

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

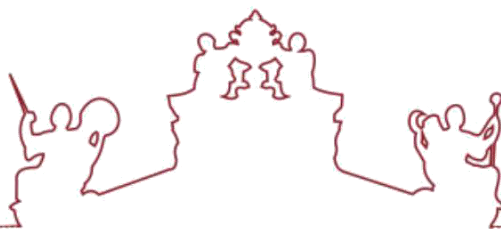
Dissertação

**Valorização das espécies condimentares *Calamintha nepeta*,
Mentha cervina, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*:
potencial nutracêutico dos seus extratos aquosos.**

Laura Sofia Silva Gomes

Orientador(es) | **Maria do Rosário Martins**

Évora 2020



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

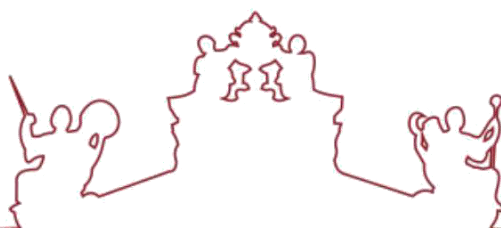
Dissertação

**Valorização das espécies condimentares *Calamintha nepeta*,
Mentha cervina, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*:
potencial nutracêutico dos seus extratos aquosos.**

Laura Sofia Silva Gomes

Orientador(es) | **Maria do Rosário Martins**

Évora 2020



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Célia M. Antunes (Universidade de Évora)
- Vogal | António Paulo da Silva Teixeira (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Maria do Rosário Martins (Universidade de Évora)

Évora 2020

À minha avó Maria da Graça e à memória do meu avô António, por serem a minha maior fonte de motivação. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Agradecimentos

Chegar até aqui não foi fácil e, como tal, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me acompanharam e contribuíram para a concretização desta dissertação.

À Professora Doutora Maria do Rosário Martins, por ter aceitado orientar esta dissertação, como também, por todo o apoio concedido, de forma a tornar exequível a sua realização.

À Mestre Andreia Piçarra, agradeço, pela sua amizade, assim como pela confiança que sempre depositou em mim e, acima de tudo, pela ajuda incansável e constante.

À Técnica de laboratório Anabela Cabeça, pela disponibilidade e ajuda prestada ao longo da componente prática deste trabalho.

À minha família, a minha profunda gratidão, pela forma como me inculcaram valores de resiliência e força, perante as adversidades. A pessoa que hoje sou, a eles se deve.

Ao meu namorado Bruno Madeira, melhor amigo e companheiro de todas as horas, pela compreensão, paciência e apoio inestimáveis durante este percurso. Esta dissertação é também tua, agradeço-te do fundo do meu coração.

Por último, porém não menos importante, aos meus colegas de mestrado, em especial à Catarina Amorim, Filipa Grosso, Pedro Alves e João Oliveira. Dirijo-lhes um agradecimento muito especial, pela motivação e, sobretudo, pelo grande companheirismo que se desenvolveu.

Abreviaturas

ABA – Ácido abscísico, do inglês *Abscisic acid*

ACh – Acetilcolina, do inglês *Acetylcholine*

AChE – Acetilcolinesterases, do inglês *Acetylcholinesterases*

AEC – Ataxia espinocerebelosa

ATCI – Iodeto de acetiltiocolina, do inglês *Acetylthiocholine iodide*

BHT – Hidroxitolueno butilado, do inglês *Butylated hydroxytoluene*

BSA – Albumina de soro bovino, do inglês *Bovine serum albumin*

BTCl – Iodeto de butiriltiocolina, do inglês *Butyrylthiocholine iodide*

BChE – Butirilcolinesterases, do inglês *Butyrylcholinesterases*

CAT – Catalases

ChAT – Colina acetiltransferase, do inglês *Choline acetyltransferase*

CHS – Chalcona sintase

CL₅₀ – Concentração letal para 50% de uma população de teste

CoA – Coenzima A

Cu/Zn-SOD – Cobre-zinco superóxido dismutases

DA – Doença de Alzheimer

DH – Doença de Huntington

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DP – Doença de Parkinson

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), do inglês *5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*

EAA – Equivalentes em ácido ascórbico

EAG – Equivalentes em ácido gálico

EAT – Equivalentes em ácido tânico

EC – Comissão de Enzimas do inglês *Enzyme Commission*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EHD – Extrato obtido a partir das águas de decocção, resultantes do processo de hidrodestilação das plantas

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

EPF – Extrato aquoso obtido por trituração a frio da planta fresca

EQ – Equivalentes em quercetina

Fe-SOD – Ferro superóxido dismutases

GPx – Glutathione peroxidases

GR – Glutathione reductases

GSH – Glutathione reduzido

GST – Glutathione-S-transferases

IC₅₀ – Concentração média máxima inibitória, do inglês *Half-maximal inhibitory concentration*

JNM – Junção neuromuscular

MAO – Monoamino oxidases

Mn-SOD – Manganês superóxido dismutases

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida), do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)*

¹O₂[•] – Radical oxigénio singlete

•O₂ – Radical superóxido

OEs – Óleos essenciais

OH[•] – Radical hidroxilo

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAL – Fenilalanina amónia liase, do inglês *Phenylalanine ammonia lyase*

PAMs – Plantas aromáticas e medicinais

POD – Peroxidases

PPO – Polifenoloxidasas, do inglês *Polyphenol oxidases*

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive oxygen species*

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutases

tBOOH – *tert*-butilhidroperóxido

TCA – Ácido tricarbóxico, do inglês *Tricarboxylic acid*

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-visível

VACHT – Transportador vesicular de acetilcolina, do inglês *Vesicular acetylcholine transporter*

Unidades e convenções

°C – Grau Celsius/centígrado

cm – Centímetro

ε – Coeficiente de absorvidade molar

g, mg, µg – Grama, miligrama, micrograma

h, min – Hora, minuto

M, mM – Molar, milimolar

mL, µL – Mililitro, microlitro

nm – Nanómetro

% – Percentagem

U – Unidade de atividade enzimática

Valorização das espécies condimentares *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*: potencial nutracêutico dos seus extratos aquosos.

Resumo

Neste projeto, selecionaram-se quatro espécies aromáticas e condimentares da família Lamiaceae, *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*, para preparação de extratos aquosos, extratos de hidrodestilação (EHD) e extratos de planta fresca (EPF), e avaliação das suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras.

Os EHD apresentaram maior conteúdo em fenóis e flavonoides do que os EPF. O teste de letalidade em *A. salina* revelou baixa toxicidade para os extratos. Os EHD apresentaram maior potencial antioxidante para captar radicais livres, proteger a oxidação lipídica e evitar a oxidação do ferro hémico. Os EHD revelaram também maior atividade inibitória dos sistemas enzimáticos de catalases (CAT), glutathione peroxidases (GPx), acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BChE). Os EHD destas plantas condimentares revelaram-se promissores no combate do *stress* oxidativo, com potencial aplicação nas indústrias alimentar e/ou farmacêutica.

Palavras-chave: Extratos de plantas aromáticas; Nutracêutico; Potencial antioxidante e anti-neurodegenerativo; Letalidade em *Artemia salina*.

Flavouring herbs *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* and *Mentha spicata* valorisation: nutraceutical potential of aqueous extracts.

Abstract

In this project, four aromatic and flavouring species of Lamiaceae family, *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* and *Mentha spicata* were selected to prepare their aqueous extracts, hydrodistillation extracts (EHD) and fresh plant extracts (EPF), to evaluate their antioxidant and neuroprotective properties.

Extracts were rich in bioactive compounds and EHD had higher phenol and flavonoid content. *A. salina* lethality test showed low toxicity of extracts. EHD showed higher antioxidant potential to scavenge free radicals, protect lipid oxidation and prevent the hemic iron oxidation. EHD presented higher inhibitory activity of catalases (CAT), glutathione peroxidases (GPx), acetylcholinesterases (AChE) and butyrylcholinesterases (BChE) enzyme systems. Results showed that EHD from these flavouring herbs are promising extracts against oxidative stress with potential application in the food and/or pharmaceutical industries.

Keywords: Aromatic plant extracts; Nutraceutical; Antioxidant and anti-neurodegenerative potential; *Artemia salina* lethality.

Índice

1. Problemática.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Introdução	5
3.1. Plantas aromáticas e medicinais (PAMs)	5
3.1.1. Processos metabólicos nas plantas.....	5
3.1.2. Atividades biológicas das PAMs	8
3.1.2.1. Stress oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante.....	9
3.1.2.2. Propriedades neuroprotetoras.....	10
3.1.2.3. Propriedades toxicológicas.....	14
3.2. Plantas aromáticas e condimentares em estudo	14
3.2.1. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi subsp. <i>nepeta</i>	15
3.2.2. <i>Mentha cervina</i> L.....	16
3.2.3. <i>Mentha pulegium</i> L.	17
3.2.4. <i>Mentha spicata</i> L.....	17
4. Materiais e métodos.....	21
4.1. Seleção e preparação das plantas	21
4.2. Preparação de extratos de hidrodestilação das plantas (EHD)	21
4.3. Preparação de extratos aquosos de planta fresca (EPF)	22
4.4. Caracterização química dos extratos.....	22
4.4.1. Pesquisa fitoquímica	22
4.4.2. Avaliação do conteúdo em fenóis totais.....	24
4.4.3. Avaliação do conteúdo em flavonoides totais	25
4.4.4. Avaliação do conteúdo em taninos totais.....	26
4.5. <i>Screening</i> de toxicidade dos extratos	26
4.6. <i>Screening in vitro</i> das propriedades antioxidantes dos extratos	27
4.6.1. Método do radical DPPH	27
4.6.2. Sistema β -caroteno/ácido linoleico	28
4.6.3. Método do poder redutor total	29

4.7. Avaliação dos mecanismos enzimáticos de atividade antioxidante.....	30
4.7.1. Avaliação do conteúdo proteico da fração citosólica	30
4.7.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de CAT	31
4.7.3. Determinação da capacidade inibitória da atividade de GPx	31
4.8. Avaliação do potencial neuroprotetor.....	32
4.8.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade de AChE.....	32
4.8.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de BChE	33
5. Resultados e discussão	35
5.1. Caracterização química dos extratos	35
5.2. <i>Screening</i> de toxicidade dos extratos	40
5.3. <i>Screening in vitro</i> das propriedades antioxidantes dos extratos	42
5.3.1. Método do radical DPPH	42
5.3.2. Sistema β -caroteno/ácido linoleico	44
5.3.3. Método do poder redutor total	46
5.3.4. Avaliação dos mecanismos <i>in vitro</i> de atividade antioxidante	48
5.4. Avaliação dos mecanismos enzimáticos de atividade antioxidante.....	52
5.4.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade de CAT	52
5.4.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de GPx	55
5.4.3. Avaliação da capacidade inibitória da atividade de CAT e GPx	58
5.5. Avaliação do potencial neuroprotetor.....	59
5.5.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade de AChE.....	59
5.5.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de BChE	62
5.5.3. Avaliação da capacidade inibitória da atividade de AChE e BChE	65
6. Conclusões e perspectivas futuras	67
7. Referências bibliográficas	68
8. Anexos	79
I. Caracterização química dos extratos	79
II. Análise estatística	80

Índice de figuras

Figura 1. Resposta da planta, em condições de <i>stress</i> biótico e/ou abiótico (Adaptado de Borges <i>et al.</i> , 2017).....	6
Figura 2. Vias metabólicas envolvidas na síntese de metabolitos secundários (Adaptado de Ncube & Staden, 2015).....	7
Figura 3. Classificação dos antioxidantes naturais (Adaptado de Shalaby & Azzam, 2018).	9
Figura 4. Primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigénio (ROS) (Adaptado de Ighodaro & Akinloye, 2018).....	10
Figura 5. Metabolismo da ACh nos terminais nervosos colinérgicos (Adaptado de Purves <i>et al.</i> , 2004).....	12
Figura 6. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi subs. <i>nepeta</i>	15
Figura 7. <i>Mentha cervina</i> L.	16
Figura 8. <i>Mentha pulegium</i> L. (Adaptado de Flora-On, 2012).	17
Figura 9. <i>Mentha spicata</i> L.	18
Figura 10. Quantificação do conteúdo dos EHD (A) e EPF (B) em fenóis totais.....	37
Figura 11. Quantificação do conteúdo dos EHD (A) e EPF (B) em flavonoides totais.	38
Figura 12. Quantificação do conteúdo dos EHD (A) e EPF (B) em taninos totais.....	39
Figura 13. Curvas dose-resposta referentes aos EHD (A–D), EPF (E–F) e dicromato de potássio (G), pelo teste de letalidade em <i>Artemia salina</i>	41
Figura 14. Atividade antioxidante dos EHD (A), EPF (B) e padrões (C), pelo método do radical DPPH.	43
Figura 15. Atividade antioxidante dos EHD (A), EPF (B), ácido ascórbico (C) e quercetina (D), pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.	45
Figura 16. Atividade antioxidante dos EHD (A), EPF (B) e padrões (C), pelo método do poder redutor total.....	47
Figura 17. Atividade antioxidante dos EHD (A) e EPF (B), expressa em EAA, pelo método do radical DPPH.	48
Figura 18. Atividade antioxidante dos EHD (A) e EPF (B), expressa em EAA, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.	49

Figura 19. Atividade antioxidante dos EHD (A) e EPF (B), expressa em EAA, pelo método do poder redutor total.	49
Figura 20. Perfis de atividade de CAT, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).	53
Figura 21. Capacidade dos EHD (A) e EPF (B), para inibir a atividade de CAT.....	54
Figura 22. Perfis de atividade de GPx, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).	56
Figura 23. Capacidade dos EHD (A) e EPF (B), para inibir a atividade de GPx.....	57
Figura 24. Perfis de atividade de AChE, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).....	60
Figura 25. Potencial dos EHD (A) e EPF (B), para inibir a atividade de AChE.	61
Figura 26. Perfis de atividade de BChE, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).....	63
Figura 27. Potencial dos EHD (A) e EPF (B), para inibir a atividade de BChE.	64
Figura 28. Curvas de calibração dos padrões, utilizadas para quantificação do conteúdo dos extratos em fenóis, flavonoides e taninos totais.....	79

Índice de tabelas

Tabela 1. Classificação taxonômica das espécies aromáticas e condimentares em estudo.	15
Tabela 2. Rendimentos de extração dos extratos aquosos.....	36
Tabela 3. Perfil fitoquímico dos extratos aquosos.	36
Tabela 4. Valores de IC ₅₀ determinados para cada extrato/padrão, no âmbito da sua capacidade antioxidante pelos mecanismos estudados.....	58
Tabela 5. Valores de IC ₅₀ determinados para cada extrato, no âmbito da sua capacidade para inibir a atividade de CAT e GPx.	58
Tabela 6. Valores de IC ₅₀ determinados para os extratos/padrão, no âmbito da sua capacidade para inibir a atividade de AChE e BChE.	65
Tabela 7. Análise de variância ANOVA para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em fenóis, flavonoides e taninos totais.....	80
Tabela 8. Teste de Tukey para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em fenóis totais.	81
Tabela 9. Teste de Tukey para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em flavonoides totais.....	81
Tabela 10. Teste de Tukey para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em taninos totais.....	82
Tabela 11. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do radical DPPH.....	82
Tabela 12. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do radical DPPH.	83
Tabela 13. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.	83
Tabela 14. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	83
Tabela 15. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do poder redutor total.	84
Tabela 16. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do poder redutor total.....	85

Tabela 17. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do radical DPPH.	85
Tabela 18. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do radical DPPH.....	85
Tabela 19. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.	86
Tabela 20. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.	86
Tabela 21. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do poder redutor total.	86
Tabela 22. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do poder redutor total.	87
Tabela 23. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de CAT.....	87
Tabela 24. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de CAT.	88
Tabela 25. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de GPx.....	88
Tabela 26. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de GPx.....	89
Tabela 27. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de AChE.....	89
Tabela 28. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de AChE.	90
Tabela 29. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de BChE.....	90
Tabela 30. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de BChE.	91

1. Problemática

As plantas aromáticas e medicinais (PAMs), tradicionalmente usadas na medicina popular, representam um potencial na prevenção de doenças cardiovasculares e cancerígenas. Além disso, as PAMs são utilizadas pela indústria farmacêutica, uma vez que são ricas em compostos bioativos, que podem ser usados como agentes para a síntese de fármacos. As plantas medicinais, são também utilizadas na indústria cosmética e alimentar, como conservantes, devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana. Ao longo dos tempos, tem sido atribuído às plantas, um extenso histórico de propriedades medicinais (Henry, 2012).

O Alentejo é uma região de cariz mediterrânico, muito rica em plantas aromáticas, sendo que, algumas delas, são utilizadas pelas populações locais, como condimentos alimentares e na medicina tradicional (Arantes *et al.*, 2017). Tendo em conta que a atividade biológica das plantas aromáticas, dependente da composição de metabolitos secundários presentes, é influenciada não só pela espécie, mas também pelas condições edáfico-climáticas, métodos de extração, entre outros (Samarth *et al.*, 2017), importa validar cientificamente as suas propriedades biológicas, com vista à sua utilização como nutracêuticos e/ou agentes fitoterapêuticos.

Neste projeto, selecionaram-se quatro espécies de plantas aromáticas da família Lamiaceae, muito utilizadas no Alentejo como condimentos na Dieta mediterrânica, nomeadamente, *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*. Assim, pretendeu-se preparar dois tipos diferentes de extratos aquosos, extratos obtidos a partir das águas de decocção, resultantes do processo de hidrodestilação das plantas (EHD) e extratos aquosos obtidos por trituração a frio da planta fresca (EPF), com vista a caracterizar a sua composição química e avaliar o seu potencial antioxidante e neuroprotetor.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Neste projeto, pretendeu-se avaliar as propriedades antioxidantes e neuroprotetoras de extratos aquosos, obtidos por duas metodologias de extração diferentes, de quatro espécies condimentares autóctones do Alentejo: *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Selecionar as espécies a estudar, bem como a época de colheita, tendo em conta o estado vegetativo da planta;
- ❖ Preparar dois extratos aquosos para cada espécie em estudo, utilizando duas metodologias diferentes: extratos obtidos a partir das águas de decocção, resultantes do processo de hidrodestilação da planta fresca (EHD) e extratos aquosos obtidos por trituração a frio da planta fresca (EPF);
- ❖ Caracterizar quimicamente os extratos, por pesquisa fitoquímica e quantificação do seu conteúdo em fenóis, flavonoides e taninos totais;
- ❖ Efetuar um *screening* de toxicidade dos extratos, com avaliação da letalidade em *Artemia salina*;
- ❖ Proceder ao *screening in vitro* das propriedades antioxidantes dos extratos, pelos métodos do radical DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor total;
- ❖ Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos para inibir sistemas enzimáticos envolvidos no *stress* oxidativo, com determinação da capacidade inibitória da atividade de catalases (CAT) e glutatióno peroxidases (GPx);
- ❖ Avaliar o potencial neuroprotetor dos extratos, com determinação da capacidade inibitória da atividade de acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BChE).

3. Introdução

3.1. Plantas aromáticas e medicinais (PAMs)

As plantas aromáticas, tal como o nome indica, contêm compostos aromáticos, denominados de essências ou óleos essenciais (OEs). Estes, são misturas complexas de metabolitos secundários voláteis, hidrofóbicos e altamente concentrados. Os OEs apresentam atividade biológica e aroma característicos, sendo amplamente utilizados na área da saúde e em aromaterapia, assim como noutros setores da Indústria, onde se destacam a Indústria Alimentar, de Cosmética e de Perfumes (Samarth *et al.*, 2017).

O termo “planta medicinal” remete para plantas que, com base no saber popular e/ou na literatura, podem ser utilizadas, direta ou indiretamente, para fins medicinais, dado que apresentam princípios ativos que podem influenciar os processos fisiológicos e/ou metabólicos dos seres vivos, incluindo o Homem e, consequentemente prevenir ou diminuir os efeitos negativos associados a uma determinada patologia (Verheye, 2010).

3.1.1. Processos metabólicos nas plantas

As plantas, face ao *stress* biótico e abiótico a que estão sujeitas, desenvolveram múltiplos mecanismos de resistência (Jamwal *et al.*, 2018). O *stress* biótico e/ou abiótico redireciona o metabolismo primário das plantas, o que resulta no aumento da atividade enzimática (fenilalanina amónia liase (PAL, EC 4.1.3.5), chalcona sintase (CHS, EC 2.3.1.74), polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1), peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), etc.) e consequente síntese de metabolitos secundários, designadamente, compostos terpénicos, fenólicos e nitrogenados (**Figura 1**) (Borges *et al.*, 2017).

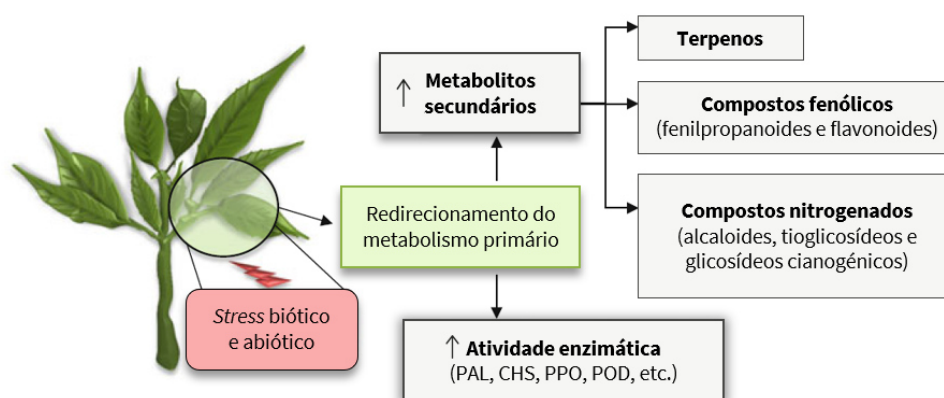


Figura 1. Resposta da planta, em condições de *stress* biótico e/ou abiótico (Adaptado de Borges *et al.*, 2017).

PAL – Fenilalanina amônia liase; CHS – Chalcona sintase; PPO – Polifenoloxidasas; POD – Peroxidasas.

Os metabolitos secundários das plantas são compostos extremamente importantes para a aclimação e defesa das mesmas. Vários estudos mostram que a ação terapêutica das plantas é conferida pelos metabolitos secundários, sendo estes uma importante fonte de fármacos e compostos ativos (Jamwal *et al.*, 2018).

Conforme a via biossintética (**Figura 1**), os metabolitos secundários são classificados em três grupos principais, nomeadamente, os terpenos, compostos fenólicos (fenilpropanoides e flavonoides) e compostos nitrogenados (alcaloides, tioglicosídeos e glicosídeos cianogénicos) (Borges *et al.*, 2017).

Os terpenos constituem o grupo mais abrangente de metabolitos secundários, nas plantas aromáticas, sendo o acetil-coenzima A (acetil-CoA) o precursor destes compostos (**Figura 2**). Os terpenos são classificados consoante o número de unidades de isopreno (C5), sendo os mais frequentes, nos OEs, os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15). Estes, são frequentemente tóxicos para os insetos e medeiam a resposta da planta, em condições de *stress*. No que respeita ao crescimento da planta, alguns sesquiterpenos (C15), como o ácido abscísico (ABA), diterpenos (C20), como as giberelinas, triterpenos (C30), como o lanosterol, precursor dos derivados esteroides, e tetraterpenos (C40), como os carotenoides, desempenham um papel de extrema importância (Bhattacharya, 2019).

Os compostos fenólicos, um grupo também relevante de metabolitos secundários das PAMs, são produzidos pelas vias do ácido malônico e ácido xiquímico (**Figura 2**), sendo esta última mais comum em plantas, fungos e bactérias. A via do ácido xiquímico recorre a precursores derivados da via das pentoses-fosfato e glicólise, de forma a produzir diversos aminoácidos aromáticos, envolvendo a fenilalanina como intermediário. Os compostos fenólicos abrangem uma grande variedade de compostos, nomeadamente, taninos, cumarinas, flavonoides e ligninas, entre outros. Muitos compostos fenólicos, como os flavonoides, apresentam atividade antioxidante, a qual é conferida pelas suas propriedades redox, além de que desempenham diferentes funções importantes nas plantas, no âmbito do crescimento, reprodução e tolerância, face ao *stress* biótico e abiótico (Bhattacharya, 2019).

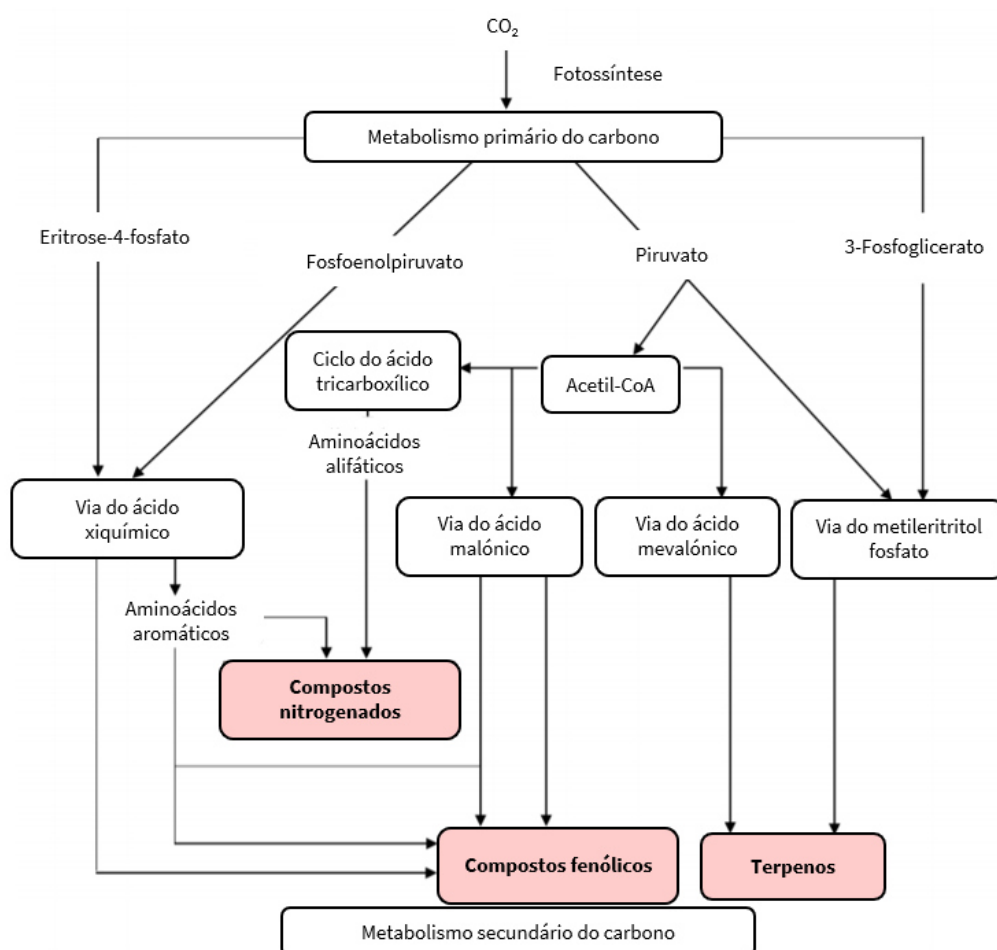


Figura 2. Vias metabólicas envolvidas na síntese de metabolitos secundários (Adaptado de Ncube & Staden, 2015).

Os compostos nitrogenados englobam os alcaloides, tioglicosídeos e glicosídeos cianogénicos. Os alcaloides apresentam baixo peso molecular e abrangem mais de 12.000 compostos (Bhattacharya, 2019). A via metabólica do ácido xiquímico e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (**Figura 2**) dão origem à biossíntese de aminoácidos aromáticos e alifáticos, respectivamente, os quais são responsáveis pela formação dos alcaloides (Azmir *et al.*, 2013).

3.1.2. Atividades biológicas das PAMs

As PAMs apresentam atividades antioxidante e antimicrobiana, as quais têm sido amplamente exploradas, reconhecendo-se a sua aplicação na área da saúde, no que diz respeito à prevenção e redução do risco de doenças cardiovasculares e cancerígenas. O potencial terapêutico apresentado por várias famílias destas plantas, designadamente, Lamiaceae, Apiaceae e Zinziberaceae, deve-se às suas propriedades antioxidantes. As condições edáfico-climáticas, os métodos de extração, a composição em metabolitos secundários das espécies vegetais e os métodos envolvidos na determinação da capacidade antioxidante, são exemplos de fatores que influenciam a atividade antioxidante das plantas aromáticas (Samarth *et al.*, 2017).

A produção de medicamentos à base de plantas engloba uma variedade de métodos, desde tecnologias tradicionais simples, até técnicas avançadas de extração, sendo que preparações à base de plantas são um dos exemplos de substâncias ativas. As preparações à base de plantas, consistem, por sua vez, em misturas relativamente complexas de metabolitos, sendo que estas podem ser obtidas na forma de decocção, infusão, extrato fluido, tintura, extrato firme (semi-sólido) ou extrato em pó. O extrato obtido pode ser utilizado, tanto para ser incorporado, após processamento, em diversas formas farmacêuticas, por exemplo, comprimidos e cápsulas, como para ser usado como agente terapêutico, na forma de tinturas e extratos fluidos, além de que pode ainda ser fracionado, de forma a isolar entidades químicas. A qualidade do extrato é influenciada por diferentes parâmetros, nomeadamente, o método de extração, a parte da planta utilizada e a substância usada como solvente de extração (Handa *et al.*, 2008).

3.1.2.1. Stress oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante

A incidência e progressão de várias patologias, em particular doenças neurodegenerativas, diabetes, aterosclerose, cancro e doenças cardiovasculares, estão intimamente relacionadas com a exposição dos organismos a radicais livres ou espécies reativas, através do *stress oxidativo* (Ighodaro & Akinloye, 2018).

O desequilíbrio fisiológico entre os níveis de antioxidantes e oxidantes (radicais livres ou espécies reativas), a favor destes últimos, resulta no *stress oxidativo*. Isto acontece, devido ao facto de os mecanismos de defesa antioxidante não terem capacidade de neutralizar os radicais livres, quando a sua produção se torna excessiva, dando assim origem a um ambiente oxidativo, ao nível celular, o qual desencadeia a oxidação de biomoléculas essenciais (por exemplo, ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lípidos) e, consequentemente, a incidência de várias doenças. Tem sido sugerido que o aumento da capacidade do organismo, para reduzir o risco de problemas de saúde relacionados com o *stress oxidativo*, pode ser promovido pela exposição reduzida a radicais livres e adoção de uma dieta rica em antioxidantes (Ighodaro & Akinloye, 2018).

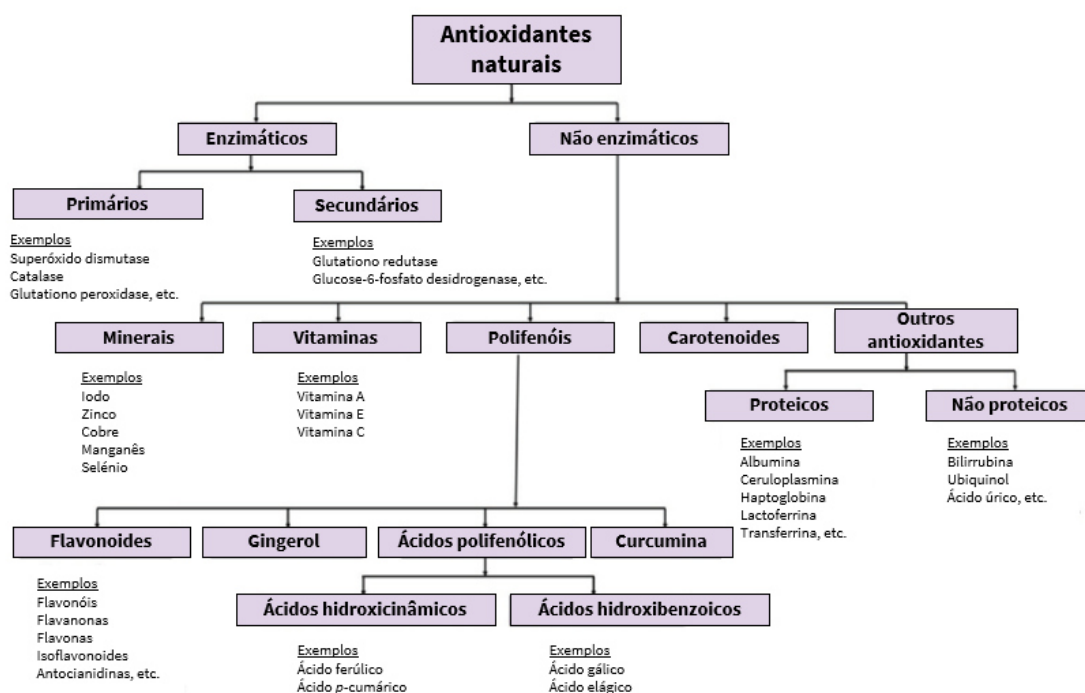


Figura 3. Classificação dos antioxidantes naturais (Adaptado de Shalaby & Azzam, 2018).

Os antioxidantes podem ser classificados como sintéticos ou naturais, sendo que estes últimos, são divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos (**Figura 3**) (Shalaby & Azzam, 2018).

Entre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a glutatono peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) (Shalaby & Azzam, 2018). A primeira linha de defesa antioxidante, estabelecida pelas atividades da SOD, CAT e GPx, desempenha um papel crucial, ao nível dos mecanismos e estratégias de defesa, nos sistemas biológicos (**Figura 4**) (Ighodaro & Akinloye, 2018).

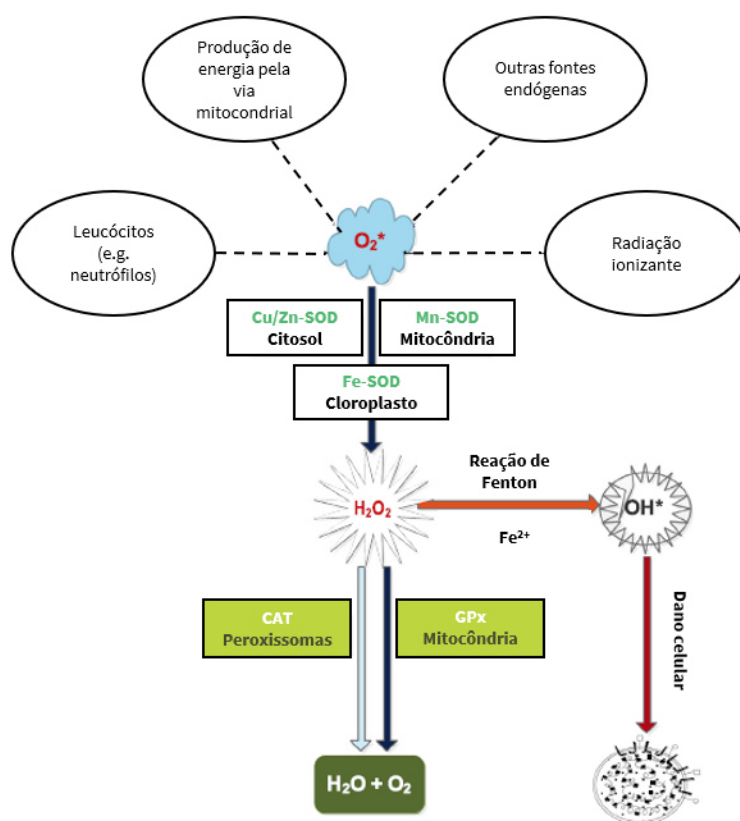


Figura 4. Primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigénio (ROS) (Adaptado de Ighodaro & Akinloye, 2018).

$\text{O}_2^{\bullet-}$ – Radical superóxido; Cu/Zn-SOD – Cobre-zinco superóxido dismutases; Mn-SOD – Manganês superóxido dismutases; Fe-SOD – Ferro superóxido dismutases; H_2O_2 – Peróxido de hidrogénio; Fe^{2+} – Catião ferro (II); $\text{OH}^{\bullet}$ – Radical hidroxilo; CAT – Catalases; GPx – Glutatio peroxidases; H_2O – Água; O_2 – Oxigénio molecular.

A SOD converte, cataliticamente, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou o radical oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) gerado nos tecidos, através do metabolismo ou reações nas células, em

peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular. Quando ocorre a acumulação de peróxido de hidrogénio, este apresenta toxicidade para as células e tecidos. Na presença de Fe^{2+} , o peróxido de hidrogénio é convertido no radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$), através da reação de Fenton, sendo que a CAT (abundante nos peroxissomas), de forma a reduzir os danos celulares causados pelos radicais livres, decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular. A nível mitocondrial, a CAT não está presente e, como tal, a GPx é responsável pela redução do peróxido de hidrogénio em água e dos peróxidos lipídicos nos seus respetivos álcoois (Ighodaro & Akinloye, 2018).

No caso dos antioxidantes não enzimáticos, destacam-se os minerais, vitaminas, polifenóis, carotenoides, entre outros. As frutas e os legumes, bem como as plantas aromáticas e condimentares, constituem importantes fontes de antioxidantes naturais, os quais são considerados como agentes promotores da saúde (Shalaby & Azzam, 2018). As plantas produzem uma ampla gama de compostos que apresentam atividade antioxidante (nomeadamente os polifenóis), podendo estes atuar de forma independente, ou sinergicamente (Henry, 2012).

3.1.2.2. Propriedades neuroprotetoras

Nas doenças neurodegenerativas, o comprometimento da função motora ou cognitiva resulta do dano progressivo nas células neuronais e perda de atividade neuronal. A doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), doença de Huntington (DH), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e ataxia espinocerebelosa (AEC) são alguns dos exemplos das doenças neurodegenerativas mais comuns (Liu *et al.*, 2017).

As defesas antioxidantes, à medida que envelhecemos, são atenuadas, o que resulta no aumento do dano oxidativo, que é considerado um fator potencial de doenças relacionadas com a idade, como a DA (Albarracin *et al.*, 2012). A DA é a forma mais comum de demência (Hroudová *et al.*, 2016) e caracteriza-se pela perda dos neurónios colinérgicos, a qual desencadeia a redução progressiva dos níveis de acetilcolina no cérebro e o comprometimento cognitivo (Nordberg *et al.*, 2013).

A acetilcolina (ACh) apresenta uma ampla ação, como transmissor, no sistema

nervoso central (SNC) e na junção neuromuscular (JNM), sendo que também atua como neurotransmissor, ao nível dos gânglios periféricos, e medeia as ações parassimpáticas do sistema nervoso autónomo (SNA) (Brady *et al.*, 2012).

A colina acetiltransferase (ChAT, EC 2.3.1.6) é a enzima responsável pela síntese da ACh, a qual ocorre nos terminais nervosos, a partir do acetil-CoA (que é sintetizado a partir da glucose) e colina (**Figura 5**). A colina, presente no plasma em concentrações elevadas (cerca de 10 mM), é absorvida, através de um transportador de elevada afinidade (Na^+ /colina), pelos neurónios colinérgicos. Após a síntese, o transportador vesicular de ACh (VACHT) armazena aproximadamente 10.000 moléculas em cada vesícula (Purves *et al.*, 2004).

A ação pós-sináptica da ACh, ao nível das sinapses colinérgicas (em particular, na JNM), é interrompida pela acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7). A AChE encontra-se concentrada na fenda sináptica, provocando uma rápida diminuição da concentração de ACh, após a sua libertação do terminal pré-sináptico. A AChE, é responsável pela hidrólise da ACh em acetato e colina. A colina produzida é, por sua vez, transportada de volta aos terminais nervosos, de forma a ser usada para ressintetizar a ACh (Purves *et al.*, 2004).

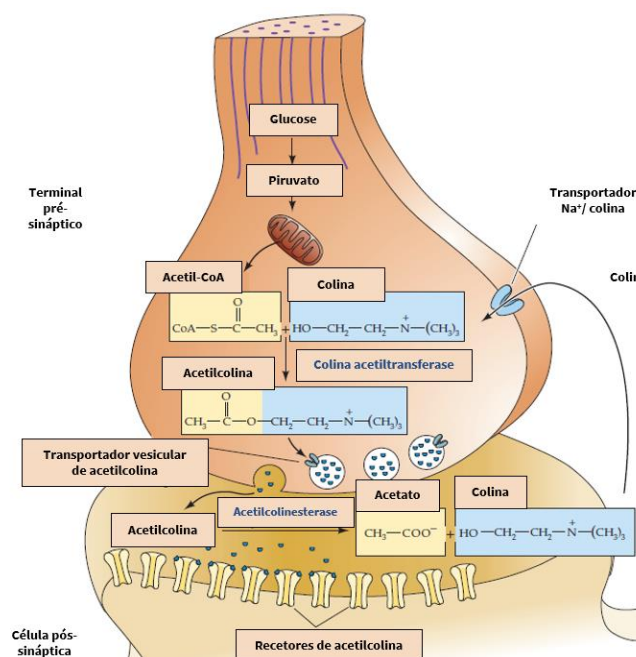


Figura 5. Metabolismo da ACh nos terminais nervosos colinérgicos (Adaptado de Purves *et al.*, 2004).

As opções terapêuticas atuais para a DA, apesar de décadas de pesquisa e importantes avanços na compreensão da sua etiologia e patogênese, são ainda muito limitadas, apostando essencialmente em alvos terapêuticos associados (Vladimir-Knežević *et al.*, 2014). Um dos alvos terapêuticos da DA envolve a inibição das AChE e butirilcolinesterases (BChE, EC 3.1.1.8) (Unzeta *et al.*, 2016).

A BChE encontra-se, maioritariamente, no fígado, soro, pâncreas e SNC, sendo responsável pela hidrólise de ésteres de colina. Tal como a AChE, a BChE está envolvida na hidrólise da ACh (Mushtaq *et al.*, 2014).

A importância da BChE no cérebro humano, devido à sua baixa expressão no cérebro saudável, em comparação com a AChE, foi subestimada inicialmente. No entanto, estudos posteriores não só confirmaram a importância da BChE no sistema nervoso, como evidenciaram o seu papel na co-regulação dos níveis de ACh no cérebro, em doentes com DA. À medida que a DA progride, os níveis de BChE aumentam, enquanto que os níveis de AChE diminuem até cerca de 85% em determinadas regiões do cérebro (Mushtaq *et al.*, 2014).

Os medicamentos existentes no mercado são apenas efetivos no estágio ligeiro a moderado da DA, apresentando efeitos colaterais consideráveis e, como tal, é fundamental a procura de novas fontes de agentes anticolinesterásicos com maior especificidade e eficácia e, consequentemente, menos efeitos colaterais (Vladimir-Knežević *et al.*, 2014).

A dieta mediterrânica promove a utilização de muitas plantas aromáticas na confeção dos alimentos, as quais são ricas em substâncias antioxidantes, podendo ser um importante fator na promoção do envelhecimento ativo (Albarracin *et al.*, 2012). Os polifenóis, presentes em muitos extratos de PAMs, possuem importantes propriedades antioxidantes pela sua capacidade para captação de radicais livres ou para decompor os peróxidos, com potencial na prevenção de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancerígenas (Pacífico *et al.*, 2015). Alguns extratos de espécies da família Lamiaceae, com elevado conteúdo em compostos fenólicos e terpénicos, apresentaram capacidades multifuncionais, podendo atingir diferentes alvos terapêuticos, com possibilidade para inibir a atividade de colinesterases e combater o

stress oxidativo e, consequentemente, com potencial aplicação na prevenção e na terapia de patologias neurodegenerativas (Vladimir-Knežević *et al.*, 2014). Um estudo com OEs e extratos de algumas plantas condimentares do Alentejo, mostrou que estes apresentaram elevada capacidade inibitória da atividade de AChE e BChE (Arantes *et al.*, 2017).

3.1.2.3. Propriedades toxicológicas

É cada vez mais notório o interesse pela fitoterapia, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento, no entanto, grande parte da informação acerca das plantas medicinais, é disponibilizada sem qualquer base científica que a suporte, quer ao nível de eficácia, quer ao nível de toxicidade e efeitos secundários. Face a esta situação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a validação científica do uso das plantas medicinais, com vista à menor incidência de efeitos secundários e toxicidade (Ohikhena *et al.*, 2016).

O bioensaio de letalidade em *Artemia salina* determina a concentração de compostos ativos e extratos capaz de causar a mortalidade a 50% (CL₅₀) destes microcrustáceos, em meio salino. Este ensaio é simples, rápido e de baixo custo, permitindo que um grande número de amostras seja testado e processado adequadamente. É um procedimento muito utilizado na pesquisa de compostos bioativos em extratos de plantas medicinais, bem como para avaliar a toxicidade (Parra *et al.*, 2001).

3.2. Plantas aromáticas e condimentares em estudo

Neste projeto, selecionaram-se quatro espécies aromáticas e condimentares da família Lamiaceae, sendo elas a *Calamintha nepeta*, *Mentha cervina*, *Mentha pulegium* e *Mentha spicata*, cuja classificação taxonómica está apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação taxonómica das espécies aromáticas e condimentares em estudo.

Reino	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Divisão	Spermatophyta	Spermatophyta	Spermatophyta	Spermatophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales	Lamiales	Lamiales	Lamiales
Família	Lamiaceae	Lamiaceae	Lamiaceae	Lamiaceae
Género	<i>Calamintha</i>	<i>Mentha</i>	<i>Mentha</i>	<i>Mentha</i>
Espécie	<i>Calamintha nepeta</i>	<i>Mentha cervina</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Mentha pulegium</i>

3.2.1. *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta*

Calamintha nepeta (L.) Savi subsp. *nepeta* (**Figura 6**), vulgarmente conhecida como erva-das-azeitonas ou nêveda, é autóctone de Portugal Continental, assim como dos arquipélagos dos Açores e da Madeira. Ocorre naturalmente em locais secos, taludes e orlas de sobreirais, sebes, pinhais, soutos, azinhais, olivais e carrascais, como também em sítios mais ou menos nitrificados e prados sombrios (Flora-On, 2012).



Figura 6. *Calamintha nepeta* (L.) Savi subs. *nepeta*.
(Herdade da Mitra, Évora)

É valorizada como planta tradicional, pelas suas propriedades expetorantes, digestivas, diaforéticas e antipiréticas (Pacífico *et al.*, 2015).

A literatura refere que os OEs de *C. nepeta* têm sido amplamente estudados, em virtude da grande variabilidade da sua composição química, assim como da sua capacidade fungicida e antimicrobiana (Marongiu *et al.*, 2010; Araniti *et al.*, 2013). Um estudo efetuado por Arantes *et al.* (2017), mostrou que os óleos e extratos de águas de decocção de *C. nepeta* apresentaram elevado potencial antioxidante e capacidade inibitória da atividade de colinesterases.

3.2.2. *Mentha cervina* L.

Mentha cervina L. (**Figura 7**), comumente designada por hortelã-da-ribeira, é uma espécie autóctone de Portugal Continental, podendo ocorrer naturalmente no Alentejo em regiões húmidas, como charcos e leitos de cursos de água, ou em lugares arenosos ou pedregosos (Flora-On, 2012).



Figura 7. *Mentha cervina* L.
(Montoito, Évora)

Muito utilizada na confeção de pratos regionais, apresenta também propriedades fitoterapêuticas, no que diz respeito à prevenção de distúrbios gástricos e inflamações do sistema respiratório (Rodrigues *et al.*, 2013).

A literatura refere que os extratos hidrometanólicos de *M. cervina* apresentaram elevado teor em compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante e citotóxica, em linhagens tumorais (Miguel *et al.*, 2016). Estudos anteriores relataram que o OE desta espécie apresenta atividade antifúngica contra leveduras, linhagens de dermatófitos e *Aspergillus* (Gonçalves *et al.*, 2007; Stringaro *et al.*, 2018).

3.2.3. *Mentha pulegium* L.

Mentha pulegium L. (**Figura 8**), tradicionalmente conhecida como poejo, é uma espécie que ocorre naturalmente em barrancos, prados e pastagens húmidas, charcos, margens e leitos secos de linhas de água, lagoas e outros locais temporariamente encharcados ou inundados, por vezes nitrificados, tendo esta preferência por solos ácidos, com humidade estacional, permanente ou edáfica (Flora-On, 2012).



Figura 8. *Mentha pulegium* L. (Adaptado de Flora-On, 2012).

É uma espécie autóctone de Portugal Continental, bem como dos arquipélagos dos Açores e da Madeira (Flora-On, 2012), sendo muito utilizada na gastronomia, em particular na região do Alentejo. As partes aéreas e os óleos essenciais desta planta, têm também aplicações na medicina tradicional, designadamente no tratamento de patologias digestivas, como flatulência, dispepsia e cólica intestinal (Brahmi *et al.*, 2016).

Um estudo efetuado por Mata *et al.* (2007), mostrou que os extratos de águas de decocção de *M. pulegium* apresentaram elevado potencial antioxidante pelo método do radical DPPH, revelando, deste modo, capacidade como sequestradores de radicais livres. Mahboubi & Haghi (2008) procederam à avaliação da atividade antimicrobiana do OE de *M. pulegium*, contra diferentes microrganismos, no sentido de validar as suas propriedades antissépticas.

3.2.4. *Mentha spicata* L.

Mentha spicata L. (**Figura 9**) é uma espécie de origem híbrida (*M. longifolia* x *M. rotundifolia*), naturalizada na região Mediterrânica, vulgarmente designada por hortelã, hortelã-comum, ou hortelã-vulgar, que cresce espontaneamente em ambientes onde está presente a ação humana, como sejam cascalheiras, aterros e bermas de caminhos, bem como em terrenos cultivados (Flora Digital de Portugal, 2004).



Figura 9. *Mentha spicata* L.
(Montoito, Évora)

Esta espécie, frequentemente utilizada na cozinha regional mediterrânica, tem sido tradicionalmente usada como planta medicinal, com aplicação nos distúrbios gastrointestinais e doenças respiratórias, sendo-lhe também atribuídas propriedades como agente carminativo, antiespasmódico, diurético e sedativo (Mahboubi, 2017).

A literatura refere que os extratos metanólicos de *M. spicata* apresentaram elevado teor em compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante (Scherer *et al.*, 2013). O estudo efetuado por Martins *et al.* (2012), mostrou que o OE desta espécie apresentou capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, revelando, deste modo, potencial de captação de radicais livres e proteção de oxidação dos substratos lipídicos. Um estudo efetuado por Arantes *et al.* (2017), mostrou que os extratos de águas de decocção de *M. spicata* apresentaram elevado potencial antioxidante pelos métodos do radical DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor total, com valores de IC₅₀ de 163, 47 e 122 μ g/mL, respetivamente.

4. Materiais e métodos

4.1. Seleção e preparação das plantas

Numa primeira etapa, após seleção das espécies condimentares para este estudo, procedeu-se à colheita da parte aérea das plantas de crescimento espontâneo da espécie de *C. nepeta* na Herdade da Mitra, em Évora (38°31'39.4"N ; 8°00'59.1"W), durante a primavera de 2018 enquanto que as plantas das espécies *M. cervina*, *M. pulegium* e *M. spicata*, foram previamente colhidas na região de Montoito (38°30'18.7"N ; 7°34'23.3"W), durante os meses de setembro de 2018, maio de 2016 e abril de 2017, respetivamente. As plantas de *C. nepeta*, *M. pulegium* e *M. spicata* encontravam-se na fase não floral do crescimento, na data da colheita, enquanto que as de *M. cervina* encontravam-se na fase floral, tendo sido selecionado para o estudo a parte aérea: folha e espiga. A identificação das plantas foi efetuada pela Prof.^a Marízia Pereira, docente do Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento da Universidade de Évora, e um exemplar de cada uma das espécies foi depositado no Herbário da Universidade de Évora. Após a colheita, procedeu-se à seleção manual do material vegetal, de forma a eliminar as folhas danificadas e os caules mais grossos. Posteriormente, o material vegetal foi triturado e dividido em frações de massa conhecida, sendo armazenado a -20°C, até à data da utilização.

4.2. Preparação de extratos de hidrodestilação das plantas (EHD)

Para a preparação dos extratos de hidrodestilação (EHD), procedeu-se à recolha das águas de decocção obtidas após hidrodestilação. Para o efeito, colocaram-se cerca de 100 g de material vegetal num balão de fundo redondo de 1000 mL e adicionaram-se cerca de 500 mL de água destilada, para extração dos óleos essenciais por hidrodestilação, num aparelho tipo *Clevenger*, durante 3 horas, de acordo com a metodologia proposta pela Farmacopeia Portuguesa (INFARMED, 2008). Posteriormente, foram recolhidas as águas de decocção resultantes e prepararam-se os

extratos finais através de um procedimento otimizado pelo grupo de trabalho e descrito na Patente Nacional nº 110047 (Universidade de Évora, 2018).

4.3. Preparação de extratos aquosos de planta fresca (EPF)

Os extratos de planta fresca (EPF) foram preparados diretamente a partir do material vegetal em solução aquosa, tendo sido acautelados todos os procedimentos para preservar os constituintes das plantas.

4.4. Caracterização química dos extratos

4.4.1. Pesquisa fitoquímica

De modo a proceder à caracterização da composição química dos extratos, procedeu-se à avaliação do seu perfil fitoquímico. Para o efeito preparam-se soluções aquosas de cada um dos extratos, na concentração de 1 mg/mL e procedeu-se à avaliação qualitativa dos principais constituintes, seguindo os procedimentos descritos na literatura (Matos, 1988; Anyasor *et al.*, 2010; Aziz, 2015). Os resultados foram expressos de acordo com os seguintes critérios: ausência (-), vestígios (+), presença (++) e presença intensa (+++) de compostos bioativos.

Para pesquisa de taninos e fenóis, prepararam-se alíquotas (1 mL) de cada uma das soluções dos extratos, às quais se adicionaram 3 gotas de solução alcoólica de cloreto de ferro (III) 1%. Preparou-se também um ensaio em branco, no qual o volume da solução de extrato foi substituído por água destilada, para estabelecer uma comparação com as amostras. Considerou-se que o aparecimento de uma intensa coloração verde-azulada indica a presença de fenóis, que a formação de um precipitado azul-escuro indica a presença de taninos hidrolisáveis e que o aparecimento de um precipitado verde-escuro indica a presença de taninos condensados (Matos, 1988).

Para avaliação da presença de flavonoides, antocianinas e antocianidinas, selecionaram-se três alíquotas (1 mL) de cada extrato, sendo que o pH das mesmas foi ajustado a 3, 8,5 e 11, respectivamente. Na solução com pH ajustado a 3, o aparecimento de uma coloração vermelha indica a presença de antocianinas. Na solução com pH ajustado a 8,5, o aparecimento de uma coloração lilás indica a presença de antocianinas. Na solução com pH ajustado a 11, o aparecimento de uma coloração azul-púrpura indica a presença de antocianinas; a coloração amarela indica a presença de flavonas, flavonóis e/ou xantonas e o aparecimento de uma coloração vermelha-alaranjada indica a presença de flavanonóis (Matos, 1988).

Para pesquisa de xantonas, foi preparada uma alíquota (1 mL) de cada extrato, à qual se adicionou um pedaço de fita de magnésio e, posteriormente, algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de uma coloração vermelha, após ter terminado a efervescência, confirma a presença de xantonas (Matos, 1988).

Para avaliação da presença de catequinas, um palito de fósforo foi humedecido na alíquota (1 mL) de cada extrato e, posteriormente, em ácido clorídrico concentrado, sendo aquecido durante 2–3 min, na chama de uma lamparina de álcool. O aparecimento de uma coloração vermelha ou pardo-avermelhada confirma a presença de catequinas (Matos, 1988).

Para pesquisa de flavonoides, foi preparada uma alíquota (1 mL) de cada extrato, à qual se adicionou 1 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Após agitação, o aparecimento de uma coloração amarela indica a presença de flavonoides (Anyasor *et al.*, 2010).

Para avaliação da presença de esteroides e triterpenos, foram preparadas 10 mg de cada extrato, às quais se adicionou 1 mL de clorofórmio. Após filtração, procedeu-se à adição de 1 mL de anidrido acético e, posteriormente, 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de uma coloração azul evanescente, seguida de verde, após agitação, indica a presença de esteroides livres, enquanto que, o aparecimento de uma coloração entre o pardo e o vermelho indica a presença de triterpenos pentacíclicos (Matos, 1988).

Para pesquisa de cumarinas, foram aplicadas, num pedaço de papel de filtro, duas gotas de cada extrato, sendo que se adicionou a uma delas, uma gota de solução alcoólica de hidróxido de potássio 1M. A presença de cumarinas, aquando da exposição à luz ultravioleta (UV), é indicada por uma fluorescência azul, após a adição de solução alcoólica de hidróxido de potássio 1M (Matos, 1988).

Para avaliação da presença de saponinas, foi preparada uma alíquota (5 mL) de cada extrato e procedeu-se à sua agitação, durante 15 segundos. A formação de espuma abundante e persistente indica a presença de saponinas (Anyasor *et al.*, 2010).

Para pesquisa de alcaloides, foram preparadas 200 mg de cada extrato, às quais se adicionaram 2 mL de ácido clorídrico 1%. Após agitação e filtração, foram adicionadas 3 gotas de água destilada ao filtrado obtido. A solução foi alíquotada em 3 vidros de relógio, aos quais foram adicionadas 3 gotas de solução saturada de ácido pícrico, reagente de Mayer e reagente de Dragendorff, respetivamente. A formação de precipitado, pelo menos por dois dos métodos testados, indica a presença de alcaloides (Anyasor *et al.*, 2010).

Para avaliação da presença de glúcidos, foi preparada uma alíquota (1 mL) de cada extrato, à qual se adicionaram 3 gotas de reagente de Molisch. Após agitação, procedeu-se à adição de 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A formação de um anel púrpura, na interface, indica a presença de glúcidos (Aziz, 2015).

4.4.2. Avaliação do conteúdo em fenóis totais

O conteúdo em fenóis totais foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu, modificado por Singleton *et al.* (1999). Os polifenóis presentes nos extratos, reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, formando um cromóforo azul constituído por um complexo de fosfomolibdénio/fosfotungsténio, em solução alcalina, que pode ser quantificado por espetrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis). A formação de cromóforo é diretamente proporcional à concentração de compostos fenólicos (Blainski *et al.*, 2013).

Foram avaliadas soluções aquosas de EHD (1–5 mg/mL), EPF (2,5–5 mg/mL) e soluções padrão etanólicas de ácido gálico (10–500 µg/mL). O ensaio foi efetuado em microplaca, em sextuplicado, de acordo com o método descrito por Singleton *et al.* (1999). Foram preparados dois brancos, um para o extrato e outro para o padrão, nos quais o volume de amostra/solução padrão foi substituído por água destilada e etanol, respetivamente. Após incubação da microplaca, procedeu-se à leitura dos valores de absorvância a 630 nm num leitor Thermo Scientific™ Multiskan™ GO. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes em ácido gálico (EAG) por mg de extrato.

4.4.3. Avaliação do conteúdo em flavonoides totais

O conteúdo em flavonoides totais foi quantificado com o cloreto de alumínio, através do método espectrométrico de absorção molecular UV-Vis descrito por Deng *et al.* (2012). Este método baseia-se na formação de um complexo entre o catião alumínio e os grupos carbonilo e hidroxilo dos flavonoides, com uma relação proporcional entre a intensidade de coloração obtida e a concentração de compostos presentes (Popova *et al.*, 2004).

Para o efeito, foram avaliadas soluções aquosas de EHD (1–5 mg/mL), EPF (5–20 mg/mL) e soluções padrão etanólicas de quercetina (6,25–800 µg/mL). O ensaio foi efetuado em microplaca, em sextuplicado. Após incubação da microplaca, à temperatura ambiente, durante 10 min, foram efetuadas as leituras da absorvância a 490 nm, num leitor Thermo Scientific™ Multiskan™ GO. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes em quercetina (EQ) por mg de extrato.

4.4.4. Avaliação do conteúdo em taninos totais

Procedeu-se à quantificação do conteúdo em taninos totais pelo método de Folin-Denis, descrito por Joslyn (1950) e modificado por Soni *et al.* (2015). Neste procedimento, os taninos reduzem os ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, em meio alcalino, o que resulta na formação de uma intensa coloração azul. A intensidade da coloração desenvolvida, é proporcional ao teor de taninos presente nos extratos (Soni *et al.*, 2015).

Para o efeito, foram avaliadas soluções aquosas de EHD (1,25–5 mg/mL), EPF (1,25–5 mg/mL) e soluções padrão etanólicas de ácido tânico (62,5–2000 µg/mL). O ensaio foi efetuado em microplaca, em sextuplicado, de acordo com Soni *et al.* (2015). Foram preparados dois brancos, um para o extrato e outro para o padrão, nos quais o volume de amostra/solução padrão foi substituído por água destilada e etanol, respetivamente. Após incubação à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura dos valores de absorvância a 760 nm, num leitor Thermo Scientific™ Multiskan™ GO. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes em ácido tânico (EAT) por mg de extrato.

4.5. Screening de toxicidade dos extratos

O *screening* de toxicidade dos extratos foi efetuado por avaliação da letalidade em *Artemia salina* (ArtoxKit M™).

Após inclusão dos ovos de *Artemia salina*, a 25°C, as larvas foram transferidas para uma nova solução salina (água do mar sintética) e incubadas a 25°C, durante 24 h. Foram avaliadas soluções de EHD (0,039–30 mg/mL) e EPF (0,039–10 mg/mL) em solução salina e, como controlo positivo, foi utilizado o dicromato de potássio (1,25–100 µg/mL). O ensaio foi efetuado em placas de 24 poços, em nonuplicado (n=9), sendo que, em cada poço da placa, foram adicionados 100 µL de cada uma das concentrações de amostra/solução padrão a 900 µL de água do mar sintética. Posteriormente, foram transferidas, para cada poço, cerca de 10 larvas. A placa foi incubada a 25°C, durante

24 h.

Após incubação, efetuou-se a contagem das larvas mortas, com recurso a uma lupa (Olympus SZX9), e a curva dose-resposta foi expressa em percentagem de mortalidade em função da concentração de extrato/padrão. Determinou-se o valor de CL₅₀ (concentração letal para 50% de uma população de teste), recorrendo ao *software* OriginPro 2017.

4.6. Screening in vitro das propriedades antioxidantes dos extratos

4.6.1. Método do radical DPPH

O potencial dos extratos, para captação de radicais livres, foi avaliado pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Tepe *et al.*, 2007). O DPPH é um radical livre estável, que apresenta uma forte absorção por volta dos 517 nm, sendo dotado de uma intensa coloração púrpura. Os compostos antioxidantes, cedem eletrões ou átomos de hidrogénio ao radical DPPH, convertendo-o num composto mais estável. A mudança de cor da solução, de púrpura para amarelo, resultante da redução do radical DPPH, permite a determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante (Akar *et al.*, 2017).

Foram avaliadas soluções aquosas de EHD (3,9–521,7 µg/mL) e EPF (3,9–521,7 µg/mL). Como padrões, foram utilizados a quercetina (0,8–13 µg/mL) e o ácido ascórbico (0,3– 65,2 µg/mL). O ensaio foi efetuado em sextuplicado, de acordo com Arantes *et al.* (2017). Foi preparado um branco para o extrato, assim como para cada um dos padrões, quercetina e ácido ascórbico, no qual o volume de amostra/solução padrão foi substituído por água destilada, etanol e água destilada, respetivamente. Após incubação à temperatura ambiente, na ausência de luz, procedeu-se à leitura dos valores de absorvância a 517 nm, em intervalos de 30 min (EHD: 30', 60' e 90'; EPF: 30', 60', 90', 120', 150' e 180'; Padrões: 30', 60' e 90'). A percentagem de inibição da atividade antioxidante (I%) foi determinada recorrendo à seguinte expressão:

$$I\% = \frac{\text{Absorvância (branco)} - \text{Absorvância (amostra)}}{\text{Absorvância (branco)}} \times 100$$

A concentração de extrato/padrão, capaz de inibir 50% da oxidação (IC₅₀), foi determinada por interpolação da curva dose-resposta obtida para cada extrato/padrão.

4.6.2. Sistema β -caroteno/ácido linoleico

O potencial dos extratos, para proteção de oxidação dos substratos lipídicos, foi avaliado a partir de uma adaptação do método do β -caroteno/ácido linoleico (Sarikurkcu *et al.*, 2009). O ácido linoleico, possui grupos metileno-dialílicos, sendo que a abstração de um átomo de hidrogénio a um destes grupos, leva à formação de um radical livre, que ataca as moléculas de β -caroteno, altamente insaturadas. Consequentemente, o β -caroteno é oxidado e, em parte, decomposto, perdendo o seu cromóforo, assim como a sua cor laranja característica, a qual pode ser monitorizada espectralmente (Goze *et al.*, 2009).

Para o efeito, foram avaliadas soluções aquosas de EHD (1,8–982,5 $\mu\text{g/mL}$) e EPF (1,8–1964,9 $\mu\text{g/mL}$). Como padrões, foram utilizados a quercetina (0,4–12,3 $\mu\text{g/mL}$) e o ácido ascórbico (61–3930 $\mu\text{g/mL}$). Previamente, foi preparada uma solução de β -caroteno/ácido linoleico, a partir da adição de 1 mg de β -caroteno, 1 mL de clorofórmio, 25 μL de ácido linoleico e 200 mg de *Tween* 40. Após evaporação do clorofórmio, em rotavapor, adicionou-se água saturada com oxigénio, com ajuste do valor de absorvância (490 nm) a 0,7 e a solução resultante foi conservada ao abrigo da luz.

O ensaio foi efetuado em microplaca, em sextuplicado, de acordo com Arantes *et al.* (2017). Efetuaram-se ensaios em branco para os extratos e para os padrões, nos quais o volume de amostra/solução padrão foi substituído por água destilada e etanol, respetivamente. Procedeu-se à leitura da absorvância a 490 nm (t₀), sendo a microplaca, posteriormente, incubada a 50°C durante 2 h, ao abrigo da luz. Após incubação, foi efetuada uma segunda leitura da absorvância a 490 nm (t₁). A percentagem de inibição da oxidação (I%) foi determinada recorrendo à seguinte expressão:

$$I\% = \frac{\Delta \text{ Absorvância (branco)} - \Delta \text{ Absorvância (amostra)}}{\Delta \text{ Absorvância (branco)}} \times 100,$$

onde os valores de Δ Absorvância correspondem à diferença entre a primeira (t₀) e a segunda (t₁) leitura dos valores de absorvância.

A concentração de extrato/padrão, capaz de inibir 50% da oxidação (IC₅₀), foi determinada por interpolação da curva dose-resposta obtida para cada extrato/padrão.

4.6.3. Método do poder redutor total

O potencial dos extratos, para atuarem como agentes redutores e evitarem a oxidação do Fe(II) a Fe(III), foi avaliado pelo método do poder redutor total. A presença de substâncias dotadas de capacidade redutora (isto é, antioxidantes), provoca a redução do complexo Fe³⁺/ferricianeto à forma ferrosa (Fe²⁺). A concentração de Fe²⁺, pode assim, ser monitorizada pela medição espectrofotométrica, a 700 nm, da intensidade do azul da Prússia formado. Dependendo do poder redutor de cada extrato, verifica-se uma alteração da cor da solução, de amarelo para verde-azulado (Ferreira *et al.*, 2007).

Para o efeito, foram avaliadas soluções aquosas de EHD (3,5–470,6 µg/mL) e EPF (3,5–470,6 µg/mL). Como padrões, foram utilizados a quercetina (0,4–11,8 µg/mL) e o ácido ascórbico (0,2–58,8 µg/mL). O ensaio foi efetuado em sextuplicado, de acordo com o método descrito por Arantes *et al.* (2017).

A concentração de extrato/padrão, capaz de inibir 50% da oxidação (IC₅₀), foi determinada por interpolação da curva dose-resposta obtida para cada extrato/padrão.

4.7. Avaliação dos mecanismos enzimáticos de atividade antioxidante

De forma a avaliar a capacidade antioxidante dos extratos para inibir sistemas enzimáticos, envolvidos nos processos de *stress* oxidativo, procedeu-se à avaliação da capacidade dos EHD e EPF, para inibir a atividade de catalases (CAT) e glutathione peroxidases (GPx) presentes na fração citosólica preparada a partir do fígado de ratinhos *Swiss*.

4.7.1. Avaliação do conteúdo proteico da fração citosólica

Após obtenção da fração citosólica dos hepatócitos, procedeu-se à quantificação da proteína total no citosol, pelo método do Biureto, modificado por Enechi & Emilia (2013). Este método baseia-se na interação entre o catião cobre (II), presente no reagente do Biureto, e as proteínas, em meio alcalino, o que resulta no aparecimento de uma coloração violeta (Bertholf, 2014).

Para o efeito, procedeu-se à preparação de uma série de padrões de albumina bovina (BSA) em solução alcalina de hidróxido de sódio 10% (1–10 mg/mL). A tubos contendo 1 mL de padrão/fração citosólica (previamente diluída de 1:5 e/ou 1:10), foram adicionados 4 mL de reagente do Biureto, sendo estes incubados à temperatura ambiente, durante 30 min. Após incubação, procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm. O ensaio foi efetuado em triplicado.

4.7.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de CAT

O estudo da capacidade inibitória da atividade de CAT pelos EHD (6,5–1111,1 µg/mL) e EPF (15,9–1222,2 µg/mL), foi efetuado de acordo com o método descrito por Lee *et al.* (2003), com algumas modificações. Cada uma das soluções de extrato em estudo foi previamente incubada com a fração citosólica ($\approx$ 20–40 mg/mL de proteína total), na proporção de 1:10, a 37°C, durante 30 min. Foi também preparado um ensaio em branco, com tampão fosfato 50 mM pH 7. Para quantificação da atividade de CAT, foi preparada uma mistura de reação, diluindo as amostras previamente incubadas em tampão fosfato 50 mM pH 7, para cada uma das concentrações testadas. Após incubação a 25°C, durante 2 min, a reação foi iniciada pela adição de 100 µL de peróxido de hidrogénio 33%. A leitura cinética dos valores de absorvância foi efetuada a 240 nm, durante 2 min.

Os valores de atividade de CAT foram determinados a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares ($\Delta A/\text{min}$) e utilizando o valor do coeficiente de absortividade molar ($\epsilon = 0,0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito na bibliografia (Bergmeyer, 1983). Os valores de atividade específica foram expressos em U/mg de proteína. Os valores de IC₅₀ dos extratos (concentração capaz de inibir 50% da atividade de CAT) foram determinados por interpolação gráfica da curva dose-resposta obtida a partir da % de inibição da atividade enzimática de CAT em função da concentração de extrato, recorrendo ao *software* OriginPro 2017.

4.7.3. Determinação da capacidade inibitória da atividade de GPx

A avaliação da capacidade dos EHD (3,8–750 µg/mL) e EPF (15,6–1000 µg/mL), para inibir a atividade de GPx, foi efetuada a partir do método descrito por Lee *et al.* (2003), com algumas modificações. Cada uma das soluções de extrato foi previamente incubada com a fração citosólica ($\approx$ 60–80 mg/mL de proteína total), na proporção de 1:10, a 37°C, durante 30 min. Foi também preparado um branco, com soro fisiológico. Para a quantificação da atividade de GPx, foi preparada uma mistura de reação constituída por tampão fosfato 50 mM pH 7,2, glutationo reduzido (GSH) 25 mM, azida de sódio 5 mM,

EDTA 3 mM, NADPH 1 mM, glutationato redutase (GR, EC 1.6.4.2) e 100 µL de extrato/padrão em cada uma das concentrações testadas. Após incubação a 37°C, durante 2 min, a reação foi iniciada pela adição de 100 µL de *tert*-butilhidroperóxido (tBOOH) 4 mM. A leitura cinética dos valores de absorvância foi efetuada a 340 nm, durante 2 min.

Os valores de atividade de GPx foram determinados a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares ($\Delta A/\text{min}$) e utilizando o valor do coeficiente de absortividade molar ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito na bibliografia (Bergmeyer, 1983). Os valores de atividade específica foram expressos em U/mg de proteína. Os valores de IC_{50} dos extratos (concentração capaz de inibir 50% da atividade de GPx) foram determinados por interpolação gráfica da curva dose-resposta obtida a partir da % de inibição da atividade enzimática de GPx em função da concentração de extrato, recorrendo ao *software* OriginPro 2017.

4.8. Avaliação do potencial neuroprotetor

4.8.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade de AChE

O potencial dos extratos, para inibir a atividade de acetilcolinesterases (AChE), foi avaliado a partir do método de Ellman modificado por Ingkaninan *et al.* (2003), utilizando AChE de *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich).

Foram preparadas soluções de EHD (11,7–4500 µg/mL) e EPF (11,7–9000 µg/mL) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Como padrão, foi utilizada a galantamina (0,005–2,775 µg/mL). O ensaio foi efetuado em microplaca de 96 poços, em sextuplicado, utilizando uma mistura reacional em tampão Tris-HCl 50mM pH 8 contendo ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 3 mM e AChE 0,3 U/mL, de acordo com Arantes *et al.* (2017). Após incubação das soluções na ausência de luz, à temperatura ambiente durante 30 min, iniciou-se a reação por adição de 25 µL de iodeto de acetilticolina (ATCI) 15 mM, monitorizando-se esta durante 20 min, a 405 nm.

Os valores de atividade de AChE foram determinados a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares ($\Delta A/\text{min}$) e utilizando o valor do coeficiente de absortividade molar ($\epsilon = 13300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito na bibliografia (Ellman *et al.*, 1961). Os valores de IC_{50} dos extratos (concentração capaz de inibir 50% da atividade de AChE) foram determinados por interpolação gráfica da curva dose-resposta obtida a partir da % de inibição da atividade enzimática de AChE em função da concentração de extrato, recorrendo ao *software* OriginPro 2017.

4.8.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de BChE

O potencial dos extratos, para inibir a atividade de butirilcolinesterases (BChE), foi avaliado a partir do método de Ellman modificado por Ingkaninan *et al.* (2003), utilizando BChE (0,3 U/mL) de soro equino (Sigma-Aldrich).

Foram avaliadas soluções de EHD (11,7–4500 µg/mL) e EPF (11,7–6000 µg/mL), previamente preparadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Como padrão, foi utilizada a galantamina (0,005–2,775 µg/mL). O ensaio foi efetuado em microplaca de 96 poços, em sextuplicado, utilizando uma mistura reacional em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 contendo DTNB 3 mM e BChE 0,3 U/mL, de acordo com Arantes *et al.* (2017). Após incubação das soluções na ausência de luz, à temperatura ambiente durante 30 min, iniciou-se a reação por adição de 25 µL de iodeto de butirilticolina (BTCl) 15 mM, monitorizando-se esta durante 20 min, a 405 nm.

Os valores de atividade de BChE foram determinados a partir do coeficiente angular das curvas de reação lineares ($\Delta A/\text{min}$) e utilizando o valor do coeficiente de absortividade molar ($\epsilon = 13300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrito na bibliografia (Ellman *et al.*, 1961). Os valores de IC_{50} dos extratos (concentração capaz de inibir 50% da atividade de BChE) foram determinados por interpolação gráfica da curva dose-resposta obtida a partir da % de inibição da atividade enzimática de BChE em função da concentração de extrato, recorrendo ao *software* OriginPro 2017.

5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização química dos extratos

Na **Tabela 2**, apresentam-se os rendimentos de extração dos extratos em estudo. Os valores foram expressos por grama de planta fresca.

Tabela 2. Rendimentos de extração dos extratos aquosos.

	Rendimento (%)	
	EHD	EPF
<i>C. nepeta</i>	2,8 ± 0,2	2,4 ± 0,1
<i>M. cervina</i>	1,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
<i>M. pulegium</i>	2,6 ± 0,4	1,8 ± 0,1
<i>M. spicata</i>	2,2 ± 1,3	1,4 ± 0,1

Os EHD apresentaram um rendimento de extração compreendido entre 1,5 e 2,8%. O EHD de *C. nepeta* foi o que apresentou um maior rendimento de extração (2,8%), seguido dos EHD de *M. pulegium* (2,6%), *M. spicata* (2,2%) e *M. cervina* (1,5%).

Os resultados da pesquisa fitoquímica dos extratos, para os compostos bioativos presentes, estão apresentados na **Tabela 3**. Os extratos não revelaram a presença de catequinas, esteroides, triterpenos, cumarinas e saponinas.

Os EHD apresentaram elevados conteúdos em compostos bioativos, designadamente em fenóis totais e flavonoides. O extrato de *C. nepeta* revelou elevada presença de fenóis, taninos condensados, flavonoides e alcaloides, bem como a presença de glúcidos. No EHD de *M. cervina*, observou-se a elevada presença de alcaloides e glúcidos, como também vestígios de fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas e flavonoides. O EHD de *M. pulegium* revelou a presença de fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas e flavonoides, assim como vestígios de alcaloides. O EHD de *M. spicata* evidenciou a presença de fenóis, taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, flavonoides e alcaloides e vestígios de glúcidos.

Tabela 3. Perfil fitoquímico dos extratos aquosos.

Compostos bioativos	EHD				EPF			
	<i>C. nepeta</i>	<i>M. cervina</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. spicata</i>	<i>C. nepeta</i>	<i>M. cervina</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. spicata</i>
Fenóis	+++	+	++	++	++	+	+	+
Taninos condensados	+++	-	-	++	-	-	-	-
Flavonas, flavonóis e/ou xantonas	+++	+	++	++	+++	+	+	+
Catequinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+++	+	++	++	+++	+	+	+
Esteroides e triterpenos	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	+++	+++	+	++	+	+	+	+
Glúcidos	++	+++	-	+	++	+	+	++

EHD – extratos preparados a partir das águas de decocção, resultantes do processo de hidrodestilação;
 EPF – extratos preparados por trituração a frio da planta fresca.

Os EPF apresentaram menor conteúdo em compostos bioativos comparativamente aos EHD, tendo estes sido maioritários para o extrato de *C. nepeta*, que revelou um elevado conteúdo em fenóis, flavonoides e glúcidos, bem como vestígios de alcaloides (**Tabela 3**). Quanto aos EPF de *M. cervina* e *M. pulegium*, estes apresentaram vestígios de fenóis, flavonoides, alcaloides e glúcidos. No EPF de *M. spicata*, observou-se a presença de glúcidos e vestígios de fenóis, flavonoides, flavonas, flavonóis, xantonas e alcaloides.

A composição dos extratos variou não só com a espécie de planta utilizada, mas também com o modo de obtenção dos extratos, tendo os extratos de *C. nepeta* sido os mais ricos em compostos fenólicos e flavonoides. Os EPF de *M. pulegium* e *M. spicata* apresentaram um conteúdo em compostos fenólicos muito inferior ao dos EHD. No estudo efetuado por Ullah *et al.* (2011), os extratos metanólicos de *M. spicata*, proveniente de diferentes regiões do norte de Khyber Pakhtunkhwa (Paquistão), revelaram presença de taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides, cumarinas, esteróis e terpenos.

O conteúdo em fenóis totais dos extratos foi expresso em equivalentes em ácido gálico (EAG) (**Figura 10**), o conteúdo em flavonoides totais foi expresso em equivalentes em quercetina (EQ) (**Figura 11**) e o conteúdo em taninos totais foi expresso em equivalentes em ácido tânico (EAT) (**Figura 12**), por interpolação das curvas de calibração dos padrões ácido gálico, quercetina e ácido tânico, respetivamente (**Anexo I – Figura 28**).

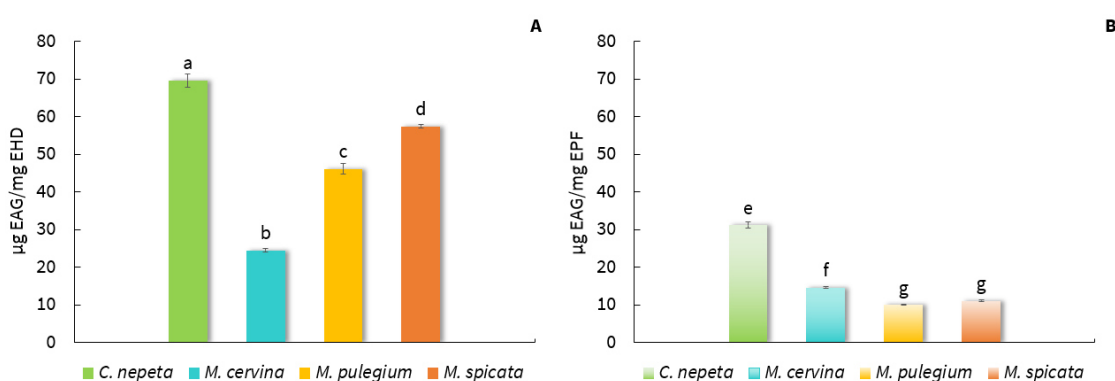


Figura 10. Quantificação do conteúdo dos EHD (A) e EPF (B) em fenóis totais.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; EAG – Equivalentes em ácido gálico.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os EHD (**Figura 10 A**) apresentaram um elevado conteúdo em fenóis totais, compreendido entre 24,5 e 69,6 μg EAG/mg extrato. O EHD de *C. nepeta* foi o que apresentou maior teor em fenóis totais (69,6 μg EAG/mg extrato), seguido dos EHD de *M. spicata* (57,4 μg EAG/mg extrato), *M. pulegium* (46,1 μg EAG/mg extrato) e *M. cervina* (24,5 μg EAG/mg extrato).

O conteúdo em fenóis totais nos EPF (**Figura 10 B**) foi muito inferior ao observado para os EHD, tendo variado entre 10,0 e 31,2 μg EAG/mg extrato. O EPF de *C. nepeta* foi o que apresentou maior teor em fenóis totais (31,2 μg EAG/mg extrato), relativamente aos EPF de *M. cervina* (14,7 μg EAG/mg extrato), *M. spicata* (11,1 μg EAG/mg extrato) e *M. pulegium* (10,0 μg EAG/mg extrato).

Na literatura, um estudo refere que os extratos etanólicos preparados a partir de *M. pulegium*, proveniente da província de Tehran (Irão), apresentaram elevado conteúdo em fenóis totais, comparativamente aos extratos etanólicos de *M. spicata* (Nickavar *et al.*, 2008). No estudo realizado por Benabdallah *et al.* (2016), o teor em fenóis totais nos extratos metanólicos de *M. pulegium*, proveniente do nordeste da Argélia, foi de 17 µg EAG/mg extrato, inferior ao obtido para o EHD, mas superior ao obtido para o EPF de *M. pulegium*.

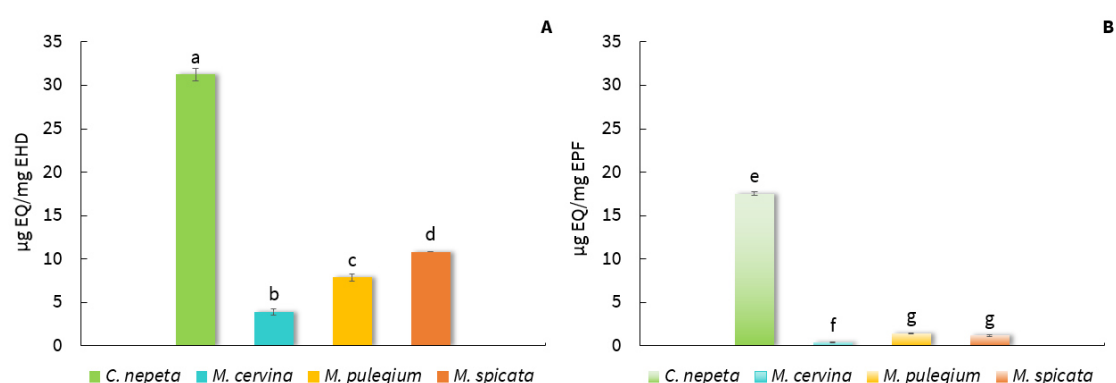


Figura 11. Quantificação do conteúdo dos EHD (A) e EPF (B) em flavonoides totais.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; EQ – Equivalentes em quercetina.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

O conteúdo dos EHD (**Figura 11 A**) em flavonoides totais variou entre 3,9 e 31,3 µg EQ/mg extrato, tendo sido superior no EHD de *C. nepeta* (31,3 µg EQ/mg extrato), comparativamente aos EHD de *M. spicata* (10,9 µg EQ/mg extrato), *M. pulegium* (7,9 µg EQ/mg extrato) e *M. cervina* (3,9 µg EQ/mg extrato).

O conteúdo em flavonoides totais nos EPF (**Figura 11 B**) foi muito inferior ao observado para os EHD, tendo variado entre 0,4 e 17,5 µg EQ/mg extrato. O EPF de *C. nepeta* (17,5 µg EQ/mg extrato) foi o que apresentou maior teor em flavonoides totais, seguido dos EPF de *M. pulegium* (1,5 µg EQ/mg extrato), *M. spicata* (1,2 µg EQ/mg extrato) e *M. cervina* (0,4 µg EQ/mg extrato).

A literatura refere que o conteúdo dos extratos metanólicos de *M. pulegium*, proveniente de Berilovac (Sérvia), em flavonoides totais foi de 150 µg EQ/mg extrato (Palić *et al.*, 2015). No estudo efetuado por Benabdallah *et al.* (2016), os extratos metanólicos de *M. pulegium*, proveniente do nordeste da Argélia, apresentaram um baixo conteúdo em flavonoides totais.

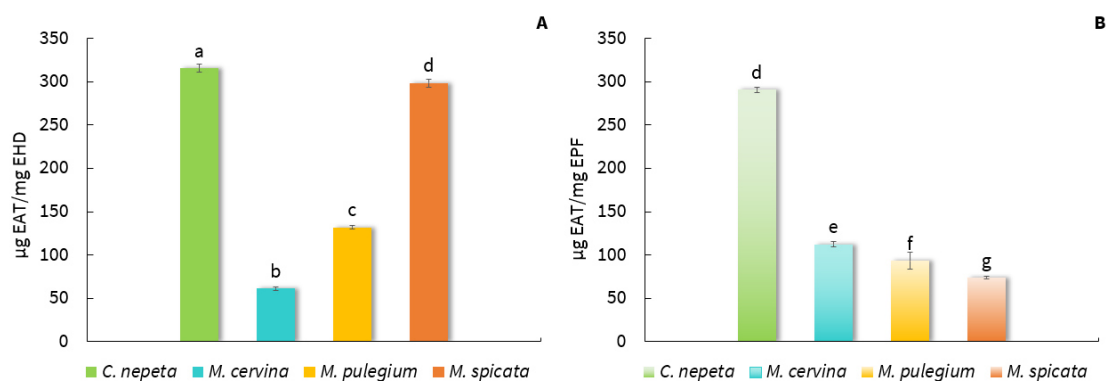


Figura 12. Quantificação do conteúdo dos EHD (A) e EPF (B) em taninos totais.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; EAT – Equivalentes em ácido tânico.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

No que respeita ao conteúdo dos EHD (**Figura 12 A**) em taninos totais, este variou entre 61,3 e 315,8 µg EAT/mg extrato. O EHD de *C. nepeta* foi o que apresentou maior teor em taninos totais (315,8 µg EAT/mg extrato), seguido dos EHD de *M. spicata* (298,4 µg EAT/mg extrato), *M. pulegium* (131,9 µg EAT/mg extrato) e *M. cervina* (61,3 µg EAT/mg extrato).

O conteúdo em taninos totais nos EPF (**Figura 12 B**) foi similar ao observado para os EHD, tendo variado entre 73,7 e 290,9 µg EAT/mg extrato. O EPF de *C. nepeta* foi o que apresentou maior teor em taninos totais (290,9 µg EAT/mg extrato), comparativamente aos EPF de *M. cervina* (112,1 µg EAT/mg extrato), *M. pulegium* (93,0 µg EAT/mg extrato) e *M. spicata* (73,7 µg EAT/mg extrato).

Na literatura, um estudo refere que o teor dos extratos aquosos de *M. spicata*, proveniente do deserto da província de Matrouh (Egipto), em taninos totais foi de 18,60 mg EAT/g extrato (Gaafar *et al.*, 2018), valor que pode ser considerado baixo, quando comparado com os resultados obtidos para os EHD e EPF desta espécie.

5.2. Screening de toxicidade dos extratos

Na **Figura 13**, estão apresentadas as curvas dose-resposta referentes aos EHD (**Figura 13 A–D**) e EPF (**Figura 13 E–F**), como também ao dicromato de potássio (**Figura 13 G**).

A literatura refere que os extratos de plantas não são considerados tóxicos, quando apresentam valores de CL₅₀ superiores a 1000 µg/mL. Caso os valores de CL₅₀ variem entre 500 e 1000 µg/mL, os extratos são considerados fracamente tóxicos. De referir, ainda, que os extratos são considerados moderadamente tóxicos quando apresentam valores de CL₅₀ compreendidos entre 100 e 500 µg/mL e muito tóxicos, caso os valores de CL₅₀ sejam inferiores a 100 µg/mL (Karchesy *et al.*, 2016).

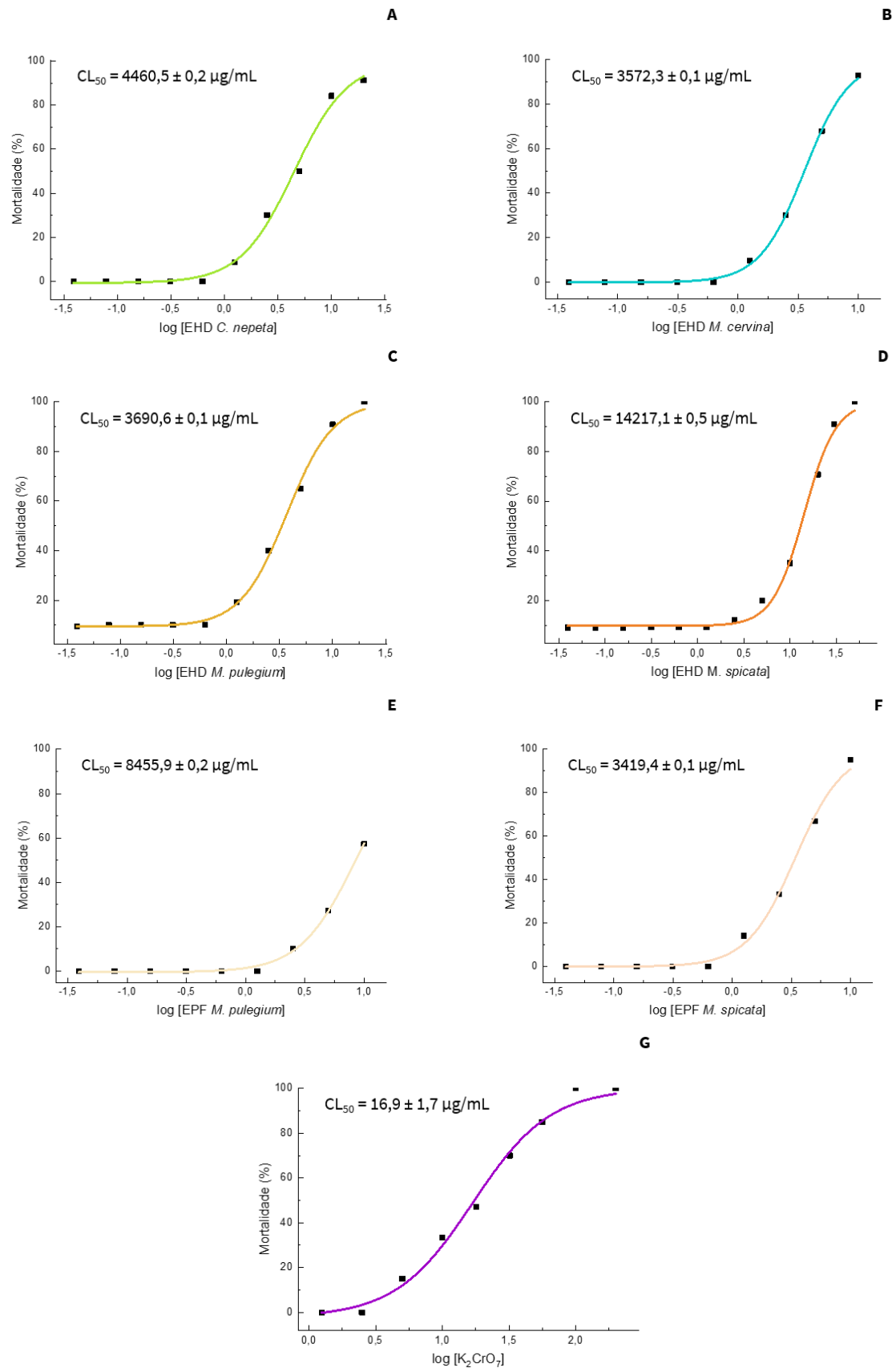


Figura 13. Curvas dose-resposta referentes aos EHD (A-D), EPF (E-F) e dicromato de potássio (G), pelo teste de letalidade em *Artemia salina*.

A – EHD *C. nepeta*; **B** – EHD *M. cervina*; **C** – EHD *M. pulegium*; **D** – EHD *M. spicata*; **E** – EPF *M. pulegium*; **F** – EPF *M. spicata*; **G** – Dicromato de potássio.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; K_2CrO_7 – Dicromato de potássio.

O bioensaio de letalidade em *Artemia salina* revelou baixa toxicidade para os EHD de *C. nepeta*, *M. cervina* e *M. pulegium*, assim como para o EPF de *M. spicata*, com valores de CL_{50} compreendidos entre 3000 e 5000 $\mu\text{g/mL}$. Observou-se muito baixa toxicidade para o EHD de *M. spicata* (com um valor de CL_{50} superior a 10000 $\mu\text{g/mL}$), como também para os EPF de *M. pulegium* (com um valor de CL_{50} superior a 8000 $\mu\text{g/mL}$), *C. nepeta* e *M. cervina*, sendo que para estes dois últimos não foi possível determinar o valor de CL_{50} , uma vez que na concentração de 10000 $\mu\text{g/mL}$ causaram a morte a 20 e 40% da população em estudo, respetivamente.

O dicromato de potássio (**Figura 13 G**) apresentou um valor de CL_{50} de 16,9 $\mu\text{g/mL}$, revelando-se, deste modo, muito tóxico em *Artemia salina*.

No estudo efetuado por Parra *et al.* (2001), os resultados apontam para o facto da resposta toxicológica no teste de letalidade em *A. salina* (CL_{50}) estar correlacionada com a resposta dos testes de avaliação da toxicidade aguda *in vivo*, designadamente a dose letal de 50% de uma população de teste (DL_{50}), permitindo de um modo simples, rápido e económico, estimar a toxicidade dos extratos de plantas.

5.3. Screening *in vitro* das propriedades antioxidantes dos extratos

O *screening in vitro* das propriedades antioxidantes dos extratos foi efetuado pelos métodos do radical DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor total, com vista a avaliar os mecanismos presentes: capacidade de captação de radicais livres, proteção do substrato lipídico e/ou capacidade de redução do ferro hémico, respetivamente.

5.3.1. Método do radical DPPH

Os valores apresentados na **Figura 14** correspondem à percentagem de inibição de oxidação pelo método do radical DPPH, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 14 A**), EPF (**Figura 14 B**) e padrão (**Figura 14 C**).

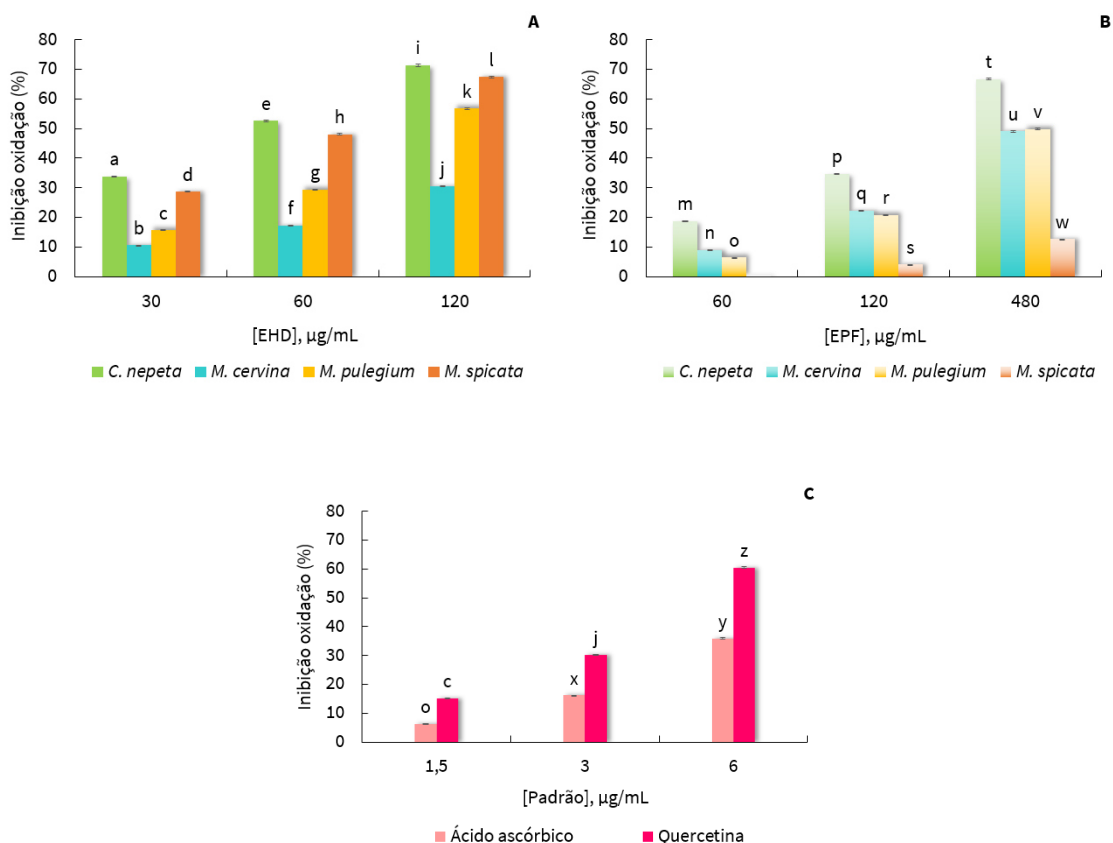


Figura 14. Atividade antioxidante dos EHD (A), EPF (B) e padrões (C), pelo método do radical DPPH. EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca. Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os EHD (**Figura 14 A**) apresentaram elevada atividade antioxidante, sendo que se observou um aumento significativo da capacidade para captação de radicais livres, proporcional ao aumento da concentração ($p < 0,05$). A capacidade antioxidante do EHD de *C. nepeta* foi significativamente superior à dos restantes EHD ($p < 0,05$). Por outro lado, o EHD de *M. cervina* foi o que apresentou menor capacidade para captação de radicais livres, com valores de inibição de 10,6, 17,2 e 30,5% para as concentrações de 30, 60 e 120 µg/mL, respetivamente.

Os EPF (**Figura 14 B**) apresentaram menor atividade antioxidante, relativamente aos EHD, tendo sido o EPF de *C. nepeta* o que mais se destacou. No entanto, foi igualmente notório o aumento da capacidade para captação de radicais DPPH, proporcional ao aumento da concentração. Os EPF de *M. cervina* e *M. pulegium* revelaram um perfil antioxidante semelhante nas concentrações apresentadas. Por sua vez, o EPF de *M. spicata* foi o que apresentou menor capacidade para captação de radicais livres, com valores de inibição de 4,1 e 12,6% para as concentrações de 120 e 480 µg/mL, respetivamente.

Os padrões ácido ascórbico e quercetina (**Figura 14 C**) apresentaram, na mesma ordem de grandeza, maior capacidade para captação de radicais livres, relativamente à observada nos EHD e EPF.

5.3.2. Sistema β -caroteno/ácido linoleico

Os valores apresentados na **Figura 15** correspondem à percentagem de inibição de oxidação lipídica, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 15 A**), EPF (**Figura 15 B**) e padrão (**Figuras C e D**).

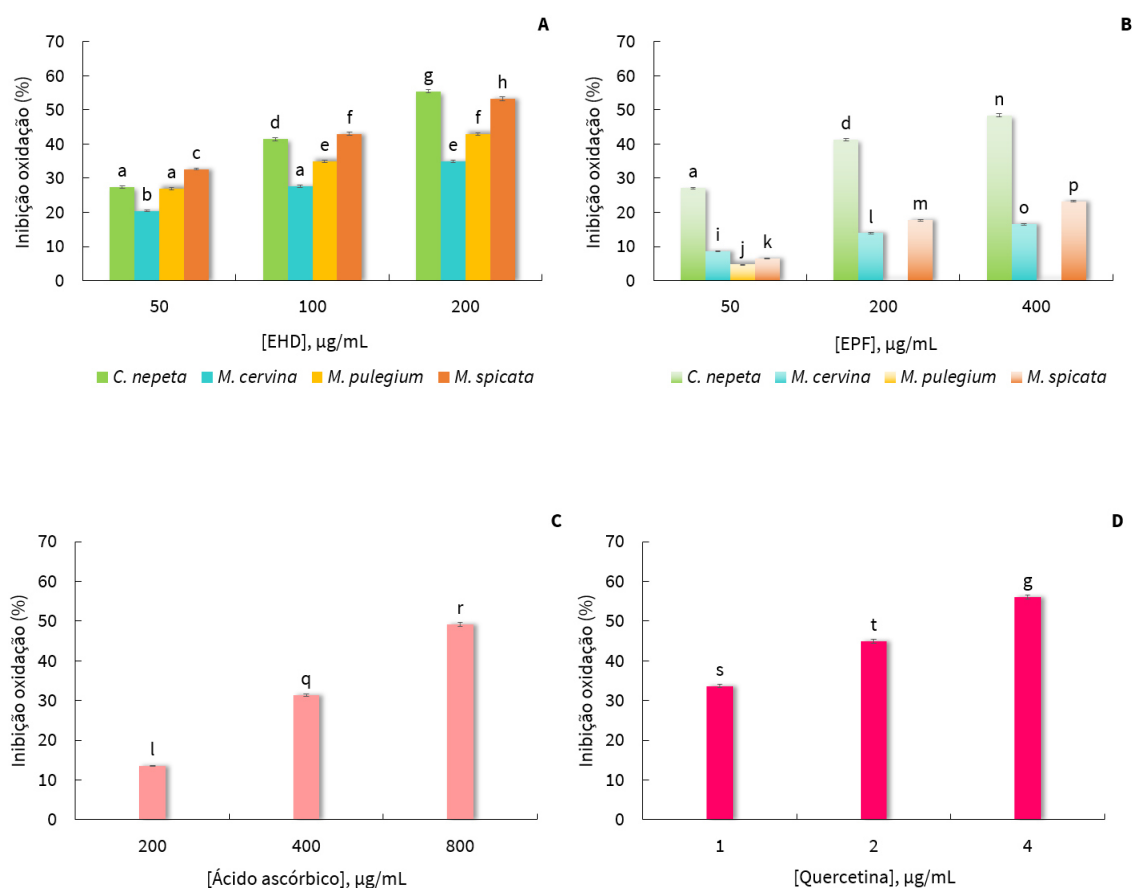


Figura 15. Atividade antioxidante dos EHD (A), EPF (B), ácido ascórbico (C) e quercetina (D), pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos EHD (**Figura 15 A**), observou-se um aumento da capacidade para proteção de oxidação dos substratos lipídicos, proporcional ao aumento da concentração, com valores significativamente diferentes para cada uma das concentrações testadas ($p < 0,05$). Os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata* revelaram um perfil antioxidante semelhante nas concentrações apresentadas, tendo sido estes os mais relevantes. Paralelamente, o EHD de *M. cervina* foi o que apresentou menor capacidade para proteção de oxidação dos substratos lipídicos, com valores de inibição de 20,4, 27,6 e 34,8% para as concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, respetivamente.

Os EPF (**Figura 15 B**) apresentaram menor atividade antioxidante, comparativamente aos EHD, tendo-se observado valores de atividade antioxidante significativamente superiores para os EHD na concentração de 200 µg/mL, do que para os EPF na concentração de 400 µg/mL ($p < 0,05$). Nos EPF de *C. nepeta*, *M. cervina* e *M. spicata*, observou-se um aumento da capacidade para proteção de oxidação dos substratos lipídicos, proporcional ao aumento da concentração. No entanto, tal não se verificou para o EPF de *M. pulegium*, uma vez que o aumento da concentração levou a uma diminuição da atividade deste. O EPF de *C. nepeta* apresentou maior atividade antioxidante, comparativamente aos restantes EPF, sendo que a percentagem de inibição da oxidação lipídica foi de cerca de 50%, na concentração de 400 µg/mL.

O padrão quercetina (**Figura 15 D**) apresentou maior capacidade para proteção de oxidação dos substratos lipídicos, relativamente à observada nos EHD e EPF ($p < 0,05$). No que respeita ao padrão ácido ascórbico (**Figura 15 C**), este apresentou menor capacidade antioxidante, com valores de atividade muito inferiores aos obtidos para os EHD ($p < 0,05$). No entanto, a atividade do ácido ascórbico foi superior à observada para os EPF, à exceção do EPF de *C. nepeta* que apresentou um valor superior ao do ácido ascórbico ($p < 0,05$).

5.3.3. Método do poder redutor total

Os valores apresentados na **Figura 16** correspondem à percentagem de inibição de oxidação do Fe(II), pelo método do poder redutor total, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 16 A**), EPF (**Figura 16 B**) e padrão (**Figura 16 C**).

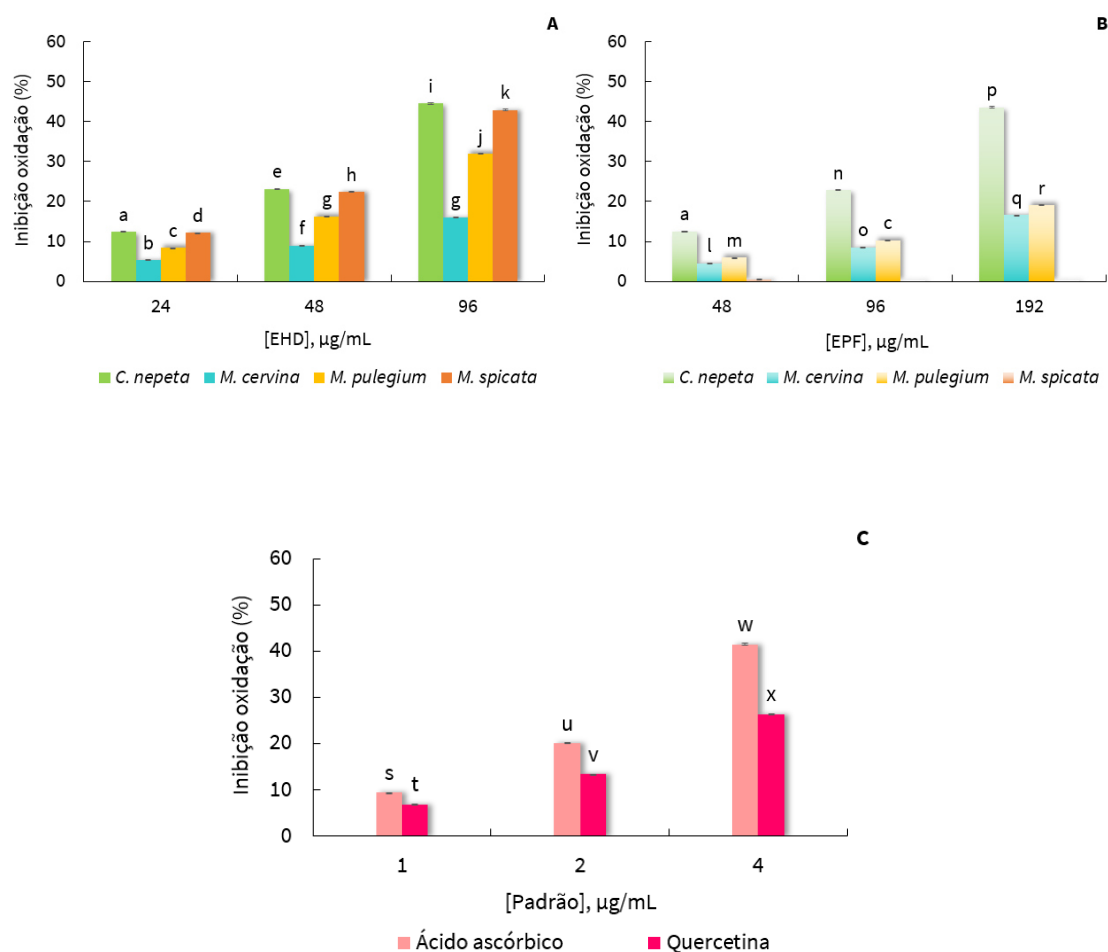


Figura 16. Atividade antioxidante dos EHD (A), EPF (B) e padrões (C), pelo método do poder redutor total. EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca. Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos EHD (**Figura 16 A**), observou-se um aumento significativo da capacidade dos extratos para reduzir o Fe(III), proporcional ao aumento da concentração ($p < 0,05$). Os EHD apresentaram elevada atividade antioxidante, com destaque para o EHD de *C. nepeta*, com valores de inibição de 12, 23 e 45% para as concentrações de 24, 48 e 96 µg/mL, respetivamente. Em contrapartida, o EHD de *M. cervina* foi o que apresentou menor capacidade antioxidante.

A capacidade antioxidante dos EPF (**Figura 16 B**) foi bastante inferior à observada para aos EHD. Nos EPF de *C. nepeta*, *M. cervina* e *M. pulegium*, observou-se um aumento da capacidade redutora do Fe(III), proporcional ao aumento da concentração ($p<0,05$). Porém, o mesmo não se observou para o EPF de *M. spicata*, uma vez que o aumento da concentração levou a uma diminuição da atividade deste. O EPF de *C. nepeta* apresentou maior capacidade redutora do Fe(III), comparativamente aos restantes EPF. De referir, ainda, que os EPF de *M. cervina* e *M. pulegium* revelaram um perfil antioxidante semelhante nas concentrações apresentadas.

Os padrões ácido ascórbico e quercetina (**Figura 16 C**) apresentaram, na mesma ordem de grandeza, maior capacidade redutora do Fe(III), comparativamente à observada nos EHD e EPF.

5.3.4. Avaliação dos mecanismos *in vitro* de atividade antioxidante

De forma a poder estabelecer uma comparação entre a capacidade antioxidante apresentada pelos EHD e EPF, nos três métodos estudados, a atividade antioxidante foi expressa em μg de equivalentes em ácido ascórbico (EAA) por mg de extrato (**Figuras 17–19**), nos casos em que se observou um comportamento linear.

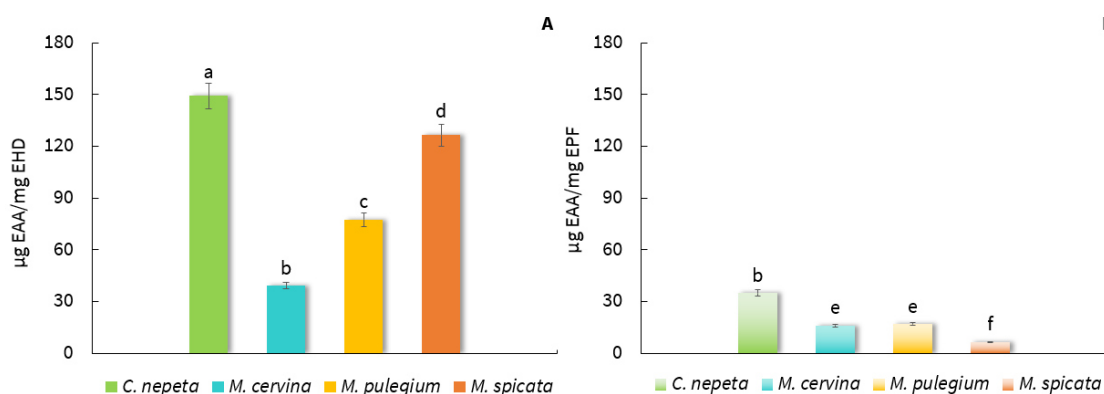


Figura 17. Atividade antioxidante dos EHD (**A**) e EPF (**B**), expressa em EAA, pelo método do radical DPPH. EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$).

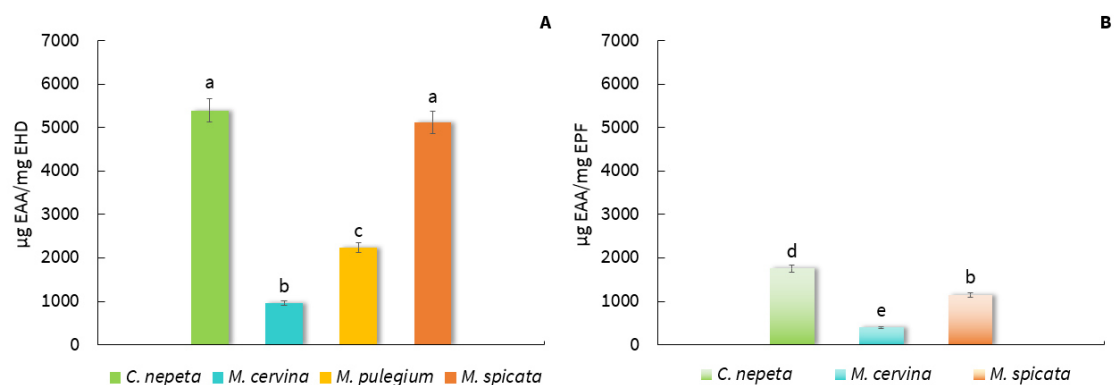


Figura 18. Atividade antioxidante dos EHD (A) e EPF (B), expressa em EAA, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

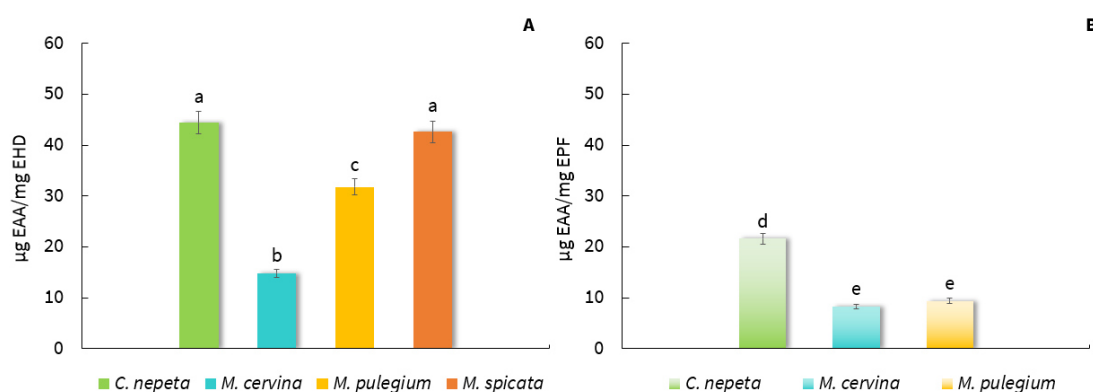


Figura 19. Atividade antioxidante dos EHD (A) e EPF (B), expressa em EAA, pelo método do poder redutor total.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os EHD de cada uma das plantas demonstraram capacidade antioxidante superior à dos EPF ($p < 0,05$), para os diferentes mecanismos estudados, revelando, deste modo, capacidade de sequestro de radicais livres (Figura 17), proteção do substrato lipídico (Figura 18) e capacidade de reduzir o ferro hémico (Figura 19). De referir, que os EHD que apresentaram maior potencial antioxidante foram os de *C. nepeta* e de *M. spicata*, seguidos de *M. pulegium*. Nos EPF, o de *C. nepeta* foi também o que apresentou maior atividade pelos três mecanismos de ação, enquanto que alguns dos EPF não

apresentaram atividade antioxidante por alguns dos mecanismos estudados.

Na **Tabela 4**, estão apresentados os valores de IC₅₀ determinados para cada extrato/padrão. Os EPF apresentaram muito baixa atividade antioxidante, pelo que não foi possível determinar o valor de IC₅₀ do EPF de *M. spicata* pelo método do radical DPPH, dos EPF de *M. cervina* e *M. spicata* pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico e dos EPF de *M. cervina* e *M. pulegium* pelo método do poder redutor total. O mesmo se observou para o EPF de *M. pulegium* pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico, assim como para o EPF de *M. spicata* pelo método do poder redutor total, uma vez que não apresentaram um comportamento linear.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ determinados para cada extrato/padrão, no âmbito da sua capacidade antioxidante pelos mecanismos estudados.

	IC ₅₀ (µg/mL)					
	Método do radical DPPH		Sistema β-caroteno/ácido linoleico		Método do poder redutor total	
	EHD	EPF	EHD	EPF	EHD	EPF
<i>C. nepeta</i>	54,5 ± 1,1	232,9 ± 4,7	152,7 ± 3,1	468,8 ± 9,4	108,1 ± 2,2	221,9 ± 4,4
<i>M. cervina</i>	207,7 ± 4,2	503,6 ± 10,1	861,8 ± 17,2	nd	323,7 ± 6,5	nd
<i>M. pulegium</i>	105,0 ± 2,1	483,7 ± 9,7	368,7 ± 7,4	nd	151,0 ± 3,0	nd
<i>M. spicata</i>	64,3 ± 1,3	nd	160,8 ± 3,2	nd	112,5 ± 2,3	nd
Ác. ascórbico	8,1 ± 0,2		824,1 ± 16,5		4,8 ± 0,1	
Quercetina	5,0 ± 0,1		2,7 ± 0,1		7,6 ± 0,2	

nd – não determinado.

Com base no valor de IC₅₀, é possível observar que os extratos de *C. nepeta* apresentaram elevada atividade pelos três mecanismos estudados, tendo maior atividade pelo método do radical DPPH. Para cada um dos mecanismos em estudo, os EHD de *C. nepeta* apresentaram maior atividade do que os EPF.

Em relação aos EHD, o de *C. nepeta* foi o que apresentou maior capacidade para captação de radicais DPPH (IC₅₀ = 54,5 µg/mL), relativamente aos EHD de *M. spicata* (IC₅₀ = 64,3 µg/mL), *M. pulegium* (IC₅₀ = 105,0 µg/mL) e *M. cervina* (IC₅₀ = 207,7 µg/mL). No que respeita aos EPF, o de *C. nepeta* foi o que revelou maior capacidade para captação de radicais DPPH (IC₅₀ = 232,9 µg/mL), comparativamente aos EHD de *M. pulegium* (IC₅₀ = 483,7 µg/mL) e *M. cervina* (IC₅₀ = 503,6 µg/mL). A literatura refere que os extratos metanólicos de *C. nepeta* e *M. spicata* apresentaram elevado potencial antioxidante pelo método do radical DPPH, com valores de IC₅₀ de 13,27 e 8,93 µg/mL,

respetivamente (Gonçalves *et al.*, 2016). No estudo realizado por Mata *et al.* (2007), os extratos aquosos de *M. pulegium* e *M. spicata* revelaram maior capacidade para captação de radicais DPPH, comparativamente à observada no padrão hidroxitolueno butilado (BHT). Um estudo efetuado por Arantes *et al.* (2017), mostrou que os extratos de águas de decocção de *C. nepeta* apresentaram elevado potencial antioxidante pelo método do radical DPPH, com um valor de IC₅₀ de 60 µg/mL, ligeiramente superior ao valor obtido neste projeto (IC₅₀ = 54,5 µg/mL).

É também de salientar, que o EHD de *C. nepeta* foi o que revelou maior capacidade para proteção de oxidação do substrato lipídico (IC₅₀ = 152,7 µg/mL), comparativamente aos EHD de *M. spicata* (IC₅₀ = 160,8 µg/mL), *M. pulegium* (IC₅₀ = 368,7 µg/mL) e *M. cervina* (IC₅₀ = 861,8 µg/mL). É de referir, ainda, que o EPF de *C. nepeta* foi o que apresentou maior potencial para proteção de oxidação dos substratos lipídicos (IC₅₀ = 468,8 µg/mL), comparativamente aos restantes EPF. Estudos efetuados por Arantes *et al.* (2017), mostraram que os extratos de águas de decocção de *C. nepeta* e *M. spicata* apresentaram maior capacidade para proteção de oxidação dos substratos lipídicos, comparativamente à observada no padrão ácido ascórbico, resultados que estão de acordo com o observado neste projeto. Os extratos etanólicos de *M. pulegium* e *M. spicata*, no estudo realizado por Mata *et al.* (2007), apresentaram elevada atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico, com valores de IC₅₀ de 165 e 36,9 µg/mL, respetivamente, muito superior à observada, neste projeto, para os extratos aquosos, com valores de IC₅₀ de 368,7 e 160,8 µg/mL, respetivamente. Estas diferenças poderão estar relacionadas com o conteúdo em fenóis totais, o qual também foi superior nos extratos etanólicos (Mata *et al.*, 2007), do que nos extratos aquosos em estudo.

O EHD de *C. nepeta* destacou-se pela sua elevada capacidade redutora do Fe(III) (IC₅₀ = 108,1 µg/mL), seguido dos EHD de *M. spicata* (IC₅₀ = 112,5 µg/mL), *M. pulegium* (IC₅₀ = 151,0 µg/mL) e *M. cervina* (IC₅₀ = 323,7 µg/mL). O EPF de *C. nepeta* foi o que denotou, também, maior capacidade redutora do Fe(III) (IC₅₀ = 221,9 µg/mL), comparativamente aos restantes EPF. A literatura refere que os extratos metanólicos de *M. pulegium* revelaram elevado potencial antioxidante pelo método do poder redutor total, o qual pode ser justificado pelo seu conteúdo em fenóis e flavonoides (Sarikurkc

et al., 2012). No estudo efetuado por Miguel *et al.* (2016), os extratos hidrometanólicos de *M. cervina* destacaram-se pela sua elevada capacidade redutora do Fe(III). Um estudo realizado por Arantes *et al.* (2017), mostrou que os extratos de águas de decocção de *C. nepeta* apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método do poder redutor total, com um valor de IC₅₀ de 47 µg/mL, inferior ao valor obtido neste projeto (IC₅₀ = 108,1 µg/mL). Estas diferenças poderão ser justificadas pelo conteúdo em fenóis totais, o qual também foi superior para o extrato aquoso de *C. nepeta*, no estudo realizado por Arantes *et al.* (2017), comparativamente ao extrato aquoso em estudo.

Os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata* destacaram-se pela sua elevada capacidade antioxidante pelos diferentes mecanismos estudados, o que parece estar relacionado com o seu conteúdo em compostos fenólicos. De facto, os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata* foram os que apresentaram maior conteúdo em fenóis totais, flavonoides e taninos totais, comparativamente aos restantes EHD. Nos EPF, o de *C. nepeta* foi o que apresentou maior capacidade antioxidante pelos três mecanismos estudados, tendo também apresentado um conteúdo superior em fenóis, flavonoides e taninos totais, comparativamente aos restantes EPF. Diversos estudos apontam para uma correlação linear entre o conteúdo em compostos fenólicos e a capacidade antioxidante (Aaby, *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007; Scherer & Godoy, 2009; Aryal *et al.*, 2019). Um estudo efetuado por Benabdallah *et al.* (2016), refere existir uma correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenóis, flavonoides e taninos de extratos metanólicos de seis espécies do género *Mentha*.

5.4. Avaliação dos mecanismos enzimáticos de atividade antioxidante

5.4.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade de CAT

Na **Figura 20**, estão apresentados os perfis de atividade de catalases (CAT) (U/mg proteína), para diferentes concentrações de EHD (**Figura 20 A–D**) e EPF (**Figura 20 E–H**).

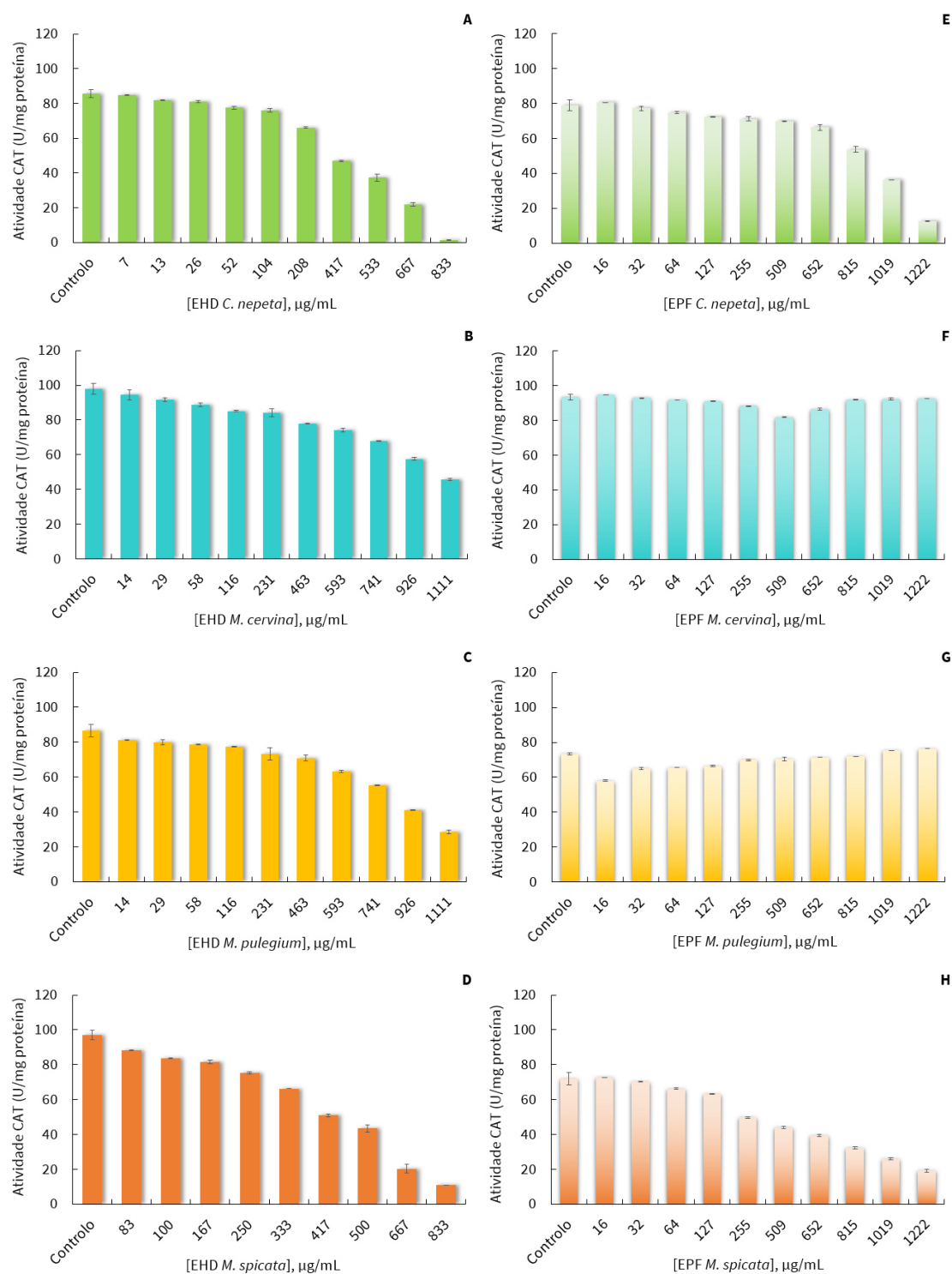


Figura 20. Perfis de atividade de CAT, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).
A – EHD *C. nepeta*; **B** – EHD *M. cervina*; **C** – EHD *M. pulegium*; **D** – EHD *M. spicata*; **E** – EPF *C. nepeta*;
F – EPF *M. cervina*; **G** – EPF *M. pulegium*; **H** – EPF *M. spicata*.
 EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; CAT – Catalases.

Os EHD de *C. nepeta* (**Figura 20 A**) e *M. spicata* (**Figura 20 D**) destacaram-se pela elevada capacidade inibitória da atividade de CAT, proporcional à concentração.

Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória de CAT, comparativamente aos EHD, sendo que o EPF de *M. spicata* (**Figura 20 H**) foi o mais relevante. Para o EPF de *M. cervina* (**Figura 20 F**), observou-se, a partir da concentração de 652 µg/mL, uma diminuição da capacidade inibitória, o que se traduz no aumento da atividade de CAT. No EPF de *M. pulegium* (**Figura 20 G**), o aumento da concentração levou a um aumento da atividade de CAT.

Os valores apresentados na **Figura 21** correspondem à percentagem de inibição da atividade de CAT, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 21 A**) e EPF (**Figura 21 B**).

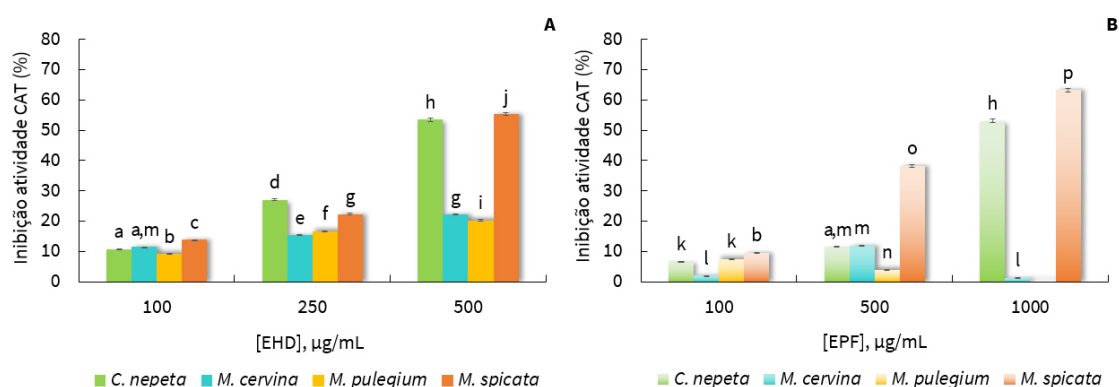


Figura 21. Capacidade dos EHD (**A**) e EPF (**B**), para inibir a atividade de CAT.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; CAT – Catalases.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas, para cada um dos gráficos, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos EHD (**Figura 21 A**), observou-se um aumento da capacidade inibitória da atividade da CAT, proporcional ao aumento da concentração de extrato ($p < 0,05$). Como já referido, os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata* destacaram-se pela elevada capacidade inibitória da atividade de CAT, com valores de inibição de 54 e 55% de atividade para a concentração de 500 µg/mL, respetivamente. Os EHD de *M. cervina* e *M. pulegium* revelaram um perfil antioxidante semelhante para as concentrações estudadas, não se

tendo observado linearidade entre a atividade inibitória de CAT e o aumento da concentração. A elevada capacidade para inibir a atividade de CAT, apresentada pelos EHD de *C. nepeta* e *M. spicata*, poderá estar relacionada com o seu conteúdo em compostos fenólicos.

Nos EPF de *C. nepeta* e *M. spicata* (**Figura 21 B**), observou-se um aumento da capacidade inibitória da atividade de CAT, proporcional ao aumento da concentração. No entanto, este efeito não se observou para o EPF de *M. cervina*, dado que, apesar deste ter apresentado algum potencial inibitório para baixas concentrações, observou-se uma diminuição da sua capacidade antioxidante, para concentrações mais elevadas. O EPF de *M. pulegium* apresentou também um comportamento idêntico, tendo-se observado uma diminuição da capacidade inibitória de CAT para concentrações mais elevadas deste extrato.

5.4.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de GPx

Na **Figura 22**, estão apresentados os perfis de atividade de glutathione peroxidases (GPx) (U/mg proteína), para diferentes concentrações de EHD (**Figura 22 A–D**) e EPF (**Figura 22 E–H**).

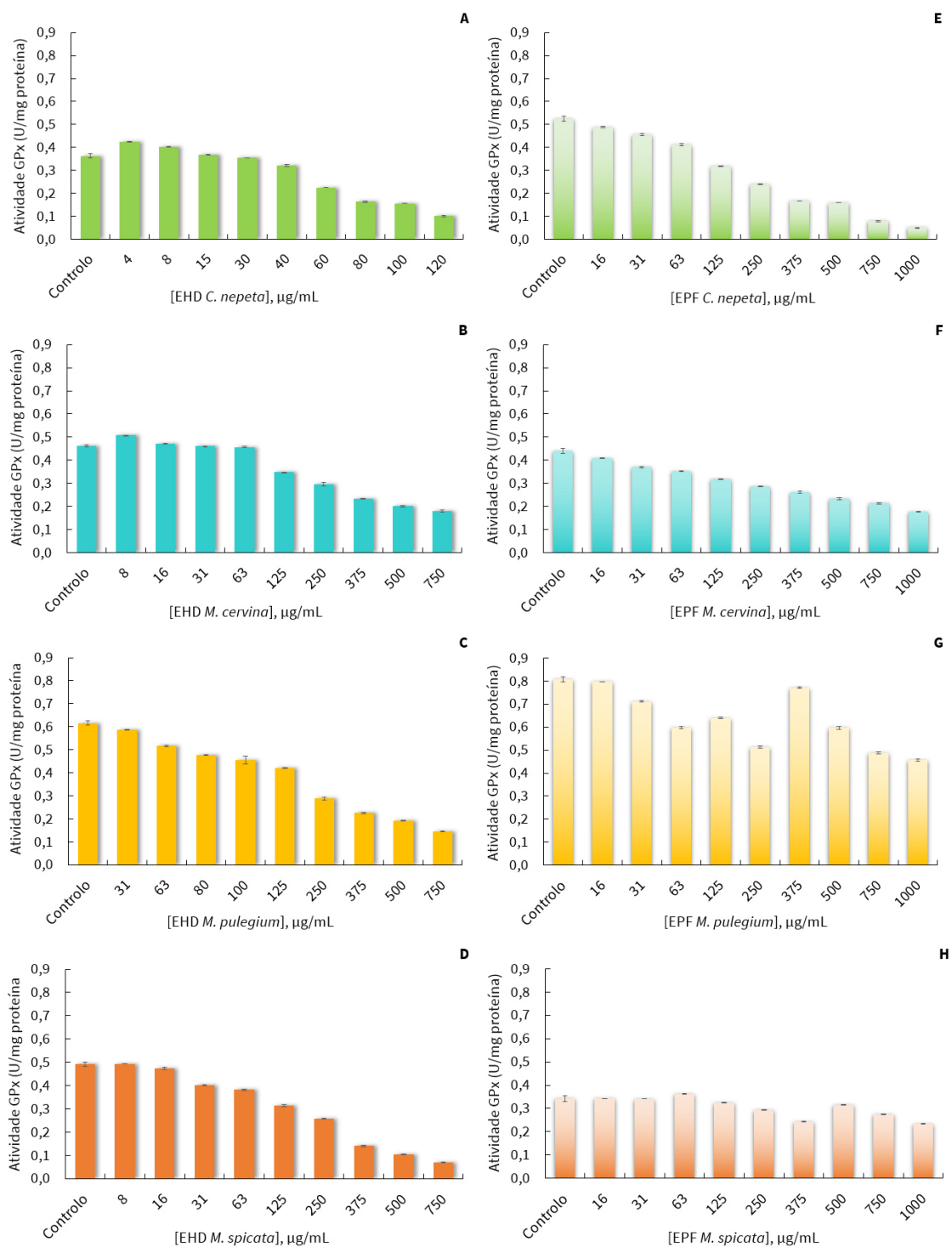


Figura 22. Perfis de atividade de GPx, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).
A – EHD *C. nepeta*; **B** – EHD *M. cervina*; **C** – EHD *M. pulegium*; **D** – EHD *M. spicata*; **E** – EPF *C. nepeta*;
F – EPF *M. cervina*; **G** – EPF *M. pulegium*; **H** – EPF *M. spicata*.
 EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; GPx – Glutathione peroxidases.

O EHD de *C. nepeta* (**Figura 22 A**) destacou-se pela elevada capacidade inibitória da atividade de GPx, proporcional à concentração.

Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de GPx, relativamente aos EHD, sendo que o EPF de *C. nepeta* (**Figura 22 E**) foi o mais ativo. Para os EPF de *M. pulegium* (**Figura 22 G**) e *M. spicata* (**Figura 22 H**), não se observou um comportamento linear.

Os valores apresentados na **Figura 23** correspondem à percentagem de inibição da atividade de GPx, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 23 A**) e EPF (**Figura 23 B**).

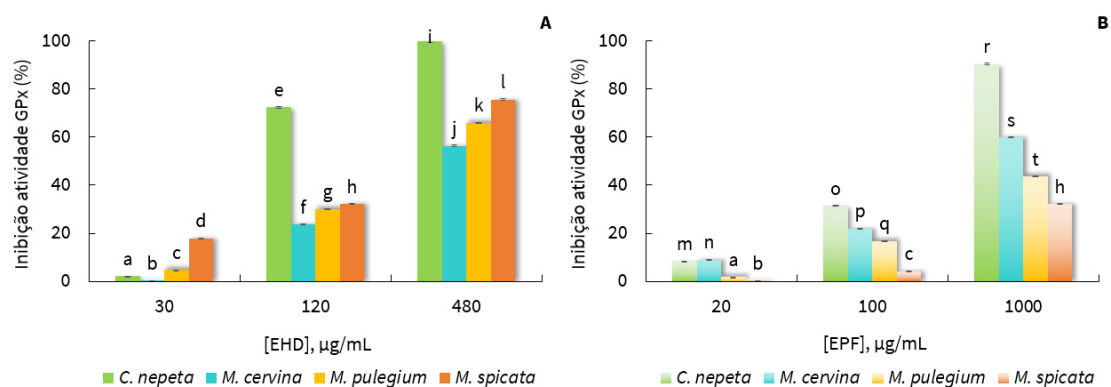


Figura 23. Capacidade dos EHD (**A**) e EPF (**B**), para inibir a atividade de GPx.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; GPx – Glutathione peroxidases.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas, para cada um dos gráficos, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos EHD (**Figura 23 A**), observou-se um aumento da capacidade inibitória da atividade de GPx, proporcional ao aumento da concentração, com valores significativamente diferentes para cada uma das concentrações testadas ($p < 0,05$). O EHD de *C. nepeta*, como já mencionado, apresentou elevada capacidade inibitória da atividade de GPx, registando 100% na concentração de 480 µg/mL. Paralelamente, o EHD de *M. cervina* foi o que apresentou menor capacidade inibitória da atividade de GPx, com valores de inibição de 0,3, 23,7 e 56,4% de atividade para as concentrações de 30, 120 e 480 µg/mL, respetivamente.

Nos EPF de *C. nepeta* e *M. cervina* (**Figura 23 B**), observou-se um aumento da capacidade inibitória da atividade de GPx, proporcional ao aumento da concentração.

5.4.3. Avaliação da capacidade inibitória da atividade de CAT e GPx

Na **Tabela 5**, estão apresentados os valores de IC₅₀, no âmbito da capacidade dos extratos para inibir a atividade de CAT e GPx. De referir, que não foi possível determinar o valor de IC₅₀ dos EPF de *M. cervina* e *M. pulegium*, para o estudo da capacidade inibitória da atividade de CAT, como também dos EPF de *M. pulegium* e *M. spicata*, para o estudo da capacidade inibitória da atividade de GPx.

Tabela 5. Valores de IC₅₀ determinados para cada extrato, no âmbito da sua capacidade para inibir a atividade de CAT e GPx.

	IC ₅₀ (µg/mL)			
	Capacidade inibitória da atividade de CAT		Capacidade inibitória da atividade de GPx	
	EHD	EPF	EHD	EPF
<i>C. nepeta</i>	470,6 ± 14,4	946,7 ± 9,4	80,0 ± 3,7	214,2 ± 22,2
<i>M. cervina</i>	1190,8 ± 15,8	nd	206,4 ± 37,9	832,2 ± 42,6
<i>M. pulegium</i>	953,2 ± 12,9	nd	190,9 ± 13,3	nd
<i>M. spicata</i>	485,9 ± 8,4	713,8 ± 26,9	232,8 ± 27,8	nd

nd – não determinado.

No que respeita aos EHD, o de *C. nepeta* foi o que apresentou maior capacidade inibitória da atividade de CAT (IC₅₀ = 470,6 µg/mL), seguido dos de *M. spicata* (IC₅₀ = 485,9 µg/mL), *M. pulegium* (IC₅₀ = 953,2 µg/mL) e *M. cervina* (IC₅₀ = 1190,8 µg/mL). Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de CAT, comparativamente aos EHD. O EPF de *M. spicata* revelou maior capacidade inibitória da atividade de CAT (IC₅₀ = 713,8 µg/mL), comparativamente ao EPF de *C. nepeta* (IC₅₀ = 946,7 µg/mL).

Quanto aos EHD, o de *C. nepeta* foi o que apresentou maior capacidade inibitória da atividade de GPx ($IC_{50} = 80,0 \mu\text{g/mL}$), seguido dos de *M. pulegium* ($IC_{50} = 190,9 \mu\text{g/mL}$), *M. cervina* ($IC_{50} = 206,4 \mu\text{g/mL}$) e *M. spicata* ($IC_{50} = 232,8 \mu\text{g/mL}$). Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de GPx, comparativamente aos EHD. O EPF de *C. nepeta* denotou maior capacidade inibitória da atividade de GPx ($IC_{50} = 214,2 \mu\text{g/mL}$), relativamente ao EPF de *M. cervina* ($IC_{50} = 832,2 \mu\text{g/mL}$).

A literatura refere que os compostos fenólicos promovem o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, desempenhando um importante papel na prevenção e terapia de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo. Em ensaios realizados com animais, o consumo de frutas, ricas em compostos fenólicos, tem sido associado a níveis reduzidos de ROS (Anantachoke *et al.*, 2016).

5.5. Avaliação do potencial neuroprotetor

5.5.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade de AChE

Na **Figura 24**, estão apresentados os perfis de atividade de acetilcolinesterases (AChE) (U/mg proteína), para diferentes concentrações de EHD (**Figura 24 A–D**) e EPF (**Figura 24 E–H**).

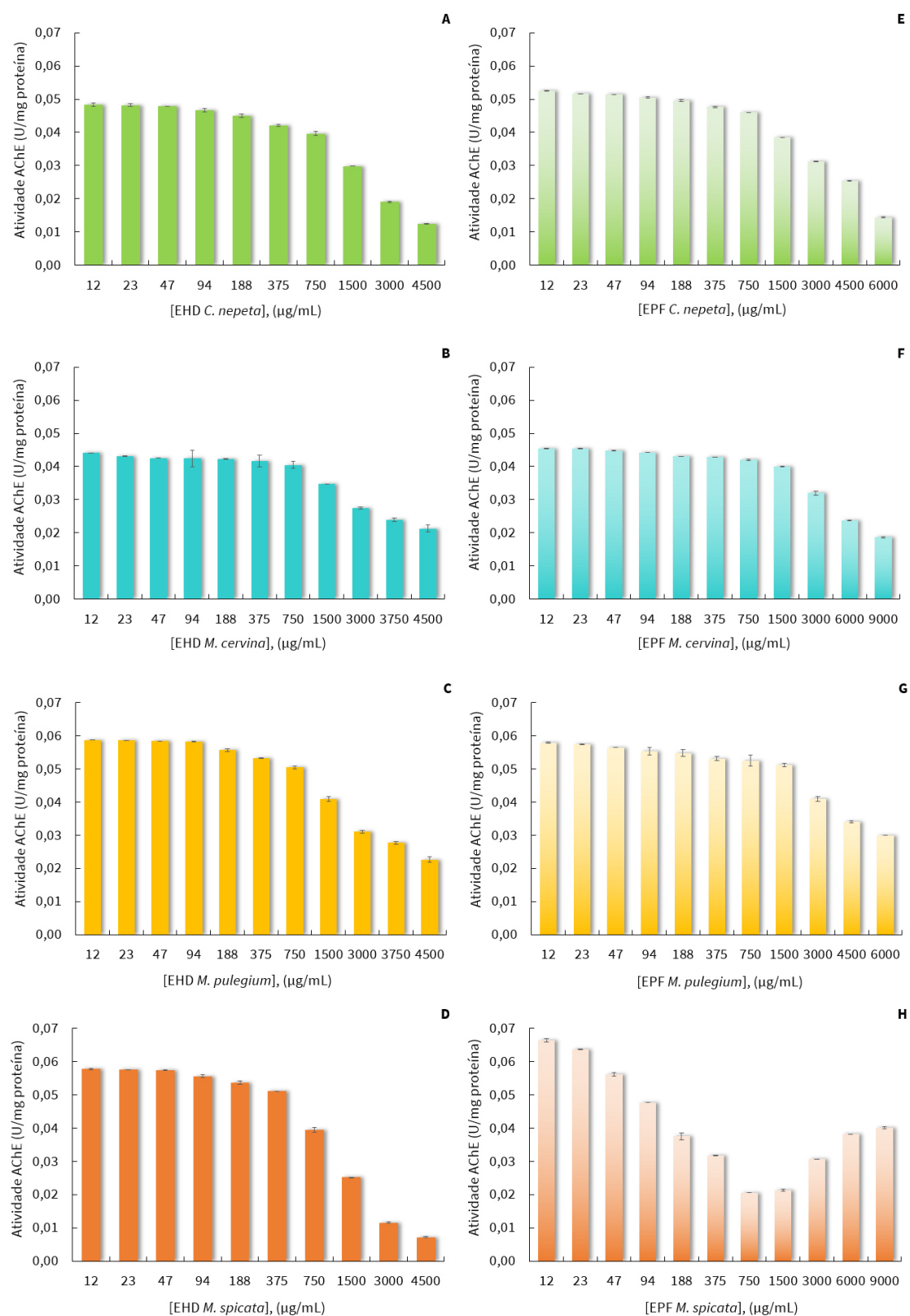


Figura 24. Perfis de atividade de AChE, para diferentes concentrações de EHD (A-D) e EPF (E-H).
A – EHD *C. nepeta*; **B** – EHD *M. cervina*; **C** – EHD *M. pulegium*; **D** – EHD *M. spicata*; **E** – EPF *C. nepeta*;
F – EPF *M. cervina*; **G** – EPF *M. pulegium*; **H** – EPF *M. spicata*.
 EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; AChE – Acetilcolinesterases.

O EHD de *M. spicata* (**Figura 24 D**) destacou-se pela elevada capacidade inibitória da atividade de AChE, proporcional à concentração.

Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de AChE, comparativamente aos EHD. De referir, ainda, que o EPF de *M. spicata* (**Figura 24 H**) apresentou considerável potencial inibitório até à concentração de 750 µg/mL, no entanto, a capacidade deste, foi menor para concentrações superiores.

Os valores apresentados na **Figura 25** correspondem à percentagem de inibição da actividade de AChE, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 25 A**) e EPF (**Figura 25 B**).

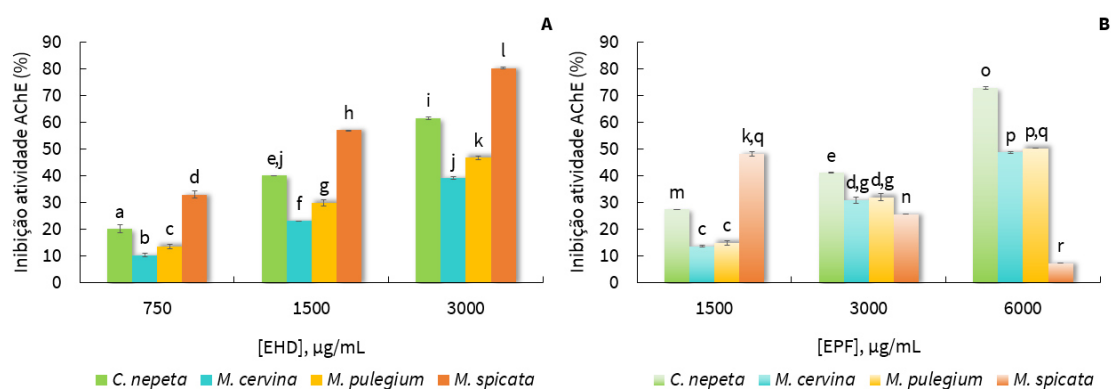


Figura 25. Potencial dos EHD (**A**) e EPF (**B**), para inibir a atividade de AChE.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; AChE – Acetilcolinesterases.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas, para cada um dos gráficos, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

No que respeita aos EHD (**Figura 25 A**), observou-se um aumento significativo da capacidade inibitória da atividade de AChE, proporcional ao aumento da concentração ($p<0,05$), tendo sido o EHD de *M. spicata* o que mais se destacou, com valores de inibição de 33, 57,2 e 80,3% de atividade para as concentrações de 750, 1500 e 3000 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. Por outro lado, o EHD de *M. cervina* foi o que apresentou menor capacidade inibitória da atividade de AChE, com valores de inibição de 10,5, 23,3 e 39,3% de atividade para as concentrações de 750, 1500 e 3000 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente.

Nos EPF de *C. nepeta*, *M. cervina* e *M. pulegium* (**Figura 25 B**), foi notório um aumento da capacidade inibitória da atividade de AChE, proporcional ao aumento da concentração. No que respeita aos EPF, o de *C. nepeta* foi o que revelou ser o mais promissor, com maior potencial inibitório.

5.5.2. Determinação da capacidade inibitória da atividade de BChE

Na **Figura 26**, estão apresentados os perfis de atividade de butirilcolinesterases (BChE) (U/mg proteína), para diferentes concentrações de EHD (**Figura 26 A–D**) e EPF (**Figura 26 E–H**).

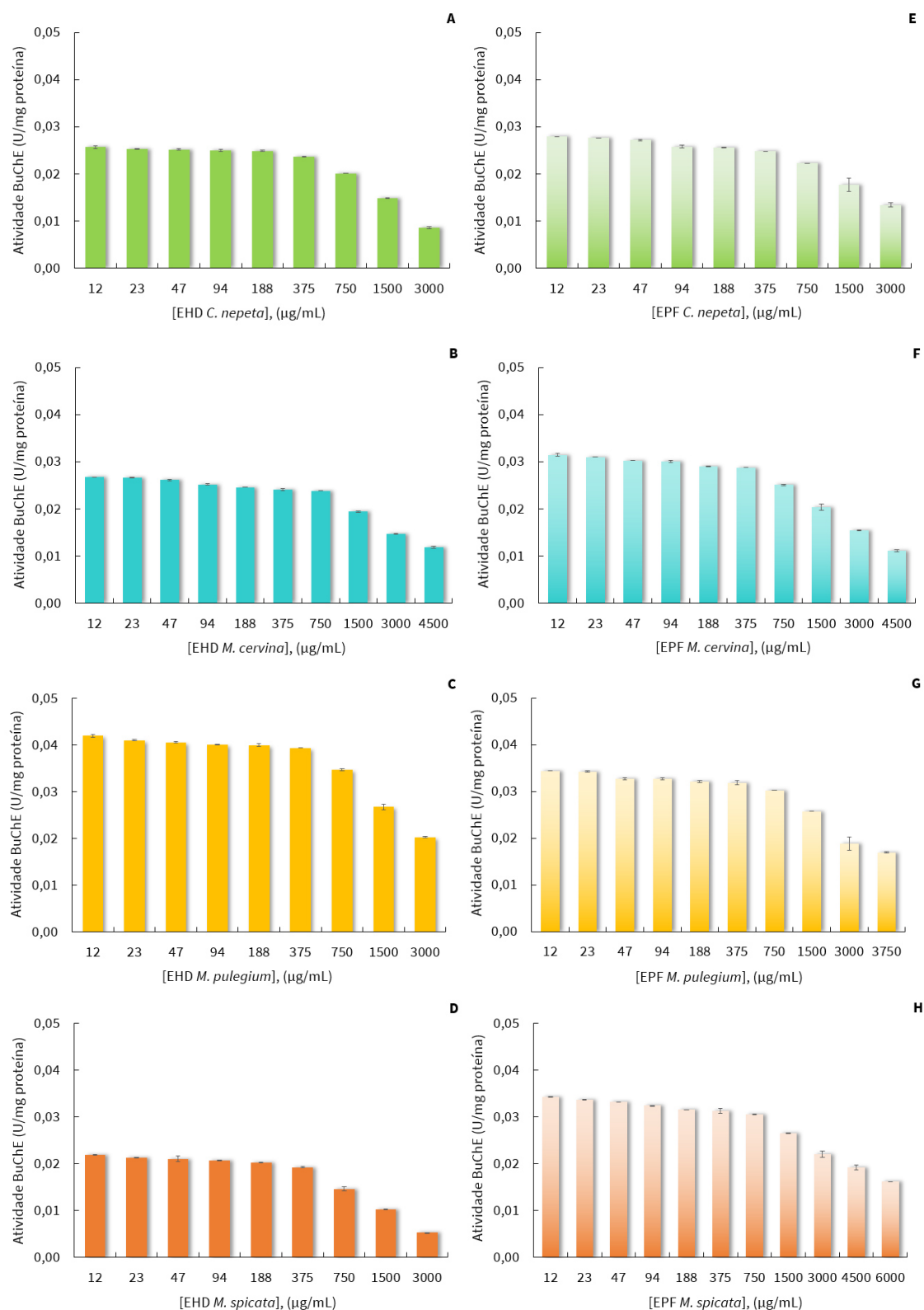


Figura 26. Perfis de atividade de BChE, para diferentes concentrações de EHD (A–D) e EPF (E–H).
A – EHD *C. nepeta*; **B** – EHD *M. cervina*; **C** – EHD *M. pulegium*; **D** – EHD *M. spicata*; **E** – EPF *C. nepeta*;
F – EPF *M. cervina*; **G** – EPF *M. pulegium*; **H** – EPF *M. spicata*.
 EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; BChE – Butirilcolinesterases.

O EHD de *M. spicata* destacou-se, também, pela elevada capacidade inibitória da atividade de BChE, proporcional à concentração (**Figura 26 D**).

Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de BChE, comparativamente aos EHD, sendo que os EPF de *C. nepeta* (**Figura 26 E**) e *M. cervina* (**Figura 26 F**) foram os mais ativos.

Os valores apresentados na **Figura 27** correspondem à percentagem de inibição da atividade de BChE, para diferentes concentrações de EHD (**Figura 27 A**) e EPF (**Figura 27 B**).

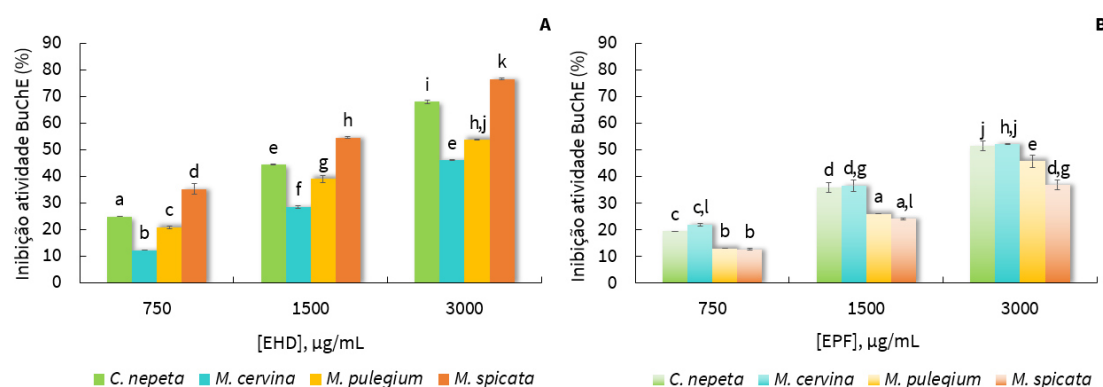


Figura 27. Potencial dos EHD (**A**) e EPF (**B**), para inibir a atividade de BChE.

EHD – Extrato de hidrodestilação; EPF – Extrato de planta fresca; BChE – Butirilcolinesterases.

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados $\pm$ desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas, para cada um dos gráficos, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nos EHD (**Figura 27 A**) e EPF (**Figura 27 B**), observou-se um aumento significativo da capacidade inibitória da atividade de BChE, proporcional ao aumento da concentração ($p < 0,05$).

O EHD de *M. spicata* foi o que revelou maior capacidade inibitória da atividade de BChE, com um valor de inibição de 35,3% de atividade para a concentração de 750 µg/mL, enquanto que os restantes EHD apresentaram valores compreendidos entre 12,3 e 24,9%.

Os EPF de *C. nepeta* e *M. cervina* apresentaram um perfil semelhante nas concentrações apresentadas. No que respeita aos EPF, o de *M. spicata* foi o que apresentou menor capacidade inibitória da atividade de BChE, com valores de inibição de 12,6, 24,1 e 36,9% de atividade para as concentrações de 750, 1500 e 3000 µg/mL, respetivamente.

5.5.3. Avaliação da capacidade inibitória da atividade de AChE e BChE

Na **Tabela 6** estão apresentados os valores de IC₅₀, no âmbito da capacidade dos extratos, como também do padrão galantamina, para inibir a atividade de AChE e BChE.

Tabela 6. Valores de IC₅₀ determinados para os extratos/padrão, no âmbito da sua capacidade para inibir a atividade de AChE e BChE.

	IC ₅₀ (µg/mL)			
	Capacidade inibitória da atividade de AChE		Capacidade inibitória da atividade de BChE	
	EHD	EPF	EHD	EPF
<i>C. nepeta</i>	2172,0 ± 87,7	3894,6 ± 215,1	1895,0 ± 32,3	2828,7 ± 166,7
<i>M. cervina</i>	3855,6 ± 111,3	6691,9 ± 267,4	3827,9 ± 154,0	2801,9 ± 112,9
<i>M. pulegium</i>	6273,3 ± 477,1	6739,5 ± 261,0	2754,6 ± 172,0	3779,2 ± 119,9
<i>M. spicata</i>	1271,2 ± 29,9	738,9 ± 20,3	1383,8 ± 57,3	5891,8 ± 221,8
Galantamina	0,5 ± 0,1		2,6 ± 0,1	

Em relação aos EHD, o de *M. spicata* foi o que apresentou maior capacidade inibitória da atividade de AChE (IC₅₀ = 1271,2 µg/mL), relativamente aos de *C. nepeta* (IC₅₀ = 2172,0 µg/mL), *M. cervina* (IC₅₀ = 3855,6 µg/mL) e *M. pulegium* (IC₅₀ = 6273,3 µg/mL). Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de AChE, comparativamente aos EHD. No que respeita aos EPF, o de *C. nepeta* foi o que revelou ser o mais promissor, com um valor de IC₅₀ de 3894,6 µg/mL. O padrão galantamina apresentou um valor de IC₅₀ de 0,5 µg/mL e, como tal, uma capacidade inibitória da atividade de AChE bastante superior à observada nos extratos em estudo. No estudo realizado por Vladimir-Knežević *et al.* (2014), os extratos etanólicos de *M. pulegium* não atingiram 50% de inibição da atividade de AChE.

Quanto aos EHD, o de *M. spicata* foi o que apresentou maior capacidade inibitória da atividade de BChE ($IC_{50} = 1383,8 \mu\text{g/mL}$), seguido dos de *C. nepeta* ($IC_{50} = 1895,0 \mu\text{g/mL}$), *M. pulegium* ($IC_{50} = 2754,6 \mu\text{g/mL}$) e *M. cervina* ($IC_{50} = 3827,9 \mu\text{g/mL}$). Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de BChE, comparativamente aos EHD. Relativamente aos EPF, os de *C. nepeta* e *M. cervina* foram os que apresentaram maior capacidade inibitória da atividade de BChE, com valores de IC_{50} de 2828,7 e 2801,9 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. O padrão galantamina apresentou um valor de IC_{50} de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ e, como tal, uma capacidade inibitória da atividade de BChE bastante superior à observada nos extratos em estudo. O estudo efetuado por Giacobini (2014) mostrou que a galantamina, apesar de inibir também a BChE, é cerca de 9 vezes mais seletiva para a AChE. Na literatura, um estudo refere que os extratos aquosos de *C. nepeta* apresentaram maior capacidade inibitória da atividade de BChE, comparativamente aos extratos aquosos de *M. spicata*, com valores de IC_{50} de 1669,9 e 1787,0 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente (Arantes *et al.*, 2017).

De referir, que os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata*, que apresentaram maior atividade inibitória de AChE e de BChE foram, também, os que apresentaram maior conteúdo em compostos fenólicos.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Numa primeira etapa, procedeu-se à caracterização da composição química dos extratos em estudo, efetuando a pesquisa fitoquímica, a qual revelou a presença de fenóis, taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, flavonoides, alcaloides e glúcidos.

Os EHD apresentaram um elevado conteúdo em fenóis totais, compreendido entre 24,5 e 69,6 µg EAG/mg extrato. Nos EPF, o teor em fenóis totais foi muito inferior ao observado para os EHD, tendo variado entre 10,0 e 31,2 µg EAG/mg extrato.

Relativamente ao conteúdo dos EHD em flavonoides totais, este variou entre 3,9 e 31,3 µg EQ/mg extrato. Nos EPF, o conteúdo em flavonoides totais foi muito inferior ao observado para os EHD, tendo variado entre 0,4 e 17,5 µg EQ/mg extrato.

No que respeita ao conteúdo dos EHD em taninos totais, este variou entre 61,3 e 315,8 µg EAT/mg extrato. Nos EPF, o conteúdo em taninos totais foi similar ao observado para os EHD, tendo variado entre 73,7 e 290,9 µg EAT/mg extrato.

O bioensaio de letalidade em *Artemia salina* revelou baixa ou muito baixa toxicidade para os extratos em estudo.

Os EHD apresentaram elevada atividade antioxidante pelos métodos do radical DPPH ($55 < IC_{50} < 208$), sistema β -caroteno/ácido linoleico ($153 < IC_{50} < 862$) e poder redutor total ($108 < IC_{50} < 324$), revelando, deste modo, potencial de captação de radicais livres, proteção de oxidação dos substratos lipídicos e capacidade redutora do Fe(III), respetivamente. Os EPF apresentaram muito baixa atividade antioxidante, comparativamente aos EHD.

Os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata* destacaram-se pela sua elevada capacidade antioxidante pelos diferentes mecanismos estudados, o que parece estar relacionado com o seu conteúdo em compostos fenólicos. De facto, os EHD de *C. nepeta* e *M. spicata* foram os que apresentaram maior conteúdo em fenóis, flavonoides e taninos totais, comparativamente aos restantes EHD. Nos EPF, o de *C. nepeta* foi o que apresentou

maior capacidade antioxidante pelos três mecanismos estudados, tendo também apresentado um conteúdo superior em fenóis, flavonoides e taninos totais, comparativamente aos restantes EPF.

Os EHD apresentaram elevada capacidade inibitória da atividade de CAT ($471 < IC_{50} < 1191$) e GPx ($80 < IC_{50} < 233$). Os EPF apresentaram muito baixa capacidade inibitória dos sistemas enzimáticos em estudo, relativamente aos EHD.

Os EHD revelaram, também, elevada capacidade inibitória da atividade de AChE ($1271 < IC_{50} < 6273$) e BChE ($1384 < IC_{50} < 3828$). Os EPF apresentaram menor capacidade inibitória da atividade de AChE e BChE, comparativamente aos EHD.

Em suma, os EHD apresentaram propriedades antioxidantes e neuroprotetoras bastante promissoras, assim como muito baixa toxicidade *in vitro*, com potencial aplicação nas indústrias alimentar e/ou farmacêutica.

No entanto, é fundamental aprofundar o conhecimento acerca das propriedades biológicas dos extratos em estudo, de forma a definir uma dose segura, pelo que seria relevante proceder:

- ❖ Avaliação da toxicidade *in vivo*, com determinação dos valores de DL_{50} em ratinhos *Swiss*;
- ❖ Avaliação da capacidade antioxidante para inibir outros sistemas enzimáticos envolvidos no *stress* oxidativo, como por exemplo, a capacidade inibitória da atividade de SOD, GST e GR;
- ❖ Avaliação do potencial neuroprotetor para outras patologias, como a DP, com avaliação da capacidade inibitória da atividade de MAO;
- ❖ Avaliação das propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e anti-tumorais dos extratos.

7. Referências bibliográficas

- Aaby, K., Hvattum, E. & Skrede, G. (2004). Analysis of Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Array Detection: Relationship to Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), pp.4595-4603.
- Akar, Z., Küçük, M. & Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), pp.640-647.
- Albarracin, S. L., Stab, B., Casas, Z., Sutachan, J. J., Samudio, I., Gonzalez, J., Gonzalo, L., Capani, F., Morales, L. & Barreto, G. E. (2012). Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutritional Neuroscience*, 15(1), pp.1-9.
- Anantachoke, N., Lomarat, P., Praserttirachai, W., Khammanit, R. & Mangmool, S. (2016). Thai Fruits Exhibit Antioxidant Activity and Induction of Antioxidant Enzymes in HEK-293 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, pp.1-14.
- Anyasor, G. N., Ogunwenmo, K. O., Oyelana, O. A. & Akpofunure, B. E. (2010). Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl. (Costaceae). *African Journal of Biotechnology*, 9(31), pp.4880-4884.
- Araniti, F., Graña, E., Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A. M. & Abenavoli, M. R. (2013). Individual and joint activity of terpenoids, isolated from *Calamintha nepeta* extract, on *Arabidopsis thaliana*. *Natural Product Research*, 27(24), pp.2297-2303.
- Arantes, S., Piçarra, A., Candeias, F., Teixeira, D., Caldeira, A. T. & Martins, M. R. (2017). Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo. *Natural Product Research*, 31(18), pp.2183-2187.

- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. & Koirala, N. (2019). Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4).
- Aziz, M. A. (2015). Qualitative phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Microcos paniculata* barks and fruits. *Journal of Integrative Medicine*, 13(3), pp.173-184.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.426-436.
- Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O. & Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), pp.760-766.
- Bergmeyer, H. U. (1983). *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie.
- Bertholf, R. L. (2014). Proteins and Albumin. *Laboratory Medicine*, 45(1), pp.e25-e41.
- Bhattacharya, A. (2019). *Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules*. 1st ed. Academic Press.
- Blainski, A., Lopes, G. C. & Mello, J. C. P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), pp.6852-6865.
- Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A. & Lima, G. P. P. (2017). Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*, pp.259-277.

- Brady, S., Siegel, G., Albers, R. W. & Price, D. (2012). *Basic Neurochemistry*. 8th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., Drifa, Y., Fahmi, E. M., Khodir, M. & Mohamed, C. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, pp.96-105.
- Deng, J., Chang, Y., Wen, C., Liao, J., Hou, W., Amagaya, S., Huang, S. & Huang, G. (2012). Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Vitis thunbergii* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats through anti-oxidative activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), pp.795-803.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), pp.88-95.
- Enechi, O. C. & Emilia, C. N. (2013). A New Colorimetric Method for the Determination of Proteins. *Advances in Biological Research*, 7(5), pp.159-162.
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100(4), pp.1511-1516.
- Flora Digital (2004). Flora Digital de Portugal, Jardim Botânico, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro. <https://jb.utad.pt/flora> (acedido em 6 Agosto, 2019).
- Flora-On (2012). Flora de Portugal interativa. Sociedade Portuguesa de Botânica. <https://flora-on.pt/> (acedido em 6 Agosto, 2019).

- Gaafar, A. A., Nooman, M. U., Ibrahim, E. A., Ali, M. M. & Al-kashef, A. S. (2018). Prophylactic and Therapeutic Uses of Egyptian *Mentha spicata* L., *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Stalks as Agro-industrial Byproducts. *Journal of Biological Sciences*, 18(7), pp.354-363.
- Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, 50(4), pp.433-440.
- Gonçalves, M. J., Vicente, A. M., Cavaleiro, C. & Salgueiro, L. (2007). Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal. *Natural Product Research*, 21(10), pp.867-871.
- Gonçalves, S., Moreira, E., Grosso, C., Andrade, P. B., Valentão, P. & Romano, A. (2016). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *Journal of Food Science and Technology*, 54(1), pp.219-227.
- Goze, I., Alim, A., Tepe, A. S., Sokmen, M., Sevgi, K. & Tepe, B. (2009). Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(4), pp.246-254.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G. & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International Centre for Science and High Technology.
- Henry, J. (2012). *Advances in Food and Nutrition Research*. San Diego: Academic Press.
- Hroudová, J., Singh, N., Fišar, Z. & Ghosh, K. K. (2016). Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, pp.774-784.

- Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, pp.287-293.
- INFARMED (2008). *Farmacopeia Portuguesa IX*. INFARMED, Ministério da Saúde, Lisboa, Portugal.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T. & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3), pp.261-264.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. & Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, pp.26-38.
- Joslyn, M. A. (1950). *Methods in Food Analysis Applied to Food Products*. Academic Press.
- Karchesy, Y. M., Kelsey, R. G., Constantine, G. & Karchesy, J. J. (2016). Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *SpringerPlus*, 5(1).
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J., Jeong, H. & Kim, J. H. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(2), pp.167-179.
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P. & Zuo, L. (2017). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp.1-11.
- Mahboubi, M. & Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), pp.325-327.

- Mahboubi, M. (2017). *Mentha spicata* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 26, pp.1-4.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C. & Salgueiro, L. (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Natural Product Research*, 24(18), pp.1734-1742.
- Martins, M. R., Tinoco, M. T., Almeida, A. S. & Cruz-Morais, J. (2012). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Three Essential Oils from Portuguese Flora. *Journal of Pharmacognosy*, 3(1), pp.39-44.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103(3), pp.778-786.
- Matos, F. J. A. (1988). *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Edições UFC.
- MicroBioTests (2001). https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/05/Artemia-toxicity-test_Artoxkit-M_Bench-protocol.pdf (acedido em 12 Outubro, 2019).
- Miguel, M., Barros, L., Pereira, C., Calhelha, R. C., Garcia, P. A., Castro, M. A., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food & Function*, 7(5), pp.2223-2232.
- Mushtaq, G., Greig, N. H., Khan, J. A. & Kamal, M. A. (2014). Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13(8), pp.1432-1439.

- Ncube, B. & Staden, J. V. (2015). Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. *Molecules*, 20(7), pp.12698-12731.
- Nickavar, B., Alinaghi, A. & Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), pp.203-209.
- Nordberg, A., Ballard, C., Bullock, R., Darreh-Shori, T. & Somogyi, M. (2013). A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *The Primary Care Companion For CNS Disorders*, 15(2).
- Ohikhena, F. U., Wintola, O. A. & Afolayan, A. J. (2016). Toxicity Assessment of Different Solvent Extracts of the Medicinal Plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). *International Journal of Pharmacology*, 12(7), pp.701-710.
- Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S., Marciano, S., Bauer, R. & Monaco, P. (2015). Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Research International*, 69, pp.121-132.
- Palić, I. R., Ickovski, J. D., Đorđević, A. S., Mitić, V. D., Jovanović, V. P. S. & Stojanović, G. S. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and solvent extracts of *Mentha pulegium* L. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology*, 13(2), pp.109-119.
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G. & Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), pp.395-400.

- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L. & Bogdanov, S. (2004). Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochemical Analysis*, 15(4), pp.235-240.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O. & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Rodrigues, L., Póvoa, O., Berg, C. V. D., Figueiredo, A. C., Moldão, M. & Monteiro, A. (2013). Genetic diversity in *Mentha cervina* based on morphological traits, essential oils profile and ISSRs markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, pp.50-59.
- Samarth, R. M., Samarth, M. & Matsumoto, Y. (2017). Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity. *Future Science OA*, 3(4).
- Sarikurkcü, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G. & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), pp.2479-2483.
- Sarikurkcü, C., Eryigit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Cakir, A. & Mete, E. (2012). Screening of the Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Mentha pulegium* L. From Turkey. *Spectroscopy Letters*, 45(5), pp.352-358.
- Scherer, R. & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), pp.654-658.
- Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L. & Silva, A. G. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, pp.408-413.
- Shalaby, E. & Azzam, G. M. (2018). *Antioxidants in foods and its applications*. IntechOpen.

- Singh, R., Singh, S., Kumar, S. & Arora, S. (2007). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry*, 103(2), pp.505-511.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, pp.152-178.
- Soni, P., Soni, V., Patidar, L. & Rijhwani, N. (2015). Spectrophotometric Estimation of Total Tannin Content in Some Ayurvedic Eye Drops. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*, 7(3), pp.131-133.
- Stringaro, A., Colone, M. & Angiolella, L. (2018). Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. *Medicines*, 5(4).
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A. & Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100(3), pp.985-989.
- Ullah, N., Khurram, M., Amin, M. U., Afridi, H. H., Khan, F. A., Khayam, S. M. U., Ullah, S., Najeeb, U., Hussain, J. & Khan, M. A. (2011). Comparison of Phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Mentha spicata* from four northern districts of Khyber pakhtunkhwa. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), pp.72-76.
- Universidade de Évora (2018). Patente de invenção Nacional nº 110047, *New process for preparation of bioactive extracts from aromatic plants*, refª DP/01/2018/65953/2018.
- Unzeta, M., Esteban, G., Bolea, I., Fogel, W. A., Ramsay, R. R., Youdim, M. B. H., Tipton, K. F. & Marco-Contelles, J. (2016). Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 10.

Verheye, W. H. (2010). *Soils, plant growth and crop production*. Oxford: Eolss Publishers.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D. & Brantner, A. H. (2014). Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules*, 19(1), pp.767-782.

8. Anexos

I. Caracterização química dos extratos

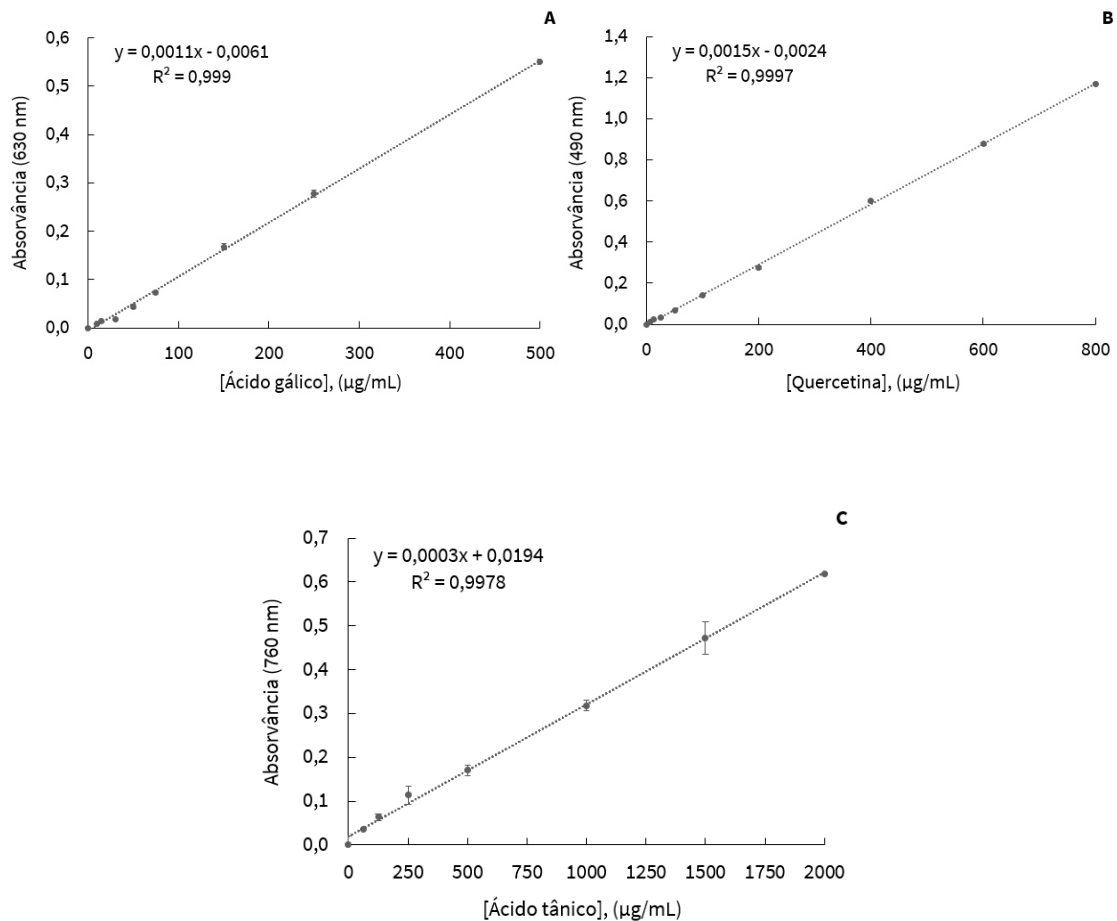


Figura 28. Curvas de calibração dos padrões, utilizadas para quantificação do conteúdo dos extratos em fenóis, flavonoides e taninos totais.

A – Ácido gálico; **B** – Quercetina; **C** – Ácido tânico.

II. Análise estatística

Tabela 7. Análise de variância ANOVA para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em fenóis, flavonoides e taninos totais.

ANOVA

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Fenóis_totais	Entre Grupos	10600,705	7	1514,386	1871,713	,000
	Nos grupos	12,945	16	,809		
	Total	10613,651	23			
Flavonoides_totais	Entre Grupos	2368,543	7	338,363	3089,582	,000
	Nos grupos	1,752	16	,110		
	Total	2370,295	23			
Taninos_totais	Entre Grupos	252385,222	7	36055,032	1694,282	,000
	Nos grupos	340,487	16	21,280		
	Total	252725,709	23			

Tabela 8. Teste de Tukey para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em fenóis totais.

Fenóis_totais

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
EPF <i>M. pulegium</i>	3	9,9880	14,6550	24,4730	31,2000	46,1220	57,4490	69,6120
EPF <i>M. spicata</i>	3	11,0640						
EPF <i>M. cervina</i>	3							
EHD <i>M. cervina</i>	3							
EPF <i>C. nepeta</i>	3							
EHD <i>M. pulegium</i>	3							
EHD <i>M. spicata</i>	3							
EHD <i>C. nepeta</i>	3							

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 9. Teste de Tukey para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em flavonoides totais.

Flavonoides_totais

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
EPF <i>M. cervina</i>	3	,3970						
EPF <i>M. spicata</i>	3		1,1870					
EPF <i>M. pulegium</i>	3		1,4530					
EHD <i>M. cervina</i>	3			3,9200				
EHD <i>M. pulegium</i>	3				7,8870			
EHD <i>M. spicata</i>	3					10,8530		
EPF <i>C. nepeta</i>	3						17,5200	
EHD <i>C. nepeta</i>	3							31,2530

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 10. Teste de Tukey para quantificação do conteúdo dos EHD e EPF em taninos totais.

Taninos_totais

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
EHD <i>M. cervina</i>	3	61,2870						
EPF <i>M. spicata</i>	3		73,6890					
EPF <i>M. pulegium</i>	3			92,9670				
EPF <i>M. cervina</i>	3				112,1000			
EHD <i>M. pulegium</i>	3					131,9070		
EPF <i>C. nepeta</i>	3						290,8670	
EHD <i>M. spicata</i>	3						298,3730	
EHD <i>C. nepeta</i>	3							315,7530

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 11. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do radical DPPH.

ANOVA

DPPH

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	37848,096	29	1305,107	38287,310	,000
Nos grupos	2,045	60	,034		
Total	37850,142	89			

Tabela 12. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do radical DPPH.

Tukey B^a

DPPH

Subconjunto para $\alpha = 0.05$

Extrato	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
EPF M	3	,0000																										
spicata_60_u/ml	3		4,1023																									
EPF M	3			6,2917																								
spicata_120_u/ml	3				6,4000																							
ácido_ascórtico_1_5_u/ml	3					8,9970																						
EPF M	3						10,5840																					
spicata_60_u/ml	3							12,6217																				
EHD M	3								15,2693																			
quercetina_1_5_u/ml	3								15,6580																			
EHD M	3									16,1830																		
ácido_ascórtico_3_u/ml	3										17,2380																	
EHD M	3											18,6997																
spicata_60_u/ml	3												20,8797															
EPF C nepeta_60_u/ml	3													22,3660														
EPF M	3														28,7250													
pulegium_120_u/ml	3															29,3860												
EPF M	3																30,3173											
spicata_120_u/ml	3																30,5460											
EHD M	3																	33,8497										
spicata_30_u/ml	3																		34,6967									
EHD M	3																			35,9650								
pulegium_60_u/ml	3																				48,0873							
quercetina_3_u/ml	3																					49,0733						
EHD M	3																						49,8393					
spicata_120_u/ml	3																							52,6050				
EPF C	3																								56,8420			
quercetina_6_u/ml	3																									60,4130		
EPF C	3																										66,6917	
spicata_480_u/ml	3																											67,4500
EHD M	3																											
spicata_120_u/ml	3																											
EHD C	3																											71,3603

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.
a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3.000.

Tabela 13. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

ANOVA

b_caroteno

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	23754,894	29	819,134	7312,970	,000
Nos grupos	6,721	60	,112		
Total	23761,614	89			

Tabela 14. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

b_caroteno

Tukey B^a

Extrato		N	Subconjunto para alfa = 0.05																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
EPF M. pulegium_200_ug/mL	3	.0000																					
EPF M. pulegium_400_ug/mL	3	.0000																					
EPF M. pulegium_50_ug/mL	3		4,7447																				
EPF M. spicata_50_ug/mL	3			6,5830																			
EPF M. cervina_50_ug/mL	3				8,6873																		
ácido ascórbico_200_ug/mL	3					13,5110																	
EPF M. cervina_200_ug/mL	3					13,9010																	
EPF M. cervina_400_ug/mL	3						16,5080																
EPF M. spicata_200_ug/mL	3							17,7030															
EHD M. cervina_50_ug/mL	3								20,4283														
EPF M. spicata_400_ug/mL	3									23,2623													
EHD M. pulegium_50_ug/mL	3										26,9423												
EPF C.nepeta_50_ug/mL	3										27,1157												
EHD C.nepeta_50_ug/mL	3										27,4130												
EHD M. cervina_100_ug/mL	3										27,6280												
ácido ascórbico_400_ug/mL	3											31,3737											
EHD M. spicata_50_ug/mL	3												32,6850										
quercetina_1_ug/mL	3													33,6760									
EHD M. cervina_200_ug/mL	3														34,8277								
EHD M. pulegium_100_ug/mL	3															34,9420							
EPF C. nepeta_200_ug/mL	3																41,2903						
EHD C. nepeta_100_ug/mL	3																	41,4390					
EHD M. pulegium_200_ug/mL	3																		42,9417				
EHD M. spicata_100_ug/mL	3																		42,9610				
quercetina_2_ug/mL	3																			44,8853			
EPF C. nepeta_400_ug/mL	3																				48,3780		
ácido ascórbico_800_ug/mL	3																					49,2363	
EHD M. spicata_200_ug/mL	3																						53,2373
EHD C. nepeta_200_ug/mL	3																						55,4653
quercetina_4_ug/mL	3																						56,0950

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.
 a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 15. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do poder redutor total.

ANOVA

poder_redutor

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	14774,467	29	509,464	45331,301	,000
Nos grupos	,674	60	,011		
Total	14775,142	89			

Tabela 16. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD, EPF e padrões, pelo método do poder redutor total.

poder_redutor

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alpha = 0.05																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
EPF M	3	.0000																									
spicata_96_ujml	3	.0000																									
EPF M	3		.4857																								
spicata_192_ujml	3			.4857																							
EPF M	3				.4510																						
spicata_48_ujml	3					.53397																					
EPF M	3						.59130																				
cervina_48_ujml	3							.69197																			
EHD M	3								.83900																		
cervina_24_ujml	3									.85437																	
EPF M	3										.89157																
cervina_48_ujml	3											.94190															
ácido_ascórbico_1_ujml	3												.103003														
EPF M	3													.121640													
pulegium_96_ujml	3														.124393												
EHD M	3															.125027											
spicata_24_ujml	3																.133980										
EHD C. nepeta_24_ujml	3																	.160677									
EPF C. nepeta_48_ujml	3																		.162550								
quercetina_2_ujml	3																			.165693							
EHD M	3																				.190747						
cervina_96_ujml	3																					.201047					
EHD M	3																						.224220				
spicata_48_ujml	3																							.228517			
EPF C. nepeta_96_ujml	3																								.231600		
EHD C. nepeta_48_ujml	3																									.263553	
quercetina_4_ujml	3																										.319840
EHD M	3																										.414770
pulegium_96_ujml	3																										.429370
ácido_ascórbico_4_ujml	3																										.435490
EHD M	3																										.446020
spicata_96_ujml	3																										
EPF C. nepeta_192_ujml	3																										
EHD C. nepeta_96_ujml	3																										

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3.000.

Tabela 17. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do radical DPPH.

ANOVA

Equivalentes_acido_ascorbico_DPPH

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	61085,528	7	8726,504	586,969	,000
Nos grupos	237,873	16	14,867		
Total	61323,402	23			

Tabela 18. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do radical DPPH.

Equivalentes_acido_ascorbico_DPPH

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
EPF <i>M. spicata</i>	3	6,5830					
EPF <i>M. cervina</i>	3		16,1390				
EPF <i>M. pulegium</i>	3		16,8050				
EPF <i>C. nepeta</i>	3			34,9030			
EHD <i>M. cervina</i>	3			39,1340			
EHD <i>M. pulegium</i>	3				77,3790		
EHD <i>M. spicata</i>	3					126,5100	
EHD <i>C. nepeta</i>	3						149,1650

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 19. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

ANOVA

Equivalentes_ácido_ascorbico_b_caroteno

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	73509016,892	6	12251502,815	520,654	,000
Nos grupos	329433,742	14	23530,982		
Total	73838450,633	20			

Tabela 20. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.**Equivalentes_ácido_ascorbico_b_caroteno**Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
EPF <i>M. cervina</i>	3	400,2530				
EHD <i>M. cervina</i>	3		956,2160			
EPF <i>M. spicata</i>	3		1146,9830			
EPF <i>C. nepeta</i>	3			1757,9270		
EHD <i>M. pulegium</i>	3				2235,1840	
EHD <i>M. spicata</i>	3					5125,7680
EHD <i>C. nepeta</i>	3					5397,8570

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 21. Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do poder redutor total.**ANOVA**

equivalentes_acido_ascorbico_poder_redutor

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	4109,586	6	684,931	339,914	,000
Nos grupos	28,210	14	2,015		
Total	4137,796	20			

Tabela 22. Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante dos EHD e EPF, expressa em EAA, pelo método do poder redutor total.

equivalentes_acido_ascorbico_poder_redutor

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
EPF <i>M. cervina</i>	3	8,2970	14,8200	21,6190	31,7770	42,6360
EPF <i>M. pulegium</i>	3	9,3920				
EHD <i>M. cervina</i>	3					
EPF <i>C. nepeta</i>	3					
EHD <i>M. pulegium</i>	3					
EHD <i>M. spicata</i>	3					42,6360
EHD <i>C. nepeta</i>	3					44,3870

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 23. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de CAT.

ANOVA

Inibição_catalase

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	23973,989	23	1042,347	8104,494	,000
Nos grupos	6,173	48	,129		
Total	23980,162	71			

Tabela 24. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de CAT.

Inibição_catalase

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
EPF M. pulegium_1000	3	,0000																
EPF M. cervina_1000	3		1,2517															
EPF M. cervina_100	3		1,9817															
EPF M. pulegium_500	3			3,9273														
EPF C. nepeta_100	3				6,7240													
EPF M. pulegium_100	3				7,5557													
EHD M. pulegium_100	3					9,1890												
EPF M. spicata_100	3					9,5190												
EHD C. nepeta_100	3						10,8297											
EHD M. cervina_100	3						11,4290	11,4290										
EPF C. nepeta_500	3						11,5673	11,5673										
EPF M. cervina_500	3							11,9527										
EHD M. spicata_100	3								13,8000									
EHD M. cervina_250	3									15,3297								
EHD M. pulegium_250	3										16,6403							
EHD M. pulegium_500	3											20,2680						
EHD M. cervina_500	3												22,2030					
EHD M. spicata_250	3												22,3527					
EHD C. nepeta_250	3													27,0717				
EPF M. spicata_500	3														38,2207			
EPF C. nepeta_1000	3															53,1537		
EHD C. nepeta_500	3															53,5217		
EHD M. spicata_500	3																55,3477	
EPF M. spicata_1000	3																	63,2590

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 25. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de GPx.

ANOVA

Inibição_glutatioono_peroxidase

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	63600,907	23	2765,257	55336,494	,000
Nos grupos	2,399	48	,050		
Total	63603,306	71			

Tabela 26. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de GPx.

Inibição *glutathione_peroxidase*

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
EPF M. spicata_20	3	,2190																			
EHD M. cervina_30	3	,3067																			
EPF M. pulegium_20	3		1,8563																		
EHD C. nepeta_30	3		2,1580																		
EPF M. spicata_100	3			4,2633																	
EHD M. pulegium_30	3			4,7297																	
EPF C. nepeta_20	3				8,4863																
EPF M. cervina_20	3					9,0370															
EPF M. pulegium_100	3						16,7197														
EHD M. spicata_30	3							17,8533													
EPF M. cervina_100	3								22,0400												
EHD M. cervina_120	3									23,6753											
EHD M. pulegium_120	3										30,1880										
EPF C. nepeta_100	3											31,3450									
EPF M. spicata_1000	3												32,0753								
EHD M. spicata_120	3												32,1160								
EPF M. pulegium_1000	3													43,5980							
EHD M. cervina_480	3														56,3840						
EPF M. cervina_1000	3															59,9277					
EHD M. pulegium_480	3																65,9227				
EHD C. nepeta_120	3																	72,4120			
EHD M. spicata_480	3																		75,5770		
EPF C. nepeta_1000	3																			90,4607	
EHD C. nepeta_480	3																				100,0000

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 27. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de AChE.**ANOVA**inibição *acetilcolinesterase*

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	26089,304	23	1134,318	2263,330	,000
Nos grupos	24,056	48	,501		
Total	26113,361	71			

Tabela 28. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de AChE.

inibição_acetilcolinesterase																				
Tukey B ^a																				
		Subconjunto para alfa = 0.05																		
Extrato	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
EPF_M	3	7,4700																		
spicata_6000_ug/mL	3		10,4720																	
EHD_M	3			13,6950																
cervina_750_ug/mL	3																			
EHD_M	3			13,7630																
pulegium_750_ug/mL	3																			
EPF_M	3			15,0160																
cervina_1500_ug/mL	3																			
EPF_M	3				20,2130															
EHD_C	3																			
nepeta_750_ug/mL	3					23,2900														
EHD_M	3																			
cervina_1500_ug/mL	3																			
EPF_M	3						25,7200													
spicata_3000_ug/mL	3																			
EPF_C	3							27,5500												
nepeta_1500_ug/mL	3								29,9830											
EHD_M	3									31,0280										
pulegium_1500_ug/mL	3										31,0280									
EPF_M	3											32,0810								
cervina_3000_ug/mL	3												32,0810							
EPF_M	3																			
pulegium_3000_ug/mL	3																			
EHD_M	3																			
spicata_750_ug/mL	3																			
EHD_M	3																			
cervina_3000_ug/mL	3												39,2690							
EHD_C	3																			
nepeta_1500_ug/mL	3												40,1200	40,1200						
EPF_C	3																			
nepeta_3000_ug/mL	3													41,2270						
EHD_M	3																			
pulegium_3000_ug/mL	3														46,8420					
EPF_M	3																			
spicata_1500_ug/mL	3														48,3180	48,3180				
EPF_M	3																			
cervina_6000_ug/mL	3															48,8220	48,8220			
EPF_M	3																			
pulegium_6000_ug/mL	3																50,3100			
EHD_M	3																			
spicata_1500_ug/mL	3																	57,1900		
EHD_C	3																			
nepeta_3000_ug/mL	3																		61,6050	
EPF_C	3																			
nepeta_6000_ug/mL	3																			72,9130
EHD_M	3																			
spicata_3000_ug/mL	3																			80,3430

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

Tabela 29. Análise de variância ANOVA para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de BChE.**ANOVA**

inibição_butirilcolinesterase

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	20561,515	23	893,979	826,311	,000
Nos grupos	51,931	48	1,082		
Total	20613,446	71			

Tabela 30. Teste de Tukey para avaliação da capacidade inibitória dos EHD e EPF, no âmbito da atividade de BChE.

inibição_butirilcolinesterase

Tukey B^a

Extrato	N	Subconjunto para alfa = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EHD_M. cervina_750_ug/mL	3	12,2600											
EPF_M. spicata_750_ug/mL	3	12,6160											
EPF_M. pulegium_750_ug/mL	3	12,9900											
EPF_C. nepeta_750_ug/mL	3		19,3800										
EHD_M. pulegium_750_ug/mL	3		20,9060										
EPF_M. cervina_750_ug/mL	3		21,9990	21,9990									
EPF_M. spicata_1500_ug/mL	3			24,1260	24,1260								
EHD_C. nepeta_750_ug/mL	3				24,8700								
EPF_M. pulegium_1500_ug/mL	3				25,9000								
EHD_M. cervina_1500_ug/mL	3					28,5040							
EHD_M. spicata_750_ug/mL	3						35,2510						
EPF_C. nepeta_1500_ug/mL	3						35,9180						
EPF_M. cervina_1500_ug/mL	3						36,5320	36,5320					
EPF_M. spicata_3000_ug/mL	3						36,8530	36,8530					
EHD_M. pulegium_1500_ug/mL	3							39,0770					
EHD_C. nepeta_1500_ug/mL	3								44,3860				
EPF_M. pulegium_3000_ug/mL	3								45,7140				
EHD_M. cervina_3000_ug/mL	3								46,0330				
EPF_C. nepeta_3000_ug/mL	3									51,4710			
EPF_M. cervina_3000_ug/mL	3									52,0670	52,0670		
EHD_M. pulegium_3000_ug/mL	3									53,7190	53,7190		
EHD_M. spicata_1500_ug/mL	3										54,5560		
EHD_C. nepeta_3000_ug/mL	3											67,9520	
EHD_M. spicata_3000_ug/mL	3												76,5950

São exibidas as médias para os grupos em subconjuntos homogêneos.

a. Usa o tamanho de amostra de média harmônica = 3,000.

