

**montanha  
viva**

Sistema Previsional Inteligente de Suporte à Decisão em Sustentabilidade

## A1. Identificação e caracterização das plantas silvestres de montanha

### T1.2. Identificação e caracterização das Plantas Silvestres de Montanha com propriedades de aplicação na saúde e bem-estar

Março de 2025

## Sumário

O Projeto Montanha Viva tem como objetivo desenvolver um sistema de apoio à decisão, inteligente e com funcionamento em tempo real, na exploração económica de plantas de montanha, especialmente em locais remotos (sem ligação à internet), para estimular o aproveitamento económico das plantas existentes, aumentar a produção, reduzir o consumo de recursos naturais, contribuindo para a promoção da biodiversidade e preservação da sustentabilidade ambiental, em particular das plantas silvestres de montanha.

Os seus objetivos são:

- Recolher informação básica e produzir dados de identificação e caracterização de plantas de montanha com propriedades de aplicação na saúde e bem-estar e com características potenciadoras de mitigação natural de pragas e doenças em culturas agrícolas na região montanhosa da Serra da Gardunha, promovendo a sustentabilidade das explorações agroflorestais existentes e o desenvolvimento de novos produtos e novos negócios a partir da utilização da flora silvestre.
- Avaliar e caracterizar as propriedades biológicas das espécies selecionadas com base na recolha de informação proveniente de levantamentos etnobotânicos.
- Adaptação de soluções tecnológicas existentes e a potencial necessidade de desenvolvimento de soluções específicas para a monitorização local em zonas remotas (sem acesso a fontes de energia elétrica nem a comunicações) e inóspitas (com gradientes termo-higrométricos muito elevados)
- Analisar o potencial da deteção remota de alta resolução para a classificação das espécies e deteção do seu estado fenológico.
- Desenvolver um sistema inteligente de previsão do vigor das plantas de montanha, informação e apoio à decisão em sustentabilidade ambiental, de forma a otimizar o cultivo/exploração de plantas silvestres na região de montanha.
- Promover a sensibilização sustentável, através da instalação de mesas interpretativas e informação digital com identificação e divulgação do valor ambiental, paisagístico e patrimonial da flora que visam a sensibilização e planeamento da visita às zonas de montanha.
- Dinamizar os percursos turísticos para a promoção da sustentabilidade da montanha através da sensibilização para a biodiversidade local.
- Comunicar, divulgar, transferir dados e tecnologia e disseminar os resultados do projeto.

Este documento tem como objetivo expor a atualização do estado da arte das plantas silvestres de montanha colhidas na região da Serra da Gardunha tendo por base a informação obtida em diferentes artigos científicos publicados em revistas internacionais.

**Palavras-Chave:** Ilha de sensores, Comunicação, Integração de sensores, Monitorização local e remota, Redes de sensores sem fios.

## Conteúdo

A1. Identificação e caracterização das plantas silvestres de montanha .....	1
T1.2. Identificação e caracterização das Plantas Silvestres de Montanha com propriedades de aplicação na saúde e bem-estar.....	1
Sumário.....	2
Conteúdo.....	3
Introdução .....	4
Objetivos .....	4
Resultados obtidos .....	4
Caraterização fitoquímica .....	4
Atividade anti-inflamatória.....	6
Atividade antioxidante.....	6
Atividade antimicrobiana.....	7
Inibição da formação de biofilmes.....	10
Inibição do mecanismo de comunicação entre bactérias.....	11
Efeito da combinação dos extratos com antibióticos .....	12
Biocompatibilidade em células humanas .....	13
Conclusão .....	15
Participação em eventos científicos.....	17

## Introdução

As plantas silvestres podem ser uma fonte de diversas moléculas com capacidade de anular a atividade dos radicais livres e com propriedades antimicrobianas que assim podem defender o corpo humano contra agentes patogénicos e também reações celulares de oxidação, preferencialmente com baixa toxicidade celular. Assim, investigou-se o potencial das plantas silvestres selecionadas a partir da tarefa T1.1. para obter novos compostos fitoterapêuticos com atividade antioxidante e/ou para o tratamento de patologias de origem microbiana, utilização na cosmética ou em produtos alimentares. Para tal, foram obtidos extratos hidroetanólicos das plantas silvestres considerando a sua forma de aplicação tradicional, que foram posteriormente caracterizados fitoquimicamente. A avaliação das propriedades biológicas dos extratos teve em consideração o seu potencial antioxidante, antimicrobiano e também a sua citotoxicidade.

A atividade descrita neste relatório incluído nas atividades do Projeto Montanha Viva, consiste na enumeração das plantas colhidas e dos seus resultados obtidos em laboratório.

## Objetivos

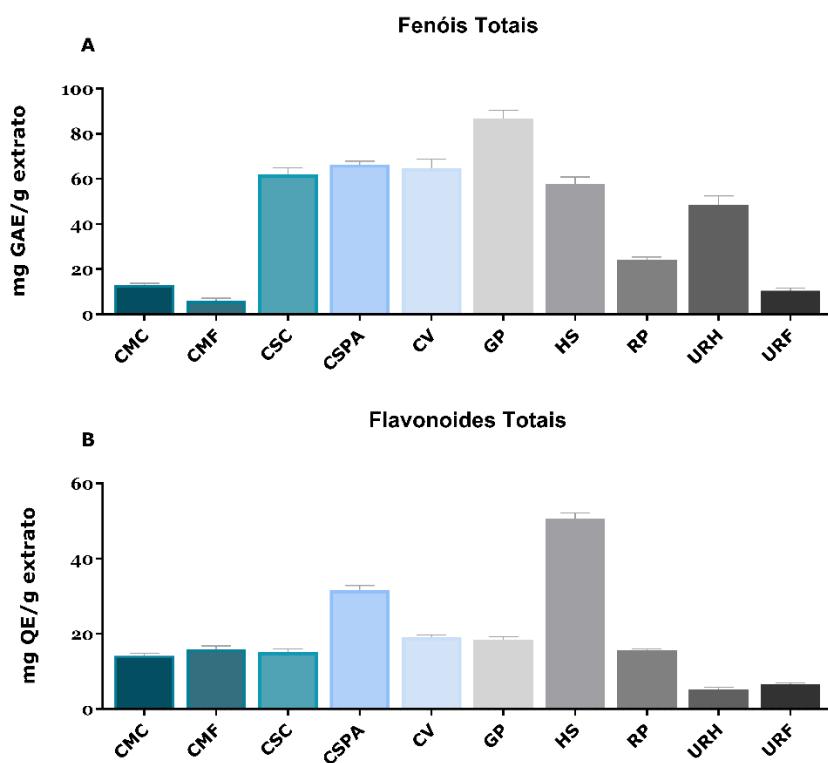
A tarefa consiste na descrição dos resultados obtidos a partir dos extratos obtidos das plantas silvestres de montanha colhidas na região da Serra da Gardunha.

## Resultados obtidos

Identificaram-se e colheram-se sete plantas silvestres na zona norte da Serra da Gardunha: *Cistus salviifolius*, *Clinopodium vulgare*, *Coincyia monensis*, *Glandora prostrata*, *Helichrysum stoechas*, *Rubia peregrina* e *Umbilicus rupestris*. E foram obtidos extratos hidroetanólicos (80:20) das plantas silvestres colhidas.

## Caracterização fitoquímica

Os resultados da caracterização fitoquímica dos extratos foram obtidos através da determinação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados podem ser observados na Figura 1. O conteúdo de flavonoides nos extratos foi determinado espetrofotometricamente utilizando o método do cloreto de alumínio e calculados como equivalentes de quercetina (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Teor de fenóis totais presentes em cada um dos extratos hidroetanólicos brutos das plantas colhidas na Serra da Gardunha (média de três determinações ± desvio padrão). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE/g extrato). (B) Teor de flavonoides presentes em cada um dos extratos (média de três determinações ± desvio padrão). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de queracetina por grama de extrato (mg QE/g extrato). CMC – *Coincya monensis* (Saramago-de-bico-recurvo, caules); CMF - *Coincya monensis* (Saramago-de-bico-recurvo, flores); CSC - *Cistus salvifolius* (estevinha, caules); CSPA - *Cistus salvifolius* (estevinha, partes aéreas); CV - *Clinopodium vulgare* (Clinopódium); GP - *Glandora prostrata* (erva das sete sangrias); HS - *Helichrysum stoechas* (perpétua das areias); RP - *Rubia peregrina* (Raspa línguas); URH - *Umbilicus rupestris* (chapéus de parede, hastes com flores); URF - *Umbilicus rupestris* (chapéus de parede, folhas).

O extrato de *Glandora prostrata* demonstrou ter maior concentração de fenóis totais, seguido dos extratos de *Cistus salvifolius*. Em relação aos flavonoides totais, o extrato com maior concentração é o de *Helichrysum stoechas* seguido do extrato obtido das partes aéreas de *Cistus salvifolius*.

Os extratos também foram caracterizados através de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS) de modo a identificar qual a composição fitoquímica. Estes resultados encontram-se em análise.

## Atividade anti-inflamatória

Relativamente às propriedades biológicas dos extratos, a atividade anti-inflamatória das amostras foi estudada avaliando a sua capacidade de inibir a desnaturação proteica. Embora este método não seja um teste direto, é frequentemente utilizado para avaliar o potencial anti-inflamatório de amostras de plantas.

**Tabela 1.** Resultados da atividade anti-inflamatória (média ± desvio padrão).

<b>Amostras</b>	<b>Atividade anti-inflamatória</b>
	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<i>Coincydia monensis</i> caules	402,71 ± 6,04
<i>Coincydia monensis</i> flores	371,93 ± 1,55
<i>Cistus salvifolius</i> partes aéreas	745,34 ± 31,96
<i>Cistus salvifolius</i> caules	700,42 ± 14,87
<i>Clinopodium vulgare</i>	309,25 ± 6,85
<i>Glandora prostrata</i>	276,31 ± 8,08
<i>Helichrysum stoechas</i>	51,75 ± 3,76
<i>Rubia peregrina</i>	304,11 ± 4,91
<i>Umbilicus rupestris</i> hastes com flores	54,79 ± 2,35
<i>Umbilicus rupestris</i> folhas	38,82 ± 2,72
Ácido acetilsalicílico	4,20 ± 1,41

Observando os resultados apresentados na Tabela 1 é possível verificar que as amostras com menor IC<sub>50</sub> e, consequentemente, com maior atividade anti-inflamatória são o extrato de *Umbilicus rupestris* folhas, seguido do extrato de *Helichrysum stoechas* e *Umbilicus rupestris* hastes com flores.

## Atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes foram avaliadas através de duas metodologias diferentes. Usando o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo) verificou-se se os extratos possuem atividade antioxidante no que diz respeito à sequestração de radicais livres e com o método do sistema β-caroteno/ácido linoleico avaliou-se a capacidade de os extratos inibirem a peroxidação lipídica. O uso de diferentes metodologias permite verificar se os extratos de plantas possuem vários mecanismos de ação relativamente à atividade antioxidante.

**Tabela 2.** Atividade antioxidante pelo método DPPH e ensaio do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão).

Amostras	Método do DPPH			$\beta$ -caroteno/ácido linoleico
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	AAI	Classificação	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Coincyda monensis</i> caules	279,74 $\pm$ 57,57	0,21 $\pm$ 0,04	Pobre	721,55 $\pm$ 9,03
<i>Coincyda monensis</i> flores	307,49 $\pm$ 57,57	0,20 $\pm$ 0,09	Pobre	608,89 $\pm$ 9,39
<i>Cistus salvifolius</i> partes aéreas	19,18 $\pm$ 5,43	2,93 $\pm$ 0,12	Muito forte	466,4 $\pm$ 10,71
<i>Cistus salvifolius</i> caules	20,72 $\pm$ 5,73	2,84 $\pm$ 0,28	Muito forte	342,82 $\pm$ 10,03
<i>Clinopodium vulgare</i>	24,57 $\pm$ 7,52	2,32 $\pm$ 0,02	Muito forte	696,49 $\pm$ 25,80
<i>Glandora prostrata</i>	25,56 $\pm$ 7,80	2,21 $\pm$ 0,03	Muito forte	352,72 $\pm$ 13,39
<i>Helichrysum stoechas</i>	67,83 $\pm$ 18,87	0,83 $\pm$ 0,04	Moderada	433,09 $\pm$ 20,56
<i>Rubia peregrina</i>	126,09 $\pm$ 78,59	0,55 $\pm$ 0,12	Moderada	621,47 $\pm$ 20,85
<i>Umbilicus rupestris</i> hastes com flores	69,02 $\pm$ 25,72	0,81 $\pm$ 0,04	Moderada	335,57 $\pm$ 6,76
<i>Umbilicus rupestris</i> folhas	945,01 $\pm$ 393,37	0,29 $\pm$ 0,11	Sem atividade	505,96 $\pm$ 16,77
Ácido gálico	3,92 $\pm$ 1,26	13,00 $\pm$ 0,67	Muito forte	-
BHT	-	-	-	99,63 $\pm$ 10,76

AAI - Índice de atividade antioxidante

Em relação ao método do DPPH, considerou-se que os extratos apresentaram atividade antioxidante pobre quando o índice de atividade antioxidante (AAI)  $\leq 0,5$ ; atividade antioxidante moderada entre  $0,5 < \text{AAI} \leq 1,0$ ; atividade antioxidante forte  $1,0 < \text{AAI} < 2,0$  e muito forte quando AAI  $\geq 2,0$  [98].

Os extratos das plantas estudadas, apresentam atividade antioxidante através de diferentes mecanismos. Os extratos de *Cistus salvifolius*, *Clinopodium vulgare* e *Glandora prostrata* mostraram ter atividade antioxidante mais relevante na sequestração de radicais livres e o extrato das hastes de *Umbilicus rupestris* em relação à inibição da peroxidação lipídica.

## Atividade antimicrobiana

Nos ensaios relativos à avaliação da atividade antimicrobiana foram estudadas várias espécies bacterianas de Gram positivo (*Bacillus cereus* ATCC 11778; *Listeria monocytogenes* LMG 16779; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* MRSA 05/15), e Gram negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* AcB 13/10 e *Acinetobacter baumannii* LMG 1025), bem como duas espécies de leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida tropicalis* ATCC 750), usando duas metodologias diferentes: avaliação da suscetibilidade por difusão em disco e determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos.

**Tabela 3.** Diâmetros dos halos de inibição dos extratos hidroetanólicos em espécies de bactérias e de leveduras apresentados como média ± desvio padrão. Usaram-se discos com o diâmetro de 6 mm.

Espécies	Difusão em disco (mm)			
	CSC	CSPA	GP	HS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11,72 ± 0,43	12,67 ± 0,78	-	24,03 ± 2,21
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 05/15	10,77 ± 0,03	10,05 ± 0,78	-	22,95 ± 0,92
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	9,99 ± 0,42	8,52 ± 0,83	-	21,01 ± 1,27
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	11,23 ± 0,57	10,55 ± 0,33	-	28,91 ± 1,36
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	9,49 ± 0,43	8,39 ± 1,24	8,63 ± 1,32	8,71 ± 2,18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> AcB 13/10	7,67 ± 0,73	9,13 ± 0,11	-	6,52 ± 0,75
<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	8,73 ± 0,53	9,11 ± 0,57	-	6,3 ± 0,61
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	-	-	-	7,53 ± 2,64
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	-	-	-	-

CSC - *Cistus salviifolius* (estevinha, caules); CSPA - *Cistus salviifolius* (estevinha, partes aéreas); GP - *Glandora prostrata* (erva das sete sangrias); HS - *Helichrysum stoechas* (perpétua das areias).

Os extratos das plantas *Clinopodium vulgare* (clinopódium), *Coincyia monensis* (Saramago-de-bico-recurvo, *Rubia peregrina* (raspa línguas) e *Umbilicus rupestris* (chapéus de parede) não possuem atividade antimicrobiana em relação aos microrganismos em estudo usando a metodologia de difusão em disco (resultados não apresentados).

**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos hidroetanólicos em espécies de bactérias e de leveduras apresentada como valores modais.

Espécies	MIC (mg/mL)									
	CMC	CMF	CSC	CSPA	CV	GP	HS	RP	URH	URF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 2	> 2	0,5	0,5	> 2	2	0,008	> 2	> 2	> 2
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 05/15	> 2	> 2	0,5	0,5	> 2	> 2	0,008	> 2	> 2	> 2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	> 2	> 2	0,5	0,25	> 2	> 2	0,008	> 2	> 2	> 2
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	> 2	> 2	1	0,5	> 2	> 2	0,008	> 2	> 2	> 2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	> 2	> 2	1	1	2	1	2	> 2	> 2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
<i>Acinetobacter baumannii</i> AcB 13/10	> 2	> 2	2	2	> 2	> 2	2	> 2	> 2	> 2

<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	> 2	> 2	1	1	> 2	> 2	2	> 2	> 2	> 2
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	> 2	> 2	0,016	0,03	> 2	> 2	0,5	> 2	0,03	> 2
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	> 2	> 2	0,25	0,25	1	1	0,5	> 2	0,25	> 2

CMC – *Coincyda monensis* (Saramago-de-bico-recurvo, caules); CMF - *Coincyda monensis* (Saramago-de-bico-recurvo, flores); CSC - *Cistus salvifolius* (estevinha, caules); CSPA - *Cistus salvifolius* (estevinha, partes aéreas); CV - *Clinopodium vulgare* (Clinopódium); GP - *Glandora prostrata* (erva das sete sangrias); HS - *Helichrysum stoechas* (perpétua das areias); RP - *Rubia peregrina* (Raspa línguas); URH - *Umbilicus rupestris* (chapéus de parede, hastes com flores); URF - *Umbilicus rupestris* (chapéus de parede, folhas).

Dos extratos obtidos, o extrato com atividade antimicrobiana mais promissora é o extrato de *Helichrysum stoechas*, seguido dos extratos de *Cistus salvifolius*. Estes extratos possuem maior atividade contra espécies de bactérias de Gram positivo, uma vez que foram obtidos menores valores de concentração mínima inibitória em relação a estas espécies. Em relação às espécies de leveduras, o extrato de *Umbilicus rupestris*, tal como os extratos de *Helichrysum stoechas*, e *Cistus salvifolius* demonstraram maior atividade.

Dos resultados obtidos da atividade antimicrobiana, foram selecionados os extratos das partes aéreas e dos caules de *Cistus salvifolius* e o extrato de *Helichrysum stoechas* e prosseguiu-se com o estudo em *Staphylococcus aureus*. Foi usada uma estirpe de referência de *S. aureus* (ATCC 25923), uma estirpe suscetível à meticilina (SA 03/10) e uma estirpe resistente a meticilina (MRSA 12/08).

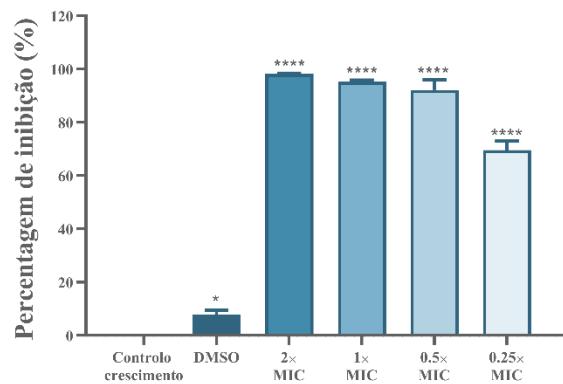
**Tabela 5.** Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos hidroetanólicos em estirpes de *Staphylococcus aureus* como valores modais.

Espécies	MIC (mg/mL)		
	<i>Cistus salvifolius</i> caules	<i>Cistus salvifolius</i> partes aéreas	<i>Helichrysum stoechas</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5	0,5	0,008
<i>Staphylococcus aureus</i> SA 03/10	> 2	> 2	> 2
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 12/08	> 2	2	0,06

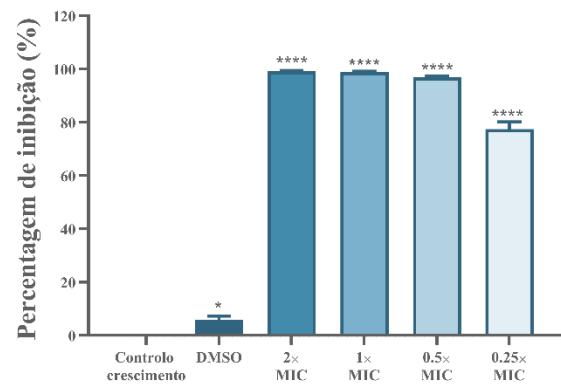
Os extratos selecionados, não demonstraram atividade antibacteriana em relação à estirpe de *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (SA 03/10) e em relação à estirpe resistente a meticilina (MRSA 12/08), os valores de concentração mínima inibitória aumentaram comparativamente à estirpe de referência de ATCC 25923, sendo que o extrato obtido dos caules de *Cistus salvifolius*, também não mostrou atividade.

## Inibição da formação de biofilmes

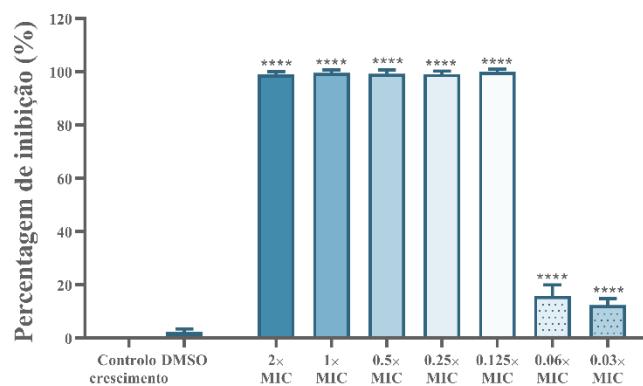
A formação de biofilmes pode ser uma forma de resistência aos agentes antimicrobianos, aos sistemas de defesa do hospedeiro e aos stressors externos. Esta matriz extracelular permite que as bactérias sobrevivam, persistam e se disseminem e ao mesmo tempo aumentam a sua tolerância. Assim, os extractos selecionados foram testados em relação a *S. aureus* de referência e a estirpe resistente à meticilina. Em relação à estirpe resistente, o extrato obtido dos caules de *Cistus salvifolius*, também não foi testado pois não foi possível obter o valor de concentração mínima inibitória e consequentemente selecionar as respetivas concentrações a testar nesta metodologia.



*Cistus salvifolius* Caules

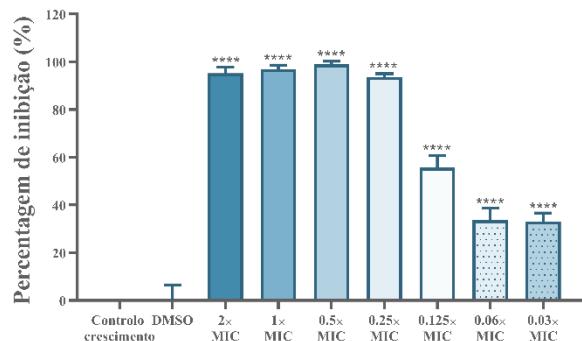


*Cistus salvifolius* Partes Aéreas

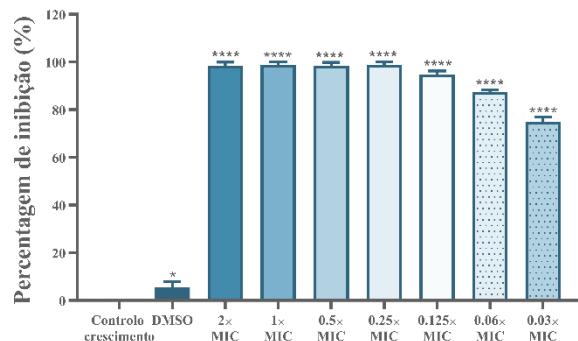


*Helichrysum stoechas*

**Gráfico 2.** Efeito de diferentes concentrações dos extractos na formação de biofilmes da estirpe *S. aureus* ATCC 25923 e os resultados são expressos como % de inibição da biomassa do biofilme. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controlo de toxicidade de solvente. A formação de biofilme foi estimada pelo ensaio de violeta de cristal. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).



*Cistus salvifolius* Partes Aéreas



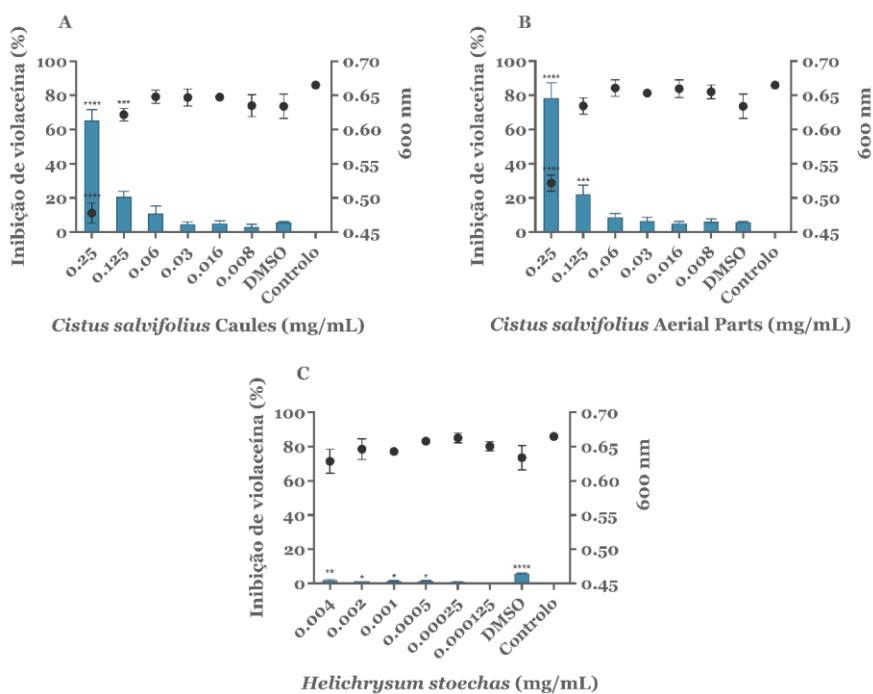
*Helichrysum stoechas*

**Gráfico 3.** Efeito de diferentes concentrações dos extratos na formação de biofilmes da estirpe *S. aureus* MRSA 12/o8 e os resultados são expressos como % de inibição da biomassa do biofilme. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controlo de toxicidade de solvente. A formação de biofilme foi estimada pelo ensaio de violeta de cristal. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

Os extratos demonstraram atividade anti virulência, inibindo a formação de biofilmes de estirpes de *S. aureus* mesmo em concentrações subinibitórias.

### Inibição do mecanismo de comunicação entre bactérias

O 'quorum sensing' é um mecanismo de comunicação entre bactérias que permite regular e coordenar a produção de fatores de virulência, de forma dependente da densidade populacional. Uma das estratégias anti virulência visa interferir na comunicação célula-célula. Assim, foi avaliado se os extratos podem inibir este mecanismo de resistência, utilizando *Chromobacterium violaceum* como um biossensor para avaliar o potencial dos extratos como inibidores de "quorum sensing".



**Gráfico 4.** Inibição do “quorum sensing” pelos extratos contra *Chromobacterium violaceum*. Percentagem de inibição da violaceína (%) por diferentes concentrações dos extratos e avaliação da viabilidade microbiana (DO 600 nm) após 48 h de incubação. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

O potencial dos extratos de *C. salvifolius* como inibidores de “quorum-sensing” foi observado na concentração mais elevada, levou a uma redução significativa da produção do pigmento violaceína ( $p < 0,0001$ ) sem afetar o crescimento de *C. violaceum*. As concentrações testadas de *H. stoechas*, não inibiram a produção de violaceína. Através deste ensaio podemos verificar que a atividade inibitória na formação de biofilmes do extrato de *Helichrysum stoechas*, pode não ter como mecanismo de ação a comunicação entre bactérias, mas sim outro mecanismo para a sua atividade antimicrobiana.

### Efeito da combinação dos extratos com antibióticos

O uso combinado de compostos não antibióticos (conhecidos como adjuvantes de antibióticos) e antibióticos pode ser uma estratégia para aumentar a atividade dos antibióticos e, assim, aumentar a suscetibilidade de estirpes de bactérias resistentes.

**Tabela 6.** Efeito da interação entre extratos e antibióticos com base no valor do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) calculado a partir do ensaio “checkerboard”.

Antibióticos	Estirpes de <i>S. aureus</i>	Extratos		
		<i>Cistus salvifolius</i> caules	<i>Cistus salvifolius</i> partes aéreas	<i>Helichrysum stoechas</i>
Ampicilina	ATCC 25923	Aditivo	Aditivo	Aditivo
	SA 03/10	Sinérgico	Sinérgico	Sem interação
	MRSA 12/08	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico
Ciprofloxacina	ATCC 25923	Sinérgico	Aditivo	Sinérgico
	SA 03/10	Sem interação	Sem interação	Aditivo
	MRSA 12/08	Sinérgico	Sinérgico	Sinérgico
Vancomicina	ATCC 25923	Sem interação	Aditivo	Aditivo
	SA 03/10	-	-	-
	MRSA 12/08	Aditivo	Sinérgico	Aditivo

“-” foi utilizado quando obtivemos crescimento em toda a placa, não permitindo calcular o FICI.

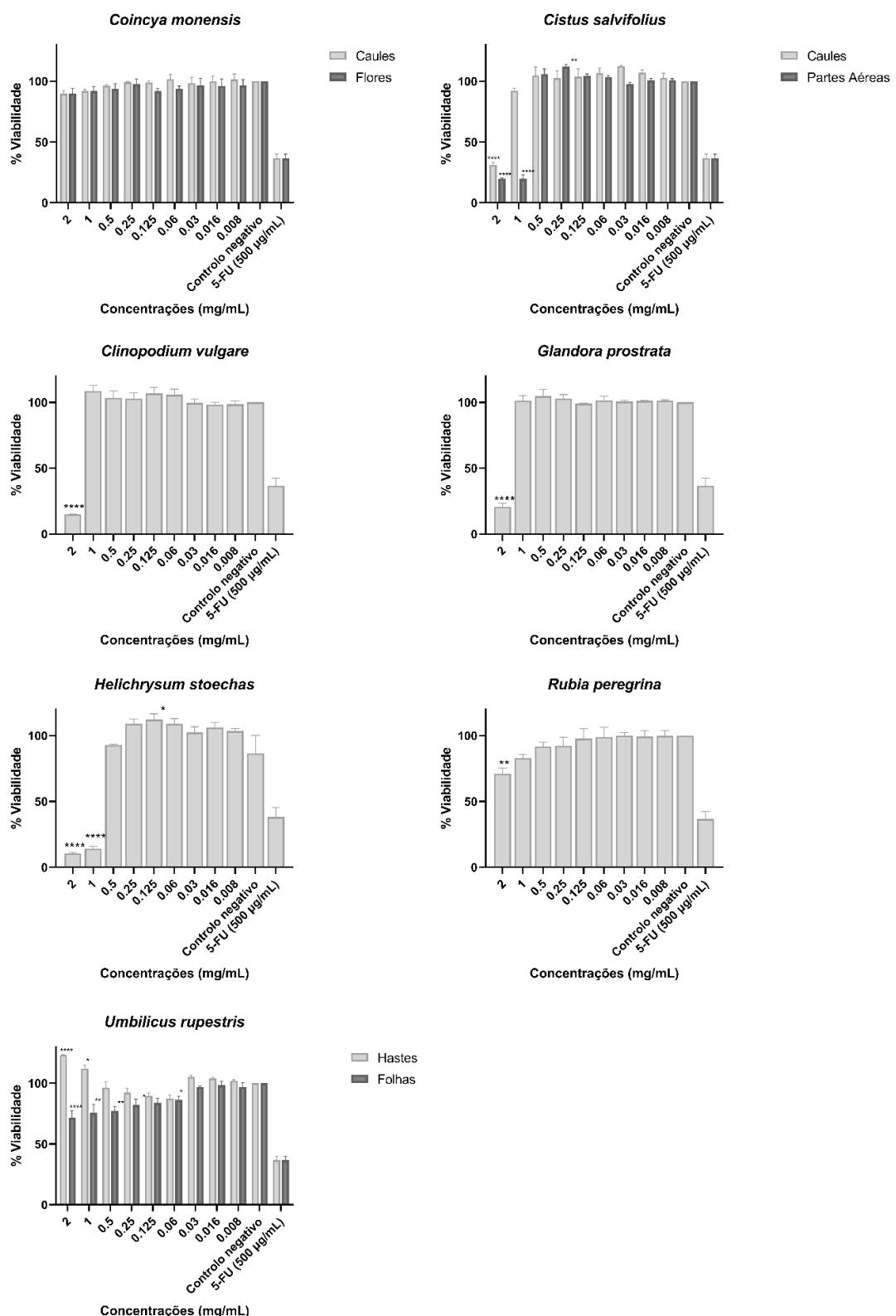
De acordo com os resultados apresentados, a combinação dos extratos com os antibióticos ampicilina, ciprofloxacina ou vancomicina potenciou os efeitos destes antibióticos contra as estirpes de *S. aureus* testadas, demonstrando um efeito maioritariamente sinérgico ( $FICI \leq 0,5$ ) ou aditivo ( $0,5 < FICI \leq 1$ ). Algumas destas interações levaram a uma resensibilização das estirpes resistentes a estes antibióticos.

De modo a avaliar se os extratos possuem atividade bactericida ou bacteriostática em relação a *Staphylococcus aureus*, foram realizados ensaios de curvas de morte. Os resultados encontram-se em análise.

A avaliação do impacto dos extratos na emergência de resistência à ciprofloxacina em *Staphylococcus aureus*, ainda está em progresso.

### Biocompatibilidade em células humanas

Para avaliar o perfil citotóxico dos extratos em células humanas, foi utilizando uma linha celular normal de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF).



**Figura 5.** Biocompatibilidade dos extratos para a linha celular de fibroblastos dérmicos humanos normais medida pelo ensaio MTT após 24 h de tratamento. O controlo negativo foi realizado utilizando células não tratadas e as células cultivadas com Fluorouracil (5-FU, 500 µg/mL) foram utilizadas como controlo positivo. Os resultados são expressos como médias ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

A avaliação da citotoxicidade usando culturas de células humanas, nomeadamente fibroblastos dérmicos normais, mostrou que o extrato obtido das partes aéreas de *Cistus salvifolius* e o de *Helichrysum stoechas*, são os mais citotóxicos, diminuído a viabilidade celular com concentrações mais baixas. A viabilidade das células NHDF excedeu os 75% quando expostas a extractos em concentrações de 1 mg/mL ou inferiores, exceto para os extractos das partes aéreas de *Cistus salvifolius* e o de *Helichrysum stoechas* ( $IC_{50} < 1$  mg/mL). No caso dos extractos das últimas duas plantas que apresentaram atividade antimicrobiana, verifica-se que as concentrações que apresentam citotoxicidade são superiores ao necessário para obter inibição dos microrganismos-alvo.

A capacidade cicatrizante dos extractos foi avaliada através de ensaios de migração celular mimetizando uma ferida, usando também fibroblastos dérmicos normais. No entanto, os extractos não demonstraram atividade cicatrizante.

## Conclusão

Das plantas silvestres de montanha colhidas na região da Serra da Gardunha, verificou-se que a mais promissora em relação às propriedades anti-inflamatórias é o *Umbilicus rupestris*, principalmente as folhas.



**Figura 6.** Foto obtida na Serra da Gardunha do *Umbilicus rupestris*.

As plantas que apresentaram atividade antioxidante, relativa à sequestração de radicais livres, é o *Cistus salvifolius* e em relação à inibição da peroxidação lipídica, o *Umbilicus rupestris*. De referir, que podemos afirmar que as diferentes partes destas plantas, também influenciam na atividade antioxidante, sendo que as partes aéreas do *Cistus salvifolius* e as hastes com flores do *Umbilicus rupestris*, demonstraram maior atividade antioxidante.



**Figura 7.** Foto obtida na Serra da Gardunha do *Cistus salviifolius*.

Em relação à atividade antimicrobiana, o *Helichrysum stoechas* é a planta com melhores resultados, apresentando maiores halos de inibição e menores concentrações mínimas inibitórias em relação a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como leveduras. Esta planta também mostrou ter atividade anti virulência em relação a *Staphylococcus aureus*, inibindo a formação de biofilmes mesmo com concentrações subinibitórias. Por exemplo, a concentração de 0,002 mg/mL de extrato inibiu cerca de 80% da formação de biofilme da estirpe resistente a meticilina de *Staphylococcus aureus*. O extrato de *Helichrysum stoechas* também potenciou o efeito de diferentes antibióticos, sendo uma mais-valia no combate à resistência a antibióticos.



**Figura 8.** Foto obtida na Serra da Gardunha do *Helichrysum stoechas*.

## Participação em eventos científicos

Os resultados obtidos neste projeto foram apresentados na forma de poster em dois congressos internacionais:

**1)** Alexandra Coimbra, Ângelo Luís, Pedro Gaspar, Susana Ferreira, Ana Paula Duarte (2024). Phytochemical characterization and evaluation of antimicrobial properties of wild plants collected in the mountain region of Serra da Gardunha, Portugal. 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS), Florence, Italy, October 23-25, 2024. (<https://iums2024.com/>).

## Phytochemical characterization and evaluation of antimicrobial properties of wild plants collected in the mountain region of Serra da Gardunha, Portugal

**Alexandra Coimbra<sup>1</sup>, Ângelo Luís<sup>1</sup>, Pedro Dinis<sup>2</sup>, Susana Ferreira<sup>1</sup>, Ana Paula Duarte<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CICS-UBI, Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> C-MAST, Center for Mechanical and Aerospace Science and Technologies, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

### Introduction

Natural products have received attention as alternative therapeutic options, since they can play a crucial role in the prevention and treatment of different diseases. The plants in the mountain region of **Serra da Gardunha** have been used in traditional medicine, attracting interest in their bioactive properties. Seven wild plants were identified and collected in the northern area of Serra da Gardunha, *Cistus salvifolius* aerial parts (**CSAP**) and stems (**CSS**), *Clinopodium vulgare* (**CV**), *Coincya monensis* flowers (**CMF**) and stems (**CMS**), *Glandora prostrata* (**GP**), *Helichrysum stoechas* (**HS**), *Rubia peregrina* (**RP**) and *Umbilicus rupestris* flowers (**URF**) and leaves (**URL**).

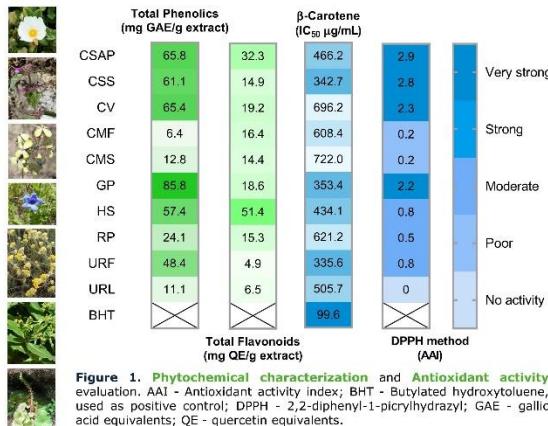
**Aim:** This work aimed to evaluate the bioactivity of different plants, studying their chemical composition and bioactivity, namely antimicrobial properties.



### Methodology

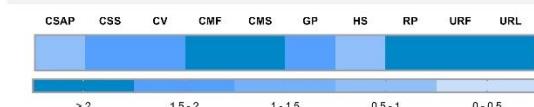


### Results



The GP extract contains a higher total phenolic content and the HS extract has a greater total flavonoids content.

The extracts have antioxidant activity through different mechanisms. The DPPH methodology and based on Scherer and Godoy (2009) classification, showed that the CSAP, CSS, CV and GP extracts exhibited very strong antioxidant activity related to scavenge free radicals. The β-carotene bleaching assay demonstrated that the CSS, GP and URF extracts can inhibit lipid peroxidation.



**Figure 2. Biocompatibility** for NHDF cell line measured by MTT assay after 24 h of treatment with the extracts. The results are presented as IC<sub>50</sub> values in mg/mL.

The viability of NHDF cells exceeded 75% when exposed to extracts at concentrations of 1 mg/mL or lower, except for the CSAP and HS extracts (IC<sub>50</sub> < 1 mg/mL).

**Table 1. Antimicrobial activity** evaluated by the determination of the MIC values (mg/mL) in bacterial and yeast species (modal values).

Species	CSAP	CSS	CV	GP	HS	URF	URL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.5	0.5	>2	2	<b>0.008</b>	>2	>2
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 05/15	0.5	0.5	>2	>2	<b>0.008</b>	>2	>2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0.25	0.5	>2	>2	<b>0.008</b>	>2	>2
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	0.5	1	>2	>2	<b>0.008</b>	>2	>2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	1	2	1	2	>2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	2	2	>2	>2	2	>2	>2
<i>Acinetobacter baumannii</i> AcB 13/10	1	1	>2	>2	2	>2	>2
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	0.03	0.02	>2	>2	<b>0.5</b>	<b>0.03</b>	>2
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	0.25	0.25	1	1	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>	>2

The antimicrobial evaluation demonstrated that the HS extract exhibited the strongest antibacterial activity against the Gram-positive, while the CSAP and CSS extracts also showed activity, albeit at comparatively lower values. Additionally, the CSAP, CSS and URF extracts showed a promising anti-*Candida* activity.

### Conclusion

It can be concluded that extracts from these plants demonstrated relevant bioactive activities. These results are promising, indicating the potential of these extracts in the discovery of new bioactive molecules.

### Acknowledgements

Research project financed by "Montanha Viva - Sistema Previsional Inteligente de Suporte à Decisão em Sustentabilidade" (Ref. PD21-00009), supported by Fundação La Caixa, through the program "Promove o Futuro do Interior, Concurso 2022".



Look at the project  
 "Montanha Viva"

2) Alexandra Coimbra, Ângelo Luís, Pedro Gaspar, Susana Ferreira, Ana Paula Duarte (2025). Evaluation of the bioactive activities of wild plants from Serra da Gardunha Mountain region in Portugal. V International Congress in Health Sciences Research 2025: From molecule to community (HSRCongress2025), Covilhã, Portugal, March 20-22, 2025. (<https://www.hsrcongress.pt/>).

## Evaluation of the bioactive activities of wild plants from Serra da Gardunha mountain region in Portugal

Alexandra Coimbra<sup>1,2</sup>, Ângelo Luis<sup>1,2</sup>, Pedro Dinis<sup>3</sup>, Susana Ferreira<sup>1,2</sup>, Ana Paula Duarte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> RISE-Health – Department of Medical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> C-MAST – Center for Mechanical and Aerospace Science and Technologies, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

### INTRODUCTION

Natural products have received attention as alternative therapeutic options, since they can play a crucial role in the prevention and treatment of different diseases. The **Montanha Viva** project proposes to collect information about the Serra da Gardunha region's wild plants used by local communities and to investigate potential new phytotherapeutic compounds with antioxidant activity and/or for the treatment of microbial-related pathologies. Two wild plants were identified and collected in the northern area of Serra da Gardunha as presenting potential bioactive properties, *Cistus salvifolius* aerial parts (CSAP) and stems (CSS) and *Helichrysum stoechas* (HS).

**AIM:** Therefore, the aim of this study was to assess the bioactivity of these plants, with a focus on antimicrobial activity.

### METHODOLOGY

Plant extracts	Antioxidant activity	Anti-inflammatory activity	Antimicrobial activity	Antivirulence activity	Combined effect with antibiotics
Hydroethanolic extraction, followed by the evaporation of the ethanolic part under reduced-pressure and the aqueous part was freeze-dried.	DPPH and β-Carotene Bleaching assays.	Inhibition of protein denaturation using bovine serum albumin (BSA)	Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) against different Gram + and Gram - bacteria and yeasts.	Inhibition of biofilm formation through crystal-violet assay.	Checkerboard Assay

### RESULTS

**Table 1.** Antioxidant activity using the DPPH method and β-carotene-bleaching assay and anti-inflammatory activity results (results expressed as mean ± standard deviation).

Samples	DPPH method		β-Carotene-Bleaching Assay		Anti-Inflammatory Activity
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	AAI	Classification	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
CSAP	19.18 ± 5.43	2.93 ± 0.12	Very strong	466.23	745.34 ± 31.96
CSS	20.72 ± 5.73	2.84 ± 0.28	Very strong	342.68	700.42 ± 14.87
HS	67.83 ± 18.87	0.83 ± 0.04	Moderate	434.12	51.75 ± 3.76
Gallic acid	3.92 ± 1.26	13.00 ± 0.67	Very strong	-	-
BHT	-	-	-	99.56	-
Acetylsalicylic acid	-	-	-	-	4.20 ± 1.41
AAI - Antioxidant activity index; BHT - Butylated hydroxytoluene; DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.					

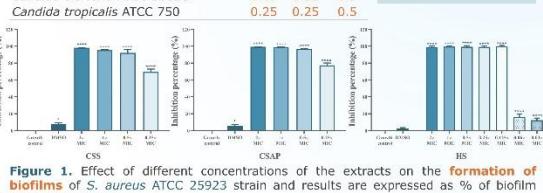
The DPPH methodology showed that the CSAP and CSS extracts exhibited very strong antioxidant activity related to scavenge free radicals.

The β-carotene bleaching assay demonstrated that the CSS extract can inhibit lipid peroxidation.

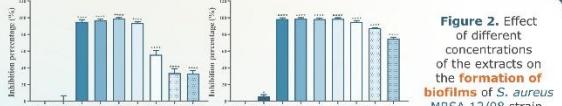
**Table 2.** Antimicrobial activity evaluated by the determination of the MIC values (mg/mL) in bacterial and yeast species (modal values).

Species	CSAP	CSS	HS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.5	0.5	0.008
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS A 12/08	> 2	2	0.06
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0.25	0.5	0.008
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	0.5	1	0.008
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	1	2
<i>Acinetobacter baumannii</i> LMG 1025	2	2	2
<i>Acinetobacter baumannii</i> AcB 13/10	1	1	2
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	0.03	0.02	0.5
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	0.25	0.25	0.5

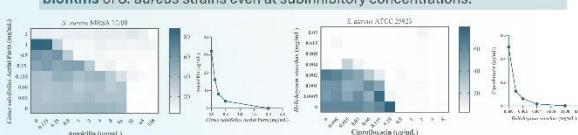
The extracts exhibited antimicrobial activity, particularly against *S. aureus* and *Candida* species presenting MIC values between 0.008 and 0.5 mg/mL.



**Figure 1.** Effect of different concentrations of the extracts on the formation of biofilms of *S. aureus* ATCC 25923 strain and results are expressed as % of biofilm biomass inhibition.



**Figure 2.** Effect of different concentrations of the extracts on the formation of biofilms of *S. aureus* MRS A 12/08 strain.



**Figure 3.** Some examples of the results obtained for the combined effect with antibiotics. Checkerboards of CSAP and ampicillin (FICI=0.19–0.28) or HS and ciprofloxacin (FICI=0.37–0.5) for growth inhibition of *S. aureus* MRS A 12/08 and *S. aureus* ATCC 25923, respectively. In the checkerboard graphics, white indicates 0% cell viability using the resazurin assay. Points on isobolograms represent combinations of extracts and antibiotics (relative to their MICs alone).

**Table 3.** Effect of the interaction between extracts and antibiotics based on the fractional inhibitory concentration index (FICI) value calculated from the checkerboard assay.

Antibiotics	<i>S. aureus</i> strains	CSAP	CSS	HS
Ampicillin	ATCC 25923	Additive		
	SA 03/10	Synergistic		
	MRS A 12/08	Synergistic		
Ciprofloxacin	ATCC 25923	Additive		
	SA 03/10	No interaction		
	MRS A 12/08	Synergistic		
Vancomycin	ATCC 25923	Additive		
	SA 03/10	Synergistic	No interaction	
	MRS A 12/08	Synergistic	Additive	

“-” was used when we obtained growth across the entire plate not allowing to calculate the FICI.

The combination of the extracts with the antibiotic's ampicillin, ciprofloxacin or vancomycin potentiated the effects of these antibiotics against the *S. aureus* strains tested, demonstrating mostly synergistic (FICI ≤ 0.5) or additive (0.5 < FICI ≤ 1) effect. Some of these interactions led to a resensitization of the resistant strains to these antibiotics.

### CONCLUSION

These findings are encouraging for the potential use of these extracts in the discovery of new bioactive compounds and the possible use of the extracts as an alternative antibacterial agent for the control of *Staphylococcus aureus*.



Look at the project:  
 montanha  
viva

### ACKNOWLEDGMENTS

Alexandra Coimbra is recipient of a research fellowship (Ref PD21-00009) within the Research project titled "Montanha Viva - Sistemas Previsões Inteligentes de Suporte à Decisão em Sustentabilidade", supported by Fundação La Caixa.  
This work was developed within the scope of the CICS-UBI projects UIDB/00709/2020 and UIDP/00709/2020, financed by national funds through the Portuguese Foundation for Science and Technology/MCTES.