilidade de fitoterápicos na pele. *Natureza on line [revista em internet]* 2006 [25 de Janeiro de 2013];4(2); pg. 62-66 [online] Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>.

- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B.. The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag Publication. 1970.
- Malinin, N.L., West, X.Z., Byzova, T.V.. Oxidation as “The Stress of Life”. AGING, 2011, 3, 1-5.
- Martin, A., Puech, S.. *Interannual and interpopulation variation in Helichrysum stoechas* (Asteraceae), a species of disturbed habitats in the Mediterranean region. Plant Species Biology, 2001, 16, 29-37.
- Martins, I.M.D.. Microencapsulation of thyme oil by coacervation: Production, characterization and release evaluation [Tese de Doutoramento]. Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, 2012.
- Mi-Yae, H.E., Tae-Hun, K., Nak-ju, S.. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochataceae) extracts. Food Chemistry, 2003, 82, 593 – 597.
- Molyneux, P..The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2004, 26, 211-219.
- Montse, R., Bonet, M.A., Garcia, S., Garnatje, T., Valle`s, J.,. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river *Ter valley* (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Journal of Ethnopharmacology, 2007, 113, 267-277.
- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., Gomes, L.R.. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124, 270-283.
- Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z.. Antioxidative activity of natural products from plants. Life Sciences, 2000, 66, 709-723.

- Novais, M.H. Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C.. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 93, 183-195.
- Ohkawa, H., Oshishi, N., Yagi, K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95, 351-358.
- Oyaizu, M.. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 1986, 44, 307-315.
- Pio Font Quer. *Plantas Medicinales, el Dioscórides renovado*. Barcelona. Ediciones Península, s.a., 2000, 783-784.
- Poljsak, B., Dahmane, R.. Free Radicals and Extrinsic Skin Aging. *Dermatology Research and Practice*, 2012, 1-4.
- PubChem Compound [base de dados na Internet]. National Center for Biotechnology Information [13 de Fevereiro de 2013]. Acesso em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=85297340&viewopt=PubChem>
- Quiles, J.L., Pamplona, R. Ramirez-Tortosa, M.C., Naudí, A., Portero-Otin, M., Araujo-Nepomuceno, E., López-Frías, M., Battino, M., Ochoa, J.J.. Coenzyme Q addition to an n-6 PUFA-rich diet resembles benefits on age-related mitochondrial DNA deletion and oxidative stress of a MUFA-rich diet in rat heart. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2010, 131, 38-47.
- Quesada, T.G., Rodriguez, B., Valverde, S.. The constituents of *Helichrysum stoechas*. *Phytochemistry*, 1972, II, 446-449.
- Schrooyen, P.M.M., Meer, R., De Kruif, C.G.. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2001, 475-479.

- Setti, R.F. (IC), Vieira, P.T., Rosa. Formação e Caracterização de Partículas PCL/PLA por Tecnologia de Flúidos Supercríticos para Liberação. [15de Janeiro de 2013]. Disponível em: <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xixcongresso/paineis/094353.pdf>
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F.. Administração oral de peptídeos e proteínas: II Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2003, 39, 1-20.
- Silva, C.G., Herdeiro, R.S., Mathias, C.J., Panek, A.D., Silveira, C.S., Rodrigues, V.P., Rennó, M.N.. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 2005, 52, 229-233.
- Singh, R.P., Agarwal, R.. Cosmeceuticals and Silibinin. *Clin Dermatol*, 2009, 27, 479-484.
- Steenkamp, V., Mathivha, E., Gouws, M.C., Rensburg, C.E.J.. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 95, 353-357.
- Theakston F.. *Air Quality Guidelines for Europe World*. 2nd. Edition. World Health Organization Regional Office for Europe Copenhagen: WHO Regional Publications, 2000.
- The Plant List 2013 [base de dados na Internet]. [30 de Setembro de 2013]. Acesso em: <http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=helichrysum+stoechas>
- Uprety, Y., Asselin, H., Dhakal, A. Julien, N.. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2012, 8, 1-14.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser J.. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 39, 44-84.

Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., Vega, J.M.M.. Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications, 2011, 9, 319-333.

Anexos

VI. ANEXOS

Anexo 1. Publicação submetida “*Exploring the antioxidant potential of Helichrysum stoechas (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer*”

Anexo 2. Comunicação em painel no 1^ost Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho, “*Phenolic profile of Helichrysum stoechas L. Moench*”.

Anexo 3. Comunicação em painel no 1^ost Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho, “*Antioxidant activity of decoctions of Centaurea paniculata L. and Helichrysum stoechas L. Moench*”.

Anexo 4. Comunicação oral no I Encontro de Jovens Investigadores do Instituto Politécnico de Bragança, “*Potencial antioxidante dos compostos fenólicos de Helichrysum stoechas (L.) Moench para aplicações cosméticas: caracterização química, microencapsulação e incorporação num hidratante*”.

**Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.)
Moench phenolic compounds for cosmetic applications: chemical
characterization, microencapsulation and incorporation into a
moisturizer**

Marisa R. Barroso^{1,3}, Lillian Barros,^{1,2} Montserrat Dueñas,² Ana Maria Carvalho,¹

Celestino Santos-Buelga,² Isabel P. Fernandes³, Maria F. Barreiro³

Isabel C.F.R. Ferreira^{1,*}

¹*Mountain Research Center (CIMO), ESA, Polytechnic Institute of Bragança, Campus de Santa Apolónia, 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.*

²*GIP-USAL, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.*

³*Laboratory of Separation and Reaction Engineering (LSRE), Associate Laboratory LSRE/LCM, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Santa Apolónia, 1134, 5301-857 Bragança, Portugal*

* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail: iferreira@ipb.pt telephone +351-273-303219; fax +351-273-325405).

Abstract

The present work explores the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications involving the following steps: chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. Eighteen different phenolic compounds were identified in flowering aerial parts (decoction and hydroalcoholic extract), being 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and myricetin7-*O*-acetylhexoside the most abundant phenolic acid and flavonoid, respectively. Comparatively to the decoction form, the hydroalcoholic extract presented both higher antioxidant activity and higher phenolic content, being its lyophilized form chosen to proceed with microencapsulation studies. Double emulsion/evaporation microencapsulation technique was applied to produce polycaprolactone based microspheres containing *H. stoechas* hydroalcoholic extract, which were then successfully incorporated into a moisturizer. The results obtained demonstrated the antioxidant potential of *H. stoechas* hydroalcoholic extract and the viability of its microencapsulation, thus opening new perspectives for the exploitation of these natural phenolic extracts in applications such as the cosmetic industry.

Keywords: *Helichrysum stoechas*, phenolic compounds, decoction, antioxidant activity, microencapsulation, cosmetics

Introduction

Natural matrices represent a rich source of biologically active compounds and are an example of molecular diversity, with recognized potential for the development of cosmetics or cosmeceuticals. Bioactive properties of various plants are connected with the presence of phenolic compounds, especially flavonoids (Mishra et al., 2008). The biological, pharmacological and medicinal properties of this group of compounds have been extensively reviewed (Marchand, 2002) and related to their antioxidant properties by preventing UV induced oxygen free radical generation and lipid peroxidation (Kaur and Saraf, 2011).

Cosmetic and cosmeceutical preparations from herbal origin are most popular among consumers, as these agents are typically nontoxic and possess strong antioxidant activity. Since oxidative stress is one of the major mechanisms for skin aging and dermatological disorders, phytochemicals such as phenolic compounds could be useful for treating or preventing those conditions (Singh and Agarwal, 2009).

Ethnobotanical surveys conducted in Northeastern Portugal have highlighted the medicinal use of decoctions of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (shrubby everlasting; port. douradinha) for cold, bronchitis and fever (Carvalho, 2010). Moreover, the antioxidant potential of extracts of this plant (Carini et al., 2001; Albayrak et al., 2010; Barros et al., 2010) could also support the development of cosmetic/cosmeceutical products, similarly to some documented examples dealing with the encapsulation of various plant extracts and isolated compounds. For example, Harris et al. (2011) studied the *Ilex paraguariensis* extract encapsulation in microspheres and nanoparticles of chitosan. This extract presents a high content of phenolic compounds with several pharmacological properties including anti-aging activity. In addition, the cutaneous absorption of green tea extract compounds was studied, both in free and

microencapsulated forms (Wisuitiprot et al., 2011). In what concerns the encapsulation of isolated compounds for cosmetic applications, rosmarinic acid (Kim et al., 2010) and quercetin (Sacalia and Mezzena, 2009) were studied using polycaprolactone and lipidic matrices, respectively.

Although antioxidant properties of *H. stoechas* methanol extract (Carini et al., 2001; Albayrak et al., 2010; Barros et al., 2010) and phenolic compounds (Lavault and Richomme, 2004) have been already investigated, there are no reports neither on the hydroalcoholic extract nor on its most used form, decoction. Moreover, to the best of our knowledge, microencapsulation of such extracts has never been studied.

This work aimed to characterize phenolic compounds of the hydroalcoholic extract and decoction of *H. stoechas* flowering aerial parts, and evaluate their antioxidant potential. Furthermore, the microencapsulation of the lyophilized hydroalcoholic extract was tested by means of water-in-oil-in-water (w/o/w) solvent evaporation technique, a widely used method in pharmaceutical and cosmetic applications (Li et al., 2008, Koo et al., 2008, Giri et al., 2012).

Materials and methods

Plant material

Helichrysum stoechas (L.) Moench (Asteraceae) is a perennial species growing to 0.5 m, in dry, rocky and sandy habitats of the Natural Park of Montesinho territory, Trás-os-Montes, North-eastern Portugal. The inflorescences and leafy flowering stems of about 15 cm long were randomly gathered from several specimens in 2009 late spring and early summer, considering the Portuguese folk pharmacopoeia descriptors, the local medicinal criteria of use and the species growth patterns.

Morphological key characters from the Nova Flora de Portugal (Franco, 1994) were used for plant identification. Nomenclature follows The Plant List 2013 (<http://www.theplantlist.org/>). Voucher specimens are kept in the Escola Superior Agrária de Bragança Herbarium (BRESA). The plant material was lyophilized (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, USA), reduced to powder (~20 mesh) and kept in the best conditions for subsequent use.

Standards and Reagents

HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Formic and acetic acids were purchased from Prolabo (VWR International, France). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Phenolic compound standards were from Extrasynthèse (Genay, France). All other chemicals were of analytical grade and purchased from chemical suppliers. Water was treated in a Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, USA).

Polycaprolactone diol (Mw 3000) (PCL) was supplied by Solvay Caprolactones (Solvay Interlox Ltd, United Kingdom) and Tergitol 61E was supplied by Dow Surfactants (The Dow Chemical Company, USA). Methylene Chloride (DCM) was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and Polyvinylalcohol (PVA, trade name Celvol 840) was supplied by Celanese Chemicals (USA).

Extraction procedures for phenolic compounds

A hydroalcoholic extraction was performed using the lyophilized plant material (1 g) stirring with 30 mL of methanol:water (80:20, v/v) at 25 °C at 150 rpm for 1 h and

filtered through Whatman No. 4 paper. The residue was then extracted with one additional 30 mL portion of the hydroalcoholic mixture. The combined extracts were evaporated at 35 °C under reduced pressure (rotary evaporator Büchi R-210, Flawil, Switzerland) and then further lyophilized (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, USA)

A decoction was also prepared from the lyophilized plant material (1 g), by adding 200 mL of distilled water, heating (heating plate, VELP scientific) and boiling for 5 min. The mixture was left to stand for 5 min and then filtered under reduced pressure. The obtained decoction was frozen and lyophilized.

The lyophilized hydroalcoholic extract and decoction were re-dissolved in methanol:water (80:20, v/v) and water, respectively (final concentration 2.5 mg/mL), for phenolic compounds determination and antioxidant activity evaluation. The final solutions were further diluted to different concentrations to be submitted to distinct *in vitro* assays.

Characterization of phenolic compounds

The extracts were analysed using a Hewlett-Packard 1100 chromatograph (Agilent Technologies) with a quaternary pump and a diode array detector (DAD) coupled to an HP Chem Station (rev. A.05.04) data-processing station. A Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈, 3 µm (4.6 mm × 150 mm) column thermostatted at 35 °C was used. The solvents used were: (A) 0.1% formic acid in water, (B) acetonitrile. The elution gradient established was isocratic 15% for 5 min, 15% B to 20% B over 5 min, 20-25% B over 10 min, 25-35% B over 10 min, 35-50% for 10 min, and re-equilibration of the column, using a flow rate of 0.5 mL/min. Double online detection was carried out in the DAD using 280 nm and 370 nm as preferred wavelengths and in a mass spectrometer (MS) connected to HPLC system via the DAD cell outlet.

MS detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source and a triple quadrupole-ion trap mass analyzer that was controlled by the Analyst 5.1 software. Zero grade air served as the nebulizer gas (30 psi) and turbo gas for solvent drying (400 °C, 40 psi). Nitrogen served as the curtain (20 psi) and collision gas (medium). The quadrupoles were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at -4500V in the negative mode. The MS detector was programmed for recording in two consecutive modes: Enhanced MS (EMS) and enhanced product ion (EPI) analysis. EMS was employed to show full scan spectra, so as to obtain an overview of all of the ions in sample. Settings used were: declustering potential (DP) -450 V, entrance potential (EP) -6 V, collision energy (CE) -10V. EPI mode was performed in order to obtain the fragmentation pattern of the parent ion(s) in the previous scan using the following parameters: DP -50 V, EP -6 V, CE -25V, and collision energy spread (CES) 0 V. Spectra were recorded in negative ion mode between m/z 100 and 1500.

The phenolic compounds were characterized according to their UV and mass spectra and retention times compared with standards when available. For the quantitative analysis of phenolic compounds, a 5-level calibration curve was obtained by injection of known concentrations (2.5-100 µg/mL) of different standard compounds: caffeic acid ($y=617.91x-691.51$; $R^2=0.9991$); chlorogenic acid ($y=600.27x-763.62$; $R^2=0.9998$); *p*-coumaric acid ($y=884.6x+184.49$; $R^2=0.9999$); isorhamnetin 3-*O*-glucoside ($y=262.31x-9.8958$; $R^2=1.000$); isorhamnetin 3-*O*-rutinoside ($y=327.42x+313.78$; $R^2=0.9991$); ferulic acid ($y=505.97x-64.578$; $R^2=0.9999$); kaempferol 3-*O*-glucoside ($y=190.75x-36.158$; $R^2=1.000$); kaempferol 3-*O*-rutinoside ($y=175.02x-43.877$; $R^2=0.9999$); myricetin ($y=741.41x-221.6$; $R^2=0.999$); quercetin 3-*O*-glucoside

($y=316.48x-2.9142$; $R^2=1.000$); quercetin 3-*O*-rutinoside ($y=222.79x-243.11$; $R^2=0.9998$). The results were expressed in mg per 100 g of dry weight (dw).

Evaluation of in vitro antioxidant properties

DPPH radical-scavenging activity. This methodology was performed using an ELX800 Microplate Reader (Bio-Tek, Bedfordshire, UK). The reaction mixture in each one of the 96-wells consisted of one of the different concentration solutions (30 μ L) and methanolic solution (270 μ L) containing DPPH radicals (6×10^{-5} mol/L). The mixture was left to stand for 30 min in the dark. The reduction of the DPPH radical was determined by measuring the absorption at 515 nm. The radical scavenging activity (RSA) was calculated as a percentage of DPPH discolouration using the equation: $RSA (\%) = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$, where A_S is the absorbance of the solution when the sample extract has been added at a particular level, and A_{DPPH} is the absorbance of the DPPH solution. The extract concentration providing 50% of antioxidant activity (EC_{50}) was calculated from the graph of DPPH scavenging activity against extract concentrations. Trolox was used as standard.

Reducing power. This methodology was performed using the Microplate Reader described above. The different concentration solutions (0.5 mL) were mixed with sodium phosphate buffer (200 mmol/L, pH 6.6, 0.5 mL) and potassium ferricyanide (1% w/v, 0.5 mL). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min, and trichloroacetic acid (10% w/v, 0.5 mL) was added. The mixture (0.8 mL) was poured into the well of a 48-well microplate, as also deionised water (0.8 mL) and ferric chloride (0.1% w/v, 0.16 mL), and the absorbance was measured at 690 nm. The extract concentration providing

0.5 of absorbance (EC_{50}) was calculated from the graph of absorbance at 690 nm against extract concentrations. Trolox was used as standard.

Inhibition of β -carotene bleaching. A solution of β -carotene was prepared by dissolving β -carotene (2 mg) in chloroform (10 mL). Two millilitres of this solution were pipetted into a round-bottom flask. After the chloroform was removed at 40 °C under vacuum, linoleic acid (40 mg), Tween 80 emulsifier (400 mg), and distilled water (100 mL) were added to the flask with vigorous shaking. Aliquots (4.8 mL) of this emulsion were transferred into different test tubes containing different concentrations of the samples (0.2 mL). The tubes were shaken and incubated at 50 °C in a water bath. As soon as the emulsion was added to each tube, the zero time absorbance was measured at 470 nm in a spectrophotometer (AnalytikJena, Jena, Germany). β -Carotene bleaching inhibition was calculated using the following equation: $(\text{Abs after 2h of assay}/\text{initial Abs}) \times 100$. The extract concentration providing 50% of antioxidant activity (EC_{50}) was calculated from the graph of β -carotene bleaching inhibition against extract concentrations. Trolox was used as standard.

Inhibition of lipid peroxidation using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Porcine (*Sus scrofa*) brains were obtained from official slaughtering animals, dissected, and homogenized with a Polytron in ice-cold Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.4) to produce a 1:2 (w/v) brain tissue homogenate that was centrifuged at 3000g for 10 min. An aliquot (0.1 mL) of the supernatant was incubated with the different solution concentrations (0.2 mL) in the presence of $FeSO_4$ (10 μ M; 0.1 mL) and ascorbic acid (0.1 mM; 0.1 mL) at 37 °C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid (28% w/v, 0.5 mL), followed by thiobarbituric acid (TBA, 2%, w/v,

0.38 mL), and the mixture was then heated at 80 °C for 20 min. After centrifugation at 3000g for 10 min to remove the precipitated protein, the colour intensity of the malondialdehyde (MDA)-TBA complex in the supernatant was measured by its absorbance at 532 nm. The inhibition ratio (%) was calculated using the following formula: Inhibition ratio (%) = $[(A - B)/A] \times 100 \%$, where A and B were the absorbance of the control and the compound solution, respectively. The extract concentration providing 50% of antioxidant activity (EC₅₀) was calculated from the graph of TBARS formation inhibition against extract concentrations. Trolox was used as standard.

Microencapsulation of the hydroalcoholic extract

Microspheres incorporating lyophilized *H. stoechas* hydroalcoholic extract were prepared by double emulsion/evaporation technique, following the general procedure adapted from [Giri et al. \(2012\)](#). Briefly, PCL was used as the matrix material, Tergitol 61E (HLB 3) as the surfactant for the preparation of the primary w/o (water-in-oil) emulsion, and DCM as the oil phase to solubilize PCL. PVA was the protective colloid for the stabilization of the secondary o/w (oil-in-water) emulsion. For the preparation of the primary emulsion, an aqueous solution was prepared by dissolving 70 mg of the lyophilized extract in 4 mL of distilled water under stirring, then filtered and added with 1.5% (w/w) of Tergitol 61E. The oil phase was prepared by dissolving 800 mg of PCL in 20 mL of DMC. The w/o emulsion was prepared by adding the aforementioned aqueous solution to the oil phase followed by homogenization at 11000 rpm during 2 minutes using a Cat Unidrive X 1000 homogenizer. Finally, the w/o/w emulsion was prepared through the addition of the previously prepared w/o emulsion to 200 mL of a PVA aqueous solution (1%, w/v) under continuous stirring (400 rpm) during 10

minutes. Microspheres consolidation was achieved by DCM evaporation using a Buchi Rotovapor R-114 in two steps: 2 hours at 40 °C and atmospheric pressure followed by one hour under reduced pressure (600 mbar). The resulting microspheres were firstly collected by sedimentation, washed twice with distilled water and thereafter recovered through filtration. The microspheres were then lyophilized and stored in dark conditions at 4 °C.

Microspheres characterization

Microspheres in solution form were analyzed by optical microscopy (OM) using a Nikon Eclipse 50i microscope equipped with a Nikon Digital Sight camera and NIS Elements software for data acquisition. OM analysis was applied to access size and morphology of the primary and secondary emulsions, as well as of the consolidated microspheres. Evidence of successful extract microencapsulation was inspected by FTIR analysis. For that purpose, spectra of PCL, hydroalcoholic extract and corresponding microspheres were collected on a FTIR Bomem (model MB 104) by preparing KBr pellets at a sample concentration of 1% (w/w). Spectra were recorded at a resolution of 4 cm⁻¹ between 650 and 4000 cm⁻¹ and by co-adding 48 scans.

Microspheres incorporation into a base moisturizer

Lyophilized microspheres were incorporated in a base formulation prepared by an o/w technique. The water phase (WP) comprises 15 mL of water (no thickener was used), whereas the oil phase (OP) accounts with 2.0 mL of almond oil added with 0.5 g of Olivem 1000 (emulsifier), 0.2 g of Olivem 300 (emollient and co-emulsifier) and 0.25 g of Olivax (moisturizer agent). Olivem and Olivax are trademarks of BT Company (Milan, Italy). The WP and OP were heated separately to 70-75 °C until

homogenization. Thereafter they were left to cool to 40 °C before adding 100 mg of microspheres to the oil phase. Finally the WP was mixed with OP and vigorously stirred together. For control purposes, a moisturizer sample without added microspheres was also prepared. Samples with and without microspheres were analyzed by OM and compared.

Statistical analysis

All the assays were carried out in triplicate and the results are expressed as mean values and standard deviation (SD). The results were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD Test with $\alpha = 0.05$, performed with SPSS v. 18.0 program.

Results and discussion

Phenolic profile of the hydroalcoholic extract and decoction

The HPLC phenolic profile of a *Helichrysum stoechas* sample, obtained after hydroalcoholic extraction, and recorded at 280 and 370 nm is shown in **Figure 1**; peak characteristics and tentative identities are presented in **Table 1**. Eighteen compounds were detected, nine of which were phenolic acid derivatives. Among them, six compounds (peaks 1, 3, 9, 11, 13 and 16) were caffeoylquinic acid derivatives identified according to their UV spectra and pseudomolecular ions. Peak 1 ($[M-H]^-$ at m/z 353) was identified as 3-*O*-caffeoylquinic acid, yielding the base peak at m/z 191 and the ion at m/z 179 with an intensity >73% base peak, characteristic of 3-acylchlorogenic acids as reported by Clifford et al. (2003 and 2005). Peak 3 was identified as 5-*O*-caffeoylquinic acid by comparison of its UV spectrum (λ_{\max} 326 nm) and retention time

with a commercial standard. Peaks 4 and 5 were tentatively identified as 5-*O*-coumaroylquinic and 5-*O*-feruloylquinic acids, respectively, taking into account their pseudomolecular ions, fragmentation patterns and relative intensities similar to 5-*O*-caffeoylquinic acid.

Peaks 9, 11 and 13 ($[M-H]^-$ at m/z 515) corresponded to dicaffeoylquinic acids and were assigned to 3,5-*O*- (peaks 9 and 11) and 4,5-*O*- dicaffeoylquinic acids (peak 13) based on their elution order and fragmentation patterns (Clifford et al, 2003; Clifford et al, 2005). The fragmentation pattern of peaks 9 and 11 was similar to the one previously reported by Clifford et al. (2005) for 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid. MS^2 base peak was at m/z 353, produced by the loss of one of the caffeoyl moieties ($[M-H-caffeoyl]^-$), and subsequent fragmentation of this ion yielded the same fragments as 5-caffeoylquinic acid at m/z 191, 179 and 135, although in this case with a comparatively more intense signal at m/z 179 ($[caffeic\ acid-H]^-$, ~70% base peak). These peaks (9 and 11) were identified as *cis* and *trans* 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, respectively, based on the elution order described in a previous study (Barros et al., 2012). Peak 13 was assigned to 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid since its fragmentation was identical to that previously reported by Clifford et al. (2005). In this case, the signal at m/z 335 was barely detectable (<3 % of base peak) and the intense signal at m/z 173 is characteristic for an isomer substituted at position 4, which indicated loss of the caffeoyl moiety at position 5.

Peak 16 presented a pseudomolecular ion at m/z 529 that yielded fragments at m/z 367 ($[O-feruloylquinic\ acid-H]^-$), 353 ($[caffeoylquinic\ acid-H]^-$), and 179 and 193, corresponding to deprotonated caffeic acid and deprotonated ferulic acid, respectively, which allowed its identification as a caffeoyl-*O*-feruloylquinic acid.

Peak 2 was identified as protocatechuic acid by comparison of its UV spectrum (λ_{\max} 260, sh296 nm) and retention time with a commercial standard.

The remaining phenolic compounds corresponded to flavonol derivatives (**Table 1**). Myricetin 3-*O*-glucoside (peak 6) and quercetin 3-*O*-glucoside (peak 8) were positively identified according to their retention, mass and UV-vis characteristics by comparison with commercial standards. Pseudomolecular ($[M-H]^-$ at m/z 463) and product (m/z at 301, quercetin) ions of peak 14 allowed its identification as a quercetin hexoside. This peak showed λ_{\max} at higher wavelength (370 nm) than quercetin 3-*O*-glucoside (344 nm) and similar to quercetin aglycone. According to Mabry et al. (1970), the introduction of a glycoside on the hydroxyls at positions 7, 3' or 4' should not have effect on maximal wavelength or the spectrum shape in relation to the aglycone. Thus, peak 14 was tentatively assigned as quercetin 7-*O*-hexoside.

Peaks 10 and 12 ($[M-H]^-$ at m/z 505) should correspond to quercetin *O*-acetylhexosides according to their pseudomolecular ion and MS² fragment released at m/z 301 (quercetin; $[M-H-42-162]^-$, loss of an acetylhexoside moiety). Similarly, peaks 7, 15 and 17 were assigned as acetylhexosides of myricetin, isorhamnetin and kaempferol, respectively, based on their pseudomolecular and product ions. The bathochromic displacement in λ_{\max} observed in peak 7 (366 nm) in relation to myricetin 3-*O*-glucoside (peak 6; 354 nm) might allow assigning it as myricetin 7-*O*-acetylhexoside.

Finally, peak 18 presented a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ at m/z 609, releasing two MS² fragments ions at m/z 463 ($[M-H-146]$, loss of a *p*-coumaroyl moiety) and an m/z 301 ($[M-H-162]$, loss of a hexosyl moiety), although the loss of 146 mu could also correspond to a rhamnosyl residue, the maximum at 315 nm in the UV spectrum of the peak pointed to a coumaroyl substituent. Thus, the compound would correspond to a quercetin 3-*O*-[*p*-coumaroyl]-glucoside. Lavault and Richomme (2004), identified a

similar compound, quercetin 3-*O*-[6-*trans-p*-coumaroyl]- β -D-glucoside (helichryoside), presenting the same MS and UV spectra, therefore peak 18 was assigned to this compound.

trans 3,5-*O*-Dicafeoylquinic acid was the most abundant phenolic acid (43.31 and 15.65 mg/g of extract and decoction, respectively) (**Table 2**), whereas myricetin 7-*O*-acetylhexoside was the most abundant flavonoid found (21.76 and 9.54 mg/g of extract and decoction, respectively). The hydroalcoholic extract presented higher concentration in phenolic compounds (135.61 mg/g of extract) than the decoction sample (60.37 mg/g of decoction). Protocatechuic acid was only found in decoction preparation (**Table 2**), which could be formed as a degradation product of quercetin, due to the high temperature applied in this preparation.

There are some similarities in the phenolic profile identified in *H. stoechas* flowers from Portugal and samples from Italy (Carini et al., 2001) and France (Lavault and Richomme, 2004). A sample from Turkey (Albayrak et al., 2010) presented a very different profile, being chlorogenic acid the only compound found in common. Lavault and Richomme (2004) identified eighteen phenolic compounds (α -pyrones, phloroglucinols, phenolic acids, flavonoids, and coumarin), being identified four phenolic acids and flavonoids; quercetin-3-*O*- β -D-glucoside, helichryoside (quercetin 3-*O*-[6-*trans-p*-coumaroyl]- β -D-glucoside), quercetagenin 7-*O*- β -D-glucoside, 5-cafeoylquinic acid and 3,5-dicafeoylquinic acid were also identified in the sample studied herein. Carini et al. (2001) identified five phenolic acids and seven flavonoids; the phenolic acids profile was similar to the Portuguese sample, whereas for flavonoids some differences were found. Those authors identified flavones, such as apigenin and naringenin derivatives. Lavault and Richomme (2004) and Carini et al. (2001) did not

present quantification data on these compounds. Albayrak et al. (2010) were the only authors that presented quantification data, in which the major component present was chlorogenic acid, followed by apigenin 7-glucoside. The quantities found by those authors were lower than the ones obtained herein.

In vitro antioxidant properties

The results obtained in the evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract and decoction of *H. stoechas* are given in **Table 3**. The hydroalcoholic extract gave higher antioxidant activity (lower EC₅₀ values) in all the *in vitro* assays (EC₅₀ values between 79.84 and 36.62 µg/mL) than the decoction preparation (EC₅₀ values ranging from 435.20 to 147.03 µg/mL). This is in agreement with the higher phenolic compounds concentration (135.61 mg/g) found in the hydroalcoholic extract in comparison to the decoction preparation (60.37 mg/g). Regarding radical scavenging activity using DPPH assay, the hydroalcoholic extract showed lower activity than methanol extracts of *H. stoechas* from Turkey (EC₅₀ value 7.95 µg/mL, Albayrak et al., 2010). The methanol extract previously studied by our research group (Barros et al., 2010) presented higher EC₅₀ values (≤ 520 µg/mL) and, therefore, lower antioxidant activity. In our knowledge, no reports are available on the decoction preparation of the studied plant.

Microspheres preparation and incorporation in moisturizers

PCL based microspheres incorporating lyophilized *H. stoechas* hydroalcoholic extract were prepared by double emulsion/evaporation technique. The encapsulation process was monitored by OM analysis by checking several key points of the process. **Figure 2A** shows the prepared w/o emulsion evidencing the individualized spherical aqueous

droplets with an estimated size of 10 μm dispersed in the organic medium (DCM containing PCL). **Figure 2B** and **Figure 2C** show the final w/o/w emulsion right after preparation and after 10 minutes under stirring at 400 rpm, respectively. The obtained embryonic microspheres are spherical in shape and it can be noticed the presence of droplets in its interior (water droplets containing the extract). Additionally, as expected, a size reduction was observed as a consequence of stirring, being the final size of the embryonic microspheres estimated to be comprised between 40 and 170 μm .

Figure 3 shows the microspheres consolidation process. During this stage, the size of the obtained microspheres decreased accompanying DCM evaporation. As it can be noticed in **Figure 3A** (micrograph after one hour evaporation at 40 °C and atmospheric pressure) consolidation was negligible, becoming evident only after two hours under evaporation in the same conditions (**Figure 3B**). To ensure total DCM removal, and consequently total microspheres consolidation, evaporation proceeded under reduced pressure during one additional hour (**Figure 3C**). Final size of the obtained microspheres was estimated to be comprised between 30 and 100 μm .

FTIR analysis of PCL, lyophilized extract and corresponding microspheres is shown in **Figure 4**. As expected microspheres spectrum was dominated by the presence of PCL (a ratio extract/PCL of 70/800 (mg/mg) was used). Nevertheless, comparatively to the PCL spectrum, in the microspheres both OH and C=O stretching bands become more prominent compared to the CH stretching zone. This could be explained by an effective extract incorporation, containing compounds rich in OH and C=O moieties.

The obtained lyophilized microspheres were easily dispersed in the oil phase, contrary to the aqueous phase, where they remain agglomerated. For this reason, the oil phase was chosen as the more adequate vehicle to proceed with microspheres incorporation during the moisturizer preparation (an oil-in-water emulsion process). **Figure 5** presents

the images of the produced base moisturizer (**Figure 5A**), as well as of the moisturizer added with the lyophilized microspheres under 100X (**Figure 5B**) and 400X (**Figure 5C**) magnification. As it can be observed, microspheres are clearly visible in the moisturizer matrix as individualized particles.

Conclusions

Eighteen different phenolic compounds were identified, being 3,5-*O*-dicafeoylquinic acid the most abundant phenolic acid and myricetin 7-*O*-acetylhexoside the most abundant flavonoid. Comparatively with the decoction form, the hydroalcoholic extract presented the highest antioxidant activity, which can be correlated with its higher phenolic compounds content.

The double emulsion/evaporation microencapsulation technique was successfully applied to produce microspheres containing *H. stoechas* hydroalcoholic extract, which opens new avenues for the exploitation of these phenolic extracts in applications such as the cosmetic industry. As a preliminary approach microspheres were incorporated into a moisturizer. The envisaged methodology comprises its addition to the oil phase guarantying a good dispersion, i.e. the absence of agglomerates.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011) and LSRE (strategic project PEst-C/EQB/LA0020/2011). L. Barros also thanks to FCT, POPH-QREN and FSE for her grant (SFRH/BPD/4609/200). The GIP-USAL is financially supported by the Spanish Government through the *Consolider-Ingenio 2010* Programme

(FUN-C-FOOD, CSD2007-00063). M. Dueñas thanks to the *Programa Ramón y Cajal* for a contract.

References

- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Hamzaoglu, E., 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chem.* 119, 114-122.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., Santos-Buelga C., 2012. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1576-1582.
- Barros, L., Oliveira, O., Carvalho, A. M., Ferreira, I.C.F.R., 2010. In vitro antioxidant properties and characterization in nutrientes and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Ind. Crops Prod.* 32, 572-579.
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., Facino, R.M., 2001. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *J Pharm. Biomed. Anal.* 24, 517–526.
- Carvalho A.M., 2010. Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Madrid: CSIC, Biblioteca de Ciencias.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N.A., 2003. A hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N.A., 2005. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3821-3832.
- Franco, João do Amaral. (1984). *Nova Flora de Portugal. Continente e Açores- Clethraceae (Compositae)*. Vol. III. Lisboa.

- Giri, T.K., Choudhary, C., Ajazuddin, A.A., Badwaik, H., Tripathi, D.K., 2012. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharm. J.* 21, 125-141.
- Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengibar M., Heras A., 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr. Polym.* 83, 803-806.
- Kaur, C.D., Saraf, S., 2011. Development of photoprotective creams with antioxidant polyphenolic herbal extracts. *Res. J. Med. Plant* 6, 83-91.
- Kim, H.J., Kim, T.H., Kang, K.C., Pyo, H.B., Jeong, H.H., 2010. Microencapsulation of rosmarinic acid using polycaprolactone and various surfactants. *Int. J. Cosmet. Sci.* 32, 185-191.
- Koo, B.M., Jung, J.E., Han, J.H., Kim, J.W., Han, S.H., Chung, D.J., Suh, K.D., 2008. Encapsulation and stabilization of photo-sensitive antioxidants by using polymer microcapsules with controlled phase heterogeneity. *Macromol. Rapid Commun.* 29, 498-502.
- Lavault, M., Richomme, P., 2004. Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olonnense. *Chem. Natural Comp.* 40, 118-121.
- Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* 363, 26-39.
- Marchand, L.L., 2002. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed. Pharmacoth.* 56, 296-301.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag Publication.

- Mishra, K.P., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P.K., Sawhney, R.C., 2008. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomed. Pharmacother.* 62, 94-98.
- Sacalia, S., Mezzena, M., 2009. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo and Chemical stability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 90-94.
- Singh, R.P., Agarwal R., 2009. Cosmeceuticals and Silibinin. *Clinical Dermatology*, 27, 479-484.
- Wisuitiprot, W., Somsiri, A., Ingkaninan, K., Waranuch, N., 2011. *In vitro* human skin permeation and cutaneous metabolism of catechins from green tea extract and green tea extract-loaded chitosan microparticles. *Int. J. Cosmet. Sci.* 33, 572-579.

Peak	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Molecular ion [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentative identification
1	5.26	326	353	191(100),179(73),173(7),135(55)	3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid
2	6.14	260,sh29 6	163	109(100)	Protocatechuic acid
3	8.03	326	353	191(100),179(17),173(17),135(9)	5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid
4	13.09	310	337	191(100),173(7),163(9),119(3)	5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid
5	14.81	330	367	191(100),173(10),134(7)	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid
6	16.23	354	479	317(100)	Myricetin 3- <i>O</i> -glucoside
7	19.67	366	521	317(100)	Myricetin 7- <i>O</i> -acetylhexoside
8	20.64	344	463	301(100)	Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside
9	21.78	326	515	353(100),335(13),203(3),191(73),179(69),173(22),161(5),135(22)	<i>cis</i> 3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid
10	22.19	354	505	301(100)	Quercetin <i>O</i> -acetylhexoside
11	22.22	328	515	353(100),335(5),191(97),179(79),173(9),161(5),135(37)	<i>trans</i> 3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid
12	24.33	358	505	301(100)	Quercetin <i>O</i> -acetylhexoside
13	24.91	330	515	353(97),335(3),299(4),255(5),203(16),191(30),179(75),173(100),161(4),135(27)	4,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid
14	27.21	370	463	301(100)	Quercetin 7- <i>O</i> -hexoside
15	27.91	354	519	315(100)	Isorhamnetin <i>O</i> -acetylhexoside

16	28.31	326	529	367(96),353(8),335(6),193(100),191(15),179(6),173(22),134(4)	Caffeoyl- <i>O</i> -feruloylquinic acid
17	29.41	366	489	327(57),285(100)	Kaempferol <i>O</i> -acetylhexoside
18	31.77	315,sh36	609	463(70),301(40)	Quercetin 3- <i>O</i> -[<i>p</i> -coumaroyl]-glucoside
		0			

Table 1. Retention time (Rt), wavelengths of maximum absorption in the visible region (λ_{\max}), mass spectral data, tentative identification of phenolic acids and flavonoids in *Helichrysum stoechas*.

Table 2. Phenolic compounds quantification (mg/g of extract or decoction) in hydroalcoholic extract and decoction of *Helichrysum stoechas* (mean \pm SD).

Phenolic compounds	Hydroalcoholic extract	Decoction
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	0.68 \pm 0.01	0.99 \pm 0.22
Protocatechuic acid	nd	1.14 \pm 0.05
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	21.94 \pm 0.28	12.12 \pm 0.12
5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.29 \pm 0.29	0.26 \pm 0.03
5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	0.55 \pm 0.55	0.52 \pm 0.06
Myricetin 3- <i>O</i> -glucoside	9.37 \pm 0.08	3.08 \pm 0.19
Myricetin 7- <i>O</i> -acetylhexoside	21.76 \pm 0.52	9.54 \pm 0.05
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside	9.28 \pm 0.43	3.80 \pm 0.19
<i>cis</i> 3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid	2.00 \pm 0.01	0.79 \pm 0.08
Quercetin <i>O</i> -acetylhexoside	2.63 \pm 0.36	1.36 \pm 0.06
<i>trans</i> 3,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid	43.31 \pm 0.15	15.65 \pm 0.11
Quercetin 7- <i>O</i> -acetylhexoside	4.49 \pm 0.16	2.18 \pm 0.01
4,5- <i>O</i> -Dicafeoylquinic acid	4.94 \pm 0.24	2.97 \pm 0.11
Quercetin 7- <i>O</i> -hexoside	4.93 \pm 0.27	1.73 \pm 0.05
Isorhamnetin <i>O</i> -acetylhexoside	0.97 \pm 0.04	0.35 \pm 0.01
Caffeoyl- <i>O</i> -feruloylquinic acid	0.45 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02
Kaempferol <i>O</i> -acetylhexoside	4.61 \pm 0.10	2.16 \pm 0.02
Quercetin 3- <i>O</i> -[<i>p</i> -coumaroyl]-glucoside	3.43 \pm 0.11	1.51 \pm 0.09
Total phenolic acids	74.16 \pm 0.44 ^a	34.64 \pm 0.16 ^b
Total flavonoids	61.45 \pm 1.67 ^a	25.72 \pm 0.02 ^b
Total phenolic compounds	135.61 \pm 2.10 ^a	60.37 \pm 0.14 ^b

In each row different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

Table 3. Antioxidant activity of *Helichrysum stoechas* hydroalcoholic extract and decoction (mean \pm SD).

Antioxidant activity	Hydroalcoholic extract	Decoction
DPPH scavenging activity (EC ₅₀ , μ g/mL)	36,62 \pm 0,39 ^b	435,20 \pm 2,66 ^a
Reducing power (EC ₅₀ , μ g/mL)	75,14 \pm 3,77 ^b	187,57 \pm 1,98 ^a
β -carotene bleaching inhibition (EC ₅₀ , μ g/mL)	79,84 \pm 1,45 ^b	171,08 \pm 1,71 ^a
TBARS inhibition (EC ₅₀ , μ g/mL)	51,62 \pm 1,27 ^b	147,03 \pm 7,03 ^a

In each row different letters mean significant differences ($p < 0.05$).

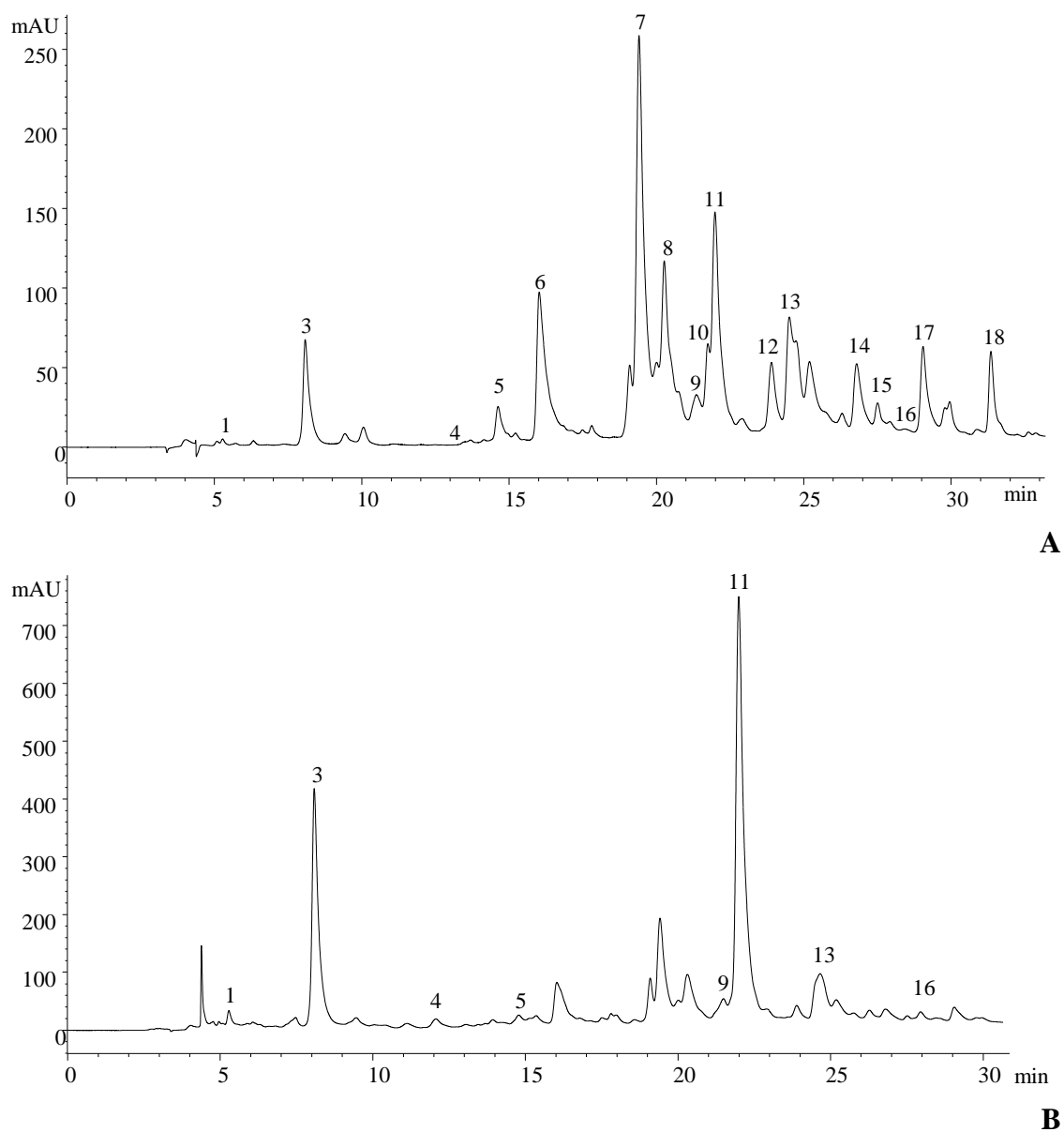


Figure 1. HPLC phenolic profile of *Helichrysum stoechas* hydroalcoholic extract recorded at 370 nm (A) and 280 nm (B).

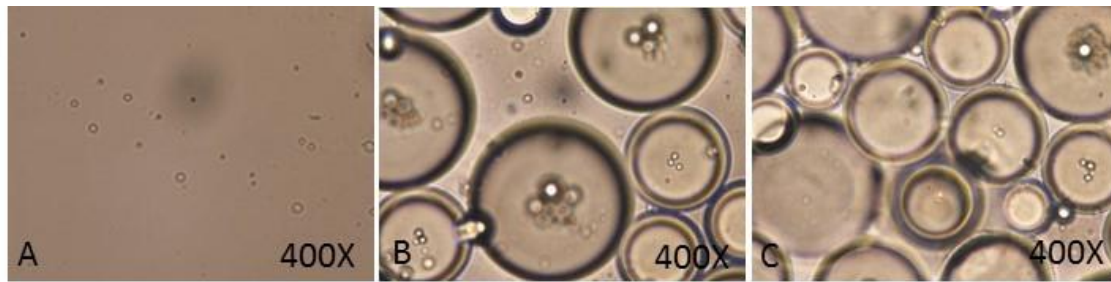


Figure 2. Optical microscopy analysis with magnification of 400X of: the w/o emulsion (A), w/o/w emulsion immediately after its preparation (B) and after 10 minutes under stirring at 400 rpm (C).

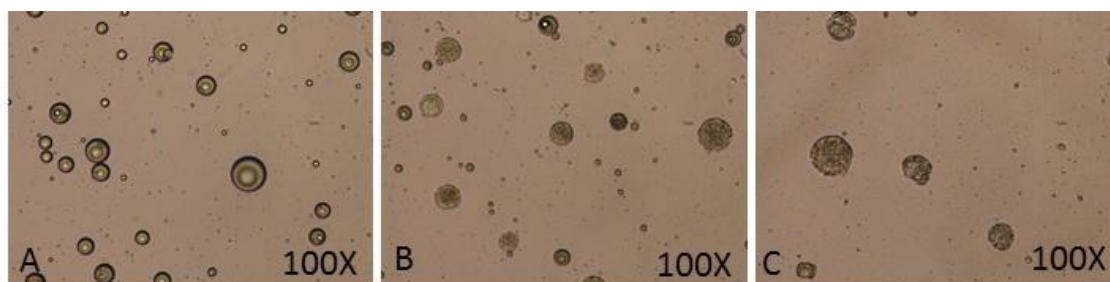


Figure 3. Microspheres morphology evolution during the solvent evaporation process (magnification of 100X): (A) after one hour under evaporation at 40 °C and atmospheric pressure, (B) after two hours under evaporation at 40 °C and atmospheric pressure, and (C) after one additional hour at 40 °C under reduced pressure.

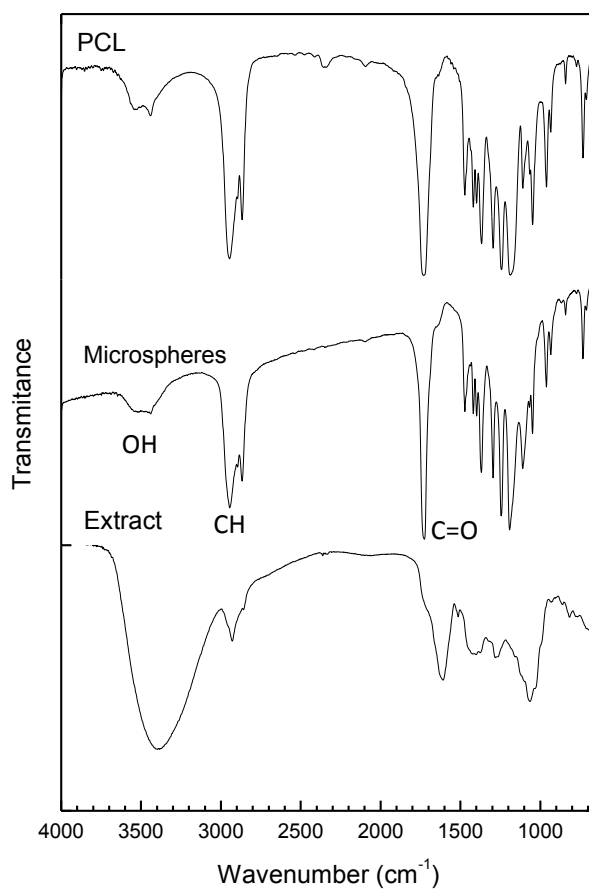


Figure 4. FTIR spectra of polycaprolactone (PCL), lyophilized extract and produced microspheres.

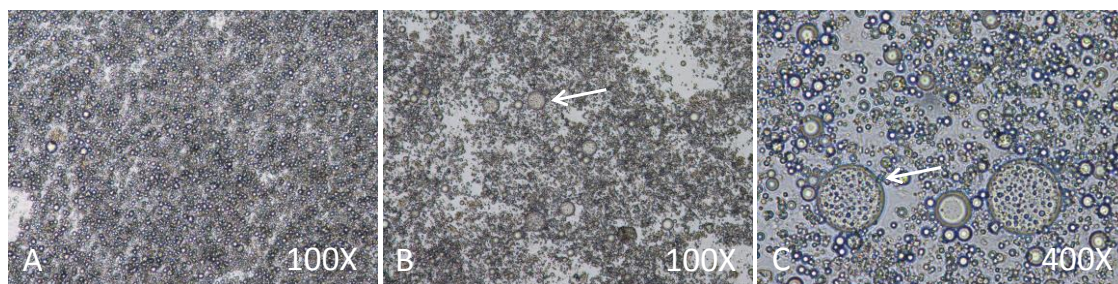


Figure 5. Microspheres incorporation in a moisturizer. (A) Base moisturizer, (B) moisturizer with incorporated microspheres under 100X magnification, and (C) moisturizer with incorporated microspheres under 400X magnification. The blank arrow puts in evidence the incorporated microspheres structures.

Phenolic profile of *Helichrysum stoechas* L. Moench

Marisa Barroso^a, Lillian Barros^{a,b}, Montserrat Dueñas^b, Ana Maria Carvalho^a, Celestino Santos-Buelga^b, Isabel C.F.R. Ferreira^{a,*}

^a*Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.*

^b*Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.*

**iferreira@ipb.pt*

Natural matrices represent a rich source of biologically active compounds and are an example of molecular diversity, with recognized potential in drug discovery and development. Many plants frequently used in folk medicine have antioxidant and pharmacological properties connected with the presence of phenolic compounds, especially flavonoids [1]. The biological, pharmacological and medicinal properties of this group of compounds have been extensively reviewed [2]. Ethnobotanical surveys conducted in the Northeast of Portugal highlighted the decoction of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (shrubby everlasting; port. douradinha) for cold, bronchitis and fever [3].

In the present study, the phenolic composition of *H. stoechas* (inflorescences and leafy flowering stems) was analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry with electron spray ionization (HPLC-DAD-ESI/MS), after extraction with methanol:water (80:20 v/v).

Seventeen different phenolic compounds were identified, in which eight were characterized as phenolic acids, being 5-*O*-caffeoylquinic and 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acids the most abundant compounds. Furthermore, nine flavonols were also identified, mostly derivatives of quercetin and myricetin, being myricetin 7-*O*-acylhexoside the most abundant flavonoid. Overall, the analytical screening by HPLC-MS represents a valid and rapid approach in the search of new bioactive phenolic compounds.

Acknowledgements

The authors are grateful to FCT for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011). L. Barros also thanks to FCT, POPH-QREN and FSE for her grant (SFRH/BPD/4609/2008). The GIP-USAL is financially supported by the Spanish Government through the *Consolider-Ingenio 2010* Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063). M. Dueñas thanks to the *Programa Ramón y Cajal* for a contract.

References

- [1] K.P. Mishra, L. Ganju, M. Sairam, P.K. Banerjee, R.C. Sawhney, A review of high throughput technology for the screening of natural products, *Biomed. Pharmacother.*, **2008**, 62, 94-98.
- [2] L.L. Marchand. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed. Pharmacother.*, **2002**, 56, 296-301.
- [3] A.M. Carvalho. Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Madrid: CSIC, Biblioteca de Ciencias, **2010**.

Antioxidant activity of decoctions of *Centaurea paniculata* L. and *Helichrysum stoechas* L. Moench

Marisa Barroso, Ângela Fernandes, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira*

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança,
Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.
*iferreira@ipb.pt

Ethnobotanical surveys conducted in Northeastern Portugal have documented the use of decoctions prepared with flowering aerial parts of *Centaurea paniculata* L. (starthistles, knapweeds; port. escalabiosa) for inflammation and *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (shrubby everlasting; port. douradinha) for the respiratory system and to reduce fever [1], from the Asteraceae botanical family. Although antioxidant properties of those plants have been investigated [2-4], there are no reports on its most used form, the decoction. Therefore, in the present work, decoctions of inflorescences and leafy flowering stems of the two mentioned species were prepared and submitted to evaluation of antioxidant potential. Four different *in vitro* assays were performed: scavenging effects on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals, reducing power (measured in Folin Ciocalteu and ferricyanide Prussian blue assays), inhibition of β -carotene bleaching and inhibition of lipid peroxidation in brain cell homogenates by TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) assay.

The decoction of *H. stoechas* revealed higher antioxidant activity (lower EC₅₀ values) than *C. paniculata* in all the tested assays. Data obtained could provide scientific evidence for some folk uses in the treatment of diseases related to the production of reactive species and oxidative stress, but further experiments are required to explore the mechanisms of action.

Acknowledgements

FCT (Portugal) for financial support to the research centre CIMO (PEst-OE/AGR/UI0690/2011) and A. Fernandes grant (SFRH/BD/76019/2011).

References

- [1] A.M. Carvalho. Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Madrid: CSIC, Biblioteca de Ciencias, **2010**.
- [2] M. Carini, G. Aldini, S. Furlanetto, R. Stefani, R.M. Facino. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 24, 517-526.
- [3] S. Albayrak, A. Aksoy, O. Sagdic, E. Hamzaoglu. *Food Chem.*, **2010**, 119, 114-122.
- [4] L. Barros, O. Oliveira, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira. *Ind. Crop. Prod.*, **2010**, 32, 572-579.

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE HELICHRYSUM STOECHAS (L.) Moench PARA APLICAÇÕES COSMÉTICAS: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROENCAPSULAÇÃO E INCORPORAÇÃO NUM HIDRATANTE

Barroso, Marisa^{1,3}; Barros, Lillian^{1,2}; Dueñas, Montserrat²; Carvalho, Ana Maria¹; Santos-Buelga, Celestino²; P. Fernandes, Isabel³, Barreiro, Maria F.³; C.F.R. Ferreira, Isabel¹

¹Centro de Investigação da Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico Bragança, Campus de Santa Apolónia, 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

²GIP-USAL, Faculdade de Farmácia, Universidade de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Espanha.

³Laboratório de Separação e Engenharia da Reação (LSRE), Laboratório associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolónia, 1134, 5301-857 Bragança, Portugal

RESUMO

As propriedades bioativas de várias plantas têm sido atribuídas à presença de compostos fenólicos, especialmente flavonoides (Mishra *et al.*, 2008). As propriedades biológicas, farmacológicas e medicinais deste grupo de compostos têm também sido exaustivamente estudadas (Marchand, 2002). Estudos etnobotânicos realizados no Nordeste de Portugal registam o uso da decocção de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench (perpétua-das-areias ou douradinha) pelas suas propriedades medicinais nomeadamente no controlo da febre, sintomas gripais e bronquite (Carvalho, 2010). O presente trabalho teve como objetivo explorar o potencial antioxidante dos compostos fenólicos das sumidades floridas (capítulos e brácteas e os 15 cm terminais dos caules com folhas que suportam as inflorescências) de *H. stoechas* para aplicações cosméticas e envolveu as seguintes etapas: caracterização química, microencapsulação e incorporação num hidratante.

As propriedades antioxidantes do extrato hidroalcoólico e da decocção foram avaliadas por métodos químicos (determinação do poder redutor e da capacidade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e bioquímicos (inibição da descoloração do β -caroteno na presença de radicais livres derivados do ácido linoleico e inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizados cerebrais). A composição fenólica foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a deteção de díodos e espetrometria de massa com ionização por spray de eletrões (HPLC-DAD-ESI/MS). Foram identificados dezoito compostos fenólicos diferentes, sendo o ácido 3,5-O-dicafeoilquínico e a miricetina 7-O-acetil-hexósido o ácido fenólico e o flavonoide mais abundante, respetivamente.

Comparativamente à decocção, o extrato hidroalcoólico apresentou maior atividade antioxidante e conteúdo fenólico, tendo-se optado pela sua forma liofilizada para prosseguir os estudos de microencapsulação. Para a microencapsulação utilizou-se a técnica da dupla emulsão/evaporação de solvente, produzindo-se microesferas de base policaprolactona (PCL) com o respetivo conteúdo (extrato hidroalcoólico de *H. stoechas*). Estas foram incorporadas com sucesso num creme hidratante. Os resultados obtidos demonstraram o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de *H. stoechas* e a viabilidade da sua microencapsulação, abrindo novas possibilidades de exploração e aplicação destes extratos fenólicos naturais, nomeadamente na indústria de cosméticos.

Palavras-chave: atividade antioxidante; compostos fenólicos; cosméticos; *Helichrysum stoechas*; microencapsulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carvalho, A.M., (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal, Biblioteca de Ciencias, Madrid: CSIC.

Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed. Pharmacother*, 56, 296-301.

Mishra, K.P., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P.K., & Sawhney, R.C. (2008). A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomed. Pharmacother*, 62, 94-98.

AGRADECIMENTOS

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (projeto estratégico PEst-OE/AGR/UI0690/2011) e ao LSRE (projeto estratégico PEst-C/EQB/LA0020/2011). L. Barros agradece ao FCT, POPH-QREN e FSE pelo seu contrato de investigação no âmbito do "Programa Compromisso com Ciência-2008". O GIP-USAL é financeiramente suportado pelo governo espanhol através do Programa *Consolider-Ingenio 2010* (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063).