

Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

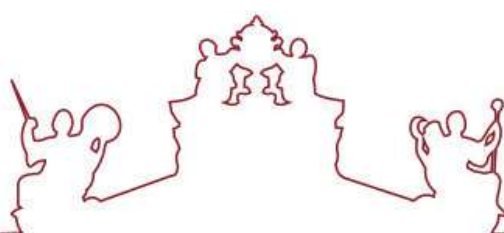
Tese de Doutoramento

**Óleos essenciais de plantas aromáticas do Alentejo:
caracterização química e potencial fitoterapêutico**

Sílvia Alexandra Macedo Arantes

Orientador(es) | Ana Teresa Caldeira
Maria do Rosário Martins

Évora 2020



Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

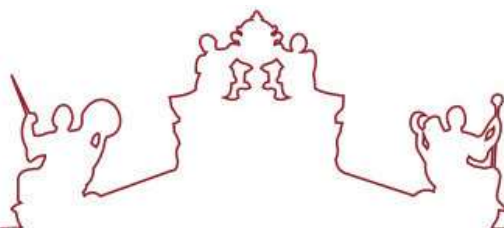
Tese de Doutoramento

**Óleos essenciais de plantas aromáticas do Alentejo:
caracterização química e potencial fitoterapêutico**

Sílvia Alexandra Macedo Arantes

Orientador(es) | Ana Teresa Caldeira
Maria do Rosário Martins

Évora 2020



A tese de doutoramento foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Instituto de Investigação e Formação Avançada:

- Presidente | Diogo Figueiredo (Universidade de Évora)
- Vogal | Nelson Manuel Viana da Silva Lima (Universidade do Minho)
- Vogal | António Manuel Deométrio Rodrigues Lourenço Pereira (Universidade de Évora)
- Vogal | José António Mestre Prates (Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária)
- Vogal | Ana Cristina da Silva Figueiredo (Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências)
- Vogal-orientador | Maria do Rosário Martins (Universidade de Évora)

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e
nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos
benfeitores do mundo.”
(Walter S. Landor)

Ao meu pai,
que, recentemente,
deixou um grande vazio na minha vida.
Contigo aprendi a ser forte, a ser destemida...
Ficou a ausência física,
mas o tempo jamais poderá apagar as memórias.

Á minha mãe,
por todo o apoio e incentivo.
Convosco aprendi a não desistir
e a perseguir os sonhos.

Á minha irmã,
ao Sérgio Fialho
e à Carla Boal,
pelo suporte e pela paciência.
Mais do que companheiros de jornada,
um porto de abrigo.

Agradecimentos

Às minhas orientadoras Professoras Doutora Maria do Rosário Martins e Doutora Ana Teresa Caldeira sou grata pela orientação, disponibilidade, motivação, compreensão, amizade e auxílio nas dificuldades ao longo de todo o trabalho. Agradeço ainda pelo carinho e compreensão demonstrados nos momentos mais difíceis.

À Prof.^a Doutora Marízia Pereira pela disponibilidade, apoio nos estudos etnobotânicos e identificação das plantas.

À Dr.^a Fátima Candeias pelo auxílio e disponibilidade nos estudos toxicológicos e farmacológicos com animais. Sou grata pela importante colaboração na realização dos ensaios e pela sua constante disponibilidade, interesse e transmissão de conhecimentos nestas aplicações.

Ao Prof. Doutor Orlando Lopes e à Dr.^a Mónica Lima pela disponibilidade, auxílio, e apoio na realização das preparações histológicas e respetiva análise.

À Prof.^a Doutora Dora Teixeira pelos conhecimentos transmitidos acerca da técnica de GC-MS.

Às colegas de laboratório, Doutora Cátia Salvador e Mestre Andreia Piçarra, pela companhia, auxílio e amizade.

À Anabela Cabeça, D. Jesuína Mosca, D. Esperança Alves e D. Maria Helena Carvalho pela ajuda indispensável no laboratório, pela disponibilidade e amizade.

Ao Laboratório HERCULES, ao ICAAM e ao Departamento de Química da Universidade de Évora, pela disponibilização de espaço, reagentes e equipamentos sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

À minha família, principalmente, aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio e carinho em todos os momentos. Ao Sérgio Fialho, pelo suporte emocional em todos as horas, e à sua família e à Carla Boal, por todo o auxílio e suporte. Sem vós jamais teria começado e concluído este trabalho. A todos os meus amigos.

OBRIGADA! Sílvia.

Resumo

Óleos essenciais de plantas aromáticas do Alentejo: caracterização química e potencial fitoterapêutico

O Alentejo é uma região extremamente rica em plantas aromáticas e medicinais (PAM) muitas delas preservadas e consumidas em dietas diárias e também como ingredientes importantes na Dieta Mediterrânea. Adicionalmente, a par do crescente interesse dos produtos naturais como alternativas/complementos à terapêutica convencional, muitos são comercializados e adquiridos sem prescrição médica, regularmente usados em detrimento dos fármacos convencionais. De modo a possibilitar uma utilização segura das plantas e/ou dos seus óleos essenciais (OEs), é necessário um conhecimento preciso da relação entre a sua composição química, a sua toxicidade e as suas propriedades farmacológicas e mecanismos de ação envolvidos.

Para este trabalho foram selecionadas algumas plantas aromáticas autóctones do Alentejo, utilizadas frequentemente como condimentos alimentares: *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (rosmaninho), *Lavandula pedunculata* (rosmaninho-maior), *Lavandula viridis* (rosmaninho-verde), *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (erva-das-azeitonas), *Mentha spicata* (hortelã-vulgar), *Mentha pulegium* (poejo), *Origanum vulgare* subsp. *virens* (orégão), *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* (tomilho bela-luz) e *Foeniculum vulgare* L. (funcho), com vista a caracterizar a composição química dos óleos essenciais das diferentes espécies, parte vegetativa (folha) e espiga floral, e avaliar as propriedades antioxidante, neuroprotetora, antitumoral, antimicrobiana, toxicológica, analgésica e anti-inflamatória de alguns dos seus óleos essenciais mais promissores.

Os resultados mostraram importantes diferenças na composição química dos óleos essenciais, quanto à diversidade e à proporção dos seus constituintes. Os óleos

essenciais apresentaram importantes atividades biológicas, nomeadamente como antioxidantes, podendo inibir o *stress* oxidativo e prevenir os distúrbios associados; capacidade antiproliferativa em linhas celulares do cancro da mama MDA-MB-231; e importantes propriedades antimicrobianas, apresentando um largo espectro de ação face a bactérias e fungos filamentosos. Os estudos toxicológicos e farmacológicos mostraram que os óleos essenciais apresentaram citotoxicidade em *Artemia salina*, e baixa toxicidade em ratinhos; e que possuem importantes propriedades analgésica e anti-inflamatória.

Estes resultados indicam o seu potencial uso para aplicações farmacológicas como agentes nutracêuticos e/ou fitoterapêuticos.

Palavras-chave: óleos essenciais; *stress* oxidativo; atividade antimicrobiana; toxicidade; atividades analgésica e anti-inflamatória

Abstract

Essential oils of aromatic plants from Alentejo: chemical composition and phytotherapeutic potential

Alentejo is a very rich region of aromatic and medicinal plants, many them preserved and consumed in daily diets as well as important ingredients in the Mediterranean Diet. along with the growing interest in natural products as alternatives to complementary to conventional therapy, many are marketed and purchased without prescription, regularly used to the detriment of conventional drugs. In order to enable safe use of plants and/or their essential oils (EOs), precise and scientific knowledge of the relationship between their chemical composition, their toxicity and their pharmacological properties and mechanisms of action is required.

For this study, some native aromatic plants from Alentejo, often used as food condiments, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*, *Lavandula pedunculata*, *Lavandula viridis*, *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta*, *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Origanum vulgare* subsp. *virens*, *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* and *Foeniculum vulgare* L., were selected in order to characterize the chemical composition of the essential oils of the different species, vegetative part (leaf) and flower, and to evaluate the antioxidant, neuroprotective, antitumoral, antimicrobial, toxicological, analgesic and anti-inflammatory properties of some of its most promising essential oils.

The results showed important differences in the chemical composition of essential oils, in terms of diversity and proportion of their constituents. Essential oils showed important biological activities, namely as antioxidants, with ability to inhibit oxidative stress and prevent their associated disorders; antiproliferative capacity in breast cancer cell lines MDA-MB 231; and important antimicrobial properties, presenting a broad spectrum of action against bacteria and filamentous fungi. In

toxicological and pharmacological studies, EOS showed that the EOs showed cytotoxicity in brine shrimp, and low toxicity in mice; and have important analgesic and anti-inflammatory properties.

These results suggest their potential use for pharmacological applications as nutraceutical and / or phytotherapeutic agents.

Keywords: essential oils; oxidative stress; antimicrobial activity; toxicity; analgesic and anti-inflammatory activities

Índice geral

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice geral	VII
Índice de quadros	XI
Índice de figuras	XII
Abreviaturas	XV
Unidades.....	XVII
Objetivos e metodologia do trabalho.....	XIX
Estrutura da dissertação.....	XXI
Capítulo I – Introdução - Óleos essenciais: principais propriedades biológicas e potenciais aplicações	1
1.1. Introdução.....	3
1.1.1. Família Lamiaceae (Labiatae).....	8
1.1.1.1. <i>Lavandula</i> spp.	8
1.1.1.1.1. <i>Lavandula luisieri</i> ou <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	9
1.1.1.1.2. <i>Lavandula pedunculata</i>	11
1.1.1.1.3. <i>Lavandula viridis</i>	12
1.1.1.2. <i>Calamintha nepeta</i> (L) Savi subsp. <i>nepeta</i>	13
1.1.1.3. <i>Mentha</i> spp.	13
1.1.1.3.1. <i>Mentha spicata</i> L.....	14
1.1.1.3.2. <i>Mentha pulegium</i> L.	15
1.1.1.4. <i>Origanum virens</i> Hoffmanns. & Link.....	16
1.1.1.5. <i>Thymus mastichina</i>	17
1.1.2. Família Apiaceae	18
1.1.3. <i>Foeniculum vulgare</i> L.	18
Capítulo II – Avaliação da composição química dos óleos essenciais de plantas aromáticas do Alentejo	19
2.1. Introdução.....	21

2.3.	Metodologia.....	25
2.3.1.	Reagentes.....	25
2.3.2.	Material vegetal.....	25
2.3.3.	Extração dos óleos essenciais	27
2.3.4.	Caracterização dos óleos essenciais	27
2.3.4.1.	Análise por GC-FID	27
2.3.4.2.	Análise GC-MS.....	28
2.4.	Resultados e discussão	30
Capítulo III – <i>Screening</i> de atividade biológica dos óleos essenciais		51
3.1.	Introdução.....	53
3.2.	Metodologia.....	58
3.2.1.	Reagentes.....	58
3.2.2.	Avaliação da atividade antioxidante.....	58
3.2.2.1.	Método do Radical DPPH·	58
3.2.2.2.	Poder redutor do ferro	59
3.2.2.3.	Sistema β -caroteno/ácido linoleico	60
3.2.3.	Estudos <i>in vitro</i> para avaliar a inibição da atividade de colinesterases AChE e BChE.....	61
3.2.4.	Avaliação do potencial antiproliferativo em linhas celulares MDA-MB-231.....	62
3.2.4.1.	Cultura celular e manuseamento	62
3.2.4.2.	Viabilidade celular.....	63
3.3.	Resultados e discussão	65
3.3.1.	Atividade antioxidante.....	65
3.3.2.	Atividade inibitória dos colinesterases da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase	69
3.3.3.	Atividade antitumoral	73
Capítulo IV – Avaliação das propriedades antimicrobiana.....		79
4.1.	Introdução.....	81
4.2.	Metodologia.....	87
4.2.1.	Reagentes.....	87
4.2.2.	Microrganismos	87

4.2.3.	Preparação das suspensões de microrganismos	88
4.2.4.	Método de difusão em meio sólido	88
4.2.5.	Concentração mínima inibitória	89
4.3.	Resultados e discussão	91
4.3.1.	Atividade antibacteriana.....	91
4.3.2.	Atividade antifúngica	96
Capítulo V – Avaliação toxicológica		105
5.1.	Introdução.....	107
5.1.1.	Experimentação animal	109
5.1.2.	Biomarcadores na avaliação de toxicidade	111
5.1.1.1.	Biomarcadores de hepatotoxicidade	111
5.1.1.2.	Biomarcadores de nefrotoxicidade.....	113
5.2.	Metodologia.....	115
5.2.1.	Amostras	115
5.2.2.	Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i>	115
5.2.3.	Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i>	116
5.2.3.1.	Animais.....	116
5.2.3.2.	Avaliação da toxicidade aguda em ratinhos <i>Swiss</i> : determinação da dose letal 50 (DL ₅₀)	116
5.2.3.2.1	Análise histológica	117
5.2.3.3.	Avaliação da toxicidade aguda em <i>Wistar</i> : avaliação bioquímica das funções hepática e renal	118
5.2.3.3.1	Avaliação da função hepática	119
5.2.3.3.2	Avaliação da função renal.....	119
5.3.	Resultados e discussão	121
5.3.1.	Bioensaio em <i>A. salina</i>	121
5.3.2.	<i>Screening</i> farmacológico e determinação dos valores de DL ₅₀	123
5.3.3.	<i>Screening</i> farmacológico e avaliação da toxicidade hepática e renal ..	133
Capítulo VI – Ensaios de atividade farmacológica <i>in vivo</i>		151
6.1.	Introdução.....	153
6.2.	Metodologia.....	159
6.2.1.	Animais.....	159

6.2.2.	Prova da placa aquecida	159
6.1.1.	Teste de contorção induzido pelo ácido acético	160
6.2.3.	Prova de <i>Amour-Smith</i>	161
6.2.4.	Teste de edema de pata induzido pela carragenina.....	161
6.3.	Resultados e discussão	163
6.3.1.	Prova da placa aquecida	163
6.3.2.	Teste de contorção induzido pelo ácido acético	164
6.3.3.	Prova de <i>Amour-Smith</i>	165
6.3.4.	Teste de edema de pata induzido pela carragenina.....	167
Capítulo VII – Conclusões gerais e perspectivas futuras.....		171
Referências bibliográficas.....		179
Anexos		235
.	Anexo I	237
.	Anexo II	239

Índice de quadros

Quadro 1.1 – Taxonomia das plantas em estudo.....	8
Quadro 2.1 - Dados da colheita das plantas.....	25
Quadro 2.2 - Características dos óleos essenciais.....	30
Quadro 2.3 - Composição química dos OEs de <i>L. luisieri</i>	32
Quadro 2.4 - Composição química dos OEs de <i>L. pedunculata</i>	35
Quadro 2.5 - Composição química dos OEs de <i>L. viridis</i>	37
Quadro 2.6 - Composição química dos OEs de <i>C. nepeta</i>	40
Quadro 2.7 - Composição química dos OEs de <i>M. spicata</i>	42
Quadro 2.8 - Composição química dos OEs de <i>M. pulegium</i>	44
Quadro 2.9 - Composição química dos OEs de <i>O. virens</i>	45
Quadro 2.10 - Composição química dos OEs de <i>T. mastichina</i>	47
Quadro 2.11 - Composição química dos OEs de <i>F. vulgare</i>	48
Quadro 3.1 – Valores IC ₅₀ (mg/mL) dos EOs pelos três métodos de ação antioxidante testados	67
Quadro 3.2 – Valores IC ₅₀ (mg/L) das atividades inibitórias de AChE e BChE dos OEs ..	72
Quadro 3.3 – Valores de EC ₅₀ dos óleos essenciais para a células MDA-MB-231.....	75
Quadro 4.1 - Valores de CMI (μL/mL) dos óleos essenciais para as estirpes bacteriana <i>Gram</i> -positivas.....	93
Quadro 4.2 - Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais para as estirpes bacterianas <i>Gram</i> -negativas	95
Quadro 4.3 - Valores de CMI (μL/mL) dos óleos essenciais para as estirpes fúngicas ..	99
Quadro 5.1 - Valores de CL ₀ CL ₅₀	122
Quadro 5.2 - Valores de DL ₅₀ dos OEs	124
Quadro A.1 - Valores de CMI (μg/ml) e CMB/CMF (μg/ml) dos antimicrobianos de síntese	239

Índice de figuras

Figura 1.1- Alguns compostos presentes nos óleos essenciais.	6
Figura 1.2- Fotografia de <i>L. luisieri</i>	10
Figura 1.3 - Fotografia de <i>L. pedunculata</i>	11
Figura 1.4- Fotografia de <i>L. viridis</i>	12
Figura 1.5- Fotografia de <i>Calamintha nepeta</i>	13
Figura 1.6- Fotografia de <i>Mentha spicata</i>	14
Figura 1.7- Fotografia de <i>Mentha pulegium</i>	15
Figura 1.8 - Fotografia de <i>Origanum virens</i>	16
Figura 1.9- Fotografia de <i>Thymus mastichina</i>	17
Figura 1.10- Fotografia de <i>Foeniculum vulgare</i>	18
Figura 2.1 - Aparelho tipo <i>Clevenger</i>	27
Figura 3.1 – Atividade antioxidante dos OEs	65
Figura 3.2 - Curvas dose-resposta para a determinação do IC ₅₀ dos OEs para a AChE e BChE	70
Figura 3.3 - Curvas dose-resposta para a determinação do IC ₅₀ da rivastigmina (A) e da galantamina (B) para a AChE e BChE	71
Figura 3.4 – Curvas dose-resposta, expressas em % de mortalidade de células tumorais MDA-MB-231, e da concentração (log) de OE, para a determinação dos valores de EC ₅₀	74
Figura 4.1 - Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas pelos antibacterianos	82
Figura 4.2 - Alvos de terapia antifúngica	83
Figura 4.3 - Principais alvos dos óleos essenciais	85
Figura 4.4 – Atividade antibacteriana pelo ensaio de difusão em meio sólido para as estirpes bacterianas <i>Gram</i> -positivas.	92
Figura 4.5 – Atividade antibacteriana pelo ensaio de difusão em meio sólido para as estirpes bacterianas <i>Gram</i> - negativas.	94
Figura 4.6 – Atividade antimicrobiano pelo ensaio de difusão em meio sólido para as estirpes fúngicas.	98
Figura 5.1 – Curvas dose-resposta para a determinação da CL ₅₀ no bioensaio em <i>A. salina</i>	121
Figura 5.2 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>L. pedunculata</i>	127

Figura 5.3 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>M. spicata</i> e <i>M. pulegium</i>	128
Figura 5.4 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>O. virens</i> e <i>T. mastichina</i>	129
Figura 5.5 - Cortes histológicos de rim dos animais administrados com OE de <i>L. pedunculata</i>	130
Figura 5.6 - Cortes histológicos de rim dos animais administrados com OE de <i>M. spicata</i> e <i>M. pulegium</i>	131
Figura 5.7 - Cortes histológicos de rim dos animais administrados com OE de <i>O. virens</i> e <i>T. mastichina</i>	132
Figura 5.8 - Valores de atividade enzimática biomarcadores de função hepática	134
Figura 5.9 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>L. luisieri</i>	137
Figura 5.10 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>L. viridis</i>	138
Figura 5.11 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>C. nepeta</i>	139
Figura 5.12 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de <i>F. vulgare</i>	140
Figura 5.13 - Valores de atividade enzimática biomarcadores de função renal	141
Figura 5.14 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de <i>L. luisieri</i>	145
Figura 5.15 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de <i>L. viridis</i>	146
Figura 5.16 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de <i>C. nepeta</i>	147
Figura 5.17 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de <i>F. vulgare</i>	148
Figura 6.1 – Esquema da via metabólica do ácido araquidônico.	155
Figura 6.2 – Atividade analgésica dos OEs de <i>L. luisieri</i> , <i>L. pedunculata</i> , <i>L. viridis</i> e <i>T. mastichina</i> pela prova da placa aquecida	163
Figura 6.3 – Atividade analgésica dos OEs de <i>L. luisieri</i> , <i>L. pedunculata</i> , <i>L. viridis</i> e <i>T. mastichina</i> pelo teste de contorção induzido pelo ácido acético	164
Figura 6.4 – Atividade analgésica dos OEs de <i>L. luisieri</i> , <i>L. viridis</i> , <i>C. nepeta</i> , <i>M.spicata</i> e <i>F. vulgare</i> pela prova de <i>Amour-Smith</i>	166

Figura 6.5 – Atividade anti-inflamatória dos OEs de <i>L. luisieri</i> , <i>L. viridis</i> , <i>C. nepeta</i> , <i>M.spicata</i> e <i>F. vulgare</i> pelo teste do edema da pata induzido pela carragenina	167
Figura A.1 – Curvas de calibração do ácido ascórbico para o radical DPPH (A); poder redutor (B) e sistema β -caroteno/ácido linoleico (C).....	237
Figura A.2 – Efeito antiproliferativo dos OEs de <i>L. luisieri</i> , <i>L.pedunculata</i> , <i>L. viridis</i> , <i>C. nepeta</i> , <i>O. virens</i> e <i>T. mastichina</i> nas células de cancro da mama MDA-MB-231.....	238

Abreviaturas

A	Absorvência
acetil-CoA	acetilcoenzima A
Ach	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
AD	Doença de Alzheimer (do inglês <i>Alzheimer's disease</i>)
ATCC	<i>Coleção americana de culturas tipo (do inglês American Type Culture Collection)</i>
ATP	Adenosine triphosphate
BChE	butirilcolinesterase
CL ₀	Concentração máxima tolerada (CMT)
CL ₅₀	Concentração letal 50
CMI	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> - MIC)
CMT	Concentração máxima tolerada
CO ₂	dióxido de carbono
COX	cicloxygenase
DAS	Meio de Sabouraud dextrose agar
DL ₅₀	Dose letal 50
DM	Dieta Mediterrânea
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês
DOX	doxorrubicina
DPPH·	radical
EC ₅₀	Concentração efetiva 50
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>fetal bovine serum</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa acopada a detetor de ionização de chama (FID - do inglês flame ionisation detector)
GC-MS	Cromatografia gasosa acopada a detetor de espectrometria de massa (MS- do inglês mass mass spectrometry)
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogénio
HETE	ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos
HPETEs	ácidos hidroperoxi-eicosatetraenoicos
IC ₅₀	Concentração inibitória 50

Leuc	leucotrienos
LOX	lipoxigenase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Azoto
NA	Meio agar nutriente (do inglês <i>Nutrient agar</i>)
NaCl	cloreto de sódio
NB	Meio caldo nutriente (do inglês <i>Nutrient broth</i>)
NCCLS	(do ingles <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>)
NH ₃	amoníaco
NO·	óxido nítrico
NSAIDs	anti-inflamatórios não-esteroides
O ₂	oxigénio
O ₂ ·	anião superóxido
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (do inglês - OECD)
OE ou OEs	Óleo essencial ou óleos essenciais
OH·	radical hidroxilo
PAM	Plantas Aromáticas e Medicinais
PG	prostaglandinas
PGE2	prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
pH	Potencial de Hidrogénio
PKD	Doença de Parkinson (do inglês <i>Parkinson's disease</i>)
RNA	ácido ribonucleico
RNS	espécies reativas de azoto
ROS	espécies reativas de oxigénio
SD	Desvio padrão (do inglês <i>standard desviation</i>)
SDB	Meio caldo de <i>Sabouraud</i> dextrose
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Tempo
TX	tromboxanos
UFC	Unidade Formadora de Colónias
UV	Ultravioleta
v	Volume
VIS	Visível
Δ	Variação
λ	Comprimento de onda
ρ	massa volúmica

Unidades

%-percentagem

cm; mm; μm ; nm - Centímetro; milímetro; micrómetro; nanómetro;

kg; g; mg; μg – Quilograma; grama; miligrama; micrograma;

h; min; s - Horas; minutos; segundos;

L; mL; μL - Litro; mililitro; microlitro

M; mM; μM - Molar; milimolar; micromolar

N – Normal

° C - Graus Celsius

Objetivos e metodologia do trabalho

Neste trabalho pretende-se desenvolver um conjunto de estudos para caracterização da composição química e avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais (OEs) de algumas plantas aromáticas autóctones da flora alentejana, com vista a avaliar a sua potencial utilização como agentes nutracêuticos e/ou fitoterapêuticos, permitindo a aquisição de conhecimento técnicos e científicos e promovendo o desenvolvimento sustentável da fileira das plantas aromáticas e condimentares.

De modo a possibilitar uma utilização segura das plantas e/ou dos seus óleos essenciais, é necessário um conhecimento preciso da relação entre a sua composição química, a sua toxicidade e as suas propriedades farmacológicas e mecanismos de ação envolvidos. Para o efeito, foi efetuada a caracterização química dos OEs, importantes marcadores de quimiotipo, com vista à criação de uma base de dados que permita a identificação dos constituintes bioativos das plantas aromáticas e possibilite a identificação das espécies e variedades de valor acrescentado.

Para seleção dos OEs e estudo das atividades farmacológicas foi efetuado um *screening* de atividade biológica com base nas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e toxicidade dos OEs das plantas em estudo. Com vista a avaliar o mecanismo bioquímico associado aos processos analgésico e anti-inflamatório e a sua potencial ação antitumoral, foram desenvolvidos um conjunto de estudos *in vitro* e *in vivo*.

Neste projeto propomo-nos caracterizar quimicamente e avaliar a atividade biológica de OEs de algumas plantas aromáticas autóctones do Alentejo, utilizadas frequentemente como condimentos alimentares: *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (rosmaninho), *Lavandula pedunculata* (rosmaninho-maior), *Lavandula viridis* (rosmaninho-verde), *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (erva-das-azeitonas), *Mentha*

spicata (hortelã-vulgar), *Mentha pulegium* (poejo), *Origanum vulgare* subsp. *virens* (orégão), *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* (tomilho bela-luz) e *Foeniculum vulgare* L.

Com base na caracterização química dos OEs (parte vegetativa e em floração) e da avaliação das suas propriedades antioxidantes e toxicidade (*in vitro* e *in vivo*) será efetuado um *screening* para seleção dos OEs mais promissores, para estudo das atividades farmacológicas, designadamente analgésica, anti-inflamatória e antitumoral,

Estrutura da dissertação

O trabalho apresentado nesta dissertação está dividido em sete capítulos.

No primeiro capítulo são apresentados os fundamentos teóricos.

No segundo capítulo são apresentados os resultados da caracterização química dos óleos essenciais.

No sentido de avaliar a capacidade dos OEs prevenirem o *stress* oxidativo e alguns dos distúrbios associados, no terceiro capítulo são apresentados os resultados da atividade antioxidante dos OEs, da ação inibitória das colinesterases AChE e BChE e do efeito antiproliferativo em linhas celulares do cancro da mama MDA-MB-231.

No quarto capítulo são apresentados os resultados do efeito antimicrobianos dos OEs face a bactérias potencialmente patogénicas e a fungos filamentosos fitopatogénicos e/ou produtores de micotoxinas.

No quinto capítulo são apresentados os resultados toxicológicos dos OEs em *A. salina* (CL₅₀), ratinhos *Swiss* (DL₅₀), toxicidade aguda em ratos *Wistar* e avaliação dos biomarcadores da função hepática e renal.

No sexto capítulo são apresentados os resultados da avaliação farmacológica *in vivo*, onde foram testadas as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas dos óleos essenciais.

Por último, no sétimo capítulo são apresentadas as principais conclusões e são apontadas algumas sugestões de trabalho futuro.

Introdução

Óleos essenciais: principais propriedades biológicas e potenciais aplicações

1.1. Introdução

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, nomeadamente, alcalóides, flavonóides, cumarinas, terpenóides, muitos dos quais constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. Até meados do século XIX, os principais agentes terapêuticos eram constituídos por produtos à base de plantas. Atualmente, os compostos obtidos à base de plantas desempenham um papel relevante sendo cada vez mais usadas a par dos medicamentos convencionais, ou até mesmo como seus substitutos, com fins curativos ou preventivos, devido à grande variedade de efeitos que produzem ¹⁻⁴. As plantas aromáticas são cada vez mais usadas como agentes terapêuticos, e suplementos alimentares, a par de produtos de síntese industrial, com aplicação na Fitoterapia ⁴. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 80 % da população mundial recorre a produtos à base de extratos de plantas e/ou dos seus componentes ativos para diversos fins, inclusive os cuidados de saúde ^{5,6}. O crescente interesse pelo uso destes produtos justifica o aprofundamento do conhecimento científico a seu respeito, a par do conhecimento tradicional, de modo a permitir uma utilização adequada, eficaz e segura dos mesmos.

As plantas aromáticas apresentam estruturas especializadas, a partir das quais, é possível, por destilação, obter os óleos essenciais, os quais são misturas voláteis de múltiplos componentes do metabolismo secundário das plantas ^{7,8}. Os metabolitos secundários, além de desempenharem um importante papel na adaptação das plantas ao seu ambiente, representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas e com potencial terapêutico ^{9,10}, sendo a sua produção relativamente baixa (menos de 1 % do peso seco) e dependente do estágio fisiológico e de desenvolvimento da planta. Muitos metabolitos secundários apresentam uma estrutura única e complexa e a sua produção é frequentemente reforçada pelas condições de *stress* biótico e abiótico ¹¹.

Os metabolitos secundários das plantas podem ser agrupados em três classes principais: alcalóides, compostos fenólicos e terpenos (terpenóides) ^{12,13}.

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de azoto no seu anel. São sintetizados no retículo endoplasmático e derivam de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, via do ácido chiquímico) e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). A maioria possui carácter básico, podendo ser encontrados em grandes quantidades em muitos membros das famílias *Berberidaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, e *Ranunculaceae* ¹². Estes compostos apresentam propriedades bactericidas e inseticidas em baixas concentrações e também tóxicos para os vertebrados. Muitos alcalóides são bastantes tóxicos e alguns são utilizados na medicina pela ação específica que exercem. O seu modo de ação varia consoante o grupo a que pertencem, no entanto, a sua principal ação exerce efeito inibitório nas acetilcolinesterases, afetando os recetores de acetilcolina, especialmente no sistema nervoso central. Pela sua capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, podem afetar, também, os canais de sódio da membrana dos neurónios ¹².

Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de um grupo hidroxilo ligado a um anel de benzeno ou a outras estruturas complexas do anel aromático por exemplo, catecol, resorcinol, hidroquinona. Derivam de diferentes vias metabólicas, constituindo um grupo bastante heterogéneo do ponto de vista metabólico. No entanto, existem duas vias metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalónico. Estes compostos variam de fenóis simples (encontrados no óleo essencial de *Pinus sylvestris*) para polifenóis, como antocianinas e taninos ¹², sendo subdivididos em dois grupos principais: os ácidos fenólicos e os flavonóides. Os ácidos fenólicos são, estruturalmente fenóis simples que incluem dois grupos: os ácidos hidrocínâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados de origem natural, sendo-lhes atribuídas varias propriedades biológicas, entre as quais a capacidade antioxidante ¹⁴.

Os terpenos são amplamente utilizados na indústria alimentar, farmacêutica e perfumaria, bem como em uma ampla gama de aplicações farmacológicas. Incluem o maior grupo de produtos naturais a partir de plantas que compreende os óleos essenciais, aromas, fragrâncias e pigmentos vegetais lipossolúveis, sendo estes compostos hidrofóbicos produzidos por tricomas glandulares ¹⁵. São derivados de unidades de isopreno, tais como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenes (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (C50 ou mais). As misturas de terpenos contendo compostos com diferentes propriedades físicas podem ser mais tóxicos com maior persistência de defesas ¹².

Os óleos essenciais, são uma importante fonte de compostos bioativos com aplicação em Fitoterapia. São compostos complexos voláteis caracterizados por um odor forte e são ricos em compostos terpénicos, nomeadamente monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), apesar de diterpenos (C20) também poderem estar presentes, bem como uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e, excepcionalmente, compostos contendo azoto (N) e enxofre (S), cumarinas e homólogos de fenilpropanóides ¹⁶. Geralmente, os principais constituintes dos óleos essenciais (Figura 1.1) são os principais monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos monoterpénicos, hidrocarbonetos sesquiterpénicos e sesquiterpenos oxigenados, no entanto também se pode encontrar em pequenas percentagens compostos derivados do benzeno e alguns ésteres nos óleos essenciais ¹⁷.

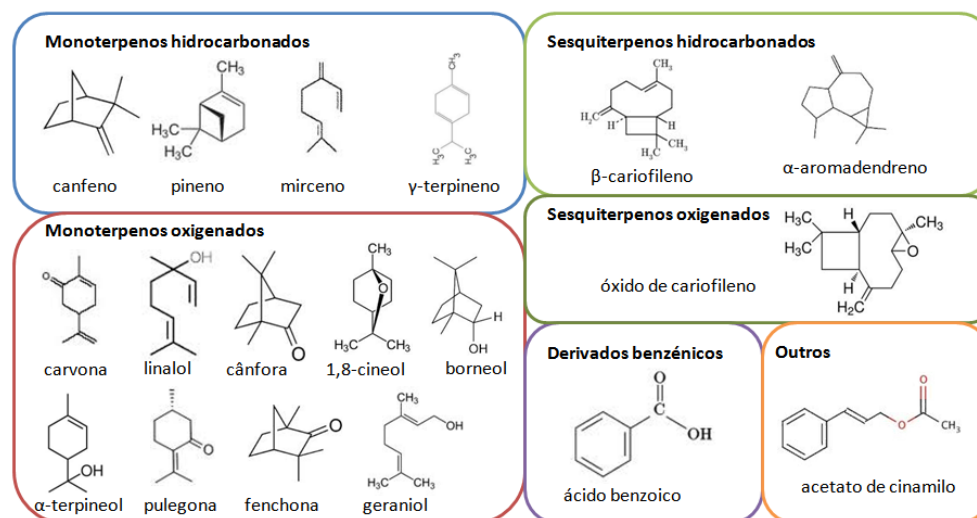


Figura 1.1- Alguns compostos presentes nos óleos essenciais.
Adaptado de Nagegowda ¹⁸

Os óleos essenciais mais utilizados são extraídos de plantas aromáticas geralmente localizadas em países de clima temperado como os Mediterrânicos e os países tropicais, representando uma parte importante de farmacopeias tradicionais. Os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o seu apetite para essas plantas. Estes compostos também podem atrair alguns insetos que favoreçam a dispersão do pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis ¹⁹.

Estudos, *in vitro* e *in vivo*, revelaram que os OEs de algumas plantas apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, analgésicas e sedativas ^{2,3}.

Alguns óleos essenciais, dependendo da sua composição, parecem apresentar propriedades medicinais particulares que têm sido reivindicadas para a cura de uma ou outra disfunção de órgão ou desordem sistêmica, nomeadamente atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, efeito sedativo, antiespasmódico e/ou anti-inflamatório. Além disso, algumas composições de óleos essenciais podem inibir as

funções metabólicas de microrganismos, ou seja, crescimento e reprodução ^{16,19,20}. Alguns estudos referem que os óleos essenciais e seus componentes voláteis são usados para prevenir e tratar doenças humanas como cancro e doenças cardiovasculares (aterosclerose e trombose) ^{17,21}. Adicionalmente, pela riqueza em antioxidantes naturais, podem desempenhar um importante papel na proteção do *stress* oxidativo, envolvido na etiologia de várias doenças como o cancro, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, infeções, doenças inflamatórias crónicas, diabetes, e doenças autoimunes ^{2,19,22}.

Um das principais fontes de antioxidantes é a sua ingestão nos alimentos consumidos na dieta, observando-se uma relação inversa entre a prática da Dieta Mediterrânea, rica em alimentos antioxidantes, e a incidência de algumas patologias, incluindo as de origem inflamatória, neurodegenerativa, cardiovascular e tumoral ^{22,23}.

Neste trabalho selecionaram-se plantas aromáticas autóctones e/ou naturalizadas, de crescimento espontâneo em Portugal continental, frequentemente utilizadas como condimentos alimentares pelas populações locais.

Pelo seu microclima Mediterrâneo (Csb), com ambiente ameno com base na classificação de Köppen & Geiger ²⁴, o Alentejo, região Sul de Portugal, é uma zona muito rica em plantas aromáticas.

Os estudos etnobotânicos estão normalmente associados a estudos etnofarmacológicos com vista a conhecer as aplicações e uso dos fármacos de origem natural associados aos sistemas tradicionais da Medicina.

Para o efeito foram selecionadas nove espécies aromáticas autóctones do Alentejo, utilizadas frequentemente como condimentos alimentares (Quadro 1.1): *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (rosmaninho), *Lavandula pedunculata* (rosmaninho-maior), *Lavandula viridis* (rosmaninho-verde), *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (ervada-azeitonas), *Mentha spicata* (hortelã-vulgar), *Mentha pulegium* (poejo), *Origanum vulgare* subsp. *virens* (orégão), *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* (tomilho bela-luz) e *Foeniculum vulgare* L. (funcho).

Quadro 1.1 – Taxonomia das plantas em estudo

Ordem	Família	Género	espécie	subespécie	Nome comum
Lamiaceae	Lamiales	<i>Lavandula</i>	<i>stoechas</i>	<i>luisieri</i>	rosmaninho
			<i>pedunculata</i>	-	rosmaninho-maior
			<i>viridis</i>	-	rosmaninho verde
		<i>Calamintha</i>	<i>nepeta</i>	<i>nepeta</i>	erva-das-azeitonas
		<i>Mentha</i>	<i>spicata</i>	-	hortelã-vulgar
			<i>pulegium</i>	-	poejo
		<i>Origanum</i>	<i>vulgare</i>	<i>virens</i>	orégão
		<i>Thymus</i>	<i>mastichina</i>	<i>mastichina</i>	tomilho bela-luz
Apiales	Apiaceae	<i>Foeniculum</i>	<i>vulgare</i>	-	funcho

1.1.1. Família Lamiaceae (Labiatae)

Estudos efetuados com óleos essenciais e extratos de plantas da família Laminaceae ou Labiatae, sugerem que estes apresentaram propriedades anti-inflamatórias e antitumorais, atribuídas preferencialmente ao elevado conteúdo em compostos terpénicos ²⁵.

1.1.1.1. *Lavandula* spp.

As plantas do género *Lavandula* L. pertencem à família Labiatae e compreendem cerca de trinta e duas espécies, além das espécies híbridas. Algumas espécies de *Lavandula* são conhecidas vulgarmente por rosmaninho, como por exemplo *L. stoechas*, *L. pedunculata* e *L. viridis*, outras como lavanda, como as de *L. angustifolia*, *L. latifolia*,

etc. Adicionalmente, as espécies deste género *Lavandula*, apesar de diferirem na composição dos óleos essenciais, têm propriedades etnobotânicas semelhantes, sendo as espécies *L. angustifolia* Mill., *L. latifolia* Medik., *L. stoechas* L. as mais comumente usadas.

A região sul de Portugal é rica em plantas aromáticas, entre as quais as nativas *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas Martínez, *L. pedunculata* (Mill.) Cav., e do Algarve, *L. viridis* L'Hér. Estes espécimes são frequentes nos sub-bosques de azinhais, sobreirais e pinhais de pinheiro bravo, matagais, estevais e sargaçais, em solos arenosos, quartzíticos, graníticos e xistosos.

Devido à sua grande diversidade, algumas espécies do género *Lavandula* apresentam difícil classificação taxonómica devido à sua capacidade de hibridização e diversidade morfológica, sendo importante caracterizá-las pela composição dos seus OEs devido à sua grande importância económica. Estas plantas têm sido usadas tradicionalmente, tanto secas ou como óleo essencial, num grande número de aplicações, sendo o óleo essencial frequentemente usado na aromaterapia, indústria farmacêutica e incorporado em produtos com agradável fragrância ou agente antimicrobiano ²⁶⁻²⁸. Os seus óleos essenciais são produzidos, geralmente, por destilação, quer da espiga floral quer das folhas. No entanto, estes óleos essenciais apresentam composição muito variável, consoante a espécie e o órgão da planta, sendo o óleo derivado das flores, geralmente, mais aromático ²⁶.

1.1.1.1.1. *Lavandula luisieri* ou *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*

Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas Martínez é uma espécie afim das alfazemas (*L. angustifolia*) com utilização em fitoterapia e aromaterapia, sendo vulgarmente conhecida por rosmaninho (Figura 1.2) ²⁹. Morfologicamente, é um caméfito lenhoso e

tomentoso, com folhas oblongas a lanceoladas acinzentado-tomentosas. As inflorescências são espigas cilíndricas pálido-purpúreas ou púrpura-anegradas, curtamente pedunculadas ou sésseis. É endêmica da Península Ibérica, muito comum no Sudoeste de Espanha e no Centro e Sul de Portugal. É uma planta termófila, típica dos sargaçais de solos xistosos ou calcários, bastante secos ⁷. Do ponto de vista biogeográfico, trata-se de uma espécie de ampla distribuição na Bacia Mediterrânica e que alcança grande variabilidade genética e, consequentemente, morfológica na Península Ibérica ³⁰.



Figura 1.2- Fotografia de *L. luisieri* (Primavera (Herdade da Mitra, Universidade de Évora)

De acordo com a flora Ibérica, a *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas Martínez foi classificada como *L. stoechas* L. subsp. *Luisieri* (Rozeira) Rozeira, tendo sido incluída, devido à semelhança morfológica, no género *stoechas*, o qual passou a compreender duas subespécies: *L. stoechas* L. subsp. *stoechas* e *L. stoechas* L. subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira ³⁰. No entanto, as composições químicas dos óleos essenciais das *L. stoechas* subsp. *stoechas* e *L. stoechas* subsp. *luisieri* são bem distintas ^{31,32}, pelo que esta classificação tem sido controversa. Alguns estudos referem que o óleo de *L. luisieri* tem uma composição única no reino Plantae, contendo componentes derivados do necrodano e que o óleo essencial da espiga contém, maioritariamente, acetato de α -necrodilo, 1,8-cineol, acetato de lavandulilo, α -pineno, α -necrodol, linalol, cânfora e fenchona, enquanto o óleo essencial da folha contém maioritariamente acetato de α -necrodilo, 1,8-cineol, acetato de lavandulilo, α -pineno, α -necrodol e linalol ^{31,33,34}.

1.1.1.1.2. *Lavandula pedunculata*

L. pedunculata (Mill.) Cav. (Figura 1.3) é uma espécie afim da *L. luisieri*, conhecida vulgarmente por rosmarinho-maior. Esta distingue-se da *L. luisieri* sobretudo pelas formas das brácteas e pelos comprimentos dos pedúnculos das espigas e pela composição dos seus óleos essenciais ^{29,35,36}. A *L. pedunculata* apresenta hastes florais muito longas (5-24cm) e brácteas férteis com 4 - 7 x 4 – 6 mm mais ou menos obtriangulares, enquanto na *L. luisieri* o pedúnculo pode variar de 0 – 30 mm e as brácteas férteis são cordado-reniformes. Morfologicamente é um caméfito lenhoso ou nanofanerófito tomentosa,



Figura 1.3 - Fotografia de *L. pedunculata*
Primavera (Évora)

com folhas acizentado-tomentosas ou verde-acinzentado-tomentosas inteiras, lineares a oblongo-oblanceoladas e floresce de Março a Julho ³⁵. É endémica de Península Ibérica e norte de África, crescendo em carrascais, tomilhais, sargaçais, piornais, estevais, zimbrais, arrelvados pobres e etapas de substituição de azinhais (*Quercus rotundifolia* Lam.), carvalhais de carvalho português (*Quercus faginea* Lam. Subsp. *Broteroi* (Cout.) A. Camus) e sobreirais (*Quercus suber* L.). Aparece também em terrenos baldios, dunas litorais, em solos siliciosos e xistosos, 0 a 1700 m de altitude.

Um estudo realizado com *L. pedunculata* do centro de Portugal ³⁷ refere que o seu óleo essencial é constituído maioritariamente por monoterpenos oxigenados (69-89 %) e hidrocarbonetos monoterpénicos (4,25 - 22,5 %), apresentando como constituintes maioritários a fenchona (1,3 - 59,7 %), o 1,8-cineol (2,4 - 55,5 %) e a cânfora (3,6 - 48,0 %).

1.1.1.1.3. *Lavandula viridis*

L. viridis L'Hér (Figura 1.4) é uma espécie afim da *L. luisieri* conhecida por rosmaninho-verde ou rosmaninho-branco. Morfologicamente, é um caméfito lenhoso e viloso-pubescente, com folhas verdes viloso-pubescentes inteiras oblongas a lineares e brácteas esverdeadas a amareladas, florescendo de Março a Maio (Junho) ³⁵. É endémica da Península Ibérica, Madeira e Açores, podendo ser encontrada em matagais silicícolas, estevais, urzais, sobreirais, carrascais, azinhais, medronhais e pinhais, em solos pedregosos, arenosos, argilosos e raramente calcários, 70 a 850 m de altitude, sendo comum na charneca alentejana e algarvia ^{7,38}.



Figura 1.4- Fotografia de *L. viridis*
Primavera (Serra de Monchique, Algarve)

Estudos efetuados com *L. viridis*, citam que o óleos essencial da parte aérea desta espécie revelam propriedades antioxidantes e são constituídos por monoterpenos oxigenados (> 50 %) e hidrocarbonetos monoterpénicos (> 20 %) e sesquiterpenos (< 5 %), apresentando como compostos maioritários: 1,8-cineol, cânfora, α -pineno e linalol, sendo as suas folhas usadas, secas, em aplicações médicas na Madeira, Portugal ³⁸⁻⁴¹.

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

Calamintha nepeta subsp. *nepeta* (Figura 1.5), vulgarmente conhecida como erva-das-azeitonas, nêveda ou calaminta ⁷, é uma planta perene e bastante aromática, podendo atingir os 80 cm de altura. Tem aspeto de um pequeno arbusto e flores de cor lilás, as suas folhas são ovaladas e pequenas ³⁰ e distribui-se amplamente na Área do Mediterrâneo^{7,30}. É bem conhecida como um tempero utilizado na aromatização de alimentos e como um estimulante antisséptico e diurético ⁴². É tradicionalmente usada na medicina como antitússico e expetorante; tem também propriedades espasmolíticas e anti-flatulência ^{43,44}. Alguns estudos referem que o seu óleo essencial apresenta atividade antifúngica e antibacteriana, devido ao elevado teor em derivados terpénicos ⁴². Tem ainda sido referido que os óleos essenciais desta espécie têm capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e sedativa ^{45-47 48}. Dependendo da variedade e da região, os componentes maioritários presentes nos óleos essenciais poderão ser carvacrol (45 a 65 %), β -pineno, geraniol, α -cariofileno e pulegona ⁴²⁻⁴⁴.



Figura 1.5- Fotografia de *Calamintha nepeta*

1.1.1.3. *Mentha* spp.

As plantas do género *Mentha* são reconhecidas, desde a antiguidade, pelas propriedades calmantes e antiespasmódicas e como adjuvantes digestivos. São pequenos arbustos perenes, sendo cultivadas pelas suas propriedades medicinais e condimentares ⁷.

1.1.1.3.1. *Mentha spicata* L.

Mentha spicata L. (Figura 1.6) pertence à família das Lamiáceas, é vulgarmente conhecida como hortelã ou hortelã-verde, hortelã-comum, hortelã-das-cozinhas ⁴⁹. Existem cerca de 25 a 30 espécies de *Mentha* originárias da Europa ⁵⁰. *Mentha spicata* L. é uma espécie de origem híbrida (*M. longifolia* x *M. rotundifolia*) oriunda da região mediterrânica, mas cultivada por todo o mundo ⁷. A sua época de floração é entre Julho e Outubro ⁵¹.



Figura 1.6- Fotografia de *Mentha spicata*

Esta planta prefere locais húmidos e frescos, sendo principalmente cultivada em hortas, jardins e quintais ⁷. O interesse no cultivo de hortelã está relacionado principalmente com a importância comercial do seu óleo essencial, que está entre os 10 mais negociados no mundo. As partes utilizadas são as folhas e o óleo essencial da parte aérea. As folhas são muito usadas como condimento para aromatizar diversos alimentos na culinária portuguesa, assim como para aromatizar bebidas e *coktails*. Esta planta é muito utilizada em fitoterapia, nos problemas digestivos (eupéptica), como carminativa, na flatulência e como vermífuga. O óleo é usado na indústria, incluindo a indústria alimentar, farmacêutica, de cosméticos, e química. A hortelã é também conhecida pela sua capacidade para melhorar a memória. Além de ser um estimulante tem várias utilizações biológicas, tais como inseticida, agente antimicrobiano, antioxidante, antiespasmódico e anti-plaquetas, sendo ainda usado para tratamento de bronquites, em inalações, e em fricções nas dores musculares e reumáticas. Os terpenos no óleo essencial e os 14 flavonóides são os responsáveis pela sua ação antisséptica, espasmolítica e estimulante das secreções gástricas ⁷.

Estudos anteriores relatam que os seus extratos têm uma excelente atividade antioxidante comparável à de antioxidantes sintéticos como por exemplo butil-hidroxitolueno ⁵².

As diferentes espécies de hortelã têm uma diversidade considerável na composição química do seu óleo essencial. A bibliografia refere que os principais constituintes dos OEs de *M. spicata* a carvona (55 a 80 %), limoneno (5 a 20 %), entre outros como mentona, mentol, mentofurano, acetato de mentilo, cineol, rutósido, apigenol, ácidos fenólicos, taninos e triterpenos (cerca de 2 %) ⁷. Na *M. spicata*, carvona confere o odor hortelã, enquanto que no óleo essencial da *Mentha piperita* o mentol é o componente principal ⁵⁰.

1.1.1.3.2. *Mentha pulegium* L.

M. pulegium (Figura 1.7) pertence à família das Lamiáceas e é também conhecida como hortelã dos açores, hortelã-pimenta-mansa e poejo ⁷. Nativa da Europa e ásia ocidental, principalmente em zonas húmidas ^{7,53}, é uma herbácea muito aromática, variável quanto ao porte, forma das folhas e indumento, frequente em Portugal continental e nos arquipélagos dos Açores e da Madeira ⁴⁹.



Figura 1.7- Fotografia de *Mentha pulegium*

Pode ser encontrada em prados e pastagens húmidas, em barrancos, margens e leitos secos de linhas de água, charcos, lagoas e outros locais temporariamente encharcados ou inundados, por vezes nitrificados ⁵¹.

São utilizadas as partes aéreas floridas e o óleo essencial. Em fitoterapia, as partes aéreas floridas empregam-se como estimulantes do apetite e da digestão e têm ação espasmolítica. O óleo essencial é antisséptico e cicatrizante, em uso externo ⁷. Podem ainda ser usadas como expetorante, carminativa, diurética, antioxidante, antifúngica e antitússica ^{53,54}. O óleo essencial emprega-se na perfumaria barata, em

detergentes, para a extração da pulegona e como repelente de insetos. O poejo é muito utilizado como aromatizante a culinária, particularmente no Alentejo ⁷.

1.1.1.4. *Origanum virens* Hoffmanns. & Link

As plantas do género *Origanum* são amplamente conhecidas no mundo das ervas e especiarias pelos seus óleos voláteis. Orégão é o nome comercial das espécies ricas em monoterpenóides fenólicos, principalmente carvacrol, ocasionalmente timol, enquanto manjerona é o nome comercial daquelas que são ricas em monoterpenóides bicíclicos *cis*- e *trans*-hidrato sabineno ⁵⁵. Há um grande número de espécies em todo o mundo que receberam o nome de orégão, a maioria pertence ao género *Origanum* (cerca de 260 gêneros e



Figura 1.8 - Fotografia de *Origanum virens*

7000 espécies) da família Lamiaceae (*vulgare*, *viride*, *virens*, *majorana*, e *onites*) e *Lippia* da família Verbenaceae (*graveolens*) ⁵⁶. Duas subespécies são aceites para esta espécie: a típica e a subespécie *virens*, sendo difícil separar os dois táxons em algumas zonas da Península Ibérica. Em Portugal a subespécie *vulgare* não ocorre ^{30,35}, sendo considerada uma espécie diferente: *Origanum virens* Hoffmanns. & Link (Figura 1.8) ⁵⁷. Na medicina popular, o orégão é usado para tratar várias doenças, como distúrbios respiratórios, dispepsia, menstruação dolorosa, artrite reumatoide e escrofulose, e. É ainda usado como expetorante, carminativo, para aliviar a tosse convulsa e para tratar distúrbios do trato urinário ⁵⁸.

1.1.1.5. *Thymus mastichina*

Thymus mastichina (L.) é uma espécie endémica da Península Ibérica, encontrando-se difundido de norte a sul de Portugal (geralmente no interior norte e sul do país), ⁷. Vulgarmente conhecido por amor de deus, bela-luz, cabeças de homem, manjerona brava, manjerona espanhola e sal puro, é caracterizada por folhas simples e opostas e por flores zigomórficas e bilabiadas. Seu tubo de cálice termina em cinco dentes com cílios longos, que dão à planta uma aparência de penas e as flores brancas são agrupadas em cabeças de



Figura 1.9- Fotografia de *Thymus mastichina*

flores ou capitula. *Thymus mastichina* L. subsp. *mastichina* (Figura 1.9) é caracterizada por cálice com mais de 5 mm, inflorescências maiores que 10 mm de diâmetro e brácteas oblonga-ovadas ou elípticas. É uma espécie com grande plasticidade ecológica, e está presente geralmente em clareiras de matos xerofíticos, bermas e taludes de estradas, campos de cultivo abandonados, pinhais, sobreirais, zonas pedregosas e afloramentos rochosos. Preferem substratos removidos, geralmente siliciosos, quanto baste arenosos, e também substratos xistosos e calcários ⁵¹. É amplamente utilizada pelas suas propriedades medicinais, incluindo efeito antisséptico, digestivo, antirreumático, antiespasmódico, expetorante e antitússico, e também é usado como aromatizante planta na indústria de perfumes e cosméticos ^{7,51,59}.

T. mastichina é uma espécie afim é uma espécie afim do *Thymus zygis* L. e, tal como as outras plantas do género *Thymus*, , apresenta um polimorfismo químico, sendo constituído principalmente por 1,8-cineol, limoneno e β -terpinol ⁷. Os tomilhos portugueses da secção *T. mastichina* caracterizaram-se por apresentarem como constituinte principal o 1,8-cineol, muitas vezes com teores superiores a 60 % ^{7,60}.

1.1.2. Família Apiaceae

A família Apiaceae (Umbelliferae) é uma das maiores famílias de plantas do mundo (aproximadamente 450 gêneros e 3700 espécies em todo o mundo), possuindo uma variedade de compostos com atividades biológicas, nomeadamente capacidade de induzir apoptose, antibacteriano, hepatoprotetor, vaso-relaxante, inibidor da 18icloxigenase e atividades antitumoral ⁶¹.

1.1.3. *Foeniculum vulgare* L.

O *Foeniculum vulgare* L. (Figura 1.10) pertence à família das Apiáceas, conhecido vulgarmente como funcho, é uma planta endémica da região mediterrânea, Norte de África e Oeste da Ásia ⁶². Coloniza baldios e incultos em sítios secos, bermas de caminhos e campos de cultivo. São conhecidas duas variedades de funcho: doce e amargo. A variedade doce é vulgarmente conhecida como funcho-doce, ou erva-doce, e a variedade



Figura 1.10- Fotografia de *Foeniculum vulgare*

amarga é conhecida vulgarmente como funcho-amargo ⁷. O funcho-doce distingue-se do funcho-amargo pelo sabor doce e anisado das folhas e frutos e pela coloração verde-claro ou castanho amarelado dos frutos. Na indústria alimentar é utilizada toda a planta ⁶². O óleo essencial do funcho é conhecido devido às suas propriedades farmacológicas, como antibacteriano, sendo eficaz contra algumas bactérias patogénicas, antifúngico, inibindo o desenvolvimento de alguns fungos e atividade antioxidante. Os constituintes principais óleo essencial são: α -pineno (até 30 %), cânfora (15 a 25 %), e o eucaliptol (15 a 50 %), variando de acordo com a região geográfica ⁷.

Avaliação da composição química dos óleos essenciais de plantas aromáticas do Alentejo

Publicações efetuadas no âmbito deste capítulo

Sílvia Macedo Arantes, Andreia Piçarra; Marisa Guerreiro; Cátia Salvador; Fátima Candeias; A. Teresa Caldeira and M. Rosário Martins (2019). "Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal)", Food and Chemical Toxicology Vol. 133, pp. 110747.

Sílvia Arantes, Andreia Piçarra, Fátima Candeias, A. Teresa Caldeira & M. Rosário Martins (2017). "Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo", Natural Product Research, pp. 1 - 5.

Sílvia Arantes, Fátima Candeias, Orlando Lopes, Mónica Lima, Marízia Pereira, Teresa Tinoco, J Cruz-Morais, M Rosário Martins (2016). "Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*". Planta Medica, 82 (14), pp. 1266 - 1273.

2.1. Introdução

A identificação dos compostos dos óleos essenciais é fundamental no estudo de plantas aromáticas. Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas constituídas por muitos componentes, essencialmente terpenos e derivados, e constituem uma fonte de compostos bioativos com potenciais propriedades farmacológicas e nutracêuticas. Estas propriedades estão relacionadas com a sua composição química, designadamente, os componentes presentes e suas proporções, os quais poderão interagir entre si, sendo assim importante caracterizar quimicamente os seus constituintes ².

Devido à sua função natural, a composição química dos óleos essenciais é determinada não só pelo género, espécie e subespécie de planta aromática, mas também por fatores externos, tais como, localização geográfica, condições ambientais, e sociais da região, condições de cultivo, época e tempo de colheita ⁶³⁻⁶⁶. Para além destes, há que ter também em conta os procedimentos utilizados, designadamente, técnicas de recolha da planta e conservação pós-colheita, parte da planta utilizada e método de extração do óleo essencial também afetam a composição química dos óleos essenciais ⁶³⁻⁶⁶.

Os OEs extraídos de plantas das famílias Apiaceae, Asteraceae e Lamiaceae são preferencialmente ricos em compostos terpénicos, os OEs extraídos de plantas das famílias Apiaceae (Umbelliferae), Lamiaceae, Myrtaceae, Piperaceae e Rutaceae são geralmente ricos em fenilpropanóide, enquanto que os OEs extraídos de plantas das famílias Alliaceae, Rutaceae e Brassicaceae são ricos em compostos contendo enxofre e azoto ⁶⁷. É, ainda, frequente a presença de variabilidade química dentro de determinada espécie de plantas, resultantes de diversos fatores que influenciam a biossíntese dos seus metabolitos secundários, justificando a classificação de diferentes quimiótipos dentro da mesma espécie ⁶⁸. A existência destes quimiótipos tem, do ponto de vista comercial, implicações marcantes para o produtor, que necessita de respeitar os padrões de qualidade desses OEs, em determinados compostos maioritários, que só alguns quimiótipos revelam, e para o consumidor final, dado que a cada composição

química está associada uma atividade biológica específica ⁶⁹. Assim, para cada espécie, é importante escolher as melhores variedades, avaliar a influência de variações sazonais e geográficas, das condições de cultivo, colheita e armazenamento, na produção de biomassa, e rendimento e qualidade do óleo essencial obtido ^{65,70}. A qualidade de um óleo essencial pode ser avaliada pelo seu índice de refração, densidade, rotação ótica, solubilidade e/ou ponto de congelação, no entanto estes parâmetros por si só, não são suficientes, pelo que é necessário proceder à caracterização química dos constituintes presentes nos óleos essenciais, não só os maioritários, mas também os minoritários ⁷¹⁻⁷³.

A análise detalhada da composição dos compostos voláteis, bem como a identificação de quimiótipos, é realizada por métodos analíticos modernos como a cromatografia acoplada a métodos de deteção ⁷⁴. O principal mecanismo de separação da cromatografia gasosa (GC), um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases (a fase estacionária e a fase móvel), está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária (líquida). Os diversos componentes presentes na amostra são separados dentro da coluna cromatográfica, que contém a fase estacionária. As substâncias com maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo enquanto que as que têm menor interação são mais rapidamente eluídas. À medida que as substâncias são eluídas da coluna, podem ser quantificadas por um detetor específico ⁷⁵.

Os métodos analíticos usualmente descritos para caracterizar quimicamente os óleos essenciais são a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) ⁷⁶. Na cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), o princípio de funcionamento do detetor baseia-se na geração de um sinal elétrico a partir da combustão da amostra na chama. Para quantificação de uma amostra de concentração desconhecida, injeta-se um padrão, e/ou uma mistura de padrões nas mesmas condições. Os tempos de retenção dos padrões são comparados com os componentes

da amostra e utilizados para a sua identificação, podendo também ser utilizado o método de co-eluição do padrão na amostra, para confirmação da identificação de alguns componentes majoritários ^{77,78}.

A determinação dos índices de retenção pode dar um contributo valioso na identificação dos componentes, quer por GC-FID quer por GC-MS porque permite comparar os valores obtidos com valores encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade, auxiliando na identificação e caracterização dos compostos ⁷⁹. O índice de retenção (IR) de um componente está relacionando com o seu tempo de retenção (TR) e permite a comparação dos resultados obtidos em diferentes análises cromatográficas, para as mesmas condições cromatográficas. Para a sua determinação são utilizados padrões de alcanos (C_n) e o IR do componente em estudo (c) será comparado com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente, série homologa de *n*-alcanos) eluídos antes (*n*) e após (*n*+1) o pico do composto de interesse ⁸⁰. De acordo com Inczedy *et al.* ⁸¹, quando se utilizam colunas com gradiente de temperatura, deverá calcular-se o índice de retenção utilizando os números extraídos de seus algoritmos (equação 1).

$$IR = 100 \times \left(n + \frac{(TR_c - TR_n)}{(TR_{n+1} - TR_n)} \right) \quad \text{equação 1}$$

onde IR corresponde ao índice de retenção, *n* ao número de carbonos, TR_c ao tempo de retenção de um dado composto, TR_n ao tempo de retenção do alcano eluído imediatamente antes do composto e TR_{n+1} ao tempo de retenção do alcano eluído após esse composto.

A técnica de padronização interna é conhecidamente uma referência em análises quantitativas por GC, devido à sua elevada sensibilidade ⁸², no entanto, como os OEs são uma mistura complexa de muitos constituintes, e importa conhecer a proporção relativa dos seus componentes, são frequentemente caracterizados por percentagem (%) relativa de área dos seus componentes ⁸³. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) é uma poderosa técnica analítica. É utilizada para separar os componentes voláteis de misturas complexas, mas também pode registar um

espectro de massa de cada componente. Esta técnica permite-nos obter informações sobre os componentes da amostra, tempos de retenção de GC e os espectros de massa obtidos por impacto eletrónico (EI). Os tempos de retenção de GC estão relacionados com as propriedades químicas específicas das moléculas em questão (por exemplo, volatilidade, polaridade, presença de grupos funcionais específicos), enquanto o peso molecular (é indicador da composição atómica ⁷⁸. Na cromatografia por GC-MS muitos mais componentes são analisados, qualitativa e quantitativamente, mas a sua identificação é realizada somente através da pesquisa de similaridade direta nas bases de dados de MS associados aos instrumentos GC-MS ^{77,84}. No entanto, muitas vezes, as bibliotecas utilizadas podem estar incompletas ou não serem suficientemente eficientes para caracterizar completamente alguns compostos. Além disso, como os espectros de massa destes compostos são, geralmente, muito semelhantes, a identificação dos sinais torna-se muito difícil e às vezes impossível ⁷⁴. Na análise por GC é comum que duas ou mais substâncias sejam eluídas ao mesmo tempo, o que poderá dificultar a identificação dos componentes apenas com base nos índices de retenção, pelo que importa também identificar os componentes presentes na mistura pelo espectro de massa. No entanto, a análise por GC-MS, apenas com base no espectro de massa, também está limitada para a identificação dos óleos essenciais, ricos em isómeros ou compostos semelhantes, podendo a identificação não ser suficientemente precisa a partir do ponto de vista da estrutura química. Assim, em misturas tão complexas como os óleos essenciais, se combinarmos a técnica de GC-MS com a determinação dos índices de retenção, é possível identificar os isómeros ou compostos co-eluídos com maior fiabilidade e precisão se os picos de cromatografia forem separados com resolução suficiente ⁷⁴.

2.3. Metodologia

2.3.1. Reagentes

Os padrões dos componentes frequentemente presentes nos OEs, com elevado grau de purezas (> 99 %) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e à Extrasynthese (Genay, França).

2.3.2. Material vegetal

A recolha das plantas efetuou-se nas regiões Alentejo e Algarve (Quadro 2.1).

Quadro 2.1 - Dados da colheita das plantas

Planta	Local	Distrito, Região	Coordenadas	Época	Estágio	Nº herbário
<i>Lavandula luisieri</i> (rosmarinho)	Herdade da Mitra	Évora, Alentejo	38°31'36,6"N 8°01'21,6"W	Primavera (2010 / 2014)	Floração	HPAM_UE 000007 HPAM_UE 000015
<i>Lavandula pedunculata</i> (rosmarinho-maior)	Guadalupe	Évora, Alentejo	38°34'04,7"N 8°01'32,9"W	Primavera (2014)	Floração	HPAM_UE 000016
<i>Lavandula viridis</i> (rosmarinho-verde)	Serra do Caldeirão	Faro, Algarve	37°13'48,8" N 07°56'47,6"W	Primavera (2011 / 2014)	Floração	HPAM_UE 000009 HPAM_UE 000017
<i>Calamintha nepeta</i> (erva-das-azeitonas)	Herdade da Mitra	Évora, Alentejo	38°31'35,5"N 8°00'56,0"W	Outono e Primavera (2013)	Vegetativo e Floração	HPAM_UE 000006 HPAM_UE 000005
<i>Mentha spicata</i> (hortelã)	Montoito	Évora, Alentejo	38°30'18,7"N 7°34'23,3"W	Outono (2013)/ Primavera (2014)	Vegetativo e Floração	HPAM_UE 000001 HPAM_UE 000013
<i>Mentha pulegium</i> (poejo)	Montoito	Évora, Alentejo	38°30'18,7"N 7°34'23,3"W	Primavera (2014)	Floração	HPAM_UE 000021
<i>Origanum virens</i> (orégão)	Herdade da Mitra	Évora, Alentejo	38°31'35,5"N 8°00'56,0"W	Primavera (2014)	Vegetativo	HPAM_UE 000014
<i>Thymus mastichina</i> (tomilho bela-luz)	Herdade da Mitra	Évora, Alentejo	38°31'34,9"N 8°01'03;0"W	Primavera (2014)	Floração	HPAM_UE 000010
<i>Foeniculum vulgare</i> (funcho var. dulce)	Herdade da Mitra	Évora, Alentejo	38°31'41,2"N 8°01'14,0"W	Primavera (2013)	Vegetativo	HPAM_UE 000003

As plantas foram identificadas pela Prof^a Doutora Marizía Pereira, do Departamento de Paisagem, Ambiente e Ordenamento Universidade de Évora. Os espécimes foram depositados no Herbário da Universidade de Évora (Quadro 2.1).

Após a colheita das plantas, o material vegetal foi seco, na ausência de luz, à temperatura ambiente, num ambiente de baixa humidade, durante 1-2 dias. Posteriormente, procedeu-se à seleção manual, de modo a eliminar folhas/flores danificadas e ramos, garantindo, assim, que a pureza e a atividade do óleo essencial permanece inalteradas ^{85,86}. A planta foi triturada com auxílio de triturador mecânico e dividida em frações de massa conhecida (aproximadamente 100 g) e conservada a -20 °C, para posterior extração dos óleos essenciais.

2.3.3. Extração dos óleos essenciais

A extração do óleo essencial foi efetuada por hidrodestilação num aparelho tipo *Clevenger* (Figura 2.1). Para o efeito, colocou-se cerca de 100 g de material vegetal num balão de fundo redondo de 1000 ml e adicionou-se cerca de 500 ml de água destilada. Procedeu-se à extração do óleo essencial por hidrodestilação durante 3 horas, em conformidade com a metodologia proposta pelas Farmacopeias Portuguesa Europeia ^{86,87}. Registou-se o volume de óleo essencial recolhido no tubo graduado do aparelho *Clevenger* e calculou-se o rendimento da extração em função da massa de planta fresca. A essência foi recolhida para um frasco de vidro e armazenada a -20 °C ⁸⁶.



Figura 2.1 - Aparelho tipo *Clevenger*

2.3.4. Caracterização dos óleos essenciais

A caracterização dos óleos essenciais foi efetuada por avaliação das propriedades físicas e químicas. No que diz respeito às propriedades físicas, os parâmetros avaliados foram a densidade relativa, determinada em balança analítica, e o índice de refração, determinado com recurso a um refratómetro (Leica ABBE Mark II, modelo 10481). A caracterização química foi efetuada por cromatografia gasosa por GC-FID e por GC-MS. As análises de cada óleo essencial foram efetuadas em triplicado ($n=3$).

2.3.4.1. Análise por GC-FID

A análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) realizou-se num cromatógrafo gasoso GC-HP 5890 Series II, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) SUPELCOWAX™ 10 (Supelco, Milford, USA), utilizando como gás de arraste o hélio (fluxo de 0,6 ml He/min), nas seguintes condições:

temperatura inicial 70 °C (3 min), 70 - 220 °C (3 °C/min) e 220 °C (5 min); injetor e detetor à temperatura de 250 °C e razão de *split* 50:1. O volume injetado foi 0,2 µl de óleo diluído.

Os OEs foram ainda analisados por uma coluna apolar de sílica fundida (30m × 0,25 mm id, espessura de filme 0,50 µm) Zebron ZB-5HT Inferno™ (Phenomenex, EUA), instalado num cromatógrafo Shimadzu Nexis GC-2030 equipado com um autoinjeter AOC20i plus um software LabSolutions 5.92 (Shimadzu Corporation). As análises foram conduzidas sob as seguintes condições: programa de temperatura do forno a 40–110 °C (2 °C/min), 110–220 °C (3 °C/min) e 220–280 °C (10 °C/min), temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detetor 310 °C, taxa de fluxo do gás de arraste 1,6 mL / min He e razão de *split* 25: 1. Foi injetado 1 µL de OE diluído.

As análises de cada uma das amostras foram efetuadas em triplicado ⁸⁸. A quantificação dos componentes dos óleos essenciais foi determinada pelo método de normalização interna com base na área dos picos sem correção do fator de resposta ⁸⁹. A identificação dos componentes foi feita por comparação dos respetivos índices de retenção, calculados em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos de C₇-C₂₀ (equação 1), com os de padrões puros ou mencionados na literatura e confirmados pelo método da adição padrão ⁹⁰.

2.3.4.2. Análise GC-MS

A análise qualitativa foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massas GCMS-QP2010 Series (Shimadzu), com ionização por impacto eletrónico (EI) e analisador quadrupolo (Q), equipado com uma coluna capilar apolar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Heliflex® AT-5MS (Grace, Deerfield, USA), tendo como gás de arraste o hélio (0,94 ml/min) e temperatura do injetor de 250 °C, pressão na coluna de 45,1 kPa, energia de ionização de 0,2 kV e uma temperatura de interface de 260 °C. A temperatura foi programada a 40 °C (6 min),

40 - 280 °C (3 °C/min). Foi injetado 0,1 µl de amostra de óleo essencial com uma razão de *split* 1:100.

Os diversos constituintes químicos dos óleos essenciais foram identificados por comparação dos seus índices de retenção, com uma série homóloga de *n*-alcanos e os seus espectros de MS com padrões de referência na literatura ^{90,91} e espectros de massa a partir de bibliotecas NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*). A quantificação dos compostos foi realizada com base nas suas áreas dos picos de GC sem fatores de correção ⁸³, e a sua percentagem determinada com o valor médio de três injeções por amostra. A identificação dos componentes foi feita por comparação dos índices de retenção, calculados em relação a uma série de *n*-alcanos de C₇-C₃₀ (equação 1), e dos respetivos espectros de massa com espectros obtidos com compostos de referência ou publicados na literatura ⁹¹.

2.4. Resultados e discussão

O rendimento de extração dos óleos essenciais, por hidrodestilação, a densidade e o índice de refração estão indicados no Quadro 2.2, para cada uma das frações de cada uma das plantas em estudo: folha, flor e Mix (folha + espiga).

Quadro 2.2 - Características dos óleos essenciais

Óleo essencial	Parte da planta	Época	Rendimento extração (%)	Massa volúmica (g/mL)	Índice de refração (n_D^{20})
<i>Lavandula luisieri</i>	Folha	P 10	0,80 ± 0,11	0,945 ± 0,001	1,472 ± 0,001
	Espiga	P 10	0,51 ± 0,04	0,936 ± 0,005	1,479 ± 0,001
	Folha	P 14	0,33 ± 0,01	0,967 ± 0,001	1,475 ± 0,001
	Espiga	P 14	0,10 ± 0,01	0,971 ± 0,001	1,482 ± 0,001
	Mix	P 14	0,45 ± 0,05	0,934 ± 0,002	1,480 ± 0,001
<i>Lavandula pedunculata</i>	Folha	P 14	0,19 ± 0,01	0,932 ± 0,001	1,474 ± 0,001
	Espiga	P 14	0,37 ± 0,01	0,984 ± 0,001	1,491 ± 0,001
	Mix	P 14	0,30 ± 0,02	0,959 ± 0,001	1,471 ± 0,001
<i>Lavandula viridis</i>	Folha	P 11	0,83 ± 0,39	0,921 ± 0,001	1,472 ± 0,001
	Espiga	P 11	0,17 ± 0,13	0,903 ± 0,001	1,476 ± 0,001
	Folha	P 14	1,01 ± 0,05	0,968 ± 0,001	1,472 ± 0,001
	Espiga	P 14	0,28 ± 0,09	0,949 ± 0,001	1,478 ± 0,001
	Mix	P 14	1,47 ± 0,12	0,944 ± 0,002	1,473 ± 0,001
<i>Calamintha nepeta</i>	Mix	P 13	0,50 ± 0,05	0,927 ± 0,001	1,471 ± 0,001
		O 13	0,61 ± 0,18	0,990 ± 0,001	1,466 ± 0,001
<i>Mentha spicata</i>	Mix	O 13	0,59 ± 0,06	0,906 ± 0,001	1,494 ± 0,001
		P 14	0,16 ± 0,06	0,934 ± 0,002	1,492 ± 0,001
<i>Mentha pulegium</i>	Mix	P 14	0,66 ± 0,02	0,943 ± 0,001	1,480 ± 0,002
<i>Origanum virens</i>	Mix	P 14	0,16 ± 0,05	0,900 ± 0,001	1,496 ± 0,001
<i>Thymus mastichina</i>	Mix	P 14	1,06 ± 0,03	0,920 ± 0,002	1,465 ± 0,001
<i>Foeniculum vulgare</i>	Mix	P 13	0,52 ± 0,1	0,894 ± 0,001	1,510 ± 0,001

Legenda: Mix – parte aérea da planta (folha + espiga). P – Primavera, O - Outono

O rendimento de extração dos óleos essenciais variou entre 0,1 e 1,5 %, observando-se que o OE da espiga de *L. luisieri* e Mix (folha + espiga) de *L. viridis* apresentaram o menor e o maior rendimento de extração, respetivamente.

Para as três espécies de *Lavandula* spp. estudadas, observou-se que o rendimento de extração dos óleos essenciais variou com a parte da planta utilizada e

com a época de colheita. Além disso, observou-se que, quando comparados os rendimentos de extração dos OEs da mesma época e planta, o rendimento de extração dos OEs de *L. luisieri* e *L. viridis* Mix (folha + espiga) foi superior ao rendimento de extração dos OEs da folha, e este último superior ao rendimento de extração dos OEs da espiga para as espécies da *L. luisieri* (valores entre 0,1 % e 0,8 %) e *L. viridis* (valores entre 0,2 % e 1,5 %). No caso da espécie de *L. pedunculata*, o rendimento de extração da espiga foi superior ao rendimento de extração do óleo Mix (folha + espiga) e do OE da folha, com valores compreendidos entre 0,2 % e 0,4 %.

No caso de *C. nepeta*, o valor do rendimento de extração do óleo essenciais da Primavera (0,5 %) foi semelhante ao do valor obtido para o óleo do Outono (0,6 %).

Relativamente aos OEs das espécies *Mentha* spp., a planta com melhor rendimento de extração foi *M. pulegium* (0,7 %), seguida de *M. spicata* colhida na Primavera (0,59 %) e, por último de *M. spicata* colhida no Outono (0,2 %).

Quanto às restantes plantas, a que apresentou um rendimento superior de extração foi *T. mastichina* (1,1 %), seguida de *F. vulgare* (0,5 %) e, por último de *O. virens* (0,2 %).

A densidade dos óleos essenciais variou entre 0,894 (*F. vulgare*) e 0,990 (*C. nepeta*, Outono) e o índice de refração variou entre 1,465 (*T. mastichina*) e 1,510 (*F. vulgare*).

São inúmeros os fatores que contribuem para qualidade e para a variação do rendimento de extração dos óleos essenciais e dos seus constituintes, nomeadamente o local e a época de colheita e o tipo de solo, a espécie, o estágio de vida da planta, as diferentes funções metabólicas dos tecidos e a parte da planta utilizada ^{26,92}. Normalmente, o conteúdo de óleo essencial extraído é muito baixo quantitativamente, sendo normalmente inferior a 1 %, havendo algumas exceções, como no caso de botões florais de cravo, onde podem ser encontrados rendimentos de até 15 % ⁹³⁻⁹⁵.

Para cada espécie em particular, é importante escolher as melhores variedades. Na natureza não existe uma diferenciação clara entre fatores pré- e pós-colheita, pelo que todos, com diferente e variável grau de importância, determinarão e contribuirão

para o rendimento e qualidade do produto final. Sendo cada espécie um caso particular, é determinante o seu quimiótipo. Nos quadros que se seguem (2.3 a 2.11) estão descritas as composições químicas dos óleos em estudo.

A composição química dos óleos essenciais de *L. luisieri* está descrita no Quadro 2.3.

Quadro 2.3 - Composição química dos OEs de *L. luisieri*

Composto		% (média $\pm$ dp) ^a					MI ^b
		OE Folha		OE Espiga		Mix	
		P 10	P 14	P 10	P 14	P 14	
MH	α -pineno	-	0,43 $\pm$ 0,02	-	1,63 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,06	IR
MH	Canfeno	0,44 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	-	-	0,42 $\pm$ 0,01	IR
MH	β -pineno	4,14 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,03	-	2,91 $\pm$ 0,01	4,04 $\pm$ 0,13	IR
MO	1,8-cineol	17,52 $\pm$ 0,12	18,95 $\pm$ 0,03	8,85 $\pm$ 0,44	9,96 $\pm$ 0,09	13,25 $\pm$ 0,35	IR, NIST
MH	Z- β -ocimeno	0,36 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	-	-	0,58 $\pm$ 0,02	IR, NIST
MO	Fenchona	1,91 $\pm$ 0,02	2,41 $\pm$ 0,01	6,73 $\pm$ 0,33	9,69 $\pm$ 0,09	2,26 $\pm$ 0,12	IR, NIST
OC	3,4,4-trimetil-2-ciclohexanona	0,70 $\pm$ 0,01	-	-	0,30 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02	IR
MO	Cânfora	1,08 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,16	9,54 $\pm$ 0,45	5,89 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,03	IR, AP
MO	Linalol	3,89 $\pm$ 0,03	3,32 $\pm$ 0,02	3,19 $\pm$ 0,14	2,73 $\pm$ 0,02	3,63 $\pm$ 0,23	IR, NIST
MO	Acetato de <i>trans</i> - α -necrodilo	11,72 $\pm$ 0,59	16,36 $\pm$ 0,02	12,83 $\pm$ 0,59	9,72 $\pm$ 0,01	24,11 $\pm$ 1,21	IR
SH	β -cariofileno	3,07 $\pm$ 0,07	10,07 $\pm$ 0,50	5,40 $\pm$ 0,20	0,52 $\pm$ 0,01	6,58 $\pm$ 0,01	IR, AP
MO	4-terpineol	-	3,10 $\pm$ 0,78	-	5,28 $\pm$ 0,02	4,58 $\pm$ 0,01	IR, AP
MO	Acetato de lavandulilo	3,42 $\pm$ 0,12	3,49 $\pm$ 0,01	4,01 $\pm$ 0,41	1,69 $\pm$ 0,01	4,26 $\pm$ 0,25	IR, NIST
MO	Acetato de <i>cis</i> - α -necrodilo	2,24 $\pm$ 0,90	1,67 $\pm$ 0,05	2,32 $\pm$ 0,13	-	1,77 $\pm$ 0,12	IR
SH	<i>allo</i> -aromadendreno	0,88 $\pm$ 0,32	0,72 $\pm$ 0,01	-	0,34 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,05	IR, AP, NIST
OC	2,3,4,4-Tetrametil-5-metilene-ciclopenten-1-ona	2,18 $\pm$ 0,12	1,71 $\pm$ 0,01	2,46 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,02	1,94 $\pm$ 0,05	IR
MO	<i>trans</i> - α -necrodol	9,99 $\pm$ 0,50	8,20 $\pm$ 0,41	3,85 $\pm$ 0,18	0,18 $\pm$ 0,01	10,05 $\pm$ 0,88	IR
MO	<i>iso</i> -borneol	10,68 $\pm$ 0,53	0,43 $\pm$ 0,07	-	-	5,73 $\pm$ 0,29	IR
MO	Lavandulol	2,46 $\pm$ 0,09	0,94 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,22	IR, AP, NIST
MO	Acetato de mirtenilo	0,51 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,06	2,30 $\pm$ 0,17	0,42 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,03	IR

Quadro 2.3 - Composição química dos OEs de *L. luisieri* (continuação)

Composto		% (média ± dp) ^a					MI ^b
		OE Folha		OE Espiga		Mix	
		P 10	P 14	P 10	P 14	P 14	
MO	Borneol	1,20 ± 0,74	1,84 ± 0,01	-	1,37 ± 0,03	0.60 ± 0.02	IR
MO	Acetato de terpenilo	0,58 ± 0,08	0,24 ± 0,01	-	0,43 ± 0,02	1.89 ± 0.06	IR
MO	α-Terpineol	2,45 ± 0,03	0,46 ± 0,01	2,22 ± 0,10	1,13 ± 0,01	0.40 ± 0.01	IR, AP, NIST
MO	Acetato de nerilo	0,46 ± 0,02	0,45 ± 0,01	-	0,65 ± 0,01	0.84 ± 0.01	IR, AP, NIST
SH	Germacrene D	0,69 ± 0,01	0,88 ± 0,04	-	1,86 ± 0,01		IR
OC	1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroxi-2-ciclopenteno	2,29 ± 0,02		-	0,41 ± 0,01	1.58 ± 0.07	IR
SO	Óxido de cariofileno	0,64 ± 0,02	0,80 ± 0,01	1,99 ± 0,05	1,01 ± 0,07	0.71 ± 0.02	IR, NIST
SO	Viridiflorol	1,51 ± 0,05	0,23 ± 0,01	-	0,36 ± 0,01	0.87 ± 0.01	IR
SO	α-Copaen-8-ol	0,93 ± 0,05	0,18 ± 0,01	-	-	2.79 ± 0.10	IR
SO	T-cadinol	-		2,53 ± 0,05	-	-	IR
SO	α-murolol	-		5,22 ± 0,22	-	-	IR
SO	α-cadinol	-	0,40 ± 0,48	2,42 ± 0,19	0,63 ± 0,16	0.81 ± 0.02	IR, NIST
OC	Ácido 3,4,5,5-tetrametilciclopenta-1,3-dienocarboxílico	-		2,16 ± 0,22	-	-	IR
SH	Calareno	0,58 ± 0,04		2,60 ± 0,57	-	-	IR
Total identificado		89.72 ± 6.07	79,57 ± 3,89	81,92 ± 4,54	61,12 ± 0,89	99,58 ± 4,40	
Grupo de compostos							
Hidrocarbonetos monoterpênicos (MH)		6.15 ± 0.07	1,81 ± 0,07	-	4,54 ± 0,02	6,21 ± 0,22	
Monoterpenos oxigenados (MO)		70.11 ± 5.29	63,12 ± 2,75	57,12 ± 2,95	50,77 ± 0,61	76,94 ± 3,84	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SH)		5.22 ± 0.44	11,24 ± 0,53	8,01 ± 0,77	1,52 ± 0,05	7,34 ± 0,06	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		3.08 ± 0.12	0,81 ± 0,49	12,17 ± 0,50	-	4,90 ± 0,15	
Outros compostos (OC)		5.18 ± 0.15	2,59 ± 0,05	4,63 ± 0,32	2,89 ± 0,04	4,20 ± 0,13	

Legenda: OE_Mix – OE da parte aérea da planta (folha + espiga); ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

Os óleos essenciais de *L. luisieri* apresentaram um perfil químico rico em monoterpenos oxigenados (> 50 %) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (5-11 %). Os óleos essenciais da folha da Primavera de 2010 e de 2014 apresentaram como compostos majoritários o 1,8-cineol (18 e 19 %), acetato de *trans*-α-necrodilo (12 e 16 %), *trans*-α-necrodol (10 e 8 %), respectivamente. O óleo da folha de 2010 apresentou

ainda um elevado teor em *iso*-borneol (11 %), enquanto o óleo de 2014 apresentou um elevado teor em β -cariofileno (10 %).

Os óleos essenciais da espiga da Primavera de 2010 e de 2014 apresentaram como compostos maioritários o 1,8-cineol (9 e 10 %) e o acetato de *trans*- α -necrodilo (13 e 9 %), respetivamente. Observou-se ainda um teor de 10 % de fenchona no óleo essencial da espiga da Primavera de 2014, enquanto no óleo de 2010 o teor de fenchona foi de 7 %.

O óleo essencial da mistura (OEMix) apresentou como compostos maioritários 1,8-cineol (13 %), acetato de *trans*- α -necrodilo (24 %) e *trans*- α -necrodol (10 %).

Estudos anteriores efetuados com óleos essenciais de *L. luisieri* revelaram que este óleo é muito distinto dos óleos essenciais das outras *Lavandula* spp. Garcia-Vallejo *et al.* ⁹⁶ identificaram a presença de monoterpenos irregulares ciclopenténicos derivados do necrodano como sendo: (1) *trans*- α -necrodol e (2) acetato de *trans*- α -necrodilo; J. Sanz *et al.* ⁹⁷ isolaram ainda, o acetato de *cis*- α -necrodilo em conjunto com (1) e (2).

Em estudos efetuados por Garcia-Vallejo *et al.* ⁹⁶ e Lavoine-Hannequelle e Casabianca ³¹ com *L. luisieri* de Espanha, os óleos essenciais apresentaram como compostos principais 1,8-cineol, lavandulol, acetato de lavandulilo, linalol e os seus acetatos, também presentes noutras espécies do género *Lavandula*, além de uma série de compostos com a estrutura 1,2,2,3,4-pentametilciclopentano (necrodano). Segundo Matos *et al.* ⁹⁸ as populações de Espanha apresentaram elevados teores de 1,8-cineol, fenchona, cânfora e 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-2-ciclopenteno-1-ona ^{97,99} e, nas do sul de Portugal, o composto maioritário foi sempre o 1,8-cineol. O acetato *trans*- α -necrodilo apareceu como composto minoritário

De acordo com Garcia-Vallejo *et al.* ¹⁰⁰, *L. luisieri* pertence ao quimiótipo 1,8-cineol/esteres. Geralmente, os constituintes característicos deste quimiótipo aparecem em concentrações superiores a 10 %, nos seus óleos. Apesar de poderem ocorrer diferenças quantitativas significativas na quantidade dos constituintes dos óleos essenciais de *L. luisieri*, os monoterpenos irregulares estão sempre presentes. Até ao

momento, *L. luisieri* é a única espécie vegetal fonte de derivados de necrodano, podendo estes serem considerados um marcador químico-taxonomico desta espécie ³⁴.

No Quadro 2.4 está representada a composição químicas dos óleos essenciais da folha, espiga e Mix (folha + espiga) de *L. pedunculata*.

O óleo essencial *L. pedunculata* é rico em monoterpenos oxigenados (> 75 %), observando-se diferenças na composição química dos óleos essenciais da folha, espiga e Mix, quer no número como na percentagem relativa dos seus constituintes, apresentando como constituintes maioritários a cânfora e a fenchona. No caso do óleo essencial da folha, o teor de cânfora (39 %) foi superior a o teor de fenchona (28 %), enquanto no óleo essencial da espiga e Mix o teor de fenchona (41 % e 42 %, respetivamente) foi superior ao teor de cânfora (36 % e 23 %, respetivamente).

Quadro 2.4 - Composição química dos OEs de *L. pedunculata*

Composto		% (média ± dp) ^a			MI ^b
		folha	espiga	Mix	
HM	α-pineno	2,79 ± 0,16	0,15 ± 0,01	3,66 ± 0,30	IR
MH	Canfeno	-	2,72 ± 0,04	0,73 ± 0,04	IR
MH	β-pineno	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,04	IR
MH	Sabineno	-	-	0,58 ± 0,01	IR
MH	β-mirceno	1,39 ± 0,02	-	2,12 ± 0,18	IR
MH	α-terpineno	4,39 ± 0,07	-	2,29 ± 0,24	IR, NIST
MH	Limoneno	-	-	0,08 ± 0,01	IR, NIST
MH	1,8-cineol	0,13 ± 0,01	3,17 ± 0,02	0,28 ± 0,11	IR, NIST
MO	cis-β-ocimeno	0,12 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,15 ± 0,01	IR, NIST
MH	trans-β-ocimeno	0,47 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,42 ± 0,02	IR, NIST
MH	Fenchona	28,02 ± 0,28	40,82 ± 0,09	42,33 ± 0,18	IR, AP, NIST
MO	Oct-1-en-3-ol	-	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	IR
OC	Canfelinona	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,14 ± 0,05	IR
MO	Óxido de trans-linalol	0,31 ± 0,01	-	0,14 ± 0,08	IR
MO	Acetato de fenchil	0,24 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,04	IR
MO	α-Canfolenal	0,62 ± 0,01	-	0,28 ± 0,01	IR, NIST
MO	Cânfora	38,58 ± 0,21	35,59 ± 0,12	22,94 ± 1,79	IR, AP, NIST
MO	Linalol	3,68 ± 0,02	1,75 ± 0,04	2,91 ± 0,02	IR, NIST
MO	α-fenchol	0,30 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,33 ± 0,07	IR

Quadro 2.4 Composição química dos OEs de *L. pedunculata* (continuação)

Composto		% (média $\pm$ dp) ^a			MI ^b
		folha	espiga	Mix	
MO	β - cariofileno	5,49 $\pm$ 0,01	2,49 $\pm$ 0,59	3,72 $\pm$ 0,62	IR
SH	Acetato de lavandulilo	0,26 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,01	IR
MO	Acetato de bornilo	0,35 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,01	IR, AP, NIST
MO	4-terpineol	0,91 $\pm$ 0,01	-	0,51 $\pm$ 0,02	IR, NIST
MO	<i>cis</i> -verbenol	0,35 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,12	IR, NIST
FP	Estragol	2,30 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	1,76 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	α -terpineol	-	-	0,69 $\pm$ 0,72	IR, NIST
MO	Acetato de terpenilo	2,33 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,02	1,99 $\pm$ 0,54	IR, NIST
MO	Borneol	1,30 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,01	2,27 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	Eremofileno	-	-	0,21 $\pm$ 0,21	IR, NIST
SH	δ -cadineno	0,41 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,01	IR
SH	Ledol	-	-	0,24 $\pm$ 0,01	IR, NIST
SO	Globulol	0,77 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,06	IR, NIST
Total identificado		95,93 $\pm$ 1,06	92,15 $\pm$ 1,76	91,97 $\pm$ 1,16	
Grupo de compostos					
Hidrocarbonetos monoterpénicos (MH)		9,37 $\pm$ 0,29	3,84 $\pm$ 0,08	10,17 $\pm$ 0,85	
Monoterpenos oxigenados (MO)		76,72 $\pm$ 0,66	84,36 $\pm$ 0,43	75,85 $\pm$ 3,85	
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos (SH)		5,91 $\pm$ 0,03	2,77 $\pm$ 0,63	4,34 $\pm$ 0,84	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		0,77 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,01	0,98 $\pm$ 0,07	
Fenilpropanóides (FP)		2,30 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	1,76 $\pm$ 0,01	
Outros compostos (OC)		0,62 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,02	

Legenda: Mix – folha + espiga; ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

Um estudo realizado com *L. pedunculata* do Centro de Portugal ³⁷ refere que o seu óleo essencial é constituído maioritariamente por monoterpenos oxigenados (69 - 89 %) e hidrocarbonetos monoterpénicos (4 - 23 %), apresentando como constituintes maioritários a fenchona (1 - 60 %), o 1,8-cineol (2 - 56 %) e a cânfora (4 - 48 %). Os resultados da composição química destes óleos estão parcialmente de acordo com a bibliografia que também demonstra a abundância de monoterpenos oxigenados, embora com diferenças quantitativas no que diz respeito às percentagens dos vários compostos ^{37,98}. O perfil químico destes óleos essenciais difere dos perfis químicos das espécies de *L. pedunculata* do Centro de Portugal, observados por M. Zuzarte *et al.* ³⁷ e categorizados em três quimiótipos: 1,8-cineol, 1,8-cineol/cânfora e fenchona. O perfil químico destes óleos essenciais é semelhante ao perfil descrito por

P. Costa *et al.* ¹⁰¹ num estudo realizado com *L. pedunculata* florida do Algarve, que apresentou como componentes maioritários a cânfora (40,6 %) e a fenchona (38 %).

No Quadro 2.5 está descrita a composição química dos óleos essenciais da folha, espiga e Mix de *L. viridis*.

Quadro 2.5 - Composição química dos OEs de *L. viridis*

Composto		% (média ± dp) ^a					MI ^b
		OE Folha		OE Espiga		OE Mix	
		P 11	P 14	P 11	P 14	P 14	
MH	α-pineno	5,11 ± 0,13	2,60 ± 0,07	2,89 ± 0,05	1,04 ± 0,03	3,00 ± 0,02	IR
MH	Canfeno	1,83 ± 0,02	0,96 ± 0,01	1,90 ± 0,03	0,89 ± 0,02	1,04 ± 0,01	IR
MH	β-pineno	0,85 ± 0,02	1,39 ± 0,02	0,81 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,40 ± 0,01	IR
MH	Sabineno	0,23 ± 0,01	1,27 ± 0,02	0,42 ± 0,01	-	1,22 ± 0,02	IR
MH	β-mirceno	0,33 ± 0,01	-	0,20 ± 0,01	0,71 ± 0,01	-	IR, NIST
MO	1,8-cineol	43,81 ± 0,32	48,54 ± 1,67	3,35 ± 0,04	18,59 ± 0,37	48,01 ± 0,03	IR, NIST
MH	γ-terpineno	0,31 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,19 ± 0,01			IR, NIST
MH	β-felandreno	0,43 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,68 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,58 ± 0,01	IR
MH	Terpinoleno	-	-	1,01 ± 0,08	-	-	IR, NIST
MO	Fenchona	0,69 ± 0,01	-	6,18 ± 0,05	-	-	IR
MO	Óxido de <i>cis</i> -linalol (furanoide)	0,41 ± 0,01	-	0,35 ± 0,01	-	-	IR
MO	Óxido de <i>trans</i> -linalol (furanoide)	0,19 ± 0,01	1,34 ± 0,03	-	-	1,21 ± 0,02	IR
MO	α-canfolenal	0,61 ± 0,02	1,10 ± 0,02	0,33 ± 0,03	-	0,95 ± 0,01	IR, NIST
MO	Cânfora	13,36 ± 0,01	12,36 ± 0,47	21,76 ± 0,21	34,10 ± 0,88	14,41 ± 0,19	IR, NIST
MO	Linalol	11,85 ± 0,03	7,19 ± 0,26	20,92 ± 0,22	10,44 ± 0,27	7,09 ± 0,01	IR, NIST
MO	Acetato de linalilo	0,38 ± 0,01	-	0,45 ± 0,01	-	-	IR, NIST
MO	Acetato de bornilo	0,78 ± 0,01	1,44 ± 0,04	0,71 ± 0,08	1,20 ± 0,02	1,42 ± 0,01	IR, AP, NIST
MO	4-terpineol	0,22 ± 0,01	-		1,10 ± 0,01	-	IR, NIST
MO	<i>cis</i> -verbenol	1,44 ± 0,01	1,65 ± 0,01	0,48 ± 0,01	2,08 ± 0,04	1,74 ± 0,06	IR, NIST
MO	Mentol	0,81 ± 0,02		0,91 ± 0,03	-		IR, NIST
MO	<i>iso</i> -borneol	-	1,23 ± 0,01	-	-	1,29 ± 0,03	IR
MO	Acetato de terpenilo	2,08 ± 0,01	2,24 ± 0,02	0,59 ± 0,06	3,37 ± 0,09	2,72 ± 0,04	IR, NIST
MO	α-terpineol	3,03 ± 0,02	4,19 ± 0,09	0,78 ± 0,04	4,20 ± 0,09	4,41 ± 0,06	IR, NIST
MO	Borneol	5,06 ± 0,02	1,89 ± 0,03	5,20 ± 0,10	1,60 ± 0,03	1,87 ± 0,01	IR, NIST
SH	β-selineno	0,72 ± 0,01	1,49 ± 0,62	14,00 ± 0,03	1,73 ± 0,01	1,40 ± 0,79	IR, NIST
SH	α-selineno	0,38 ± 0,01	-	0,92 ± 0,01	-	1,16 ± 0,01	IR
SH	Cadineno	0,27 ± 0,01	0,80 ± 0,12	1,08 ± 0,01	2,28 ± 0,05	1,18 ± 0,01	IR, NIST
MO	Carvona	0,26 ± 0,01	0,86 ± 0,01	2,30 ± 0,47	-	-	IR, NIST

Quadro 2.5 Composição química dos OEs de *L. viridis* (continuação)

Composto		% (média $\pm$ dp) ^a					MI ^b
		OE Folha		OE Espiga		OE Mix	
		P 11	P 14	P 11	P 14	P 14	
MO	Acetato de geranilo	0,26 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,49	0,47 $\pm$ 0,01	1,47 $\pm$ 0,02	2,04 $\pm$ 0,28	IR, NIST
MO	Mirtenol	-	0,78 $\pm$ 0,01	-	-	-	IR, NIST
SH	Selina-3,7(11)-dieno	2,66 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,01	5,35 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,02	-	IR, NIST
MO	Anetol	0,17 $\pm$ 0,01	-	1,14 $\pm$ 0,01	-	-	IR, NIST
SO	Ledol	0,26 $\pm$ 0,01	-	2,57 $\pm$ 0,03	1,55 $\pm$ 0,03	-	IR, NIST
SO	α -cadinol	0,23 $\pm$ 0,02	1,57 $\pm$ 0,22	0,45 $\pm$ 0,01	2,53 $\pm$ 0,15	1,76 $\pm$ 0,01	IR
MO	carvacrol	0,21 $\pm$ 0,01	-	1,51 $\pm$ 0,14	-	-	IR
Total identificado		99,22 $\pm$ 0,94	98,02 $\pm$ 4,30	98,99 $\pm$ 1,85	91,84 $\pm$ 2,18	99,90 $\pm$ 1,65	
Grupo de compostos							
Hidrocarbonetos monoterpênicos (MH)		9,77 $\pm$ 0,23	7,16 $\pm$ 0,16	8,09 $\pm$ 0,22	4,46 $\pm$ 0,08	7,24 $\pm$ 0,07	
Monoterpenos oxigenados (MO)		84,93 $\pm$ 0,57	86,17 $\pm$ 3,17	67,42 $\pm$ 1,52	78,14 $\pm$ 1,83	87,15 $\pm$ 0,76	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SH)		4,03 $\pm$ 0,11	3,12 $\pm$ 0,75	21,34 $\pm$ 0,06	5,16 $\pm$ 0,09	3,75 $\pm$ 0,81	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		0,48 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,12	3,02 $\pm$ 0,04	4,09 $\pm$ 0,18	1,76 $\pm$ 0,01	

Legenda: Mix – folha + espiga; ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados);

^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

O óleo essencial de *L. viridis* revelou elevado teor de monoterpenos oxigenados (> 65 %), nomeadamente, 1,8-cineol (3 - 49 %), cânfora (12 - 43 %), linalol (7 - 21 %) e borneol (2 - 5 %) em percentagens variáveis para a folha, espiga e Mix, nas duas épocas. Observaram-se ainda diferenças na diversidade e na proporção dos seus constituintes. Quando comparamos o óleo essencial Mix com os respetivos OEs da folha e da espiga, observou-se que o perfil químico e o teor dos componentes maioritários do óleo essencial Mix apresentava maior semelhança com os OEs da folha do que com o óleo da espiga. Quando comparamos os OEs das duas épocas observamos que o óleo da folha da Primavera 2011 apresentava um teor de linalol e borneol superior ao óleo da Primavera de 2014, enquanto o óleo da espiga de 2011 apresentou baixo teor em 1,8-cineol (3 %) e elevado teor de linalol (21 %).

As diferenças observadas nos OEs dos dois anos não se relacionam com a origem geográfica ou o a fase de desenvolvimento das plantas, mas provavelmente refletem a

variabilidade da composição química dos óleos essenciais com as condições ambientais ⁶⁵

A composição química do óleo essencial de *L. viridis* deste estudo está de acordo com estudos anteriores, onde também se observou a predominância de terpenóides, nomeadamente monoterpenos oxigenados. Alguns autores citam que o óleo essencial da parte aérea (folha + espiga) desta espécie contém maioritariamente monoterpenos oxigenados (> 50 %) e hidrocarbonetos monoterpénicos (> 20 %) e sesquiterpenos (< 5 %), apresentando como compostos maioritários: 1,8-cineol (22 - 42 %), cânfora (2,9 - 31,5 %), α -pineno (0,3 - 14,4 %) e linalol (0,2 - 7,8 %) ^{38-40,98}.

No Quadro 2.6 está representada a composição químicas dos óleos essenciais da Primavera e do Outono de *C. nepeta*, para 2 épocas distintas.

Foram identificados 20 compostos para o óleo essencial de *C. nepeta* da Primavera, representando 85 % de monoterpenos oxigenados, 10 % de hidrocarbonetos monoterpénicos e 1,7 % de sesquiterpenos. No OE de *C. nepeta* do Outono, foram identificados 29 compostos, representando 91 % de monoterpenos oxigenados, 7 % de hidrocarbonetos monoterpénicos e 1 % de sesquiterpenos. O óleo essencial obtido na Primavera apresentou como componentes maioritários o 1,8-cineol (23 %), o limoneno (8 %), a isomentona (13 %), a mentona (13 %), a isopulegona (15 %), o mentol (9 %) e a pulegona (6 %), enquanto o óleo essencial obtido no Outono apresentou como componentes maioritários o mentona (22 %), o mentol (16 %), o 1,8-cineol (28 %) e pulegona (5 %). Os resultados de composição química dos óleos desta planta revelam dois perfis distintos para as duas épocas de colheita, podendo estes estarem relacionados às diferentes fases de desenvolvimento da planta.

Quadro 2.6 - Composição química dos OEs de *C. nepeta*

Composto		% (média ± dp) ^a		MI ^b
		P 13	O 13	
MH	α-pineno	0,53 ± 0,01	0,70 ± 0,04	IR, NIST
MH	canfeno	0,03 ± 0,00	0,10 ± 0,01	IR, NIST
MH	β-pineno	1,35 ± 0,07	1,77 ± 0,09	IR, NIST
MH	β-mirceno	-	0,80 ± 0,04	IR, NIST
MH	α-felandreno	-	0,28 ± 0,01	IR, AP, NIST
MH	α-Terpinene	-	tr	IR, NIST
MH	p-cimeno	0,42 ± 0,02		IR, NIST
MH	limoneno	7,55 ± 0,38	2,61 ± 0,13	IR, NIST
MO	1,8-cineol	22,86 ± 0,22	27,86 ± 0,22	IR, NIST
MH	Z-β-ocimeno	-	tr	IR, NIST
MH	E-β-ocimeno	-	0,20 ± 0,01	IR, NIST
MH	γ-terpineno	-	tr	IR, NIST
MO	cis-β-terpineol	0,17 ± 0,01	-	IR, NIST
MO	hidrato de sabineno	-	tr	IR, AP, NIST
MO	fenchona	0,13 ± 0,01	1,91 ± 0,01	IR, NIST
MO	linalol	0,28 ± 0,01	0,50 ± 0,03	IR, NIST
MO	trans-pinocarveol	-	0,11 ± 0,01	IR, NIST
MO	isopulegol	1,26 ± 0,06	3,41 ± 0,17	IR, AP, NIST
MO	isopulegona	15,13 ± 0,11	2,69 ± 0,03	IR, NIST
MO	mentona	13,45 ± 0,67	22,00 ± 0,31	IR, NIST
MO	isomentona	12,77 ± 0,64	2,59 ± 0,03	IR, AP, NIST
MO	neo-mentol	4,74 ± 0,19	2,20 ± 0,01	IR, NIST
MO	mentol	9,03 ± 0,45	16,30 ± 0,03	IR, NIST
MO	α-terpineol	0,46 ± 0,02	0,32 ± 0,02	IR, NIST
MO	estragol	0,06 ± 0,00	1,09 ± 0,05	IR, NIST
MO	pulegona	5,70 ± 0,02	5,11 ± 0,26	IR, AP, NIST
MO	carvone	0,07 ± 0,00	0,38 ± 0,02	IR, NIST
MO	acetate de mentilo	-	0,32 ± 0,02	IR, NIST
MO	anetol	-	4,38 ± 0,10	IR, NIST
SH	β- cariofileno	-	0,71 ± 0,04	IR, NIST
SH	elemene	-	0,10 ± 0,01	IR, NIST
SO	óxido de cariofileno	1,70 ± 0,09	0,18 ± 0,01	IR, NIST
Total identificado		93,77 ± 1,20	98,62 ± 1,65	

Quadro 2. 6 Composição química dos OEs de *C. nepeta* (continuação)

Grupo de compostos			
Hidrocarbonetos monoterpénicos (MH)	9,88 ± 0,48	6,46 ± 0,32	
Monoterpenos oxigenados (MO)	85,10 ± 2,32	91,17 ± 1,28	
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos (SH)	-	0,81 ± 0,04	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)	1,70 ± 0,09	0,18 ± 0,01	

Legenda: ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão

Estudos prévios com óleos essenciais de *C. nepeta*, sugerem a existência de dois quimiótipos: um caracterizado pela predominância de pulegona e mentona, mentol e/ou os seus isómeros, piperitenona, piperitona e os seus óxidos ¹⁰²⁻¹⁰⁹, e o outro tipo caracterizado pela predominância de óxido de piperitenona e/ou óxido de piperitona ^{109,110}.

Marongiu *et al.* ⁴⁴, num estudo de comparação do perfil químico efetuado com *C. nepeta* portuguesa e italiana relataram que o óleo essencial da *C. nepeta* portuguesa apresentou como componentes maioritários a isomentona, 1,8-cineol e isopulegona, enquanto o OE italiano apresentou como componente maioritário a pulegona. Estudos realizados com *C. nepeta* do Sul de Portugal relataram que este óleo essencial apresentava como componentes maioritários a 1,8-cineol, o isopulegol e a isopulegona ^{111,112}.

Os resultados do nosso estudo e os dados da literatura que indicam a presença de um polimorfismo químico notável. Além disso, neste estudo, foi ainda possível observar diferenças significativas na composição química dos óleos essenciais de *C. nepeta* colhida no Alentejo na Primavera e no Outono.

No Quadro 2.7 está sumariada a composição química dos óleos essenciais de *M. spicata* do Outono e da Primavera.

Quadro 2.7 - Composição química dos OEs de *M. spicata*

Composto		% (média $\pm$ dp) ^a		MI ^b
		O 13	P 14	
MH	α -pineno	0,61 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,06	IR
MH	Canfeno	0,62 $\pm$ 0,01	1,49 $\pm$ 0,07	IR
MH	β -pineno	0,45 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,05	IR
MH	Mirceno	0,71 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,04	IR
MH	Limoneno	13,89 $\pm$ 0,03	18,31 $\pm$ 0,92	IR, NIST
MO	1,8-cineol	1,20 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,02	IR, NIST
MO	Sabineno	-	0,45 $\pm$ 0,02	IR, NIST
MH	γ -terpineno	0,21 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,05	IR
MO	Isomentona	2,38 $\pm$ 0,01	-	IR
MO	Pinocarvona	-	-	IR
MO	Acetato de bornilo	4,66 $\pm$ 0,34	-	IR
SH	β -cariofileno	1,85 $\pm$ 0,50	-	IR, NIST
MO	4-terpineol	0,82 $\pm$ 0,20	7,58 $\pm$ 0,38	IR, NIST
MO	Isoborneol	1,07 $\pm$ 0,04	-	IR
MO	Carvona	64,98 $\pm$ 0,21	63,22 $\pm$ 0,16	IR, NIST
MO	Actato de geranilo	0,47 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,04	IR
MO	<i>trans</i> -carveol	-	-	IR
MO	Geraniol	0,47 $\pm$ 0,01	-	IR
MO	anetol	-	-	IR, NIST
SO	Óxido de cariofileno	0,65 $\pm$ 0,01	-	IR
SH	α -humuleno	1,14 $\pm$ 0,01	1,11 $\pm$ 0,06	IR
MO	carvacrol	0,55 $\pm$ 0,01	-	IR
Total identificado		97,56 $\pm$ 1,44	98,88 $\pm$ 1,94	
Grupo de compostos				
Hidrocarbonetos monoterpênicos (MH)		17,41 $\pm$ 0,09	24,85 $\pm$ 1,24	
Monoterpenos oxigenados (MO)		76,50 $\pm$ 0,83	72,01 $\pm$ 0,60	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SH)		3,00 $\pm$ 0,51	-	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		0,65 $\pm$ 0,01	1,11 $\pm$ 0,06	

Legenda: ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados);

^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

Os óleos essenciais de *M. spicata* apresentaram uma composição rica em monoterpenos oxigenados (> 70 %) e hidrocarbonetos monoterpênicos (> 17 %). O óleo essencial do Outono diferiu do óleo essencial da Primavera na presença e na quantidade dos compostos minoritários, no entanto apresentou dois componentes majoritários em quantidades semelhantes: o limoneno (14 % e 18 %) e a carvona (65 % e 63 %) para o

óleo do Outono e da Primavera, respetivamente. Observou-se ainda a quantidade de 4-terpineol era bastante diferente nos dois óleos: o óleo do Outono apresentou uma percentagem relativa inferior a 1 % enquanto o óleo da Primavera apresentou cerca de 8 % deste composto. De referir ainda que o óleo do Outono, ao contrário do óleo da Primavera, apresentou na sua composição o acetato de bornilo (5 %).

Na bibliografia encontramos uma grande variação na composição química dos óleos essenciais de *M. spicata*, tanto na selvagem como na cultivada, de todo o mundo. Em estudos anteriores foram descritos uma série de quimiótipos, com prevalência de pulegona, carvona, linalol, piperitona, óxido de piperitona, mentona/isomentona, pulegona/mentona/isomentona, pulegona/piperitona e carvona/limoneno ¹¹³⁻¹¹⁶.

Neste estudo, os óleos essenciais de *M. spicata*, poderão pertencer ao quimiótipo carvona/limoneno, de acordo com os estudos efetuados com *M. spicata* na região Mediterrânea ¹¹⁷⁻¹²⁰, que apresentam como componente maioritário a carvona (45 - 77 %).

O perfil químico dos óleos essenciais de *M. pulegium* está representado no Quadro 2.8. O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou como componentes maioritários a pulegona (79 %) e a isomentona (10 %), expressando o quimiótipo pulegona. Este óleo apresentou um perfil químico maioritariamente constituído por monoterpenos oxigenados (> 90 %).

Quadro 2.8 - Composição química dos OEs de *M. pulegium*

Composto		% (média $\pm$ dp) ^a	MI ^b
MH	α -pineno	0,19 $\pm$ 0,12	IR
MH	β -pineno	0,53 $\pm$ 0,01	IR
MH	Limoneno	0,17 $\pm$ 0,07	IR
MO	1,8-Cineol	0,09 $\pm$ 0,01	IR
MH	γ -terpinene	0,17 $\pm$ 0,01	IR
MO	α -terpinolene	0,39 $\pm$ 0,37	IR
MO	Fenchona	1,04 $\pm$ 0,07	IR
MO	Isomentona	10,23 $\pm$ 0,30	IR
MO	Mentona	1,35 $\pm$ 0,08	IR
MO	Acetato de linalilo	0,51 $\pm$ 0,03	IR
MO	Isopulegol	0,73 $\pm$ 0,09	IR
MO	Pulegona	78,98 $\pm$ 7,40	IR
Total identificado		94,37 $\pm$ 8,56	
Grupo de compostos			
Hidrocarbonetos monoterpénicos (MH)		1,06 $\pm$ 0,22	
Monoterpenos oxigenados (MO)		93,32 $\pm$ 8,35	
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos (SH)		-	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		-	

Legenda: ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

Os resultados obtidos para a composição química deste óleo essencial estão de acordo com Lorenzo *et al.* ¹²¹ e Rodríguez-Solana *et al.* ¹²², onde os óleos essenciais de poejo apresentaram como compostos maioritários a pulegona (aproximadamente 70 %) e a mentona (5 - 7 %) Comparativamente com outros estudos do óleo essencial isolado desta mesma espécie, colhida em Portugal, os resultados foram qualitativa e quantitativamente muito semelhantes ao nível dos compostos dominantes. ⁴⁹.

A composição química do óleo essencial não florido de *Origanum vulgare* está representada no Quadro 2.9.

Quadro 2.9 - Composição química dos OEs de *O. virens*

	Composto	% (média $\pm$ dp) ^a	MI ^b
MH	α -tujeno	0,90 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MH	α -pineno	0,51 $\pm$ 0,03	IR, NIST
MH	canfeno	0,32 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MH	β -pineno	0,30 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MH	β -mirceno	1,60 $\pm$ 0,08	IR, NIST
MH	α -felandreno	0,20 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MH	α -terpineno	2,42 $\pm$ 0,12	IR, NIST
MH	<i>m</i> -cimeno	12,20 $\pm$ 0,10	IR, NIST
MO	1,8-cineol	4,90 $\pm$ 0,15	IR, NIST
MH	Z- β -ocimeno	0,51 $\pm$ 0,03	IR, NIST
MH	E- β -ocimeno	6,20 $\pm$ 0,31	IR, NIST
MH	γ -terpineno	20,17 $\pm$ 0,31	IR, AP, NIST
MO	fenchone	0,10 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	linalol	0,30 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	isomentona	0,40 $\pm$ 0,02	IR, NIST
MO	borneol	0,60 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	4-terpineol	0,70 $\pm$ 0,24	IR, NIST
MO	estragol	0,10 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	pulegona	1,80 $\pm$ 0,09	IR, NIST
MO	éter metílico de isotimol	3,49 $\pm$ 0,08	IR, NIST
MO	éter metílico de timol	13,08 $\pm$ 0,66	IR, NIST
MO	anetol	0,60 $\pm$ 0,03	IR, NIST
MO	timol	19,40 $\pm$ 0,15	IR, AP, NIST
SH	β -cariofilleno	1,80 $\pm$ 0,09	IR, NIST
SH	γ -elemeno	1,60 $\pm$ 0,08	IR, NIST
SH	D-germacreno	1,40 $\pm$ 0,07	IR, NIST
SH	β -bisaboleno	2,51 $\pm$ 0,10	IR, NIST
SO	Spatulenol	0,50 $\pm$ 0,03	IR, NIST
Total identificado		98,61 $\pm$ 2,62	
Grupo de compostos			
Hidrocarbonetos monoterpênicos (MH)		45,33 $\pm$ 1,01	
Monoterpenos oxigenados (MO)		45,47 $\pm$ 1,24	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SH)		7,31 $\pm$ 0,34	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		0,50 $\pm$ 0,03	

Legenda: ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

Foram identificados 28 compostos no óleo essencial da folha verdes de orégãos, representando 99 % dos constituintes dos óleos essenciais, dos quais 45 %

correspondem a hidrocarbonetos monoterpénicos, 46 % a monoterpenos oxigenados e 8 % a sesquiterpenos. Este óleo apresentou como constituintes maioritários o timol (19 %), γ -terpineno (20 %), o éter metílico de timol (13 %) e o *m*-cimeno (12 %).

Os OEs de orégãos são caracterizados pela elevada percentagem em monoterpenos, designadamente em timol e γ -terpineno, representando 70 a 98 % da sua composição ^{123,124}. Nos muitos estudos efetuados com *O. vulgare* de vários países, a variação na constituição do óleo essencial é uma constante e tem levado à tentativa de classificar a planta em diferentes quimiótipos de acordo com o principal constituinte ¹²⁴. Esta variação é dependente da espécie da planta de orégão, da altitude, da sazonalidade e de outras características agronómicas ¹²⁵⁻¹²⁷.

Teixeira *et al.* ⁵⁸, num estudo realizado com orégãos de Portugal, relataram que o seu óleo essencial era constituído maioritariamente por carvacrol, terpineno e timol. Outros estudos demonstraram que em Portugal existem duas formas selvagens de *O. vulgare*: uma com crescimento generalizado e rica em linalol, a outra com crescimento localizado no Sul de Portugal e com predominância de timol ^{128,129}. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que esta planta apresenta o quimiótipo timol, apresentando percentagens de timol e γ -terpineno semelhantes às descritas L. Faleiro *et al.* ¹²⁹.

No Quadro 2.10 está representada a composição química do óleo essencial de *T. mastichina* em floração. Para o óleo essencial de *T. mastichina* foram identificados 26 compostos, representando 98 % da sua composição, dos quais 86 % são monoterpenos oxigenados e 7 % hidrocarbonetos monoterpénicos. Este OE apresentou como constituintes maioritários o 1,8-cineol (72 %), o α -terpineol (9 %).

Quadro 2.10 - Composição química dos OEs de *T. mastichina*

Composto		% (média ± dp) ^a	MI ^b
MH	α-pineno	1,71 ± 0,09	IR, AP, NIST
MH	Canfeno	0,11 ± 0,01	IR, AP, NIST
MH	β-pineno	4,09 ± 0,20	IR, AP, NIST
MH	β-mirceno	0,81 ± 0,04	IR, AP, NIST
MH	α-terpineno	0,19 ± 0,01	IR, AP, NIST
MO	1,8-cineol	71,22 ± 0,52	IR, AP, NIST
MH	Z-β-ocimeno	0,10 ± 0,01	IR, AP, NIST
MH	E-β-ocimeno	tr	IR, NIST
MH	γ-terpineno	0,31 ± 0,01	IR, AP, NIST
MO	Hidrato de sabineno	0,10 ± 0,01	IR, AP, NIST
MO	Linalol	1,39 ± 0,07	IR, AP, NIST
SH	β-cariofilleno	0,39 ± 0,02	IR, AP, NIST
MO	4-terpineol	0,81 ± 0,04	IR, AP, NIST
MO	trans-pinocarveol	0,10 ± 0,01	IR, AP, NIST
MO	δ-terpineol	2,29 ± 0,11	IR, AP, NIST
MO	α-terpineol	9,69 ± 0,48	IR, AP, NIST
MO	Borneol	0,11 ± 0,01	IR, AP, NIST
SH	D-germacreno	tr	IR, NIST
MO	Carvona	0,21 ± 0,01	IR, AP, NIST
SO	Óxido de cariofileno	tr	IR, NIST
SO	Ledol	0,21 ± 0,01	IR, AP, NIST
SO	Elemol	0,88 ± 0,04	IR, AP, NIST
SO	Spatulenol	0,30 ± 0,02	IR, AP, NIST
SO	γ-eudesmol	0,27 ± 0,01	IR, AP, NIST
SO	β-eudesmol	0,61 ± 0,03	IR, AP, NIST
SO	α-eudesmol	2,30 ± 0,12	IR, AP, NIST
Total identificado		98,20 ± 1,86	
Grupo de compostos		-	
Hidrocarbonetos monoterpênicos (MH)		7,32 ± 0,36	
Monoterpenos oxigenados (MO)		85,92 ± 1,26	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SH)		0,39 ± 0,02	
Sesquiterpenos oxigenados (SO)		4,57 ± 0,23	

Legenda: ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

De acordo com Salgueiro *et al.* ⁶⁰, os óleos essenciais de algumas espécies de tomilho foram caracterizadas por um elevado teor de 1,8-cineol e um teor variável de

linalol, variável com a origem geográfica. Um outro estudo com óleos essenciais de *T. mastichina* relatou que o seu componente maioritário era o 1,8-cineol (64 %), seguido por α -terpineol (6 %) e β -pineno (5 %) ¹³⁰.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os valores descritos para os tomilhos de Portugal, quimiótipo 1,8-cineol. De acordo com Salgueiro *et al.* ⁶⁰, os tomilhos portugueses da secção *T. mastichina* caracterizaram-se por apresentarem como constituinte principal o 1,8-cineol, muitas vezes com teores superiores a 60 %.

O perfil químico do óleo essencial de *F. vulgare*, colhido na fase vegetativa (funcho verde) está apresentado no Quadro 2.11.

Foram identificados 19 compostos no óleo essencial de *F. vulgare*, representando 53 % de fenilpropanóides, 24 % de monoterpenos oxigenados, 21 % de hidrocarbonetos monoterpénicos e 0,6 % de compostos sesquiterpénicos.

Quadro 2.11 - Composição química dos OEs de *F. vulgare*

	Composto	% (média $\pm$ dp) ^a	MI ^b
MH	α -pineno	2,18 $\pm$ 0,10	IR
MH	canfeno	0,34 $\pm$ 0,01	IR
MH	β -pineno	0,78 $\pm$ 0,03	IR
MH	sabineno	0,18 $\pm$ 0,01	IR
MH	mirceno	4,9 $\pm$ 0,30	IR, NIST
MH	α -felandreno	5,06 $\pm$ 0,30	IR, NIST
MH	(R)-(+)-limoneno	6,02 $\pm$ 0,14	IR, NIST
MO	1,8-cineol	1,17 $\pm$ 0,02	IR
MH	β -ocimeno	2,77 $\pm$ 0,09	IR, NIST
MH	γ -terpineno	0,15 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MH	<i>m</i> -cimeno	1,67 $\pm$ 0,09	IR, NIST
MO	α -terpinoleno	0,35 $\pm$ 0,03	IR, NIST
MO	fenchona	20,19 $\pm$ 0,28	IR, NIST
MO	cânfora	0,38 $\pm$ 0,01	IR, NIST
MO	4-terpineol	0,13 $\pm$ 0,01	IR, NIST
FP	estragol	6,18 $\pm$ 0,06	IR, NIST
FP	metil chavicol	0,11 $\pm$ 0,02	IR
FP	anetol	46,24 $\pm$ 0,80	IR, NIST
SO	Óxido de cariofileno	0,46 $\pm$ 0,07	IR
Total identificado		99,78 $\pm$ 2,42	

Quadro 2.11 Composição química dos OEs de *F. vulgare* (continuação)

Grupo de compostos	
Hidrocarbonetos monoterpénicos (MH)	21,91 ± 1,02
Monoterpenos oxigenados (MO)	23,88 ± 0,45
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos (SH)	0,13 ± 0,01
Sesquiterpenos oxigenados (SO)	0,46 ± 0,07
Fenilpropanóides (FP)	52, 53 ± 0,88

Legenda: ^a análise quantitativa relativa por GC-FID (média correspondente a três replicados); ^b MI - Método de identificação: NIST = Identificação feita através da biblioteca de espectrometria de massas (NIST); IR = Identificação através do índice de retenção; AP = Identificação feita através da adição padrão.

O óleo essencial em estudo pertence ao quimiótipo anetol/fenchona, devido aos seus elevados teores em anetol (> 46 %) e fenchona (> 20 %) ¹³¹. Além do anetol e fenchona, este OE apresenta ainda como compostos maioritários o estragol (6 %), o limoneno (6 %), o α -felandreno (5 %) e o mirceno (5 %).

O *F. vulgare* do Sudoeste de Portugal é conhecido como funcho doce pelo seu elevado teor em anetol e baixo teor em fenchona e estragol no seu óleo essencial ⁷. Estudos prévios referem que a composição química do óleo essencial de *F. vulgare* varia com a parte da planta em estudo e com a região geográfica, sendo o anetol, estragol, fenchona e/ou limoneno em proporções variáveis, os componentes maioritários do óleo essencial de funcho ¹³²⁻¹³⁶.

A análise da composição química dos óleos essenciais em estudo revelou importantes diferenças *intra* e interespecíficas no perfil químico dos vários óleos essenciais em estudo, tanto quanto à diversidade (qualitativa) como quanto à proporção dos seus constituintes (quantitativas). Estes óleos essenciais apresentaram uma composição rica em terpenos, nomeadamente Hidrocarbonetos monoterpénicos (1 – 50 %), monoterpenos oxigenados (18 - 93 %), Hidrocarbonetos sesquiterpénicos (< 7 %) e sesquiterpenos oxigenados (< 3 %). A bibliografia refere que as plantas das

famílias Lamiacea e Apiacea caracterizam-se pela produção de óleos essenciais ricos em terpenoides ¹³⁷, sendo ainda observado frequentemente a presença de fenilpropanóides ¹³⁸.

As variações na composição química e/ou rendimento em óleo essencial têm sido consideradas, por vários autores, como um processo normal do metabolismo terpénico ^{139,140}. Estas variações podem ser promovidas por inúmeros os fatores tanto intrínsecos com extrínsecos, pelo que a decisão acerca da planta e respetiva parte a utilizar, do momento adequado de colheita, bem como do componente comercialmente mais importante e o seu rendimento mais favorável é importante do ponto de vista agronómico e económico ^{15,139}.

***Screening* de atividade biológica dos óleos essenciais**

Publicações efetuadas no âmbito deste capítulo

Sílvia Macedo Arantes, Andreia Piçarra; Marisa Guerreiro; Cátia Salvador; Fátima Candeias; A. Teresa Caldeira and M. Rosário Martins (2019). "Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal)", Food and Chemical Toxicology Vol. 133, pp. 110747.

Sílvia Arantes, Andreia Piçarra, Fátima Candeias, A. Teresa Caldeira & M. Rosário Martins (2017). "Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo", Natural Product Research, pp. 1 - 5.

Sílvia Arantes, Fátima Candeias, Orlando Lopes, Mónica Lima, Marízia Pereira, Teresa Tinoco, J Cruz-Morais, M Rosário Martins (2016). "Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*". Planta Medica, 82 (14), pp. 1266 - 1273.

Sílvia Arantes, Andreia Piçarra, M. Fátima Candeias, António Neto Vaz, M. Teresa Tinoco, Júlio Cruz-Morais, M. Rosário Martins (2015). "Antioxidant properties and analgesic and anti-inflammatory activity of *Calamintha nepeta* and *Foeniculum vulgare*". Experimental Pathology and Health Sciences Research, Clinics, Teaching and Society, 7 (1), pp. 57.

3.1. Introdução

O *stress* oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes/pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante num órgão ou no organismo ¹⁴¹⁻¹⁴³. O equilíbrio entre as funções fisiológicas e danos metabólicos está dependente das taxas relativas de formação e remoção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS), geradas em resposta a estímulos endógenos e exógenos ¹⁴⁴.

As ROS desempenham papéis importantes numa variedade de funções bioquímicas normais e processos patológicos anormais. Durante a fosforilação oxidativa, na mitocôndria, gera-se um gradiente de prótons para a síntese de ATP, podendo ocorrer reações entre os eletrões dos complexos I e III da cadeia transportadora de eletrões e produzir ROS como o anião superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^\bullet$), e outros peróxidos orgânicos ^{145,146}. As ROS podem ainda ser produzidas por uma família de enzimas ligada à membrana, como NAD(P)H oxidases, que parecem afetar a proliferação celular e apoptose ¹⁴⁶. A transferência de eletrões para a molécula de oxigénio ocorre ao nível da cadeia transportadora de eletrões, localizada na membrana mitocondrial, sendo que a mitocôndria a principal fonte celular de ROS ^{145,146}. Em condições de hipoxia, a cadeia transportadora mitocondrial pode produzir óxido nítrico (NO) e originar espécies azoto (RNS), induzindo a excessiva peroxidação lipídica ¹⁴⁷. Em concentrações fisiológicas, as ROS atuam como mediadores de crescimento, migração e diferenciação celulares. Em condições de *stress* oxidativo, resultante do desequilíbrio entre os níveis das moléculas oxidantes produzidas e os sistemas enzimáticos de proteção antioxidante, as elevadas concentrações de ROS induzem morte celular, apoptose ou necrose, senescência e respostas inflamatórias ^{141-143,148-152}, representando sérios risco para a saúde humana. O *stress* oxidativo crónico ou cumulativo induz várias modificações deletérias em componentes macromoleculares, como ADN, lípidos e proteínas, podendo aumentar os

riscos de mutagénese ^{146,153}. A superprodução de radicais livres e o *stress* oxidativo estão frequentemente associados a muitas patologias crónicas, entre as quais doenças autoimunes, cataratas, aterosclerose, cancro, diabetes, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, síndrome coronário agudo, inflamação crónica, envelhecimento e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson ^{5,14,22,148,149,152,154-156}.

As estratégias de prevenção ou redução das patologias relacionadas com a oxidação podem envolver o recurso a substâncias antioxidantes que captam e eliminam ROS ¹⁵⁷. Os antioxidantes, são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia ¹⁵⁸ e podem ser classificados em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Alguns destes antioxidantes são produzidos endogenamente e incluem enzimas, moléculas de baixo peso molecular e co-fatores enzimáticos ¹⁵⁹.

Vários estudos apontam que o *stress* oxidativo nos tecidos cerebrais está frequentemente associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas ¹⁶⁰⁻¹⁶³. A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela perda de neurónios e neurotransmissores colinérgicos que leva à redução progressiva da acetilcolina no cérebro e comprometimento cognitivo ¹⁵⁴, considerando-se a inibição das colinesterases como um alvo potencial no tratamento da doença de Alzheimer ¹⁶⁴. No sistema nervoso central humano atuam colinesterases que reconhecem como substrato a acetilcolina e outras que reconhecem o radical butirilo: acetilcolinesterases (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterases (BChE, EC 3.1.1.8), frequentemente encontradas em placas neuríticas e emaranhados em pacientes com DA. No cérebro humano, as BChE parecem ter uma distribuição predominantemente neuroglial, enquanto as AChE estão localizadas principalmente nos axónios colinérgicos e nos corpos celulares dos neurónios ¹⁶⁵.

Os óleos essenciais com potencial antioxidante, devido à capacidade para eliminar ROS formados, podem atenuar os processos de inflamação, frequentemente associadas à DA, havendo, também evidências de que alguns óleos essenciais apresentam capacidade para inibir a ação de colinesterases ^{154,166-170}, ligando-se reversivelmente aos centros ativos dos enzimas AChE/BChE, inibindo a degradação hidrolítica da acetilcolina (ACh), um importante neurotransmissor ACh, promovendo o aumento de ACh sináptica e, por consequência, o alívio dos sintomas da DA ¹⁶⁷.

No entanto, a ação dos OEs no sistema nervoso central (SNC) ainda não está completamente compreendida e é difícil explicar a atividade dos seus componentes isolados, sugerindo o efeito sinérgico dos constituintes dos OEs e/ou a existência de diversos locais de ligação nas colinesterases ^{166-168,171}. Alguns dos constituintes dos OEs parecem funcionar como inibidores competitivos das colinesterases e outros como inibidores não competitivos, consoante os componentes presentes e a sua capacidade de ligação em diversos locais do enzima ¹⁶⁶. No caso dos componentes dos OEs que atuam como inibidores competitivos, a literatura refere que estes se ligam aos centros ativos na AChE e impedem a ligação ao neurotransmissor acetilcolina (ACh), diminuindo a ligação ao neurotransmissor, mas a atividade máxima da enzima permanece inalterada ¹⁶⁶. Por outro lado, os inibidores não competitivos ligam-se a outros locais da AChE, nomeadamente ao complexo enzima-substrato, e alteram alostericamente a ação do enzima, impedindo a formação do produto e diminuindo a atividade máxima do enzima ^{163,166,167,171}.

O *stress* oxidativo também está frequentemente associado a fenómenos de carcinogénese¹⁷². As células cancerígenas são muito diferentes das células normais e o cancro, uma doença complexa devido às suas múltiplas etiologias, tem emergindo, nas últimas décadas, como uma das mais alarmantes e uma das mais letais patologias em todo o mundo ¹⁷³. A carcinogénese envolve o processo de transformação uma célula normal numa célula maligna, dividindo-se, geralmente, em três estágios: (1) iniciação,

em que ocorrem danos e mutações no DNA celular devido à agentes carcinogénicos e à falha dos mecanismos de reparação do DNA; (2) promoção, na qual ocorre proliferação, remodelação tecidual e inflamação devido à expansão da(s) célula(s) iniciada(s); e (3) progressão, na qual as células pré-neoplásicas formam tumores por expansão clonal, facilitada por um aumento da instabilidade genómica e expressão génica alterada ¹⁷⁴. Na terapia do cancro utiliza-se, geralmente, uma combinação de quimioterapia com cirurgia ou radiação - diferentes estágios de carcinogénese requerem abordagens quimioterapêuticas diferentes. No entanto, devido à natureza evolutiva do tumor, há alteração na sensibilidade à terapia e muitas vezes este tipo de terapia é ineficaz, tem inúmeros efeitos adversos, prejuízos significativos para o doente em termos de saúde e de qualidade de vida, e em vários casos observa-se resistência do tumor à terapia ¹⁷³⁻¹⁷⁶. A busca de novas substâncias com elevada eficácia e menor número de efeitos adversos para o tratamento das patologias carcinogénicas é uma constante. A bibliografia refere que várias substâncias naturais, nomeadamente monoterpenos e polifenóis, consumidos na dieta, apresentam atividade antitumoral quando testados em modelos animais ou linhas celulares, por inibição da carcinogénese, quer nos estágios de iniciação como de promoção/progressão, e que são eficazes no tratamento de carcinomas precoces e avançados ^{173,176-180}.

Na terapia antitumoral, os óleos essenciais podem atuar de duas formas: quimioprevenção e supressão do cancro¹⁸⁰. Os OEs têm demonstrado capacidade antiproliferativa em várias linhas celulares tumorais e eficácia na redução de tumores em modelos animais, com baixo ou nenhum efeito aparente em células normais, tornando-os fortes candidatos a agentes antitumorais. Vários são os mecanismos pelos quais os OEs podem atuar no tratamento do cancro: a ativação de enzimas de desintoxicação, a modulação da sinalização de reparação do DNA, antimetástase e antiangiogénese ¹⁸⁰.

No sentido de avaliar a capacidade dos OEs prevenirem o *stress* oxidativo e alguns dos distúrbios associados, foi efetuado o *screening* da capacidade antioxidante

dos OEs em estudo, determinada a ação inibitória dos OEs para a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase e avaliado o efeito antiproliferativo em linhas celulares de carcinoma mamário MDA-MB-231.

3.2. Metodologia

3.2.1. Reagentes

Os reagentes: ácido ascórbico (> 99 %); quercetina (> 99 %); 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (95 %); β -caroteno (95 %); ácido linoleico (99 %); acetilcolinesterase (AChE) tipo VI-S (electric eel); 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoic acid] (DTNB); acetiltiocolina iodada (ATCI); butiriltiocolina iodada (BTCl); e butirilcolinesterase (BuChE de soro equino) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Calbiochem™ foi adquirido na Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Todos os outros reagentes são de elevado grau de pureza adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

3.2.2. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada *in vitro* por três métodos *in vitro* com vista a avaliar os mecanismos de ação: método do radical DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico e método do poder redutor.

3.2.2.1. Método do Radical DPPH

A capacidade antioxidante por captação de radicais livres foi avaliado utilizando uma adaptação do método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) proposto por Bektas Tepe *et al.* ¹⁸¹. A atividade antioxidante dos óleos essenciais (0,4-32,6 mg/mL), em solução etanólica contendo com *Tween* 20 a 15 % (v/v), foi avaliada em microplaca de 96 poços, adicionando 200 μ L de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM a 30 μ L de solução a testar. Como padrões utilizou-se o ácido ascórbico (0,25-65,0

µg/mL), dissolvido em água bidestilada, e quercetina (0,4-13,0 µg/mL) dissolvida em etanol absoluto). Efetuaram-se ensaios em branco substituindo a amostra/padrão pelos solventes respectivos e o ensaio foi efetuado em triplicado, para cada uma das concentrações testadas. As placas foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente, e a absorvência (517 nm) foi determinada num leitor de microplacas UV-Vis Multiskan™ Go (Thermo Scientific, Finland), durante 180 min, em intervalos de 30 min ⁸⁸. A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a equação 2:

$$I (\%) = \frac{A_{490 \text{ nm}}(\text{branco}) - A_{490 \text{ nm}}(\text{amostra})}{A_{490 \text{ nm}}(\text{branco})} \times 100 \quad \text{equação 2}$$

em que A corresponde ao valor de absorvência do branco e das amostras/padrões após 30 minutos de incubação.

3.2.2.2. Poder redutor do ferro

O poder redutor dos óleos essenciais foi avaliado de acordo com o método proposto por Oyaizu ¹⁸². Em microtubos, adicionou-se 200 µL de solução das diferentes concentrações de óleo essencial (0,4 - 60,0 mg/mL), a 50 µL de etanol ¹⁸³. Seguidamente, adicionou-se 200 µL de tampão fosfato 200 mM pH 6,6 e 200 µL de ferricianeto de potássio (III) 1 %. As soluções foram homogeneizadas e incubadas a 50 °C, durante 20 minutos e a reação foi terminada por adição de 200 µL de ácido tricloroacético 10 %. Após a centrifugação (3000 rpm, 10 minutos), separou-se o sobrenadante. O ensaio foi efetuado em microplaca adicionando 50 µL de sobrenadante, 50 µL de água destilada e 100 µL de cloreto de ferro (III) 0,1 %. O ensaio foi realizado em triplicado e a absorvência foi lida a 700 nm num leitor de microplacas UV-Vis Multiskan™ Go (Thermo Scientific, Finland). A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi comparada com os padrões ácido ascórbico em solução aquosa (0,4-60,0 mg/mL), e quercetina em solução etanólica

(0,5 – 60,0 µg/mL), testados nas mesmas condições. O aumento da absorvência da mistura de reacional indica maior poder redutor da amostra ^{184,185}.

3.2.2.3. Sistema β-caroteno/ácido linoleico

A inibição da produção de compostos orgânicos voláteis e a formação de dienos hidroperóxidos conjugados resultantes da oxidação do ácido linoleico, resultando na descoloração do β-caroteno ^{5,186}, foi avaliada para os óleos essenciais (0,04 – 2,50 mg/mL) e para os padrões ácido ascórbico (0,06 - 4,00 mg/mL) e quercetina (0,8 - 24,56 µg/mL).

Para realizar o ensaio, preparou-se uma solução de β-caroteno/ácido linoleico, dissolvendo-se 0,5 mg de β-caroteno num 1 mL de clorofórmio e adicionam-se 25 µL de ácido linoleico e 200 mg de *Tween* 40. Procedeu-se à evaporação do clorofórmio em evaporador rotativo a pressão reduzida a cerca de 40 °C. Após completa evaporação adicionou-se ao resíduo cerca de 100 mL de água destilada previamente saturada em oxigénio (100 mL/min; 30 minutos), com ajuste da absorvência da solução a 0,7 (λ = 490 nm).

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, adicionando 250 µL de solução de β-caroteno/ácido linoleico a 35 µL de solução a testar ^{187,188}. As placas foram agitadas vigorosamente e mediu-se a absorvência a 490 nm num leitor de microplacas UV-Vis Multiskan™ Go (Thermo Scientific, Finland). Após incubação das soluções a 50 °C durante 2 horas, foi efetuada novamente a leitura da absorvência a 490 nm. Prepararam-se ensaios em branco (testemunhas) com o solvente respetivo para os óleos essenciais e para os padrões. O ensaio foi realizado em triplicado para cada amostra/padrão. A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a equação 3.

$$I (\%) = \frac{\Delta A_{490 \text{ nm}} (\text{branco}) - \Delta A_{490 \text{ nm}} (\text{amostra})}{\Delta A_{490 \text{ nm}} (\text{branco})} \times 100 \quad \text{equação 3}$$

em que ΔA corresponde à diferença entre a absorvência às 0 horas e a absorvência após 2 horas de incubação.

3.2.3. Estudos *in vitro* para avaliar a inibição da atividade de colinesterases AChE e BChE

A capacidade dos óleos essenciais para inibir a atividade de acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BChE) foi avaliada em microplaca por adaptação¹⁸³ do método descrito por Ellman *et al.*¹⁸⁹ e modificado por Ingkaninan *et al.*¹⁹⁰.

As soluções de óleos essenciais (0,13 a 2,00 mg/mL) foram preparadas em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8, com etanol (50 %) e *tween* 20 (1 %). Em microplaca de 96 poços, adicionou-se 75 μ L das diferentes soluções de OEs, 25 μ L ATCI/BTCI 15 mM (dissolvido em água bidestilada) e 125 μ L de DTNB 3 mM (dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 com NaCl 0,1 M e $MgCl_2$ 0,02 M). Por fim adicionou-se 25 μ L de AChE/BChE 0,3 U/mL (em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 com BSA 0,1 %). A reação foi monitorizada durante 20 minutos a 405 nm num leitor de microplacas UV-Vis MultiskanTM Go (Thermo Scientific) e determinou-se a velocidade da reação, expressa em μ U/mg OE, usando o valor de $\epsilon = 1330 \mu\text{mol/mL}^{191}$. A atividade enzimática foi calculada em percentagem de inibição de atividade enzimática, comparada com um controlo usando tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 em substituição do inibidor (100 % de atividade). A atividade inibitória foi calculada subtraindo a percentagem da atividade enzimática de cada amostra à atividade enzimática do controlo. O ensaio foi realizado em triplicado. Os resultados obtidos foram comparados com a galantamina (0,14 - 4,42 μ g/mL) e a rivastigmina (0,08 - 1,20 mg/mL), princípios ativos de fármacos existentes no mercado, testados nas mesmas condições.

3.2.4. Avaliação do potencial antiproliferativo em linhas celulares

MDA-MB-231

O potencial de antiproliferativo dos óleos essenciais previamente obtidos por hidrodestilação das partes aéreas de *L. luisieri* Mix (folha + espiga floral), *L. pedunculata* Mix (folha + espiga floral), *L. viridis* Mix (folha + espiga floral), *C. nepeta* (folha floral), *O. virens* (folha) e *T. mastichina* (folha+ flor) foi avaliado em culturas de células utilizando a linha celular tumoral mamária humana MDA-MB-231. A linha celular MDA-MB-231 representa o subtipo de tumores humanos de mama denominado triplo negativo, devido à falta de expressão de três importantes recetores: estrogénio, progesterona e fator de crescimento epidermal.

3.2.4.1. Cultura celular e manuseamento

As células MDA-MB-231, obtidas na coleção de cultura *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram cultivadas e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina (2 mM), glucose (4,5 g/L), bicarbonado de sódio (2,0 g/L), 10 % soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS – *fetal bovine serum*), e 1 % de penicilina-estreptomicina. As culturas foram mantidas em ambiente húmido com 5 % de CO₂ a 37 °C (camera de CO₂ ICOMed, Memmert GmbH, Germany). Antes de atingirem a confluência, as células foram hidrolisadas com tripsina com solução de tripsina (0,5 g/L) com EDTA (0,2 g/L) e ressuspendidas em meio de cultura e cultivadas a uma densidade de 1 x 10⁶ células/mL. O procedimento para a contagem de células viáveis foi feito pelo método de exclusão com o corante azul de tripiano ¹⁹²⁻¹⁹⁴.

3.2.4.2. Viabilidade celular

O efeito dos óleos essenciais na viabilidade celular de MDA-MB-231 foi determinado pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Calbiochem). Este método, previamente descrito por Mosmann ¹⁹⁵ baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases mitocondriais e agentes redutores presentes nas células vivas reduzirem o MTT, transformando a solução aquosa amarela num produto púrpura insolúvel de sal de formazão ^{196,197}. O produto de formazão solúvel em lípidos pode ser extraído com solventes orgânicos e quantificado por espectrometria de UV-Vis, dado que a quantidade de sais de formazão de MTT formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis ¹⁹⁶.

Foram efetuadas culturas de células MDA-MB-231 em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço, num volume final de 100 μ L e incubadas em atmosfera com 5 % de CO₂, a 37 °C. Após 24 h, as células foram incubadas com 5 μ L de solução de óleo essencial. As soluções de óleo essencial foram preparadas por dissolução em dimetilsulfóxido 20 % (DMSO, grau de cultura celular, Sigma-Aldrich), de modo a obter concentrações finais no poço no intervalo de 3,9 a 1000 mg/L. Foram efetuados dois controlos negativos: (1) 5 μ L de água ultrapura e (2) 5 μ L da solução solvente dos óleos essenciais (DMSO 20 %) para estimar o valor de 100 % de viabilidade celular. Foi ainda efetuado um controlo positivo com 5 μ L de DMSO (100 %) para estimar o valor de 100 % de mortalidade ¹⁹⁴. Após 44 h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, foi adicionado a cada poço 20 μ L da solução de MTT (2,5 mg/mL em PBS), seguido de um período de incubação de 4 h. O meio de cultura foi aspirado e os cristais de formazão foram dissolvidos com 100 μ L da solução de DMSO/ etanol (1:1 v/v) ^{193,194,198}.

A absorvência foi lida a 570 nm num leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). A viabilidade celular relativa foi determinada pela quantidade de MTT convertido em sal insolúvel de formazão ¹⁹⁵. A viabilidade celular (%) foi determinado pela variação da absorvência das diferentes soluções de OE ^{194,199}. O valor

de EC_{50} é definido como a concentração necessária para promover uma inibição de viabilidade celular em 50 % e foi calculado pela representação gráfica da percentagem de viabilidade celular das amostras em comparação com o controlo. Todos os resultados experimentais foram efetuados em triplicado em três ensaios independentes ($n = 9$) e os valores foram apresentados com valores médios $\pm$ desvio padrão (SD). As curvas dose-resposta e os valores de EC_{50} foram determinados utilizando o *software* OriginPro 9.0 (OriginLab® Corporation, 2013).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Atividade antioxidante

Os óleos essenciais testados apresentaram atividade antioxidante pelos três mecanismos testados, sendo determinada a percentagem de inibição para cada concentração de OEs e padrão. Com a curva padrão do ácido ascórbico (Anexo I - Figura A.1), os valores de atividade antioxidante dos OEs foram expressos em equivalente de ácido ascórbico (mg AA/ mL OE), para o método do radical DPPH (Figura 3.1 - A), método do poder redutor (Figura 3.1 - B) e sistema β -caroteno/ácido linoleico (Figura 3.1 - C).

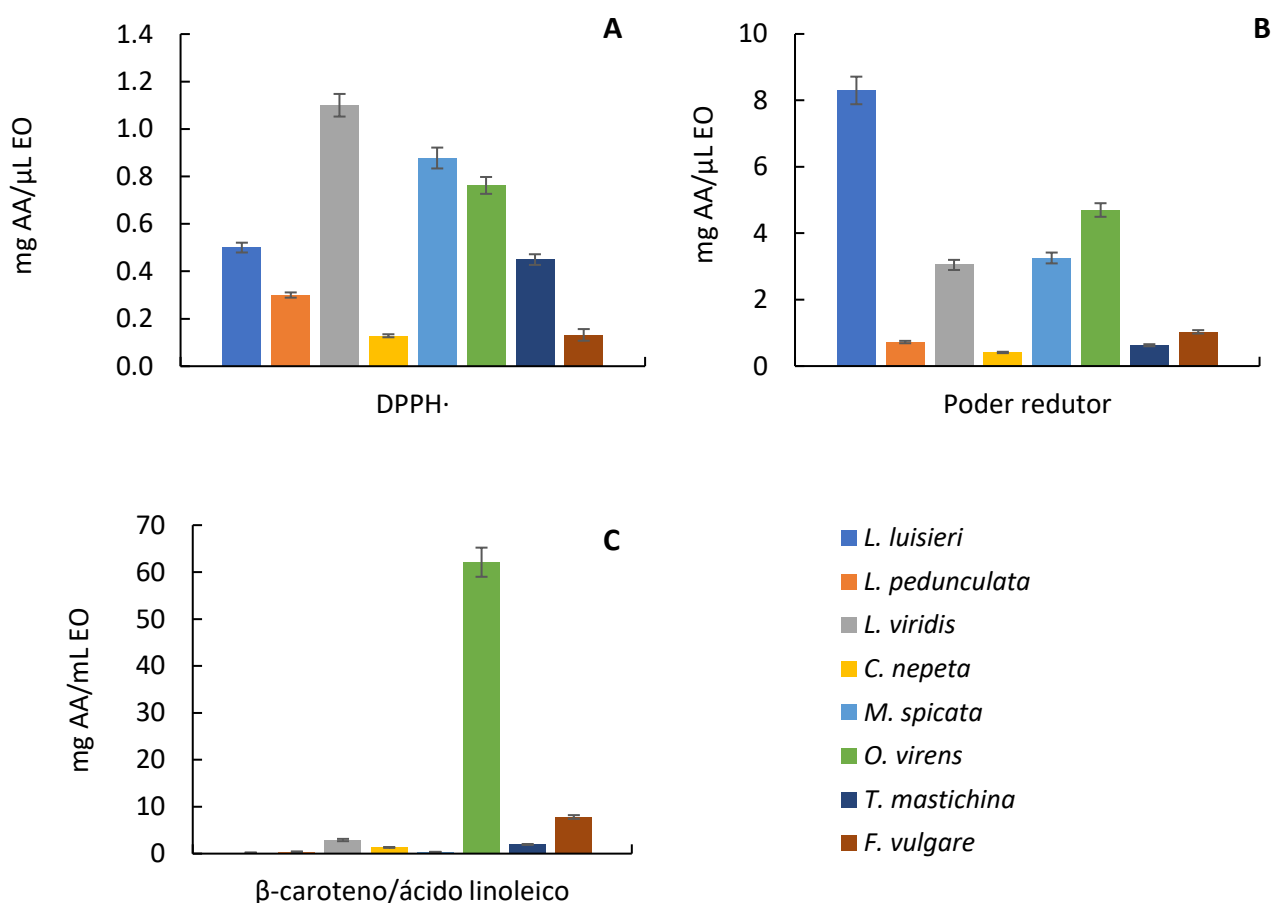


Figura 3.1 – Atividade antioxidante dos OEs

A – Método radical DPPH; **B** – método do poder redutor; **C** – sistema β -caroteno/ácido linoleico.
AA – ácido ascórbico

Os óleos essenciais que apresentaram maior atividade para captar radicais livres foram os OEs de *L. viridis*, *M. spicata* e *O. virens*, com 1,1; 0,9 e 0,8 mg AA/ μ L OE, respectivamente. No ensaio do poder redutor, em que foi avaliada a capacidade dos OEs reduzirem o Fe^{3+} e inferir sobre a sua capacidade para proteção do grupo Heme ²⁰⁰⁻²⁰², o OE de *L. Luisieri* foi o que apresentou resultados (8 mg AA/ μ L OE), seguido do OE de *O. virens* (5 mg AA/ μ L OE) e dos OEs de *L. viridis* e *M. spicata*, ambos com 3 mg AA/ μ L OE. No ensaio de avaliação da capacidade dos OEs para proteção da oxidação do ácido linoleico, o OE de *O. virens* (62,1 mg AA/mL OE) apresentou valores de atividade antioxidante bastante superior aos restantes OEs (0,2 – 7,8 mg AA/mL OE).

Adicionalmente, quando comparamos o efeito dos OEs das três espécies de *Lavandula*, pelos três mecanismos, observamos que o OE de *L. viridis* possui melhor capacidade para captar radicais livres e inibir a peroxidação lipídica, enquanto o OE de *L. Luisieri* apresenta melhores resultados como redutor do Fe^{3+} .

Para avaliação do potencial antioxidante dos OEs, determinaram-se os valores de IC_{50} (concentração que inibe 50 % da oxidação) para os OEs que apresentaram comportamento linear com a concentração e para os quais foi possível obter valores de inibição de oxidação superiores a 50 % nas concentrações testadas. No Quadro 3.1 apresentam-se os valores de IC_{50} dos OEs e dos padrões, ácido ascórbico e quercetina.

Quadro 3.1 – Valores IC₅₀ (mg/mL) dos EOs pelos três métodos de ação antioxidante testados

	IC ₅₀ (mg/mL)		
	DPPH	Poder redutor	β-caroteno/ ácido linoleico
<i>L. luisieri</i>	13,000 ± 0,650	1,680 ± 0,084	1,629 ± 0,081
<i>L. pedunculata</i>	23,730 ± 1,187	18,800 ± 0,940	0,780 ± 0,039
<i>L. viridis</i>	5,570 ± 0,279	4,530 ± 0,227	0,108 ± 0,002
<i>C. nepeta</i>	32,608 ± 0,630 ¹⁸³	26,844 ± 0,342 ¹⁸³	0,854 ± 0,003 ¹⁸³
<i>M. spicata</i>	2,528 ± 0,403 ¹⁸³	3,680 ± 0,221 ¹⁸³	3,344 ± 0,167 ¹⁸³
<i>O. virens</i>	7,300 ± 0,340	3,078 ± 0,134	0,020 ± 0,001
<i>T. mastichina</i>	9,052 ± 0,957 ¹⁸³	18,687 ± 0,434 ¹⁸³	0,622 ± 0,031 ¹⁸³
<i>F. vulgare</i>	n. d.	10,841 ± 0,542 ¹⁸³	0,160 ± 0,008 ¹⁸³
Ác. ascórbico	0,005 ± 0,001 ¹⁸³	0,013 ± 0,001 ¹⁸³	1,116 ± 0,003 ¹⁸³
Quercetina	0,004 ± 0,001 ¹⁸³	0,005 ± 0,002 ¹⁸³	0,009 ± 0,002 ¹⁸³

Legenda: n. d. – não determinado

À exceção do OE de *F. vulgare* no método do radical DPPH, todos os OEs apresentaram um perfil de atividade antioxidante dependente da dose, atingindo os 50 % de inibição pelos mecanismos testados. Pelo método do radical DPPH as OEs que apresentaram IC₅₀ mais baixos foram o OE de *M. spicata* (2,5 mg/mL), o OE de *L. viridis* (5,6 mg/mL) e o OE de *O. virens* (7,3 mg/mL). O OE de *L. luisieri* (1,6 mg/mL), o OE de *O. virens* (3,1 mg/mL) e o OE de *M. spicata* (3,7 mg/mL) foram os que apresentaram menores valores de IC₅₀ pelo método do poder redutor. Pelo método do β-caroteno/ácido linoleico, o OE de *O. virens* (0,02 mg/mL), o OE de *L. viridis* (0,108 mg/mL) e o OE de *F. vulgare* (0,16 mg/mL) apresentaram os valores mais baixos de IC₅₀. Os valores de IC₅₀ dos padrões ácido ascórbico e quercetina foram de 0,005 e 0,004 mg/mL, 0,013 e 0,005 mg/mL, e 1,12 e 0,009 mg/mL, para o método do radical DPPH, métodos do poder redutor e sistema β-caroteno/ácido linoleico, respetivamente.

Os resultados de atividade antioxidante observados estão de acordo outros estudos que evidenciando potencial antioxidante das plantas medicinais pertencentes à família Lamiaceae^{111,112}. Alguns estudos efetuados com espécies do género *Lavandula* sugerem que os óleos essenciais das partes aéreas destas plantas possuem atividade antioxidante na proteção do substrato lipídico e na captação de radicais livres^{26,29,203-205}.

Alguns estudos efetuados com OEs de *C. nepeta* de Portugal, têm demonstrado que os OEs possuem capacidade antioxidante tanto para captar radicais livres, como para reduzir o Fe³⁺ e inibir a oxidação lipídica^{111,112,120,206}. A bibliografia refere que o OE de *M. spicata* apresenta capacidade para captar radicais livres e reduzir o Fe³⁺, sendo a sua atividade atribuída ao seu composto maioritário (carvona)^{207,208}.

Estudos efetuados com OEs de *Origanum vulgare* tem demonstrado boa atividade antioxidante, tanto na capacidade de captação de radicais livre como na proteção do substrato lipídico, correlacionando essa atividade com os elevados teores de timol e carvacrol^{58,209-214}. Estudos efetuados com OEs de *T. mastichina* de Espanha e Portugal demonstraram que os seus OEs tem apresentado baixa atividade antioxidante pelo método do radical DPPH^{112,215,216}. Estudos com OEs de sementes e folhas e frutos de *F. vulgare* têm correlacionado a sua atividade antioxidante com o elevado teor de monoterpenos oxigenados e a presença de anetol, estragol e fenchona^{134,217-220}. O OE de *F. vulgare* em estudo foi obtido de funcho verde e apresentou como compostos maioritários o anetole (46 %) e fenchona (20 %).

A bibliografia tem correlacionado a atividade antioxidante dos OEs com o seu elevado teor de monoterpenos, nomeadamente limoneno, 1,8-cineol, γ-terpineno, α-terpineno, linalool, 4-terpineol^{120,221,222}. Adicionalmente, o potencial sinérgico de constituintes minoritários é frequentemente propostos para explicar as diferenças entre os valores estimados e os observados para capacidades antioxidantes^{223,224}.

Os OEs são uma importante fonte de antioxidantes potencialmente úteis para prevenir o *stress* oxidativo e promover a saúde humana ²²⁵. A sua capacidade antioxidante sugere o seu potencial também como agentes anti-inflamatórios, uma vez que a captação e eliminação de radicais livres é um dos mecanismos envolvidos na prevenção da inflamação ^{137,226}. Adicionalmente, pela sua elevada atividade na proteção do substrato lipídico, os OEs apresentam também potencial para prevenir as doenças neurodegenerativas e cancerígenas ^{206,227}.

3.3.2. Atividade inibitória dos colinesterases da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase

Os óleos essenciais apresentaram capacidade para inibir as atividades enzimáticas da AChE e da BChE (Figura 3.2). O OE de *O. virens* não apresentou capacidade para inibir a atividade dos enzimas AChE e BChE, observando-se um efeito contrário.

Relativamente à capacidade dos OEs para inibir a atividade de AChE, observou-se que os OEs de *T. mastichina* e de *M. spicata* apresentaram elevada atividade, enquanto o OE de *L. viridis* foi o que apresentou menor atividade. Pelo perfil de atividade os OEs, podemos observar que o seu efeito inibitório do OE de *T. mastichina* variou pouco com o aumento da concentração (Figura 3.2 – G), sendo que no intervalo de concentrações testadas a percentagem de inibição variou entre os 40 e os 60 %.

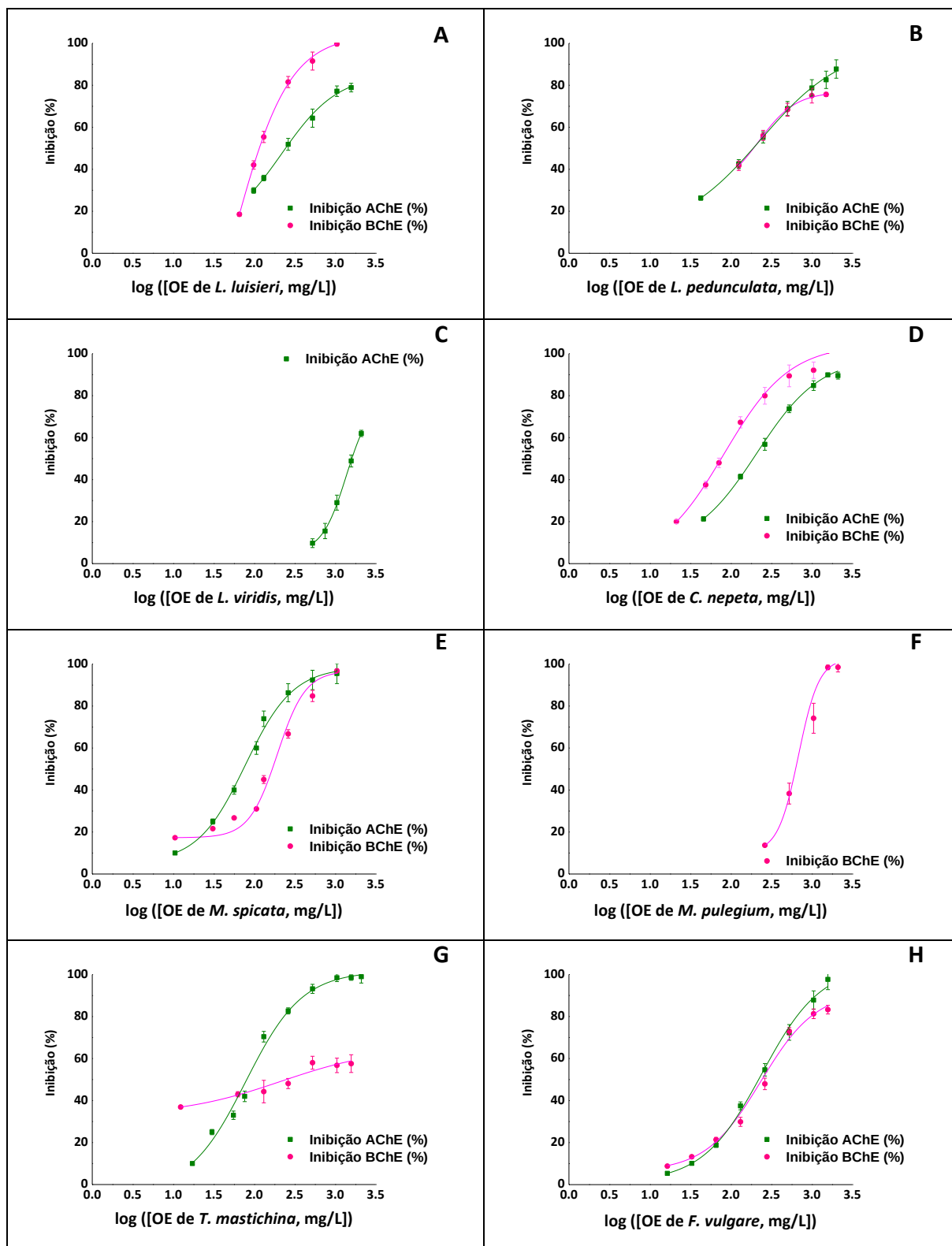


Figura 3.2 - Curvas dose-resposta para a determinação do IC₅₀ dos OEs para a AChE e BChE
A – óleo essencial de *L. luisieri*; **B** – óleo essencial de *L. pedunculata*; **C** – óleo essencial de *L. viridis*; **D** – óleo essencial de *C. nepeta*; **E** – óleo essencial de *M. spicata*; **F** – óleo essencial de *M. puegium*; **G** – óleo essencial de *T. mastichina*; **H** – óleo essencial de *F. vulgare*.

De acordo com A. Ferreira *et al.*²²⁸ (5 – 25 % baixa atividade, 25 – 50 % atividade moderada, 50 – 100 % boa atividade), o OE de *T. mastichina* apresentou uma atividade moderada a boa no intervalo de concentrações testadas. O OE de *M. pulegium* não apresentou capacidade para inibir a atividade da AChE (Figura 3.2 – F).

Relativamente à capacidade dos OEs para inibir a atividade de BChE, observou-se que os OEs de *L. luisieri* e de *C. nepeta* apresentaram as atividades inibitórias mais altas, enquanto que os OEs de *L. pedunculata* e de *T. mastichina* apresentaram menor ação inibitória de BChE. O OE de *L. viridis* não apresentou capacidade para inibir a atividade da BChE (Figura 3.2 – C).

Foi ainda possível observar que os OEs de *L. pedunculata* e *F. vulgare* apresentaram capacidade semelhante para inibir os dois enzimas AChE e BChE (Figura 3.2 – C e H, respetivamente).

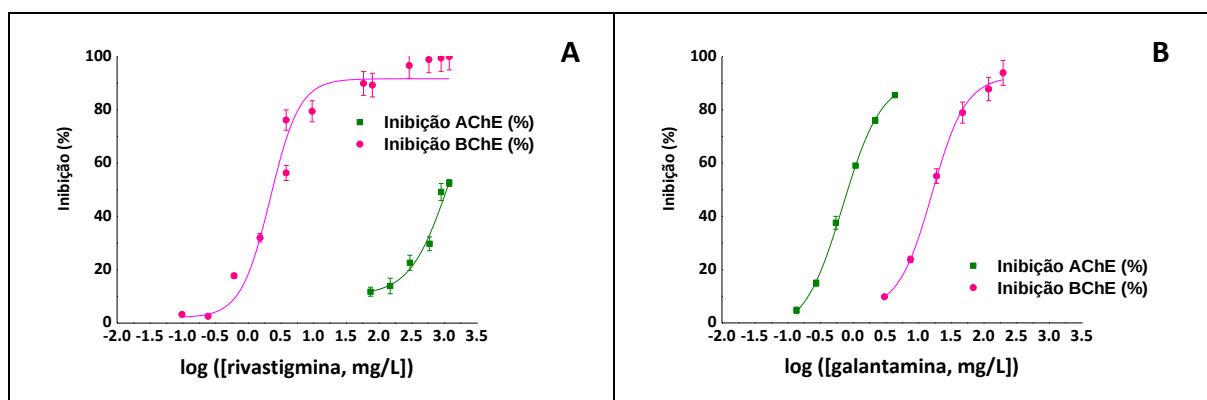


Figura 3.3 - Curvas dose-resposta para a determinação do IC₅₀ da rivastigmina (A) e da galantamina (B) para a AChE e BChE

Comparando a atividade dos OEs com a dois padrões testados, rivastigmina (Figura 3.3 - A) e galantamina (Figura 3.3 - B), observou-se que a rivastigmina apresentou uma ação inibitória de AChE bastante inferior à dos OEs, enquanto que no caso da BChE a ação da rivastigmina foi superior à dos OEs. A galantamina, um fármaco

com elevada atividade anticolinesterase, apresentou melhor ação inibitória do que os OE para ambos os enzimas AChE e BChE.

Os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50 % da atividade enzimática) foram determinados para os óleos essenciais que apresentaram atividade inibitória de AChE e BChE (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 – Valores IC₅₀ (mg/L) das atividades inibitórias de AChE e BChE dos OEs

	IC ₅₀ (mg/L)	
	AChE	BChE
<i>L. luisieri</i>	217,1 ± 47,8	54,7 ± 4,5
<i>L. pedunculata</i>	235,7 ± 16,8	220,0 ± 28,6
<i>L. viridis</i>	1374,1 ± 69,9	n. d.
<i>C. nepeta</i>	205,6 ± 10,3 ¹⁸³	88,3 ± 4,4 ¹⁸³
<i>M. spicata</i>	78,3 ± 3,9 ¹⁸³	192,1 ± 9,6 ¹⁸³
<i>M. pulegium</i>	n. d.	683,25 ± 14,2
<i>O. virens</i>	n. d.	n. d.
<i>T. mastichina</i>	78,8 ± 2,9 ¹⁸³	217,1 ± 10,9 ¹⁸³
<i>F. vulgare</i>	240,4 ± 12,1 ¹⁸³	233,9 ± 10,3 ¹⁸³
Rivastigmina	1604,0 ± 79,2 ¹⁸³	37,5 ± 1,9 ¹⁸³
Galantamina	0,9 ± 0,1 ¹⁸³	18,3 ± 0,9 ¹⁸³

Legenda: n. d. – não determinado

Os valores de IC₅₀ dos OEs variaram no intervalo 78 – 1374 mg/L e 54 – 683 mg/L para AChE e BChE, respetivamente. Comparando os valores de IC₅₀ dos OEs com os valores de IC₅₀ dos padrões, observámos que, à exceção do valor de IC₅₀ da rivastigmina para o enzima AChE, os valores apresentados foram inferiores aos valores obtidos para os OEs. No entanto, a ação inibitória das colinesterases pelos OEs em estudo, sugere o seu potencial para a prevenção e tratamento das doenças neurodegenerativas associadas à atividade destes enzimas.

O efeito inibitório da atividade das colinesterases apresentados pelos OEs está relacionado com a sua composição química. Murray *et al.* ²²⁹ refere que os produtos naturais, incluindo terpenoides, flavonoides e outros compostos fenólicos apresentam

elevada capacidade para inibir a atividade das colinesterases. No caso dos OEs, esse efeito pode estar relacionado com o seu conteúdo em monoterpenos, como 1,8-cineol, α -pinene, carvacrol, 4-terpineol, neral, geranial e linalol; a presença de alguns sesquiterpenos, como o óxido de cariofileno e de alguns fenilpropanoides como o eugenol ^{165,227,230-232}.

Relativamente aos OEs des *Lavandula* spp., o OE com melhor atividade para os enzimas AChE e BChE foi o OE de *L. luisieri*, seguido do OE de *L. pedunculata* e, por fim, o OE de *L. viridis* .(apesear de ser o OE com maior teor de 1,8-cineol).

Alguns estudos sobre a relação estrutura-atividade entre AChE e monoterpenoides demonstraram que os hidrocarbonetos apresentam maior inibição dos que alcoois e cetonas, sugerindo que a presença do grupo funcional oxigenado diminui a inibição da colinesterase (cetonas < álcoois < hidrocarbonetos) ²³³⁻²³⁵. No entanto, neste estudo foi possível observar que o OE com maior teor de hidrocarbonetos monoterpénicos, o OE de *O. virens*, não apresentou capacidade para inibir a atividade das colinesterases AChE e BChE.

3.3.3. Atividade antitumoral

Os óleos essenciais testados, *L. luisieri*, *L.pedunculata*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *O. virens* e *T. mastichina*, apresentaram capacidade para inibir o crescimento e induzir a morte celular das células MDA-MB-231, isoladas de carcinoma mamário (Anexo I - Figura A.2). Para todos os OEs observou-se um efeito antiproliferativo, dependente da dose para concentrações superiores a 125 mg/L (Anexo I - Figura A.2). Na Figura 3.4 estão apresentadas as curvas dose-resposta expressas em % de mortalidade de células tumorais MDA MB 231.

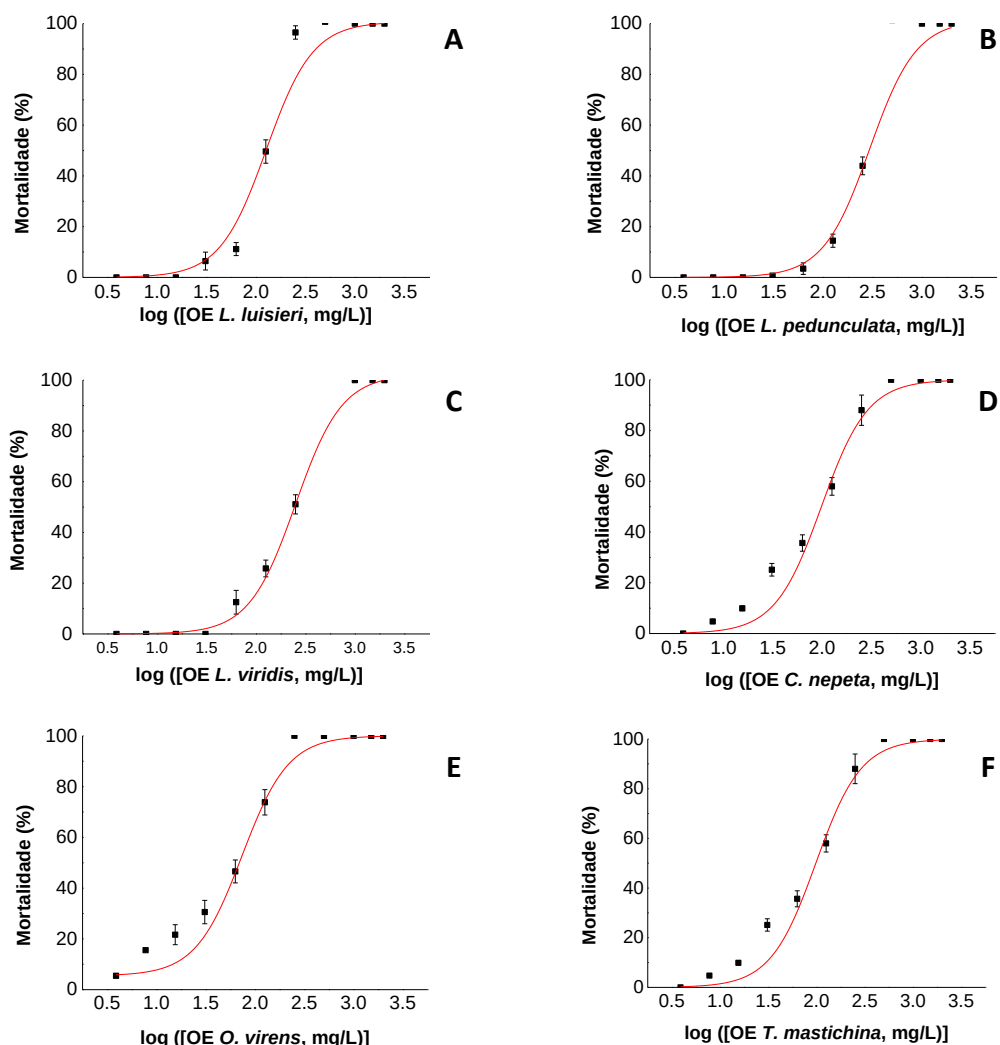


Figura 3.4 – Curvas dose-resposta, expressas em % de mortalidade de células tumorais MDA-MB-231, e da concentração (log) de OE, para a determinação dos valores de EC_{50}

A – óleo essencial de *L. luisieri*; **B** – óleo essencial de *L. pedunculata*; **C** – óleo essencial de *L. viridis*; **D** – óleo essencial de *C. nepeta*; **E** – óleo essencial de *O. virens*; **F** – óleo essencial de *T. mastichina*.

Os valores de EC_{50} (Quadro 3.3) foram calculados a partir das curvas dose-resposta, correspondendo à concentração de OEs capaz de inibir 50 % do crescimento celular.

Quadro 3.3 – Valores de EC₅₀ dos óleos essenciais para a células MDA-MB-231

OE	EC ₅₀ (mg/L)
<i>L. luisieri</i>	131,9 ± 2,5
<i>L. pedunculata</i>	271,9 ± 10,3
<i>L. viridis</i>	242,5 ± 19,4
<i>C. nepeta</i>	88,9 ± 10,9
<i>O. virens</i>	86,74 ± 8,1
<i>T. mastichina</i>	108,5 ± 11,0

Os óleos essenciais de *Lavandula* spp. apresentaram valores de EC₅₀ superiores aos OEs de *C. nepeta*, *O. virens* e *T. mastichina*. Comparando os OEs das diferentes espécies do género *Lavandula*, observou-se que o OE de *L. luisieri* foi o que apresentou maior atividade antiproliferativa, seguido do OE de *L. viridis* e *L. pedunculata*, com valores de EC₅₀ de 131,9 ± 2,5 mg/L, 242,5 ± 19,4 mg/L e 271,9 ± 10,3 mg/L, respetivamente. Os óleos essenciais de *C. nepeta*, *O. virens* e *T. mastichina* apresentaram maior capacidade para inibir o crescimento das células MDA-MB-231 superior ao observado para os OEs de *Lavandula* spp., tendo-se observado maior atividade antiproliferativa para o OE de *O. virens*, seguido do OE de *C. nepeta* e de *T. mastichina*, com valores de EC₅₀ de 86,7 ± 8,1 mg/L, 88,9 ± 10,9 mg/L e 108,5 ± 11,0 mg/L, respetivamente. Foi ainda possível observar que a adição dos OEs causou a perda da capacidade de adesão das células MDA-MB-231, as quais apresentaram alterações morfológicas semelhantes às células necróticas, com base no seu tamanho e formato, após 24 horas de tratamento, com diferentes concentrações de OE. Hakkim *et al.*²³⁶ observaram que as células MDA-MB-231, testadas em condições semelhantes, apresentaram viabilidade celular inferior a 20 % na presença de doxorrubicina (DOX) a 100 mg/L, um princípio ativo comercializado com o nome de Adriamicina, uma antraciclina com atividade antineoplásica, frequentemente utilizada como quimioterápico no tratamento do cancro, designadamente no carcinoma mamário.

Os OEs selecionados para o estudo de atividade antiproliferativa apresentaram valores de EC₅₀ muito inferiores ao referido na bibliografia para DOX, tendo sido os OEs de *O. virens* e de *C. nepeta* os mais efetivos.

Vários estudos relatam que os OEs apresentam atividade antitumoral, atuando de forma preventiva e/ou no tratamento de tumores, com células já estabelecidas. O efeito preventivo dos OEs no aparecimento de carcinomas parece estar associado à capacidade que estes apresentam para estimular a apoptose celular e dos mecanismos de reparação do DNA, inibindo a proliferação celular, a formação de metástases e a resistência a múltiplos fármacos (MDR), pelo que muitos autores indicam alguns OEs como potenciais candidatos a adjuvantes na terapia antitumoral ^{178,180,237-243}.

A atividade antiproliferativa dos óleos essenciais varia de acordo com a sua composição estando muito dependente não só dos compostos maioritários presentes, mas também de alguns compostos minoritários que poderão ter um efeito sinérgico ¹⁷⁸. Doll-Boscardin *et al.* ²⁴⁴, num estudo efetuado com OE de *Eucalypts benthamii* para avaliar o seu efeito citotóxico em quatro linhas tumorais, observou que o óleo essencial apresentou melhores resultados dos que os seus constituintes maioritários, α -pineno e γ -terpineno puros. Alguns estudos têm reportado que o efeito antitumoral estar relacionado com a presença de compostos sesquiterpenoides e fenilpropanoides, e aos seus possíveis efeitos tóxicos destes compostos na estrutura e na função das membranas celulares ²⁴⁵⁻²⁴⁷.

De momento, são poucos os estudos referidos na bibliografia sobre o efeito antiproliferativo dos OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis*, *C. nepeta*, *O. virens* e *T. mastichina*. Um estudo com extratos aquosos e etanólicos de *Lavandula stoechas* sp. *luisieri* do sul de Portugal refere que estes apresentam atividade antitumoral para a linhas celulares HEP G2 de carcinoma hepatocelular ²⁴⁸. Um estudo efetuado com extrato etanólico de *Lavandula dentata* da Arábia Saudita revelou que este apresentou atividade citotóxica promissora para células de

adenocarcinoma mamário humano (MCF-7, EC₅₀ de 39 mg/L) ²⁴⁹. A bibliografia refere que o óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Mill. (Ferdowsi University Campus, 1,8-cineol 19 % e borneol 20 %) apresentou atividade antitumoral para um grande número de linhas celulares tumorais, nomeadamente MCF-7 e HeLa ²⁵⁰, linhas celulares de carcinoma da próstata humano, PC-3 e DU145 ²⁵¹, de glioma C6, de carcinoma do pulmão H1299 e A549 ²⁵² e de células de leucemia linfoblástica aguda (células MOLT-4) ^{173,253-255}.

Estudos efetuados com OEs de *Lavandula angustifolia* da Bosnia-Herzegovina, amostra comercializada como “Rico Holding Ljubinje”, com elevado conteúdo em linalol (40,3 %) ²⁵⁶ e com OEs de *L. angustifolia* do Brasil ²⁵⁷ (rico em borneol 22 %, *epi*- α muurolol 13 %, α -bisabolol 13 %, e 1,8-cineol 8 %) demonstraram que estes óleos essenciais apresentaram atividade antitumoral para linhas celulares de GM07492-A (fibroblastos, EC₅₀ 243,7 mg/L), HeLa (EC₅₀ 80,62 mg/L), A549 (EC₅₀ 88,90 mg/L) e MRC-5 (EC₅₀ 75,19 mg/L). Já os óleos essenciais de *Lavandula vera* DC (linalol 36 %), acetato de linalilo 17 %, e 4-terpineol 16 %), *L. angustifolia* Miller (linalol 56 %) e cânfora 10 %), *Lavandula latifolia* Medikus (linalol 34 %, acetato de linalilo 24 %, e cânfora 9 %), e *Lavandula hybrida* Rev (linalol 39 %, acetato de linalilo 23 %, e 1,8-cineol 7 %) colhidas na Itália ²⁵⁸ apresentaram baixa atividade antitumoral para a linha celular Caco-2 (adenocarcinoma colorretal epitelial).

As plantas do género *Origanum* (óleo essencial e extratos) têm sido referidas como apresentando potencial antiproliferativo com elevada citotoxicidade face a linhas tumorais de hepatocarcinoma (HepG2), cancro da mama (MCF-7) e carcinoma do colon (LoVo), e baixa citotoxicidade face a linhas celulares não tumorais (HEK293) ^{259,260}. Adicionalmente, o timol, um dos principais componentes de *O. virens* em estudo (20 %), é um composto fenólico que tem demonstrado atividade anticancerígena, atuando na supressão do crescimento celular, induzindo apoptose ou produzindo espécies reativas de oxigênio intracelulares ²⁶¹⁻²⁶³. Grbovic *et al.* ²⁶⁴

demonstrou que o extrato etanólico de *O. vulgare*, apresentou citotoxicidade em duas linhas celulares tumorais (HCT-116 e MDA-MB-231), com valores de EC₅₀ superior a 140 mg/L.

Outros estudos referem que o óleo essencial de tomilho apresentou atividade antitumoral em várias linhas tumorais, correlacionando a sua atividade com conteúdo em monoterpenos e a sua capacidade de afetar o *stress* oxidativo ^{265,266}.

Um estudo com óleo essencial de *Thymus vulgaris* (33 % de timol, 24 % de *p*-cimeno e 9 % de carvacrol) refere que esse OE apresentou capacidade para inibir a proliferação de osteossarcoma humano U2OS e de linhas de células PANC-1 de cancro do pâncreas. O efeito antiproliferativo de 1,8-cineol (constituente principal dos OEs de *C. nepeta* – 28 % - e *T. mastichina* – 71 %) também está descrito na bibliografia, para células KB de cancro da boca, salientando a capacidade apoptótica do OEs, via *stress* mitocondrial ²⁶⁷. Um estudo com óleo essencial de *Thymus vulgaris* (timol 33 %, *p*-cimeno 24 % e carvacrol 9 %) relatou que esse OE inibe a proliferação de osteossarcoma humano U2OS e de linhas celulares de cancro de pâncreas (PANC-1) ²⁶⁸, sugerindo que o seu efeito antiproliferativo se deveu à diminuição do número de células na fase S e à sua acumulação na fase G1, associado, respetivamente, à diminuição da ciclina A e ao aumento dos níveis de proteína p27 do inibidor do ciclo celular. Bendif *et al.* ²⁶⁹, num estudo efetuado com óleo essencial de *Thymus munbyanus*, quimiótipo borneol, demonstrou que este apresentava ação antiproliferativa face a linhas celulares tumorais MDA-MB-231, com valores de EC₅₀ de 97 mg/L e 85 mg/L para os OEs obtidos da flor e da parte aérea da planta (folha + flor), respetivamente.

Avaliação das propriedades antimicrobiana

Publicações efetuadas no âmbito deste capítulo

Sílvia Macedo Arantes, Andreia Piçarra; Marisa Guerreiro; Cátia Salvador; Fátima Candeias; A. Teresa Caldeira and M. Rosário Martins (2019). "Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal)", Food and Chemical Toxicology Vol. 133, pp. 110747.

Sílvia Arantes, Fátima Candeias, Orlando Lopes, Mónica Lima, Marízia Pereira, Teresa Tinoco, J Cruz-Morais, M Rosário Martins (2016). "Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*". Planta Medica, 82 (14), pp. 1266 - 1273.

4.1. Introdução

O aparecimento de estirpes microbianas multirresistentes a fármacos é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um problema mundial, apresentando-se, atualmente, como um dos maiores desafios de Saúde Pública ²⁷⁰.

As infecções hospitalares e microrganismos multirresistentes são um desafio global na prática clínica e são responsáveis por alta mortalidade e morbidade ²⁷¹⁻²⁷³. O tratamento dessas infecções geralmente é difícil ou mesmo impossível com terapias convencionais ²⁷⁴. Adicionalmente, os números de estirpes resistentes a vários tipos de antibacterianos têm aumentado drasticamente a cada ano, disseminando-se pelo mundo, devido ao uso indiscriminado e extensivo de antimicrobianos em práticas terapêuticas em humanos e como promotores de crescimento e tratamento de doenças infecciosas em animais ^{137,275,276}.

Na prática clínica, os microrganismos patogênicos são controlados através do uso de antimicrobianos, a maioria obtidos por síntese química. Os antimicrobianos classificam-se em antibacterianos, antifúngicos e antivíricos.

Os antibacterianos atuam a diversos níveis para inibir o crescimento bacteriano (Figura 4.1), designadamente ao nível da síntese da parede celular (Penicilinas e as Cefalosporinas), no metabolismo do ácido fólico (Trimetroprim e Sulfametoxazol), ao nível da membrana citoplasmática (PoliMixinas), na síntese proteica (30S-Tetraciclina; 50S-Eritromicina e Cloranfenicol; e tRNA-Puromicina) e ao nível dos ácidos nucleicos (RNAPolimerase - Rifampicina; DNAGirase – Ácido nalidixico, Norfloxacin e Novobiocina).

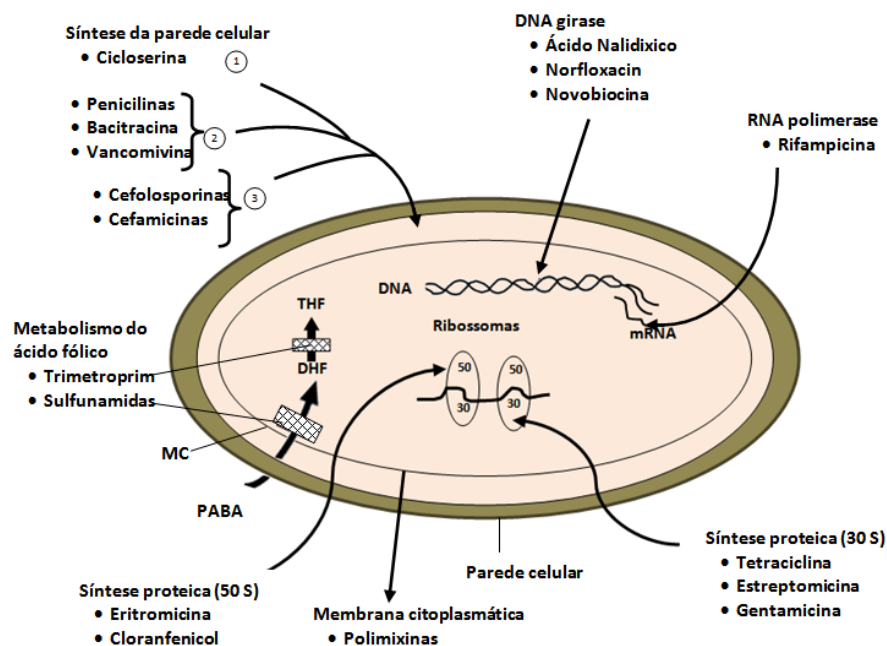


Figura 4.1 - Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas pelos antibacterianos
Adaptado de Madigan *et al.* ²⁷⁷

Os agentes antimicrobianos que possuem um anel β -lactâmico, apresentam geralmente atividade na inibição da síntese da parede celular, o qual interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin Binding Protein*), inibindo o enzima envolvido na trans-peptidação, responsável pela ligação das cadeias tetrapeptídicas do peptidoglicano e, conseqüentemente, impedindo a formação das ligações das cadeias adjacentes do peptidoglicano, provocando uma perda na rigidez da parede celular bacteriana. Os antimicrobianos da família dos aminoglicosídeos inibem o crescimento bacteriano, dada a capacidade que possuem de se ligar à membrana citoplasmática, entre as cadeias fosfolípídicas, alterando a permeabilidade membranar. Os antimicrobianos pertencentes à família das tetraciclina ligam-se a subunidade ribossomal 30S, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA ²⁷⁷.

Os antifúngicos são agentes que previnem ou inibem a proliferação fúngica ou promovem a destruição dos seus esporos. De acordo Kathiravan *et al.* ²⁷⁸, os

antimicóticos ou antifúngicos de síntese tem como alvos impedir a síntese da membrana celular (compostos azólicos), síntese de quitina (Polioxina D e Nicomicina), inibição da síntese de ergosterol promovendo a ruptura da parede celular (Anfotericina B), síntese de glucanos (Caspofungina), síntese da esqualeno-epoxidase (Amorolfina), síntese proteica (Flucitosina) e dos ácidos nucleicos (Sordarina), e síntese de microtúbulos (Griseofulvina). Na Figura 4.2 estão representados os principais alvos terapêuticos dos antifúngicos.

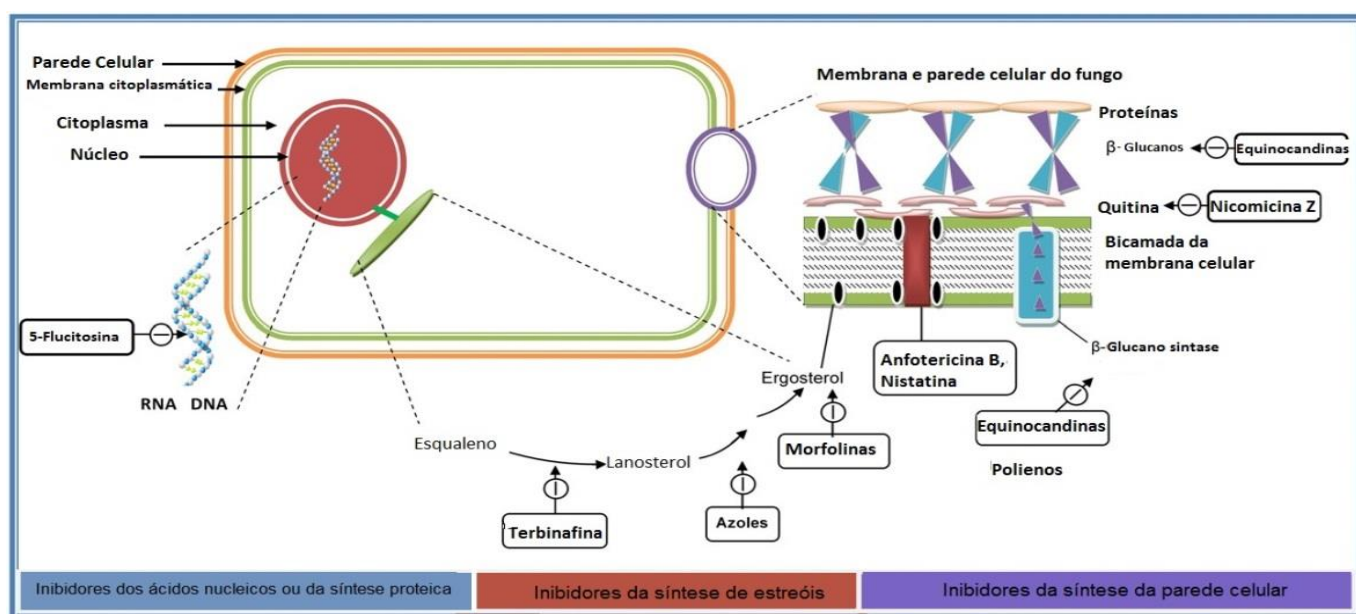


Figura 4.2 - Alvos de terapia antifúngica

Adaptado de Kathiravan *et al.* ²⁷⁸

No entanto, devido à similaridade entre a célula humana e as células eucarióticas dos fungos e à capacidade destes modificarem os antimicrobianos pelos sistemas de detoxificação, o tratamento das infecções fúngicas torna-se muitas vezes ineficiente e exige uma aplicação continuada ²⁷⁹.

Adicionalmente, o uso indiscriminado de biocidas para controlo da contaminação microbiana nos bens patrimoniais²⁸⁰, e de antimicrobianos para preservar

alimentos e prevenir o crescimento de fungos, nomeadamente fungos do género *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* produtores de micotoxinas tóxicas para animais e humanos, tem, também, contribuído para o aumento da resistência dos microrganismos ^{281,282}.

A busca constante por novos antimicrobianos aumentou a popularidade e interesse científico no uso de antimicrobianos de origem natural ¹³⁷. Os extratos vegetais e óleos essenciais integram a base de muitas aplicações, nomeadamente nas indústrias farmacêutica e alimentar ²⁸³, surgem como uma alternativa aos antimicrobianos de síntese, nomeadamente no tratamento de doenças infecciosas, patologias do sistema respiratório, aparelho urinário e gastrointestinal, biliar e sistemas, bem como sobre a pele ^{284,285}. O uso de óleos essenciais, ricos em compostos terpénicos, poderá constituir uma vantagem relativamente aos fármacos de síntese, designadamente na redução da maioria dos efeitos colaterais, registando-se apenas a ocorrência de reações alérgicas quando utilizados em concentrações muito elevadas ^{137,286}.

A atividade dos óleos essenciais está relacionada com a sua composição química e com as proporções e as possíveis interações entre os seus constituintes ²⁸⁷. De acordo com M. L. Faleiro ²⁸⁸, destacam-se três efeitos resultantes da diversidade de compostos presentes nas complexas misturas de óleos essenciais: adição (o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais), antagonismo (o efeito da combinação dos compostos é inferior ao efeito quando são aplicados individualmente) e sinergismo (o efeito da combinação dos compostos é maior que a soma dos efeitos individuais). Por este motivo, importa avaliar o efeito da interação dos OEs/componentes ²⁸⁷.

Na maioria dos estudos, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída à presença de vários compostos terpénicos, que, na sua forma pura, têm mostrado para atividade antimicrobiana ^{289,290}. Este potencial poderá ser associado ao seu carácter lipofílico ²⁹¹, no entanto, os seus mecanismos de ação ainda não estão bem compreendidos ²⁹². Considerando o vasto número de compostos presentes nos óleos essenciais, é natural que a atividade antimicrobiana não seja mediada por um único

mecanismo específico, esperando-se que vários alvos celulares sejam atingidos ^{247,293}. Alguns estudos concluíram ainda que os óleos essenciais possuem maior atividade do que a mistura dos seus componentes maioritários, sugerindo que o menor dos componentes é fundamental para a atividade, podendo apresentar um efeito sinérgico ou potenciar a sua influência ²⁴⁷. Geralmente os mecanismos de ação antibacteriana de compostos naturais estão associados à membrana celular, como o transporte de eletrões e o gradiente de iões, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzima-dependentes ²⁴⁷. Os alvos de ação (Figura 4.3) descritos para os óleos essenciais são a degradação da parede celular ²⁹⁴, o distúrbio da membrana citoplasmática, alteração da força motriz protónica, fluxo de eletrões, transporte ativo, coagulação dos constituintes celulares, perda de constituintes celulares, interferência na atividade das desidrogenases mitocondriais e na síntese mitocondrial de ATP, bloqueando o suprimento energético ^{292,295-301}.

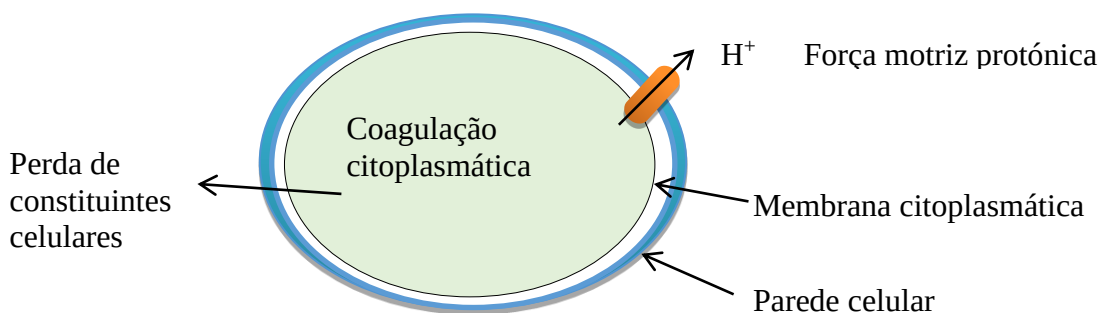


Figura 4.3 - Principais alvos dos óleos essenciais
Adaptado de Burt ²⁴⁷ e de Amarjeet Kumar e Kudachikar ²⁹²

A presença de componentes hidrofóbicos nos extratos vegetais, nomeadamente óleos essenciais, permitem a partição dos lípidos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeáveis ³⁰². Nesta altura é pois

possível que ocorra a perda de iões e algum teor celular ^{293,299,300}. Alguns estudos referem que os componentes de óleos essenciais interagem, também com as proteínas da membrana citoplasmática ³⁰³ e que os hidrocarbonetos cíclicos podem agir sobre os enzimas ATPases, localizados na membrana citoplasmática ³⁰⁴, alterando a permeabilidade das membranas citoplasmática e mitocondrial, interferindo em várias funções celulares, tais como a manutenção de energia no processo de transdução, transporte de solutos, regulação do metabolismo e controlo da pressão ^{297,305}. Alguns óleos essenciais apresentam capacidade para estimular o crescimento de pseudomicélios, indicando que podem atuar sobre os enzimas envolvidos na síntese de componentes estruturais das bactérias ³⁰⁶.

4.2. Metodologia

4.2.1. Reagentes

Os antimicrobianos de síntese nistatina, econazol, e cloridrato de tetraciclina foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os meios de cultura *Muller-Hinton* e *Saboroud Dextrose* foram adquiridos na Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Os meios de microbiologia Oxoid e os discos de susceptibilidade antimicrobiana foram adquiridos no ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) e os discos estéreis de papel de filtro *Whatman* ($\varnothing$ = 6 mm) foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes e solventes são de elevado grau de pureza (Sigma-Aldrich).

4.2.2. Microrganismos

A atividade antibacteriana foi testada usando estirpes patogénicas e comensais da coleção de culturas Americana (ATCC - *American Type Culture Collection*, Maryland, USA): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; e isolados clínicos cedidos pelo Laboratório Flaviano Gusmão, Évora, Portugal: *Enterococcus faecalis* LFG 1001, *Staphylococcus aureus* LFG 1007, *Escherichia coli* LFG 1003, *Morganella morganii* LFG 1008, *Proteus mirabilis* LFG 04, *Pseudomonas aeruginosa* LFG1002, *Salmonella enteritidis* LFG 1005 e *Salmonella enteritidis* serovar *Typhimurium* LFG 1006.

A atividade antifúngica foi determinada para cinco estirpes fúngicas fitopatogénicas, existentes na *Coleção de Culturas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Évora* (LFTUE), *Aspergillus niger* LFTUE00010, *Fusarium oxysporum* LFTUE00012, *Penicillium commune* LFTUE00014, *Penicillium chrysogenum* LFTUE00015 e *Rhizopus stolonifer* LFTUE000118, e para três estirpes de referência

adquiridas à coleção de culturas Americana (ATCC - *American Type Culture Collection*, Maryland, USA), *Aspergillus flavus* ATCC 26771™, *Aspergillus japonicus* ATCC 1042™ e *Rhizopus oryzae* ATCC 58106.

4.2.3. Preparação das suspensões de microrganismos

Para os ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana, foram preparadas suspensões dos microrganismos a estudar em soro fisiológico estéril (NaCl 0,9 %).

Para as bactérias, as suspensões de células foram preparadas na concentração de 10^8 UFC/mL, correspondente a uma turvação de 0,5 na escala de *McFarland*. Os ensaios dos microrganismos patogénicos foram realizados em Câmara de Fluxo de Ar Laminar (Airstream®, classe II, modelo AC2-4E1) no Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Évora ³⁰⁷.

Para as suspensões de fungos, as suspensões de esporos foram preparadas de na concentração correspondente a 10^8 UFC/mL (contagem em câmara de *Neubauer*). Para determinar a concentração mínima inibitória, as suspensões foram diluídas em meio de cultura de 10^8 UFC/mL para 2×10^6 UFC/mL.

Todas as suspensões preparadas e todos os ensaios microbiológicos foram realizados tendo em conta as condições de assepsia.

4.2.4. Método de difusão em meio sólido

Para a avaliação da atividade antimicrobiana prepararam-se os meios de cultura adequados para os microrganismos em estudo: MH (*Muller-Hinton Agar*) para bactérias e SDA (*Saboroud Dextrose Agar*) para fungos filamentosos. Os meios foram esterilizados em autoclave a 115 °C/15 min e armazenados à temperatura ambiente ³⁰⁸.

Posteriormente procedeu-se à liquefação dos meios e distribuição em placas de *Petri*. As placas foram inoculadas por espalhamento, com 100 µL da suspensão contendo 10⁸ UFC/mL. Colocaram-se três discos equidistantes de papel *Whatman* estéril ($\varnothing$ = 6 mm) em cada placa.

O óleo essencial (5 µL) foi aplicado nos discos, em triplicado, para cada cultura microbiana ³⁰⁸⁻³¹⁰. Também se efetuaram controlos positivos de crescimento dos microrganismos. Adicionalmente foram efetuados controlos padrão com antimicrobianos de síntese: antibacterianos específicos para cada estirpe bacteriana ³⁰⁹, e nistatina (33 µg, correspondendo à dose terapêutica 1000 UI) e econazol (50 µg). Para as testemunhas, prepararam-se placas contendo o inóculo e aplicaram-se discos de papel *Whatman* estéril ^{307,311}. De modo a evitar a volatilização do óleo essencial procedeu-se à pré-incubação das placas de Petri durante duas horas a 4 °C ³⁰⁷. Posteriormente procedeu-se à incubação das culturas em estufa a 37 °C/24 horas para as bactérias e 28 °C/4-5 dias para os fungos filamentosos.

Os resultados obtidos para os óleos essenciais foram interpretados e classificados em três categorias, de acordo com a classificação de Aboul Ela *et al.* ³¹²: fortemente ativos ($\varnothing$ > 8 mm), moderadamente ativos (6 mm < $\varnothing$ ≤ 8 mm) e inativos ($\varnothing$ ≤ 6 mm). Os resultados foram interpretados de acordo com as normas NCCLS ³¹³.

4.2.5. Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais foi determinada em meio líquido (microdiluição), de acordo com o método de referência para testar a atividade dos agentes microbianos ³⁰⁹, efetuando as alterações necessárias para o estudo de óleos essenciais. As suspensões de microrganismos (inóculos) foram preparadas como descrito anteriormente. Em microplacas de 96 poços estéreis, adicionou-se 100 µL de inóculo a 100 µL de cada concentração de óleo essencial (diluições seriadas de 31,25 a 2000 µg/mL) preparadas em meio de cultura

suplementado com DMSO (6 %) e *Tween* 20 (2,5 %). Efetuaram-se ainda dois controles contendo 100 µL de meio suplementado com DMSO (6 %) e *Tween* 20 (2,5 %) e 100 µL de inoculo (controle de crescimento) ou de meio (controle negativo). Adicionalmente, determinou-se ainda a concentração mínima inibitória do hidrocloreto de tetraciclina (1 - 1000 µg/mL), para a nistatina (2 a 60 µg/mL) e para o econazol (0,1 a 4,0 µg/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As placas foram incubadas a 37 °/18 horas para as bactérias e 25 °C/3 dias para os fungos e, posteriormente, o crescimento do microrganismo foi determinado pela leitura visual direta.

A concentração mínima inibitória é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo, sendo a resposta evidenciada pela turvação do meio ³¹⁴.

Adicionalmente, foi ainda determinado a concentração mínima bactericida ou fungicida, por avaliação do crescimento em meio sólido das soluções de concentrações onde não se verificou qualquer crescimento microbiano nos ensaios de microdiluição. Posteriormente, as placas foram incubadas a temperatura e tempo pré-definidos: 37 °C/24 horas para as bactérias e 28 °C/4-5 dias para os fungos filamentosos. Como valor de concentração mínima bactericida/fungicida considerou-se a concentração para a qual não se observou crescimento microbiano.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Atividade antibacteriana

Os óleos essenciais apresentaram um largo espectro de ação antibacteriano, com capacidade inibição do crescimento das estirpes *Gram*-positivas (

Figura 4.4) e *Gram*-negativas (Figura 4.5).

Relativamente às estirpes *Gram*-positivas, observou-se que o óleo essencial com maior potencial antimicrobiano foi o de *O. virens* que apresentou capacidade para inibir totalmente o crescimento das estirpes *E. faecalis* ATCC 29219, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Observou-se ainda que os óleos essenciais de *L. pedunculata* e *M. pulegium* inibiram totalmente o crescimento da estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto o óleo essencial de *C. nepeta* (Primavera) inibiu totalmente o crescimento da estirpe *S. aureus* ATCC 29213 e o óleo essencial de *M. spicata* apresentou capacidade para inibir totalmente o crescimento da estirpe *S. aureus* LFG 1007.

As estirpes bacterianas *Gram*-(+) estudadas apresentaram sensibilidade a todos os OEs estudados ($\varnothing \geq 6$ mm), à exceção da estirpe *E. faecalis* ATCC 29212 que apresentou resistência ao óleo essencial da parte aérea folha + espiga (Mix) de *L. luisieri*. É ainda importante referir que as duas estirpes de *E. faecalis* e a estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentaram resistência à tetraciclina ($\varnothing \leq 14$ mm).

Os valores de CMI para os óleos essenciais face às estirpes *Gram*-(+) e *Gram*-(-) estão representados no Quadro 4.1 e Quadro 4.2, respetivamente, enquanto os valores de CMI e CMB da tetraciclina encontram-se em anexo (Anexo II - Quadro A.1). No ensaio em meio líquido, os OEs que apresentaram melhor atividade antibacteriana face às estirpes *Gram*-(+) foram os OEs das folhas de *L. luisieri* e de *L. viridis*, com valores de CMI a variarem entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{L/mL}$. Para os restantes OEs, os valores de CMI são superiores a 0,8 $\mu\text{L/mL}$.

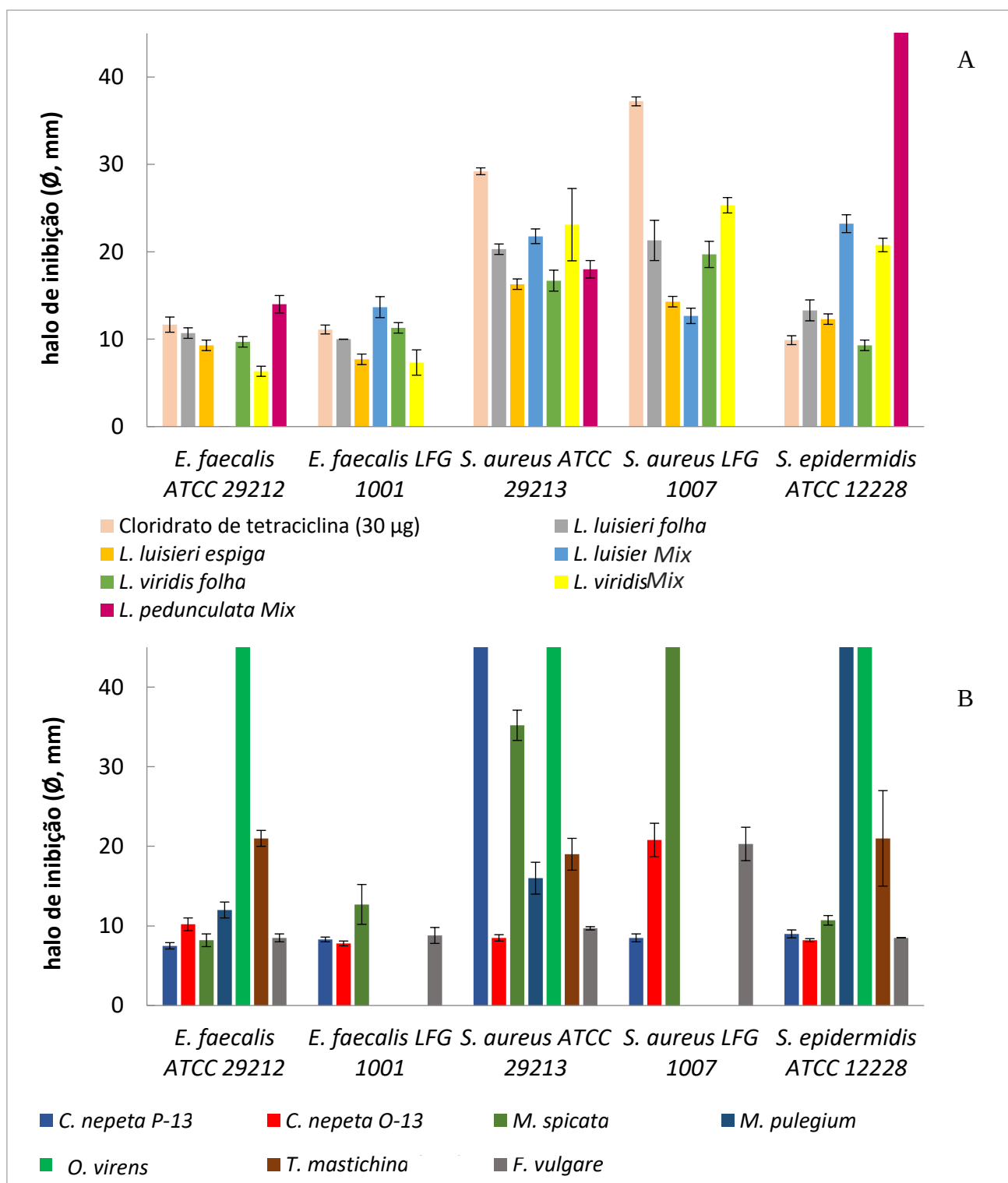


Figura 4.4 – Atividade antibacteriana pelo ensaio de difusão em meio sólido para as estirpes bacterianas Gram-positivas.

Quadro 4.1 - Valores de CMI ($\mu\text{L/mL}$) dos óleos essenciais para as estirpes bacteriana Gram-positivas

OE		Microrganismo				
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i> LFG 1001	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> LFG 1007	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
<i>L. luisieri</i>	f	0,1	0,5	0,3	0,3	0,1
	e	1,1	0,5	0,3	0,3	0,3
	Mix	> 2,1	> 2,1	> 2,1	1,6	> 2,1
<i>L. pedunculata</i>	Mix	> 2,1	> 2,1	> 2,1	0,5-1,0	> 2,1
<i>L. viridis</i>	f	0,1	n. d.	0,1-0,3	n. d.	0,1
	Mix	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1
<i>C. nepeta</i>	Mix (P)	2,2	1,1	0,5	1,1	0,8
	Mix (O)	> 2,0	> 4,0	> 2,0	2,0	> 2,0
<i>M. spicata</i>	Mix	> 2,2	> 4,0	2,2	2,2	> 2,2
<i>M. pulegium</i>	Mix	> 2,1	1,1-2,1	1,1-2,1	1,1-2,1	1,1-2,1
<i>O. virens</i>	Mix	> 2,2	> 2,2	0,6-1,1	> 2,2	> 2,2
<i>T. mastichina</i>	Mix	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2
<i>F. vulgare</i>	Mix	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2

Legenda: f – folha; e – espiga; Mix – parte aérea (folha + espiga), n. d. – não determinado, P – Primavera, O – Outono

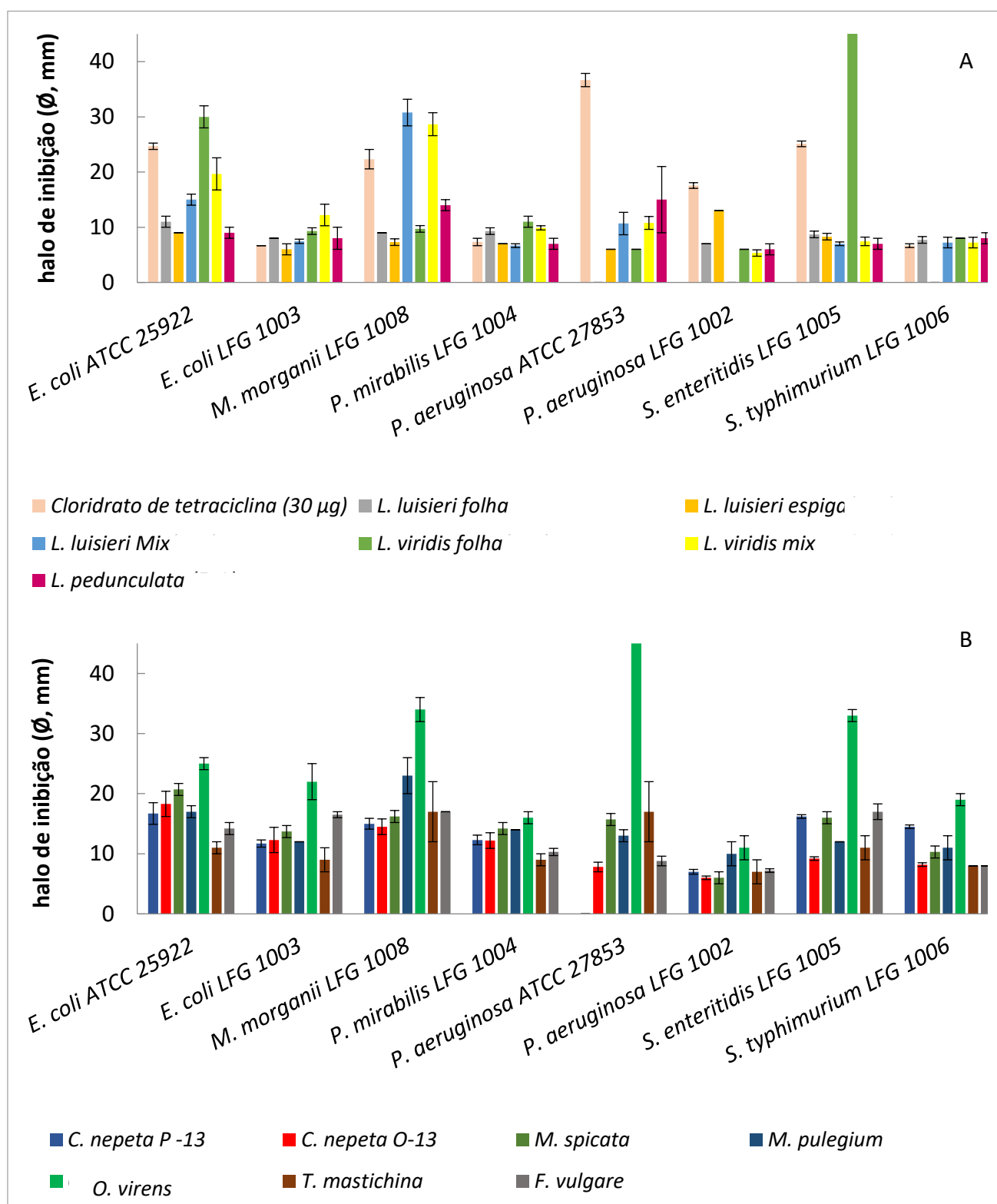


Figura 4.5 – Atividade antibacteriana pelo ensaio de difusão em meio sólido para as estirpes bacterianas Gram- negativas.

Quadro 4.2 - Valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais para as estirpes bacterianas *Gram*-negativas

OE		CMI (µL/mL)							
		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. morganii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>
		ATCC 25922	LFG 1003	LFG 1008	LFG 1004	ATCC 27853	LFG 1002	LFG 1005	LFG 1006
<i>L. luisieri</i>	f	> 1,1	0,5	0,5	0,3	> 1,1	0,3	0,8-1,1	0,8-1,1
	e	> 1,1	0,5	0,5	0,3	> 1,1	0,3	0,8	1,1
	Mix	1,1	> 2,1	0,3	> 2,1	1,1	0,3	> 2,1	> 2,1
<i>L. pedunculata</i>	Mix	1,0-2,1	1,0-2,1	n. d.	0,3-0,5	> 2,1	1,0-2,1	0,07-0,13	1,0-2,1
<i>L. viridis</i>	f	1,1	> 2,2	0,8-1,1	0,8-1,1	1,1	0,5-8,8	0,5-0,8	0,8-1,1
	Mix	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2
<i>C. nepeta</i>	Mix (P)	0,9	1,9	0,9	0,9	n. d.	0,9	0,9	1,9
	Mix (O)	1,0	> 2,0	0,7	1,0	1,0	1,0	0,7	> 2,0
<i>M. spicata</i>	Mix	1,1	2,2	0,8	2,2	1,1	1,1	0,8	>2,2
<i>M. pulegium</i>	Mix	1,1-2,1	1,1-2,1	n. d.	0,3-0,5	1,1-2,1	1,1-2,1	0,5-1,1	1,1-2,1
<i>O. virens</i>	Mix	1,1-2,2	1,1-2,2	n. d.	0,6-1,1	> 2,2	1,1-2,2	> 2,2	> 2,2
<i>T. mastichina</i>	Mix	> 2,2	1,1-2,2	n. d.	0,5-1,1	1,1-2,2	1,1-2,2	< 0,07	> 2,2
<i>F. vulgare</i>	Mix	2,2	1,1	0,8	1,1	1,1	1,1	1,1	> 2,2

Legenda: f – folha; e – espiga; Mix – parte aérea folha + espiga, n. d. – não determinado, P – Primavera, O – Outono

Os resultados sugerem que os óleos essenciais apresentaram essencialmente um efeito bacteriostático, nas concentrações testadas. O cloridrato de tetraciclina apresentou atividade bactericida para as estirpes de *S. aureus* LFG 1007, *P. aeruginosa* LFG 1002, *E. coli* ATCC 25922 e *P. mirabilis* LFG 1004, com valores compreendidos entre 125 µg/mL e 500 µg/mL. O cloridrato de tetraciclina apresentou atividade bactericida para as estirpes de *S. aureus* LFG 1007, *P. aeruginosa* LFG 1002, *E. coli* ATCC 25922 e *P. mirabilis* LFG 1004, com valores compreendidos entre 125 µg/mL e 500 µg/mL.

É importante referir que as estirpes utilizadas no estudo são isolados clínicos, patogénicas e/ou patogénicas oportunistas, que apresentam, na sua maioria, resistência aos antimicrobianos de síntese, sendo, portanto, necessário pesquisar novos compostos aos quais estes microrganismos sejam sensíveis e que poderão ser posteriormente aplicados na terapêutica.

Neste estudo de atividade antibacteriana, observamos que as bactérias *Gram*-(-) apresentaram maior resistência aos óleos essenciais. Esta resistência pode dever-se ao facto das estirpes bacterianas possuírem uma parede exterior, composta por lipopolissacáridos, circundante da parede celular de peptidoglicano, que constitui uma barreira aos óleos essenciais ³¹⁵. A elevada atividade antibacteriana observada para o óleo essencial de *O. virens* face a estirpes *Gram*-positivas e *Gram*-negativas pode estar correlacionado com o elevado teor de compostos hidrocarbonetos monoterpénicos e monoterpenos fenólicos, capazes de desintegrar a membrana externa de estirpes *Gram*-negativas ³¹⁶. Adicionalmente, alguns estudos indicam que os óleos essenciais com elevados teores de 1,8-cineol têm apresentado elevada atividade antibacteriana para estirpes *Gram*-negativas e *Gram*-positivas ^{317,318}.

4.3.2. Atividade antifúngica

Os óleos essenciais apresentaram um largo espectro de ação antifúngico (

Figura 4.6). A estirpe *A. japonicus* apresentou elevada sensibilidade aos óleos essenciais das folhas de *L. luisieri* e *L. viridis*, *C. nepeta* (Primavera), *M. spicata*, *O. virens* e *F. vulgare*, observando-se inibição total do crescimento. *A. niger* apresentou inibição total do crescimento na presença dos óleos essenciais de *L. luisieri* (folha), *C. nepeta* (Primavera) e *M. spicata* e apresentou resistência ao óleo essencial de *C. nepeta* (Outono). *A. flavus* apresentou inibição total do crescimento na presença dos OEs *M. spicata* e *O. virens*.

F. oxysporum apresentou inibição total do crescimento na presença dos óleos essenciais de *L. luisieri* (folhas), *L. viridis* (folhas), *M. spicata* e *O. virens*.

As estirpes *Penicillium* spp. apresentaram inibição total do crescimento face aos óleos essenciais de *L. luisieri* (folhas), *L. viridis* (folhas), *M. spicata*, *O. virens*, e *F. vulgare*. A estirpe *Penicillium chrysogenum* apresentou elevada sensibilidade ao óleo essencial de *C. nepeta* (Outono), com inibição total do crescimento, enquanto a estirpe *Penicillium commune* apresentou baixa sensibilidade, com um halo de inibição de 6 mm.

As estirpes de *Rhizopus* spp. apresentaram também elevada sensibilidade aos óleos essenciais de *C. nepeta* (Outono) e *O. virens*, com inibição total do crescimento. Observou-se ainda inibição total do crescimento da estirpe *R. oryzae* na presença do óleo essencial de *M. spicata* enquanto para a estirpe *R. stolonifera* observou-se elevada sensibilidade, com um halo de inibição de 21 mm. A estirpe *R. stolonifera* apresentou resistência ao OE de *C. nepeta* (Primavera), enquanto que *R. oryzae* apresentou muito baixa sensibilidade, com um halo de inibição de 6 mm.

Os óleos essenciais que apresentaram maior atividade antifúngica foram os óleos essenciais de *M. spicata* e *O. virens*, que os seus halos de inibição eram equivalentes ou superiores aos antifúngicos de síntese nistatina e econazol.

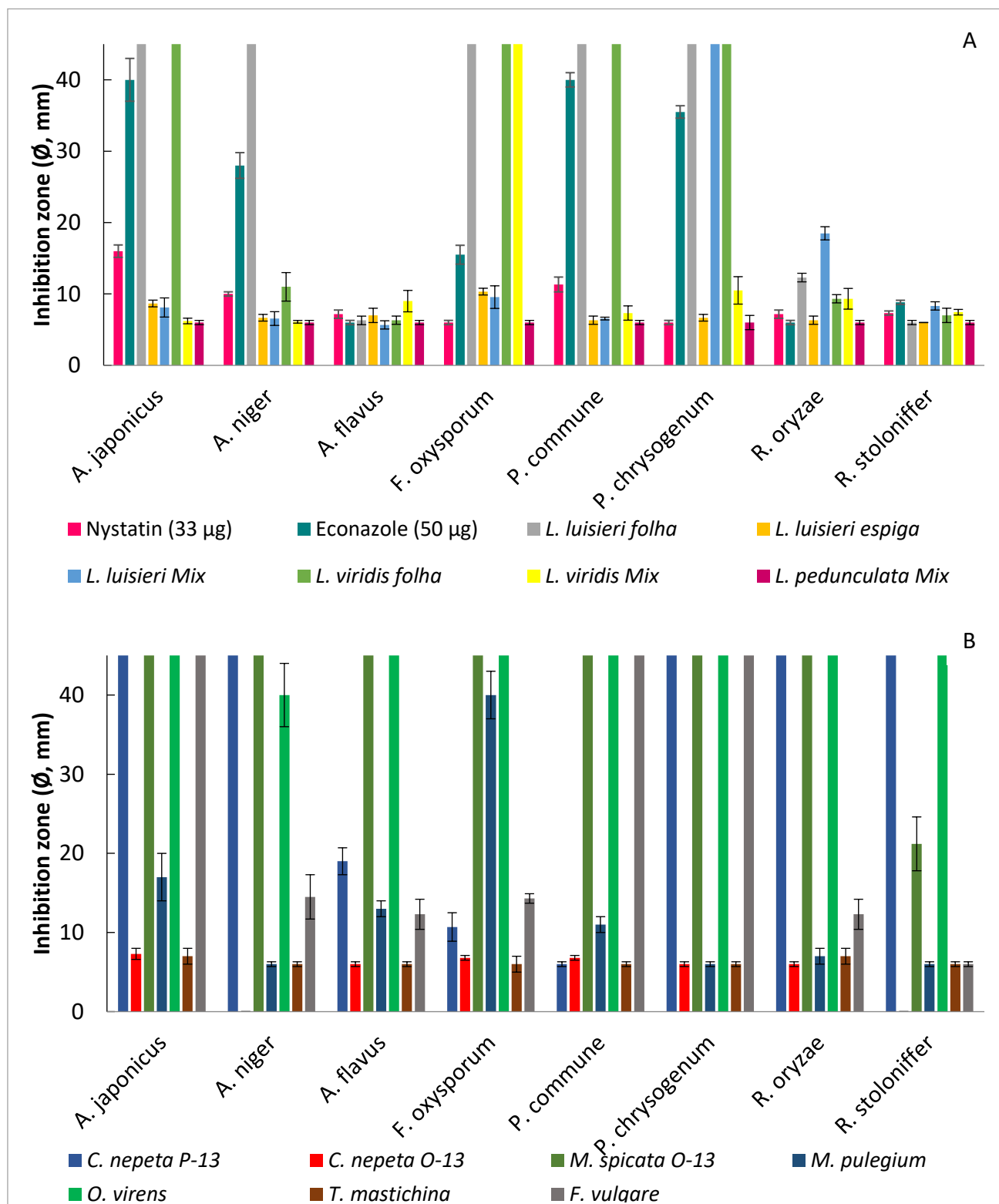


Figura 4.6 – Atividade antimicrobiana pelo ensaio de difusão em meio sólido para as estirpes fúngicas.

No Quadro 4.3 estão representados os valores de CMI dos óleos essenciais face às estirpes fúngicas. Os valores de CMI e CMF da nistatina e do econazol estão no anexo (Anexo II - Quadro A.1).

Quadro 4.3 - Valores de CMI ($\mu\text{L/mL}$) dos óleos essenciais para as estirpes fúngicas

OE		CMI ($\mu\text{L/mL}$)							
		<i>A. japonicus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. commune</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. stolonifer</i>
<i>L. luisieri</i>	f	0,3	0,3	> 1,1	0,5	0,3	0,3	> 2,1	> 2,1
	e	0,5	0,5	1,1	1,1	0,3	0,3	> 2,1	> 2,1
	Mix	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1
<i>L. pedunculata</i>	Mix	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1	> 2,1
<i>L. viridis</i>	f	2,2	2,2	1,1-2,2	1,1-2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
	Mix	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1	1,6-2,1
<i>C. nepeta</i>	Mix (P)	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,9	1,9
	Mix (O)	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0
<i>M. spicata</i>	Mix	1,1-2,2	1,1-2,2	0,6-1,1	> 2,2	0,6-1,1	1,1-2,2	1,1-2,2	1,1-2,2
<i>M. pulegium</i>	Mix	1,1-2,1	> 2,1	0,3-0,5	> 2,1	1,1-2,1	1,1-2,1	> 2,1	> 2,1
<i>O. virens</i>	Mix	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2
<i>T. mastichina</i>	Mix	> 2,2	> 2,2	> 2,2	1,1-2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2
<i>F. vulgare</i>	Mix	1,1	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2	> 2,2

Legenda: f – folha; e – espiga; Mix – parte aérea (folha + espiga), P – Primavera, O – Outono

As estirpes fúngicas em estudo apresentaram sensibilidade à nistatina, com valores de CMI entre 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (*A. japonicus*) e 30 $\mu\text{g/mL}$ (*R. oryzae*). Os valores de CMF foram superiores a 3,9 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a estirpe *A. japonicus* foi a mais sensível à nistatina.

O econazol também apresentou elevada capacidade para inibir o crescimento das estirpes fúngicas, com valores de CMI compreendidos entre 0,06 – 1 $\mu\text{g/mL}$ e os

valores de CMF variaram entre 0,1 µg/mL e 2,0 µg/mL, observando-se que as estirpes *Aspergillus* foram as que apresentaram valores mais baixos.

Relativamente aos óleos essenciais, observou-se que nas concentrações testadas apenas o OE de hortelã na concentração de 2,2 µL/mL apresentou ação fungicida. Os restantes óleos essenciais apresentaram ação fungistática nas concentrações testadas.

Os óleos essenciais em estudo apresentaram elevada atividade antifúngica, sugerindo o seu potencial como aditivos alimentares no controlo do crescimento de fungos filamentosos. Esta propriedade é especialmente importante porque os fungos filamentosos e os seus esporos podem representar uma ameaça à saúde humana, uma vez que são muitas vezes responsáveis por reações asmáticas e alérgicas. Além disso, muitos dos fungos filamentosos são capazes de produzir moléculas tóxicas, as micotoxinas, e algumas podem ser cancerígenas, nomeadamente as aflotoxinas, que podem ser absorvidas por ingestão de alimentos contaminados ³¹⁹.

A bibliografia refere que óleos essenciais ricos em compostos terpénicos, como o carvacrol, cânfora e timol (como por exemplo os OEs de *M. spicata*, *O. virens* e *L. pedunculata*) apresentaram atividade antimicrobiana, sugerindo que estes componentes são responsáveis pela atividade antimicrobiana dos OEs, quer porque se apresentam como compostos maioritários quer pelo facto de desempenharem um papel importante devido aos efeitos sinérgicos ^{291,320,321}. Alguns estudos efetuados com óleos essenciais e os seus componentes maioritários demonstraram que a mistura da totalidade dos seus componentes apresentou maior atividade que a mistura dos seus constituintes maioritários ^{247,321,322}. Adicionalmente, alguns estudos prévios têm demonstrado que a atividade antimicrobiana de um composto aumenta na presença de grupos funcionais contendo oxigénio (por exemplo, linalol, acetato de linalilo e geraniol), sugerindo uma correlação entre a estrutura dos terpenos e a sua atividade ^{303,323-325}.

Estudos óleos essenciais de *Lavandula* spp. referem que estes apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica. Um estudo refere que as estirpes *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram sensíveis ao OE de *Lavandula bipinnata* ³²⁶. O óleo essencial de *Lavandula luisieri* apresentou atividade antibacteriana para estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus* ³², *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ^{327,328}. Estudos efetuados com óleos essenciais de *Lavandula* spp. do Centro e sul de Portugal demonstraram que estes óleos essenciais apresentaram elevada atividade antifúngica para estirpes *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. ^{34,37,329}.

Na literatura é referido que o óleo essencial de *C. nepeta* apresenta atividade antimicrobiana para as estirpes *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ¹⁰⁹ e *S. typhimurium* ¹⁰⁵. Estudos prévios atribuíram o seu amplo espectro de ação antimicrobiana ao elevado teor em monoterpenos oxigenados. A atividade antifúngica tem sido correlacionada com o elevado teor em álcoois, nomeadamente 1,8-cineol, isopulegol e mentol ^{247,316,322,330}.

Os resultados antimicrobianos observados para o OE de *M. spicata* estão de acordo com a bibliografia que refere que o OE desta planta apresenta elevado espectro de atividade antibacteriana. Na literatura, existem diversos estudos de atividade antimicrobiana para este óleo essencial (*M. spicata*), onde é evidenciado que possui maior capacidade de inibição do crescimento microbiano do que alguns antibacterianos de síntese como a estreptomicina e penicilina. Alguns autores atribuem o potencial antimicrobiano do OE de *M. spicata* aos constituintes carvona e *cis*-carveol ³¹⁵.

O óleo essencial de *M. pulegium*, apesar de não se revelar tão eficaz quanto o OE de *M. spicata*, também apresentou algum efeito inibitório do crescimento microbiano. No entanto, quando é testada uma solução composta por estes dois óleos essenciais, foi observado um elevado potencial antibacteriano. Este facto deve-se ao efeito sinérgico entre a carvona, um composto maioritário do OE de *M. spicata* (56,6 %), e a pulegona, um composto maioritário do OE de *M. pulegium* (79,7 %), quando se encontra em

elevadas concentrações ³¹⁵. Estudos realizados com OE de *M. pulegium* atribuem o seu potencial antimicrobiano não só ao elevado teor em pulegona, mas também ao efeito sinérgico dos componentes minoritários ^{331,332}.

São poucos os estudos efectuados com óleo essencial *O. virens* verde, no entanto estudos prévios com óleo essencial de *O. vulgare* demonstraram o seu potencial antimicrobiano face a fungos e microrganismos potencialmente patogénicos relacionados com a alimentação ^{333,334}, atribuindo esta propriedade ao elevado teor de carvacrol ³³⁵. Lambert *et al.* ²⁹⁹, num estudo efetuado com óleo essencial de orégão e os seus principais constituintes timol e carvacrol, concluíram que a mistura adequada de carvacrol e timol, tal como acontece no óleo essencial de orégão, pode exercer a inibição total do crescimento devido a danos na integridade da membrana, afetando a homeostase do pH e o equilíbrio iónico da célula. No óleo essencial de *O. virens* em estudo, não se observou a presença de carvacrol, podendo a sua atividade antimicrobiana ser correlacionada com o elevado teor em timol ³³⁶.

Em estudos efetuados com *Thymus* spp. incluindo *T. mastichina*, observou-se que estes óleos essenciais apresentaram ação antibacteriana ³³⁵ e antifúngica ³³⁷, correlacionando-a com os seus compostos majoritários carvacrol, timol, p-cimeno e borneol ³³⁸. Os nossos resultados estão de acordo com os resultados prévios realizados com espécies *Thymus* da região Mediterrânea ³³⁹⁻³⁴¹.

Estudos relacionados com o potencial antibacteriano do óleo essencial de *F. vulgare* revelaram que este OE é eficiente no combate a estirpes bacterianas contaminantes de alimentos. Contudo, a eficácia de um óleo essencial na inibição de patogénicos em produtos alimentares está diretamente relacionada com o pH do alimento. Uma solução para o pH do alimento não interferir com a capacidade inibitória dos OEs parece ser a mistura de óleos essenciais ³¹⁹.

O largo espectro de ação antimicrobiana dos óleos essenciais observado neste estudo pode ser relacionado com o seu alto conteúdo em monoterpenos oxigenados e

de compostos, que atuam simultaneamente, impedindo o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Além disso, podem apresentar interações sinérgicas entre os compostos dos OEs, potenciando o seu efeito antimicrobiano, o qual não pode ser associado a um componente ou mecanismo de ação ^{342,343}. Adicionalmente, devido ao caráter lipofílico dos OEs, o potencial antimicrobiano dos OEs pode estar correlacionado com a alteração das estruturas e das propriedades da membrana celular e a consequente alteração da permeabilidade ^{297,316,322}.

Os resultados obtidos para os dois métodos podem diferir devido a diversos fatores, nomeadamente as diferenças no crescimento microbiano, a exposição de microrganismos ao óleo essencial, a solubilidade dos componentes do OE, e ao uso e quantidade de emulsionante ^{344,345}. Estes e outros elementos podem ser responsáveis pelas grandes diferenças observadas nos ensaios de difusão em agar e em meio líquido (CMI). *In vivo*, podem ser necessários estudos para confirmar a validade de alguns dos resultados obtidos. ³⁴⁶.

Avaliação toxicológica

Publicações efetuadas no âmbito deste capítulo

Sílvia Macedo Arantes, Andreia Piçarra; Marisa Guerreiro; Cátia Salvador; Fátima Candeias; A. Teresa Caldeira and M. Rosário Martins (2019). "Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal)", Food and Chemical Toxicology Vol. 133, pp. 110747.

Sílvia Arantes, Fátima Candeias, Orlando Lopes, Mónica Lima, Marízia Pereira, Teresa Tinoco, J Cruz-Morais, M Rosário Martins (2016). "Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*". Planta Medica, 82 (14), pp. 1266 - 1273.

Sílvia Arantes, M. Fátima Candeias, Andreia Piçarra, Orlando Lopes, Mónica Lima, Marízia Pereira, Júlio Cruz-Morais, M. Rosário Martins (2015). "Biomarkers and toxicological evaluation of *Lavandula* essential oils". Experimental Pathology and Health Sciences Research, Clinics, Teaching and Society, 7 (1), pp. 46 - 47.

5.1. Introdução

Muitos compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, isolados em extratos de plantas medicinais são utilizados como modelos para síntese de compostos como agentes terapêuticos, e aditivos alimentares. A par dos produtos de síntese industrial, os extratos e OEs de plantas aromáticas são cada vez mais aplicados em Fitoterapia, sendo amplamente utilizadas nos países em desenvolvimento como tratamentos alternativos ².

A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 80 % da população mundial recorre a produtos à base de extratos de plantas e/ou dos seus componentes ativos para diversos fins, inclusive os cuidados de saúde ^{5,6}. Por serem de origem natural, existe a percepção de que a aplicação de extratos de plantas medicinais, no tratamento de algumas patologias, é seguro e eficaz, sendo essas, muitas vezes, utilizadas no tratamento de doenças crónicas associadas com medicamentos convencionais ³⁴⁷. No entanto, estudos recentes demonstraram que o uso de alguns medicamentos fitoterápicos não estão isentos de toxicidade, podendo ser acompanhados de efeitos adversos graves, que incluem, entre outros, insuficiência renal e hepatotoxicidade ^{348,349}. Assim, é necessário adotar medidas para promover o uso correto e seguro dos fármacos provenientes da medicina tradicional, incluindo desenvolver estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a toxicidade destas substâncias e definir um intervalo de referência em que estes possam ser ingeridos sem induzir toxicidade ^{348,350}.

Os óleos essenciais têm ganho popularidade e interesse científico, podendo vir a constituir uma alternativa aos fármacos de síntese ^{2,4,181,276}. Avaliar a composição em compostos ativos e respetivos mecanismos de ação presentes nos óleos essenciais é um grande desafio devido grande diversidade de compostos que poderão contribuir para a mesma atividade. Por outro lado, a ampla utilização dos óleos essenciais como fármacos ativos ou como adjuvantes na preparação de medicamentos tem reforçado a necessidade de uma maior sensibilização sobre os potenciais efeitos adversos,

incluindo toxicidade aguda e crônica e interações com outros fármacos, visto que algumas atividades biológicas dos óleos essenciais decorrem da sua interação com funções e mecanismos da fisiologia humana ou animal ³⁵¹. Assim, a seleção de bioensaios para determinar a toxicidade e o efeito específico são etapas importantes. Os teste de bioatividade devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis ^{352,353}.

O ensaio de letalidade com *Artémia salina* é uma metodologia amplamente utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais para avaliar o potencial tóxico de extratos e substâncias isoladas por ser um pequeno crustáceo de fácil manutenção em condições laboratoriais de laboratório e porque é altamente sensível a uma variedade de substâncias químicas ³⁵⁴⁻³⁵⁶. Este ensaio, com determinação de valores da concentração letal (CL₅₀), é um bioensaio simples, barato, seguro e de resposta rápida e permite avaliar a toxicidade em geral, sendo considerado um ensaio preliminar no estudo da bioatividade de extratos vegetais, correlacionando-a com a sua citotoxicidade ^{355,357-359}. Contudo, o principal objetivo dos ensaios toxicológicos é a predição dos possíveis efeitos adversos manifestados por humanos quando expostos à substância química, seja ela um medicamento, um pesticida, um agente químico industrial ou outros, sendo os modelos animais os mais utilizados para este propósito ³⁶⁰. A toxicidade dos extratos de plantas, expressa como valores de CL₅₀, é geralmente comparada com o índice de toxicidade de Meyer ou Clarkson. De acordo com o índice de toxicidade de Meyer, extratos com valores de CL₅₀ < 1000 µg/mL são considerados como tóxicos, enquanto extratos com valores CL₅₀ > 1000 µg/ml são considerados como não-tóxicos. De acordo com o índice de toxicidade de Clarkson: valores de CL₅₀ > 1000 µg/mL são considerados não tóxicos, valores de 500 < CL₅₀ < 1000 µg/mL são indicadores de baixa toxicidade, valores de 100 < CL₅₀ < 500 µg/mL são indicadores de toxicidade e valores CL₅₀ < 100 µg/mL indicam elevada toxicidade. Assim, é considerado que os OEs com valores de CL₅₀ inferiores a 500 µg/mL apresentam toxicidade ^{187,354,358,361}. De acordo com o índice de toxicidade de Maria Lysete A Bastos

et al. ³⁵⁸, os óleos essenciais podem ser classificados em três níveis de toxicidade: não tóxico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), baixa toxicidade ($500 \leq CL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$) e tóxico ($CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$).

Um outro parâmetro que é possível aferir é a concentração máxima tolerada (CMT ou LC_0). Este conceito deriva do conceito de dose máxima tolerada (DMT ou LD_0), desenvolvido por toxicologistas de mamíferos, que define a dose além da qual uma toxicidade ou ação específica não pode ser atribuída a uma substância de teste devido ao estado comprometido do organismo ³⁶². No caso do bioensaio com *A. salina*, a concentração máxima tolerada corresponde à maior concentração de uma substância em um meio ambiental que não causa a morte de organismos ou espécies testadas ³⁶³.

Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que existe uma boa correlação entre os resultados da CL_{50} obtida com pelo ensaio de letalidade em *A. salina* e os resultados da toxicidade oral aguda em ratinhos ³⁶⁴.

5.1.1. Experimentação animal

A experimentação animal, parte integrante da pesquisa de novas terapias, fármacos e organismos geneticamente modificados, é controversa e tem provocado consideráveis e crescentes preocupações políticas e públicas, nomeadamente no que concerne aos aspetos morais que envolvem o direito do homem sobre os animais e à relação entre os riscos e benefícios ³⁶⁵.

A experimentação animal é uma prática exclusiva à comunidade científica. Neste contexto, o modelo animal possibilita a avaliação farmacológica e toxicológica no organismo vivo, permitindo avaliar toda a dinâmica metabólica, desde a administração e testar a recuperação dos animais após interrupção do tratamento. O modelo animal é ainda vital para estudos de absorção, metabolismo, distribuição e excreção (ADME) de medicamentos. Estes estudos, embora não sejam estudos estritamente de toxicidade, são usados para avaliar a quantidade de produto químico ou farmacêutico que é

absorvido no animal, onde é distribuído no corpo, como é alterado pelo metabolismo, o tempo decorrido desses eventos e como e a que taxa o material é eliminado do corpo ³⁶⁶.

Em Portugal, os estudos com animais são regulamentados pelo Decreto-Lei n.º 113/2013 de 7 de agosto que transpõe a Diretiva n.º 2010/63/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Através destas diretivas, é reconhecido que os animais têm um valor intrínseco, que deve ser respeitado, devendo ser tratados como criaturas sencientes, tendo em conta os fatores que influenciam o seu bem-estar, bem como a sua capacidade para sentir e manifestar dor, sofrimento, angústia e dano duradouro. Assim sendo, foi determinado que a utilização de animais em procedimentos deve ser limitada aos domínios em que essa utilização proporcione benefícios para a saúde humana ou animal, ou para o ambiente, sendo necessário promover o desenvolvimento de abordagens alternativas e garantir um elevado nível de proteção dos animais ^{367,368}.

Os cuidados a prestar aos animais e a sua utilização para fins científicos regem-se pelo Princípios dos 3Rs: *Replace* (Substituir), *Reduction* (Reduzir), *Refinement* (Refinar), nomeadamente no tocante à escolha dos métodos que deverão ser aplicados, conferindo preferência à utilização de métodos alternativos ³⁶⁸. De modo sucinto, o princípio dos 3Rs preconiza a redução do número de animais utilizados nos procedimentos científicos, a melhoria na orientação dos estudos, a redução do sofrimento ao mínimo possível, e a busca de novos métodos para substituírem os métodos *in vivo* ³⁶⁸.

5.1.2. Biomarcadores na avaliação de toxicidade

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da exposição a um agente tóxico, importando, mais do que determinar a dose letal, avaliar de que modo e quais vias metabólicas afetadas. Assim, toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica passível de ser determinada nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado e avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde pode ser um indicador biológico – biomarcador ^{369,370}.

A quantificação dos biomarcadores, por permitirem inferir acerca de modo de ação dos tóxicos sobre as vias bioquímicas e enzimáticas específicas, podem avaliar alterações subtis na organização e funcionalidade dos organismos expostos, manifestações precoces de lesão celular induzida quimicamente e morte celular, antes da ocorrência e estabelecimento dos danos, permitindo estabelecer relações de causalidade entre a agressão tóxica e o comprometimento de múltiplos mecanismos de regulação no organismo ³⁷¹⁻³⁷³.

5.1.1.1. Biomarcadores de hepatotoxicidade

O fígado desempenha uma função central na biotransformação e disposição dos xenobióticos (ADME). Sendo um órgão vital nos processos de desintoxicação, o fígado pode sofrer lesões, mesmo que assintomáticas, em casos de toxicidade. O fígado metaboliza substâncias endógenas e exógenas pelo processo de biotransformação, permitindo a sua eliminação ³⁷⁴, estando constantemente exposto a uma grande número de substância exógena e seus metabolitos. O metabolismo de compostos exógenos pode modular as propriedades do xenobiótico, aumentando sua toxicidade (toxicidade ou ativação metabólica) ou diminuindo sua toxicidade (desintoxicação) ³⁷⁵.

A avaliação da função hepática nos ensaios de toxicidade aguda é fundamental para um melhor conhecimento dos efeitos tóxicos de uma substância/mistura ³⁷⁶⁻³⁷⁸. A avaliação da função hepática pode ser avaliada por estudos histopatológicos e/ou complementada com a quantificação de biomarcadores hepatotoxicidade ³⁷⁸.

A alteração da permeabilidade membrana hepatocelular, causada por lesão ou distúrbio metabólico, resulta na libertação de enzimas citosólicos solúveis, provocando a sua elevação no sangue ³⁷⁸. Enzimas séricos como aspartato aminotransferase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) são biomarcadores úteis de lesão hepática ^{374,379-382}.

As aminotransferases ALT e AST encontram-se principalmente no fígado, mas estão presentes nos glóbulos vermelhos, células cardíacas, tecidos musculares e outros órgãos, como o pâncreas e rins. A atividade da ALT é o biomarcador de hepatotoxicidade mais frequentemente utilizado, sendo o parâmetro mais específico para detetar anormalidades hepáticas, apesar de atividades enzimáticas mais baixas também serem encontradas nos músculos esqueléticos e no tecido cardíaco. Este enzima hepático desempenha um importante papel no metabolismo dos aminoácidos e na gliconeogénese, catalisando a transferência redutiva de um grupo amina da alanina para o α -cetoglutarato para produzir glutamato e piruvato. Esta enzima permite detetar necrose hepatocelular ^{374,375}. O enzima AST, catalisa a reação de transaminação convertendo a alanina em piruvato e glutamato. Além do fígado, também é encontrado em outros órgãos, como coração, músculo, cérebro e rim. Portanto, lesões em qualquer um desses tecidos podem causar um nível sanguíneo elevado. Níveis elevados de AST geralmente predominam em pacientes com cirrose e até mesmo em doenças hepáticas que normalmente apresentam um aumento da ALT ^{374,375}.

A fosfatase alcalina, responsável pela hidrólise em meio alcalino de pirofosfatos inorgânicos de um vasto e variado conjunto de substratos, está presente nos epitélios da mucosa do intestino delgado, túbulo proximal do rim, osso, fígado e placenta. A atividade da ALP, em conjunto com a atividade das aminotransferases, pode ser muito

útil na avaliação da toxicidade hepática pode ser medida em qualquer tecido, mas para fins de diagnóstico é normalmente medida no soro ^{374,375,380,383}.

5.1.1.2. Biomarcadores de nefrotoxicidade

Os rins e os seus canais de drenagem compõem o sistema urinário; um conjunto de órgãos que tem como principal função a extração dos metabolitos solúveis do sangue e posterior excreção, regulando o equilíbrio dos fluidos corporais ³⁸⁴. Assim, à semelhança do fígado, com importantes funções de desintoxicação, os rins podem sofrer lesões em casos de toxicidade ^{378,382,385}.

O nefrónio é considerado a unidade funcional do rim. Cada rim possui cerca de um milhão de nefrónios. No processo de formação de urina as estruturas intervenientes do nefrónio são o crepúsculo renal e a cápsula de *Bawman*, o tubo contornado proximal, a ansa de *Henle*, o tubo contornado distal e o tubo coletor ³⁸⁴.

A urina resulta de três processos: filtração, reabsorção e secreção. Na filtração ocorre a passagem não seletiva de moléculas de pequenas dimensões dos capilares glomerulares para os túbulos renais. Na reabsorção, pequenas moléculas são devolvidas seletivamente ao fluído intersticial. Na secreção, as moléculas são adicionadas ao filtrado para serem excretadas ^{378,382,385}. Em condições normais, a urina apresenta uma coloração amarelo-pálida, pH ácido e um odor característico. A nível microscópico, o sedimento urinário poderá conter fragmentos celulares, compostos dissolvidos e cristais e pode dar um contributo importante no despiste de alterações da função renal ³⁷⁸.

A análise sumária da urina é um método rápido que permite caracterizar a urina e avaliar a presença de possível lesão renal pela presença proteínas, bilirrubina, corpos cetónicos e glucose, bem como pela presença de eritrócitos e leucócitos (indicando lesão do nefrónio) ³⁸⁶. Além a análise sumária da urina, o doseamento da creatinina e a ureia séricas, e calculo da clearance da creatinina são outros parâmetros que permitem avaliar a função renal ^{378,387}.

A creatinina, sintetizada em diversos órgãos, resulta da degradação creatina e constitui apenas uma pequena fração dos componentes presentes na urina ou no plasma. A creatinina é produzida a uma velocidade relativamente constante e é quase toda excretada pelos rins. A alteração nos níveis de creatinina é um importante indicador do comprometimento da função renal ³⁷⁸.

A ureia é proveniente do catabolismo de proteínas e aminoácidos e cerca de 90 % é excretada pelos rins. A sua concentração encontra-se aumentada quando há de disfunção renal, observando-se frequentemente aumento dos níveis séricos ³⁷⁸. Este marcador é menos específico que a creatinina, uma vez que fatores externos (aumento do catabolismo de proteínas e estados de desidratação, por exemplo) podem alterar a sua concentração ³⁸⁸.

5.2. Metodologia

5.2.1. Amostras

Nos estudos de toxicidade foram utilizados os óleos essenciais extraídos da parte aérea florida de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata*, *M. pulegium*, *O. virens*, *T. mastichina* e *F. vulgare*.

5.2.2. Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

A letalidade dos óleos essenciais foi avaliada em *A. salina*. O ensaio foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante (*Artoxkit MTM*, Microbiotest), com algumas alterações. Numa placa de 24 poços, em cada poço, adicionaram-se 100 µL da solução a testar a 900 µL de água do mar sintética. As concentrações dos óleos essenciais (0.05-10 mg/mL) foram preparadas por diluição do óleo essencial em DMSO (10 %) ^{389,390}. Seguidamente, adicionaram-se 10 náuplios (I/II estado larval, previamente eclodidos) a cada poço e procedeu-se à incubação da placa na ausência da luz (25 °C, 24 h). Realizou-se um branco contendo 100 µL de uma solução de *Tween* 20 (1 %) em DMSO (10 %) e um controlo negativo com água do mar sintética. Utilizou-se o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) como controlo positivo (10 - 100 mg/L). O ensaio foi realizado em triplicado. A avaliação da letalidade dos OEs em *A. salina* foi avaliada após contagem do número de microcrustáceos imobilizados em cada um dos poços, e determinação da percentagem da mortalidade, para elaboração da curva dose-resposta. O modelo não linear da curva dose-resposta foi ajustado utilizando o software *Origin Pro 9.0* (OriginLab® Corporation, 2013) utilizando a equação de Boltzman, para determinação da concentração letal 50 (CL₅₀) e da concentração máxima tolerada (CMT ou CL₀). A classificação toxicológica dos OEs face a *A. salina* foi efetuada de acordo com Maria

Lysete A Bastos *et al.* ³⁵⁸, com atribuição de três níveis de toxicidade: não tóxico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), baixa toxicidade ($500 \leq CL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$) e tóxico ($CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$).

5.2.3. Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

5.2.3.1. Animais

Os estudos de toxicidade aguda *in vivo* foram efetuados em grupos de animais provenientes de um Biotério certificado e foram sujeitos a um período de adaptação, sendo colocados nas gaiolas cerca de 5 dias antes do início do ensaio para permitir a aclimação dos mesmos às condições do no Biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora, para os ensaios. Os animais foram mantidos em ambiente controlado (ciclos de luz 12 h claro/escuro, $23 \pm 1^\circ\text{C}$), alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*. A ração foi suspensa 16 h dos procedimentos experimentais. Os procedimentos de experimentação, previamente aprovados pela Comissão de Ética, Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais da Universidade de Évora (ORBEA-UÉ), foram conduzidos de acordo com as linhas gerais para o uso responsável de animais em experiências (Diretiva Europeia e Legislação Nacional Portaria 1005/92 de 23 de Outubro). Os procedimentos de experimentação em animais de laboratório foram supervisionados pela Dr.^a Maria de Fátima Candeias, investigadora acreditada como pessoa competente (investigadora coordenadora) pela Direção Geral de Veterinária (Portaria 1005/92 de 23 de outubro) e pela FELASA (nº 020/08).

5.2.3.2. Avaliação da toxicidade aguda em ratinhos *Swiss*: determinação da dose letal 50 (DL_{50})

A avaliação da toxicidade aguda utilizando ratinhos *Swiss* como modelo animal, permitiu efetuar um *screening* da toxicidade de alguns compostos, com a determinação

dos valores da DL₅₀ (dose letal para 50 % dos animais teste). O ensaio foi realizado de acordo com a Diretriz 423 da OCDE, seguindo também as exigências da Direção Geral de Veterinária e da FELASA, de modo a minimizar o número de animais no ensaio e a reduzir o seu sofrimento ³⁹¹. Para o estudo da toxicidade aguda usando o método de classes. Seleccionaram-se como doses iniciais as doses de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, *per os*. Ocorrendo a morte de 1 animal até o 14º dia, repete-se a administração da dose em outros três animais. Morrendo mais de um animal, seriam administradas doses sequenciais menores até estimar a D_{L50} ³⁹¹.

Adicionalmente, foi efetuada, em todos as etapas, a triagem farmacológica (atividade motora, reflexos pineal e de postura, catalepsia, teste de tração, sensibilidade da cauda (teste de Haffner), piloereção, e condutas passiva, agressiva ou de temor) ^{392,393}, avaliando a evolução do comportamento animal durante 14 dias consecutivos, registando a latência quando não se observou morte ou qualquer outro sinal de toxicidade ³⁹⁴⁻³⁹⁷. Após o término do ensaio, a occisão dos animais foi realizada por método físico, com guilhotina, recomendado para roedores e indicado quando se pretende análise bioquímica e histológica dos órgãos, sem interferência de anestésicos, aplicando-se as normas para minimizar o sofrimento e proceder à occisão dos animais. Após a ocisão, recolheu-se o soro (centrifugação do sangue 3000 g, 15 min - conservar a -4°C) e os órgãos, fígado e rins, para análise histológica. O cálculo do valor de DL₅₀ foi efetuado recorrendo ao programa “AOT425StatPgm.” ³⁹¹.

5.2.3.2.1 Análise histológica

A análise histológica, como método complementar de avaliação toxicológica, permite inferir acerca da toxicidade dos óleos essenciais ao nível dos órgãos e das células. Estes métodos permitem a avaliação estrutural e funcional dos tecidos e a avaliação da atividade e dos mecanismos da fisiologia celular. Os cortes histológicos

foram realizados no Laboratório de Biologia, sob supervisão da Eng^a Mónica Lima e do Prof. Doutor Orlando Lopes, do Departamento de Biologia da Universidade de Évora.

Os órgãos foram limpos e pesados e procedeu-se à fixação do material, inclusão, desidratação, microtomia, coloração dos cortes histológicos e microscopia ótica foram realizados de acordo com o protocolo interno laboratório de biologia. Cortes seriados de 5 µm de espessura distanciados 30 µm foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e observados ao microscópio. Os cortes histológicos foram fotografados com uma câmara digital Leica DC acoplado a um microscópio Dialux Leitz 20.

5.2.3.3. Avaliação da toxicidade aguda em *Wistar*: avaliação bioquímica das funções hepática e renal

A avaliação da toxicidade após administração *per os* dos óleos essenciais de *L. luisieri* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg), *L. viridis* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg), *C. nepeta* (250, 500 e 1000 mg/kg) e de *F. vulgare* (500, 1000 e 2000 mg/kg) foi avaliada em ratos *Wistar* (OECD, 2001), com o intuito de proceder a análise dos biomarcadores das funções hepática e renal. Para o efeito, os animais foram divididos em grupos, um para cada dose e respetivo grupo controlo. Os animais (150 – 200 g) foram administrados com óleo essencial ou com veículo (solução salina contendo *Tween* 20 a 1 %). Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e colocados em jejum 16 horas antes do ensaio. O manuseamento foi efetuado por um investigador credenciado pela Direção Geral de Veterinária e pela FELASA, seguindo as recomendações do comité de Ética ³⁹⁸.

Foram observados e registados, diariamente, dados fisiológicos (peso, consumo de água, consumo de ração, produção de fezes e produção de urina) e alterações comportamentais anormais durante todo o estudo. No final do ensaio, procedeu-se à recolha dos soros, para posterior quantificação das atividades aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), para monitorização da função hepática (5.2.3.3.1) e quantificação de ureia e creatinina

séricas para monitorização da função renal (5.2.3.3.2), com determinação do valor de *clearance* da creatinina no final do ensaio (14º dia). Para despiste de alterações da função renal procedeu-se também à análise sumária da urina (*Combur test*®) e procedeu-se à quantificação da ureia e da creatinina na urina dos diferentes dias de ensaio.

Após a eutanásia, foi feito a avaliação macroscópica à vista desarmada dos órgãos, além da pesagem de fígado e rim para determinar os pesos relativos. Foram colhidas amostras de fígado e rim dos animais para exame histológico, de acordo com o descrito no ponto 5.2.3.2.1.

5.2.3.3.1 Avaliação da função hepática

Para a avaliação da toxicidade hepática, procedeu-se à determinação das atividades enzimáticas ALT, AST e ALP nos soros dos animais administrados com OE e dos grupos controlo. As quantificações destes biomarcadores foram efetuadas através de kits comerciais da *Sentinel diagnostics*, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada um dos testes, procedeu-se previamente à construção de uma curva de calibração com diferentes diluições de um padrão comercial (Calibrador, Sentinel). Os valores de atividade enzimática das amostras foram determinados por interpolação gráfica nas respetivas curvas de calibração. Na validação dos resultados, utilizaram-se dois controlos comerciais, C1 e C2 (*Sentinel Diagnostics*) com intervalos de referência tabelados.

5.2.3.3.2 Avaliação da função renal

Para a monitorização da função renal procedeu-se à análise sumária da urina dos animais por *Combur Test*® que permite uma rápida determinação de vários parâmetros

na urina, tais como, densidade, pH, glucose, leucócitos, nitritos, proteínas, corpos cetônicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue. Procedeu-se também à determinação das concentrações de ureia e creatinina nos soros e na urina dos animais administrados com os OEs e dos grupos controlo. As quantificações foram efetuadas através de kits comerciais da *Sentinel diagnostics*, utilizando um padrão comercial de concentração conhecida (Calibrador, Sentinel). e dois controlos comerciais, C1 e C2 (*Sentinel Diagnostics*) com intervalos de referência tabelados.

Para avaliação da função glomerular procedeu-se à determinação da taxa de filtração glomerular através da clearance da creatinina (mg/mL). Este parâmetro foi determinado de acordo com a equação 4.

$$Clearance \text{ da creatinina (mL/min)} = \frac{[Creatinina]_{urina} \text{ (mg/dL)}}{[Creatinina]_{soro} \text{ (mg/dL)}} \times \frac{Volume \text{ urina 24h (mL)}}{1440 \text{ minutos}} \quad \text{equação 4}$$

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Bioensaio em *A. salina*

O teste de letalidade em *A. salina* permitiu calcular o valor de CL_{50} , observando-se uma correlação direta entre taxa de mortalidade e a concentração. As curvas de dose-resposta das amostras e do padrão estão apresentadas na Figura 5.1.

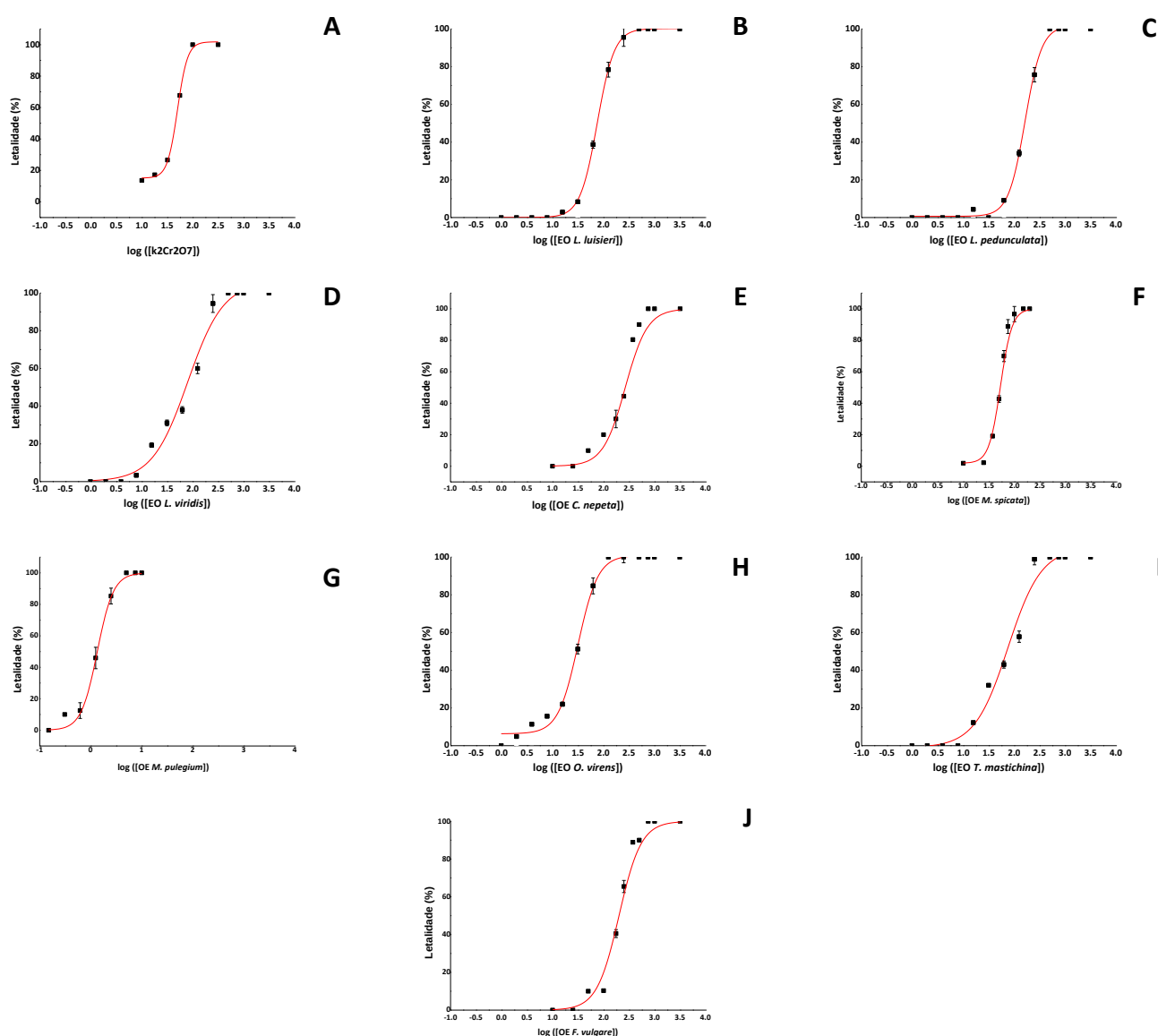


Figura 5.1 – Curvas dose-resposta para a determinação da CL_{50} no bioensaio em *A. salina*

A – Dicromato de potássio; **B** – óleo essencial de *L. luisieri*; **C** – óleo essencial de *L. pedunculata*; **D** – óleo essencial de *L. viridis*; **E** – óleo essencial de *C. nepeta*; **F** – óleo essencial de *M. spicata*; **G** – óleo essencial de *M. pulegium*; **H** – óleo essencial de *O. virens*; **I** – óleo essencial de *T. mastichina*; **J** – óleo essencial de *F. vulgare*.

Os valores da concentração máxima tolerada (CL₀) e de CL₅₀ foram determinados por interpolação gráfica e comparados com o padrão dicromato de potássio (Quadro 5.1).

Quadro 5.1 - Valores de CL₀ CL₅₀

	Amostra	CL ₀ (mg/L)	CL ₅₀ (mg/L)
OE	<i>L. luisieri</i>	15,5	75,6 ± 4,8
	<i>L. pedunculata</i>	15,5	163,4 ± 9,8
	<i>L. viridis</i>	7,8	78,3 ± 13,9
	<i>C. nepeta</i>	50,0	128,4 ± 7,3 ³⁹⁹
	<i>M. spicata</i>	25,0	55,7 ± 0,9
	<i>M. pulegium</i>	0,3	1,6 ± 0,1
	<i>O. virens</i>	2,0	31,8 ± 3,5 ³⁹⁹
	<i>T. mastichina</i>	15,6	74,1 ± 13,8 ³⁹⁹
	<i>F. vulgare</i>	100,0	200,4 ± 2,0
	K ₂ Cr ₂ O ₇	< 10,0	50,0 ± 1,0 ³⁹⁹

Os óleos essenciais apresentaram para *A. salina* com valores de CL₅₀ inferiores a 500 mg/L ^{187,354,358,361}. O óleo essencial de *M. pulegium* foi o que revelou maior toxicidade, seguido do óleo essencial de *O. virens*, sendo ambos mais tóxicos que o dicromato de potássio (CL₅₀ 50 mg/L), utilizado como controlo. Os restantes óleos essenciais apresentaram menor toxicidade que o dicromato de potássio. O OE de *F. vulgare* foi o OE que apresentou menor toxicidade para *A. salina* (CL₅₀ 200 mg/L). Os valores da concentração máxima tolerada dos óleos essenciais variaram entre 0,3 e 100 mg/L. Estes dados fornecem-nos a indicação dos intervalos de concentrações que se observa efeito, correspondendo a concentração mínima à DL₀ e a concentração máxima à DL₅₀. Os OEs que apresentem um maior intervalo são os óleos essenciais de *L. pedunculata* e de *F. vulgare*, sugerindo um maior intervalo de concentrações de uso deste OEs sem efeitos tóxicos.

A toxicidade dos óleos essenciais em *A. salina* é pouco descrita na bibliografia. Em estudos prévios realizados com óleo essencial da folha de *L. luisieri* e de *L. viridis*

mostraram que estes OEs apresentaram toxicidade para *A. salina*, com valores de CL_{50} superiores ao do dicromato de potássio ($109,8 \pm 4,2$ e $85,4 \pm 4,1$ mg/L) ^{400,401}.

Alguns estudos têm demonstrado que o ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina* é um bom método para a avaliação preliminar de toxicidade, permitindo avaliar plantas medicinais utilizadas popularmente para vários fins e monitorizar o isolamento de uma grande variedade de compostos biologicamente ativos ^{187,357,358,361,364,402}.

Alguns investigadores têm relacionado os valores de toxicidade dos extratos de plantas e óleos essenciais em *A. salina* com a sua capacidade para atuarem como agentes antimicrobianos, antioxidantes e potencial antimutagénico, permitindo inferir sobre a genotoxicidade e citotoxicidade dos compostos ^{187,356,364,403}.

A toxicidade dos óleos essenciais pode estar relacionada com o sinergismo entre os monoterpenos e os sesquiterpenos, flavonoides, taninos e polifenóis presentes e a ausência de alcaloides, que poderão sugerir atividade antitumoral dos óleos essenciais, no entanto, esta terá que ser confirmada em linhas celulares específicas verificando-se uma correlação positiva, em pesquisas com plantas medicinais, entre o teste de letalidade em *A. salina* e o teste de letalidade em ratinhos ^{187,364,389,404-406}.

5.3.2. *Screening* farmacológico e determinação dos valores de DL_{50}

O teste de toxicidade oral aguda permitiu determinar os valores da DL_{50} para os óleos essenciais em estudo (Quadro 5.2). De acordo com as normas OCDE ³⁹¹, os óleos essenciais apresentaram baixa toxicidade, sendo classificados, pelo critério de classificação GHS *Hazard Classification* (sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals GHS*), nas categorias 4 e 5, sendo a categoria 5 a de menor toxicidade, atribuída a valores de DL_{50} superiores a 750 mg/kg.

Quadro 5.2 - Valores de DL₅₀ dos OEs

OE	DL ₅₀ (mg/kg)	Categoria de toxicidade* ⁴⁰⁷
<i>L. luisieri</i>	> 2000	Categoria 5
<i>L. pedunculata</i>	1500	Categoria 4
<i>L. viridis</i>	> 2000	Categoria 5
<i>C. nepeta</i>	1500 ³⁹⁹	Categoria 4
<i>M. spicata</i>	1000	Categoria 4
<i>M. pulegium</i>	750	Categoria 4
<i>O. virens</i>	> 2000 ³⁹⁹	Categoria 5
<i>T. mastichina</i>	2000 ³⁹⁹	Categoria 4
<i>F. vulgare</i>	> 2000	Categoria 5

Legenda: * Critérios de classificação do GHS para toxicidade aguda (*per os*)

Os testes de triagem farmacológica revelaram um comportamento normal, comparativamente como grupo controlo. De modo geral, não se observarão alterações perceptíveis no padrão de sono, salivação, diarreia, reflexos posturais e pineais, teste de sensibilidade da cauda, catalepsia e atividade motora. Durante o ensaio, os ratos Swiss administrados com óleo essencial de *L. luisieri* apresentaram alterações comportamentais durante as primeiras 24h, nomeadamente ao nível da sensibilidade aos estímulos aplicados nas orelhas e na base da cauda. Observou-se ainda, no grupo da dose de óleo essencial mais elevada, 2000 mg/Kg, uma conduta passiva nos primeiros 30 min, sugerindo uma ação calmante. Este comportamento passivo observado pode ser corroborado com outros estudos que se referem aos efeitos analgésico, depressor central e anti-inflamatório em ratos *Wistar* administrados com OE de algumas *Lavandula* spp. ^{27,408}. Nos animais administrados com óleo essencial de *C. nepeta*, *L. pedunculata* e *T. mastichina* observou-se um comportamento passivo nas primeiras 6 h após administração. Após este período, os animais apresentaram comportamento normal. Os resultados obtidos sugerem que estes OEs possuem atividade analgésica e sedativa. Alguns estudos atribuem aos OE propriedades relaxantes, sedativas e anti-inflamatórias, destacando o seu uso na aromaterapia devido aos seus efeitos benéficos ⁴⁰⁹.

São poucos os estudos do efeito toxicológico dos óleos essenciais para as espécies condimentares utilizadas. Monforte *et al.* ⁴¹⁰, num estudo efetuado com OE de *Calamintha officinalis* Moench, refere que o seu óleo essencial apresentou baixa toxicidade, quando administrado por via intraperitoneal, com valores de DL₅₀ de 100 mg/kg. Os óleos essenciais de *M. spicata* e *M. pulegium* apresentaram os valores de DL₅₀ mais baixos, estando em conformidade com os estudos que reconhecem a toxicidade das plantas aromáticas e medicinais do género *Mentha* ⁴¹¹⁻⁴¹⁴. No que diz respeito ao óleo essencial de *O. virens*, Llana-Ruiz-Cabello *et al.* ⁴¹⁵ relataram que o óleo essencial de *O. virens* não apresentou efeitos adversos em ratos *Wistar* após administração oral de 200 mg/kg durante 90 dias. Dires *et al.* ⁴¹⁶ realizaram ensaios de toxicidade para o óleo essencial de *Thymus schimperi*, apresentando valores semelhantes aos que obtivemos para o óleo essencial de *Thymus mastichina*. Os animais administrados com o óleo essencial de *F. vulgare* apresentaram comportamento normal durante os 14 dias do ensaio, comparativamente ao grupo controlo. O valor da DL₅₀ está de acordo com a literatura nos ensaios efetuados por administração oral, apresentando baixa toxicidade, com valores de DL₅₀ superiores a 2000 mg/kg ⁴¹⁷. Alguns estudos demonstraram, ainda, que animais administrados com extratos de *F. vulgare* não apresentam sinais clínicos de toxicidade nem lesão hepática ⁴¹⁸⁻⁴²⁰. No final do ensaio (14 dias), os tecidos não apresentaram diferenças nos órgãos observados macroscopicamente, sem alterações induzidas por tóxicos.

Para complementar o estudo de avaliação da toxicidade oral, procedeu-se à análise histológica do fígado e rim dos animais administrados com óleo essencial e grupo controlo, com vista a avaliar eventuais alterações estruturais causados nos órgãos mais envolvidos no processo de metabolização. Nas Figuras 5.1 a 5.6 estão apresentados os cortes histológicos do fígado (Figuras 5.1 a 5.3) e rim (Figuras 5.4 a 5.6) de duas doses para os óleos essenciais de *L. pedunculata*, *M. spicata*, *M. pulegium*, *O. virens* e *T.*

mastichina. Os cortes histológicos dos OEs de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta* e *F. vulgare* foram efetuados em ratos *Wistar* e são apresentados na secção 5.3.3.

A análise histológica do fígado dos indivíduos controlo e administrados com óleos essenciais apresentaram arquitetura hepatolobular normal, independentemente da dose de OE administrada, assim como nos indivíduos do grupo controlo (Figuras 5.1 – A a 5.3 - A). Comparando com o grupo controlo, os hepatócitos dos animais de teste exibiram uma forma normal, limites bem definidos, citoplasma acidofílico e núcleos centrais redondos. Não se observaram anormalidades, degradação celular ou defeitos desfavoráveis nos grupos controle e nas duas doses de OE de *L. pedunculata* (500 mg/kg e 1500 mg/kg – Figura 5.2 A e B, respetivamente), *M. spicata* (500 mg/kg e 1000 mg/kg - Figura 5.3 B e D, respetivamente), *O. virens* (500 mg/kg e 2000 mg/kg - Figura 5.4 B e D, respetivamente) e *T. mastichina* (1000 mg/kg e 2000 mg/kg - Figura 5.4 C e E, respetivamente e na dose mais baixa de *M. pulegium* (500 mg/kg e 750 mg/kg - Figura 5.3 C e E, respetivamente). No entanto, na dose de 750 mg/kg de *M. pulegium* foi possível observar uma maior vacuolização e um ligeiro aumento dos sinusoides (Figura 5.3 E).

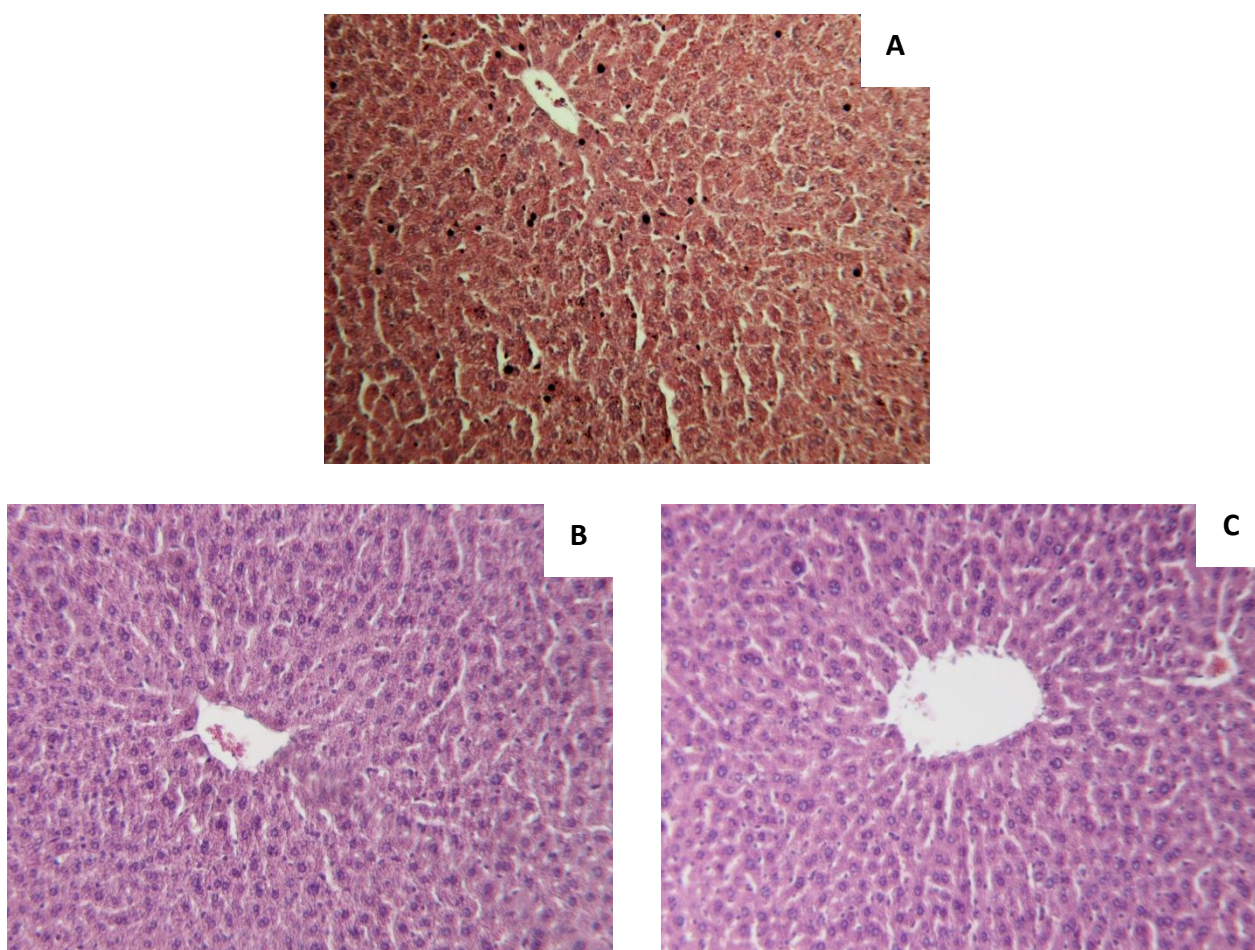


Figura 5.2 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *L. pedunculata*

A – grupo controlo; B – dose 500 mg/kg; C – dose 1500 mg/kg.

Ampliação 100X

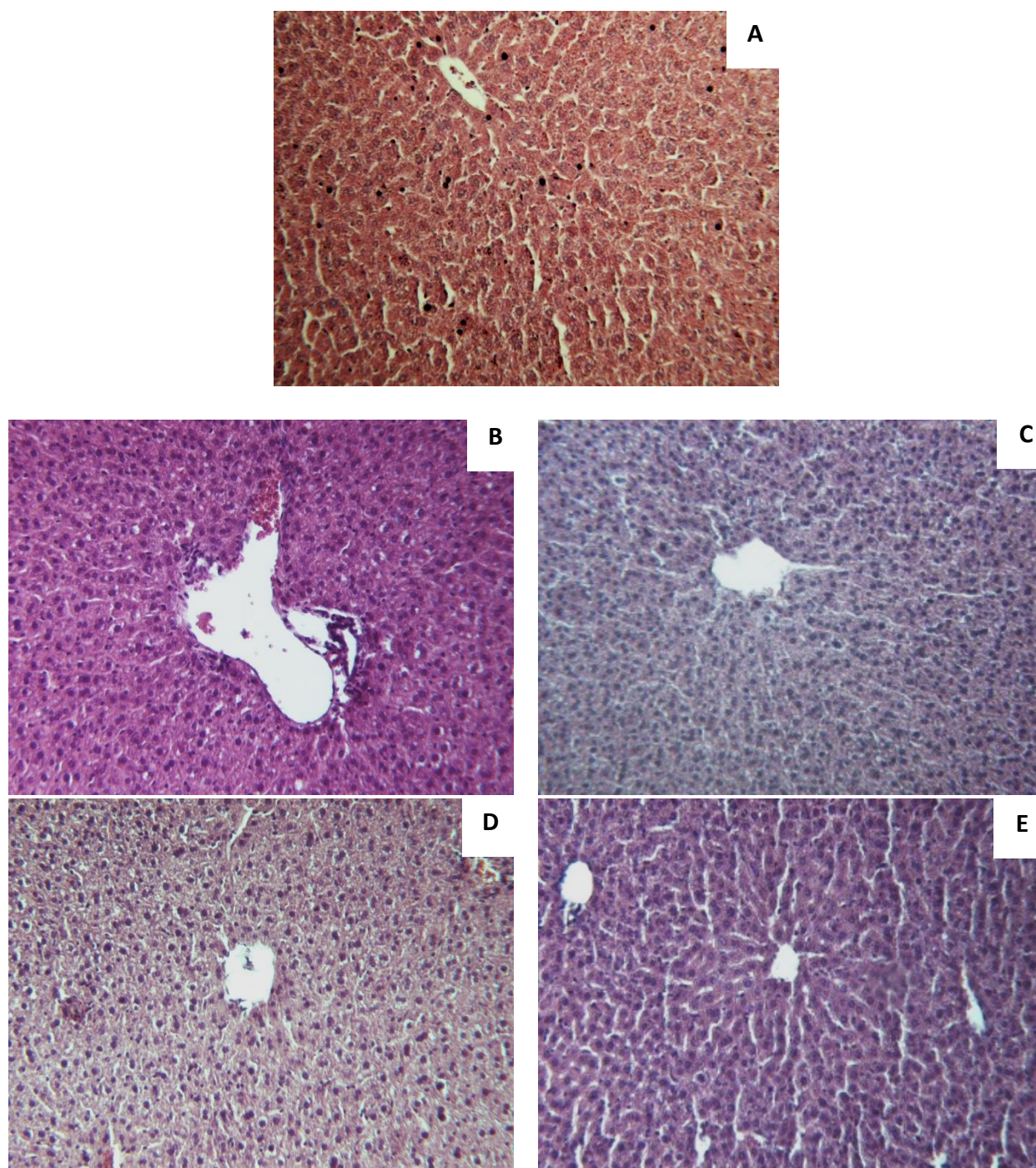


Figura 5.3 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *M. spicata* e *M. pulegium*

A – grupo controle; B e D – *M. spicata* 500 mg/kg e 1000 mg/kg, respectivamente; C e E – *M. pulegium* 500 mg/kg e 750 mg/kg, respectivamente.

Ampliação 100X

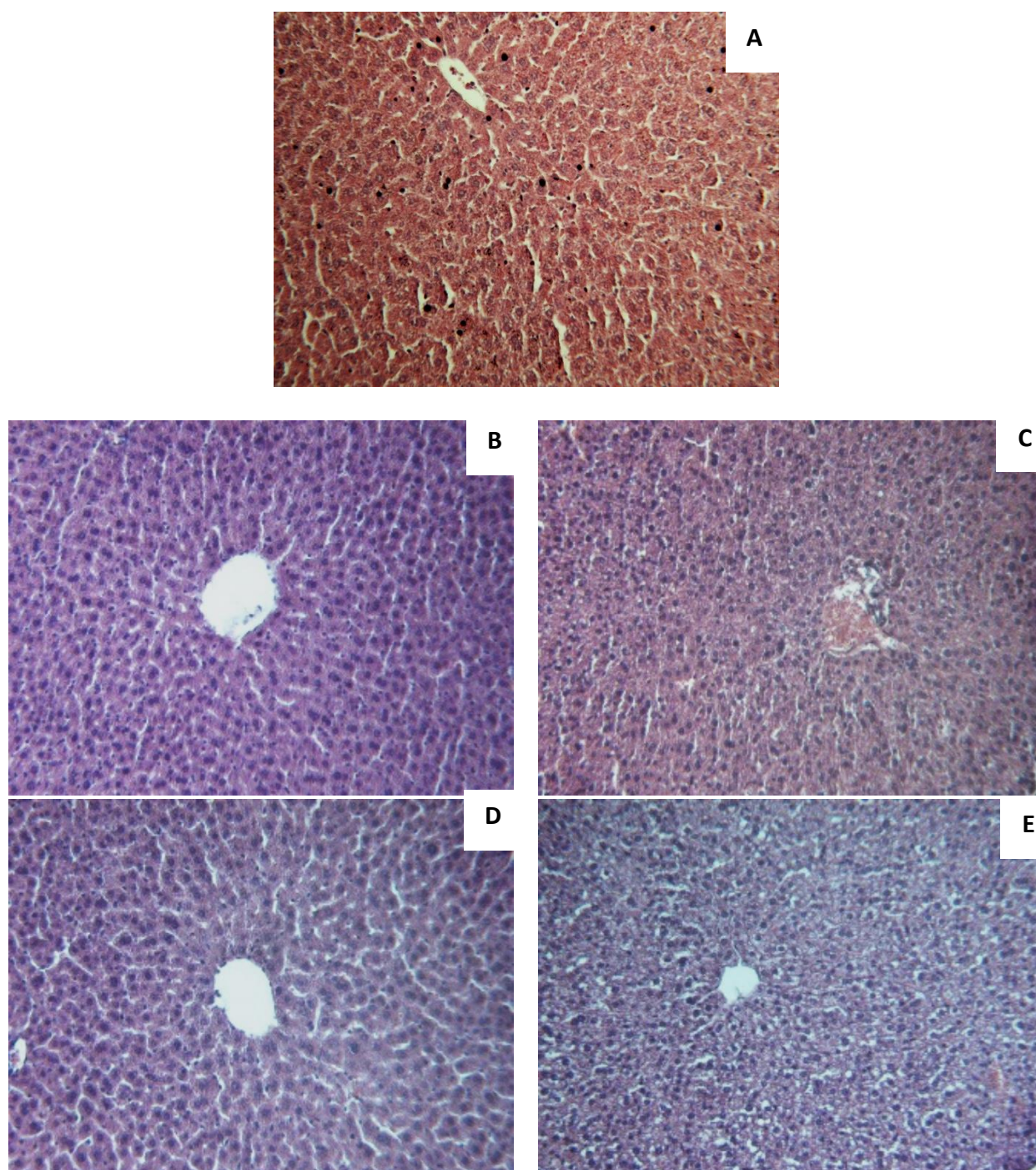


Figura 5.4 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *O. virens* e *T. mastichina*

A – grupo controle; B e D – *O. virens* 500 mg/kg e 2000 mg/kg, respectivamente; C e E – *T. mastichina* 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, repetivamente.
Ampliação 100X

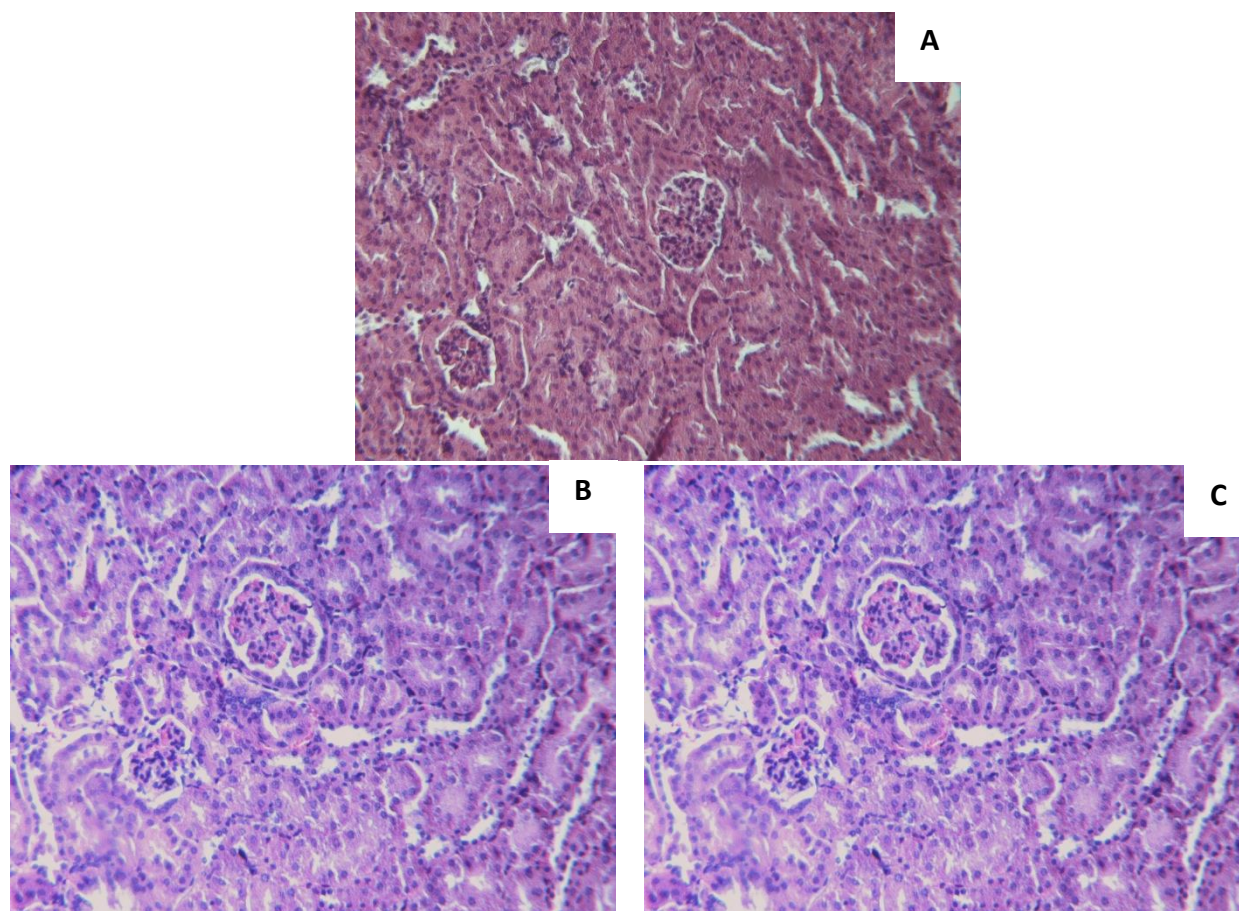


Figura 5.5 - Cortes histológicos de rim dos animais administrados com OE de *L. pedunculata*

A – grupo controlo; B - 500 mg/kg; C - 500 mg/kg e 750 mg/kg.

Ampliação 100X

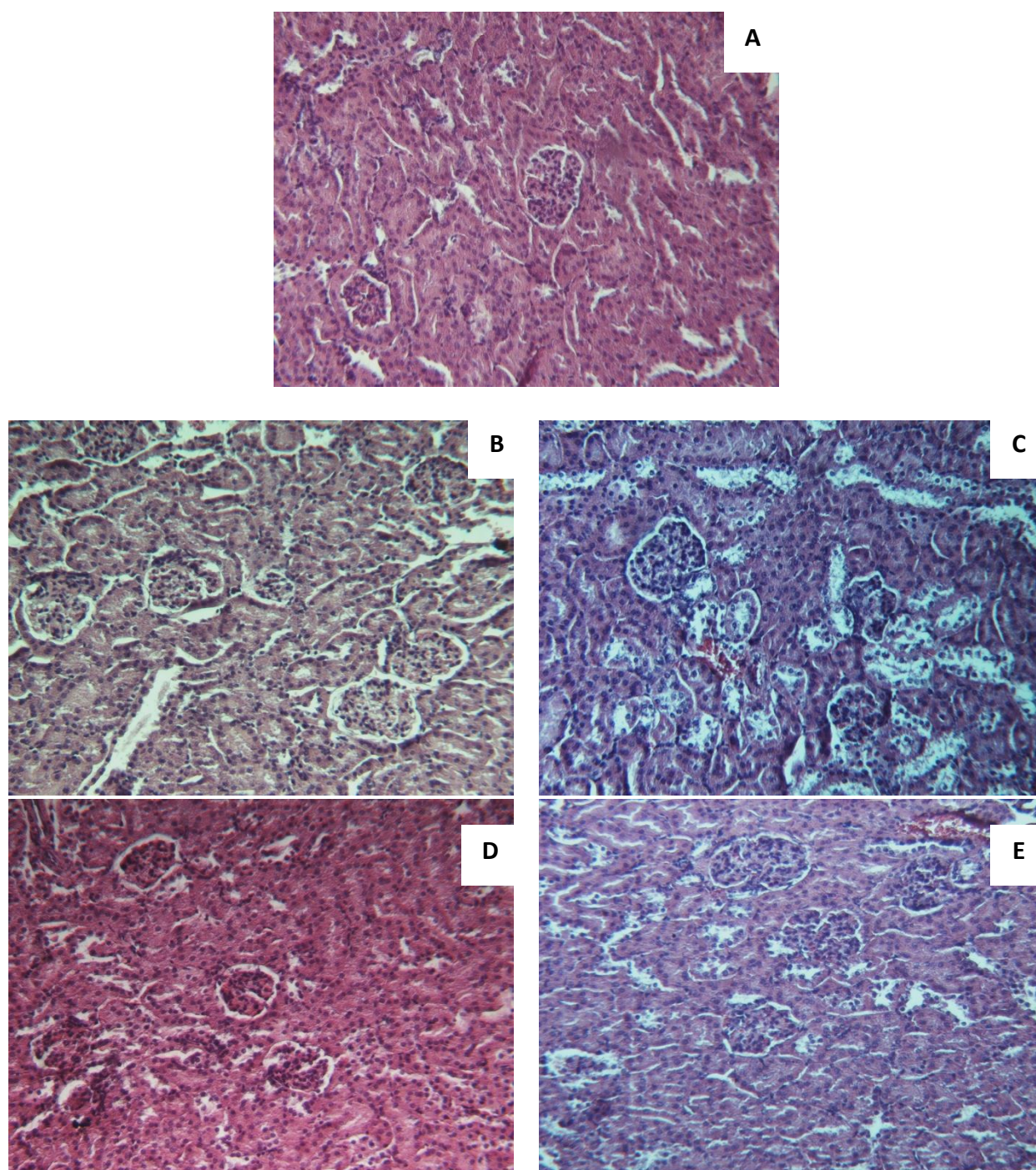


Figura 5.6 - Cortes histológicos de rim dos animais administrados com OE de *M. spicata* e *M. pulegium*

A – grupo controle; B e D – *M. spicata* 500 mg/kg e 1000 mg/kg, respectivamente; C e E – *M. pulegium* 500 mg/kg e 750 mg/kg, respectivamente.
Ampliação 100X

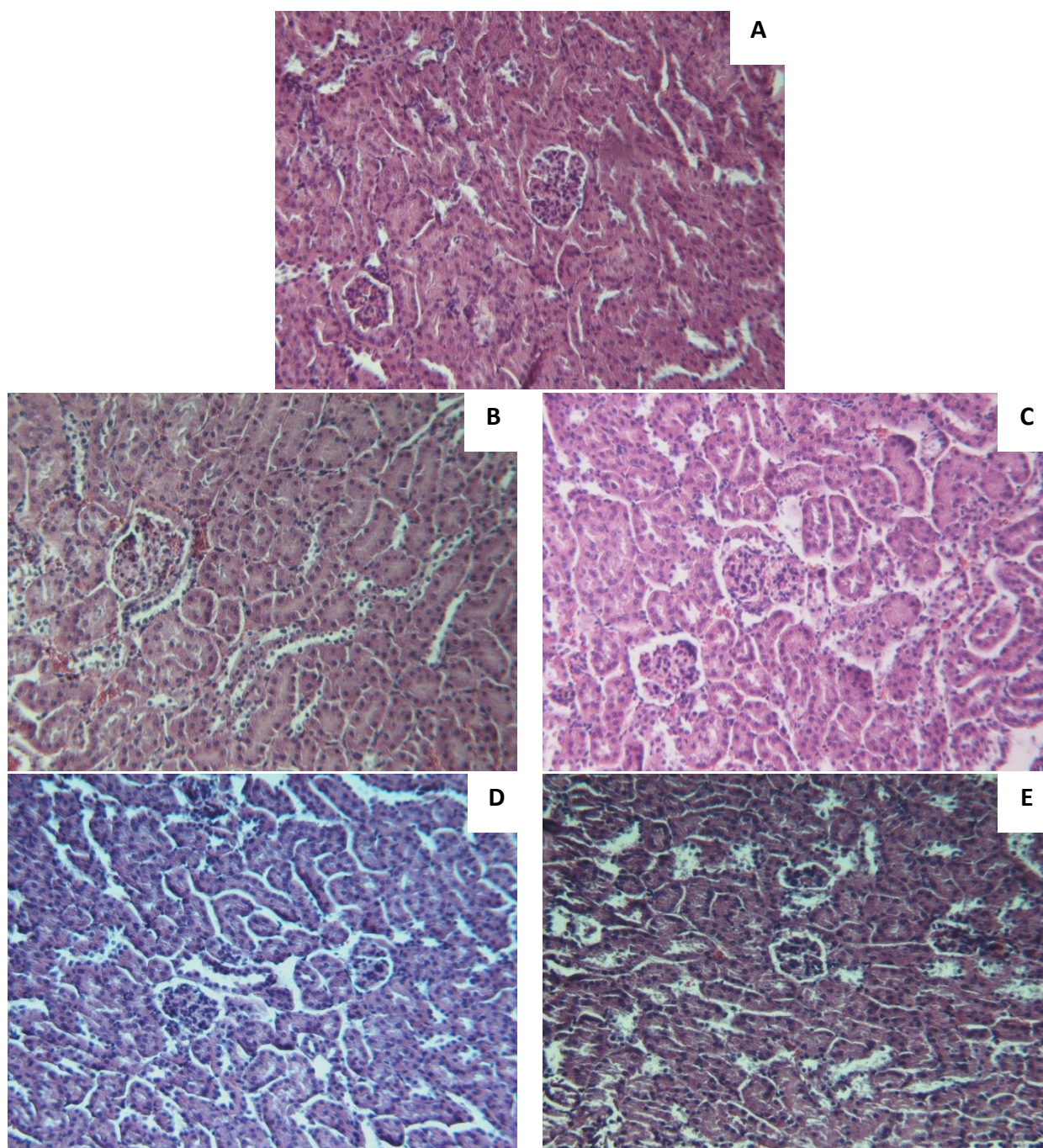


Figura 5.7 - Cortes histológicos de rim dos animais administrados com OE de *O. virens* e *T. mastichina*

A – grupo controlo; B e D– *O. virens* 500 mg/kg e 2000 mg/kg, respetivamente; C e E – *T. mastichina* 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, respetivamente.
Ampliação 100X

A análise histológica do rim dos indivíduos controlo e dos indivíduos administrados com óleos essenciais de *L. pedunculata* (500 mg/kg e 1500 mg/kg - Figura 5.5 B e C, respetivamente), *M. spicata* (500 mg/kg e 1000 mg/kg - Figura 5.6 B e D, respetivamente), *M. pulegium* (500 mg/kg e 750 mg/kg - Figura 5.6 C e E, respetivamente), *O. virens* (500 mg/kg e 2000 mg/kg - Figura 5.7 B e D, respetivamente) e *T. mastichina* (1000 mg/kg e 2000 mg/kg - Figura 5.7 C e E, respetivamente) apresentaram histoarquitetura normal. Comparando os cortes dos animais administrados com as diferentes doses de OEs como o os cortes dos animais controlo, não foram observadas alterações indicativas de toxicidade ³⁹⁷.

5.3.3. Screening farmacológico e avaliação da toxicidade hepática e renal

Os estudos de toxicidade dos óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta* e *F. vulgare* foram efetuados em ratos *Wistar*, de modo a avaliar as funções hepática e renal. As atividades dos enzimas hepáticos ALT, AST e ALP foram determinados nos soros dos animais dos grupos de teste e dos grupos controlo, recolhido no 14º dia após administração oral dos OEs. Foi também efetuada análise histológica dos animais administrados com OEs e grupos controlo.

Os óleos essenciais testados apresentaram valores de AST (Figura 5.8 A) dentro do intervalo de valores de referência (81-180 U/L) ⁴²¹. Comparativamente com o grupo controlo, os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. viridis* e *F. vulgare* apresentaram algumas alterações nos valores de AST com uma ligeira elevação dos seus valores, no entanto na dose mais elevada (2000 mg/kg) os valores de AST são mais baixos dos que os observados para a dose de 250 mg/kg. Nos animais administrados com OE de *C. nepeta*

observou-se uma ligeira diminuição dos valores de AST. Estas alterações poderão dever-se à variabilidade intraespecífica.

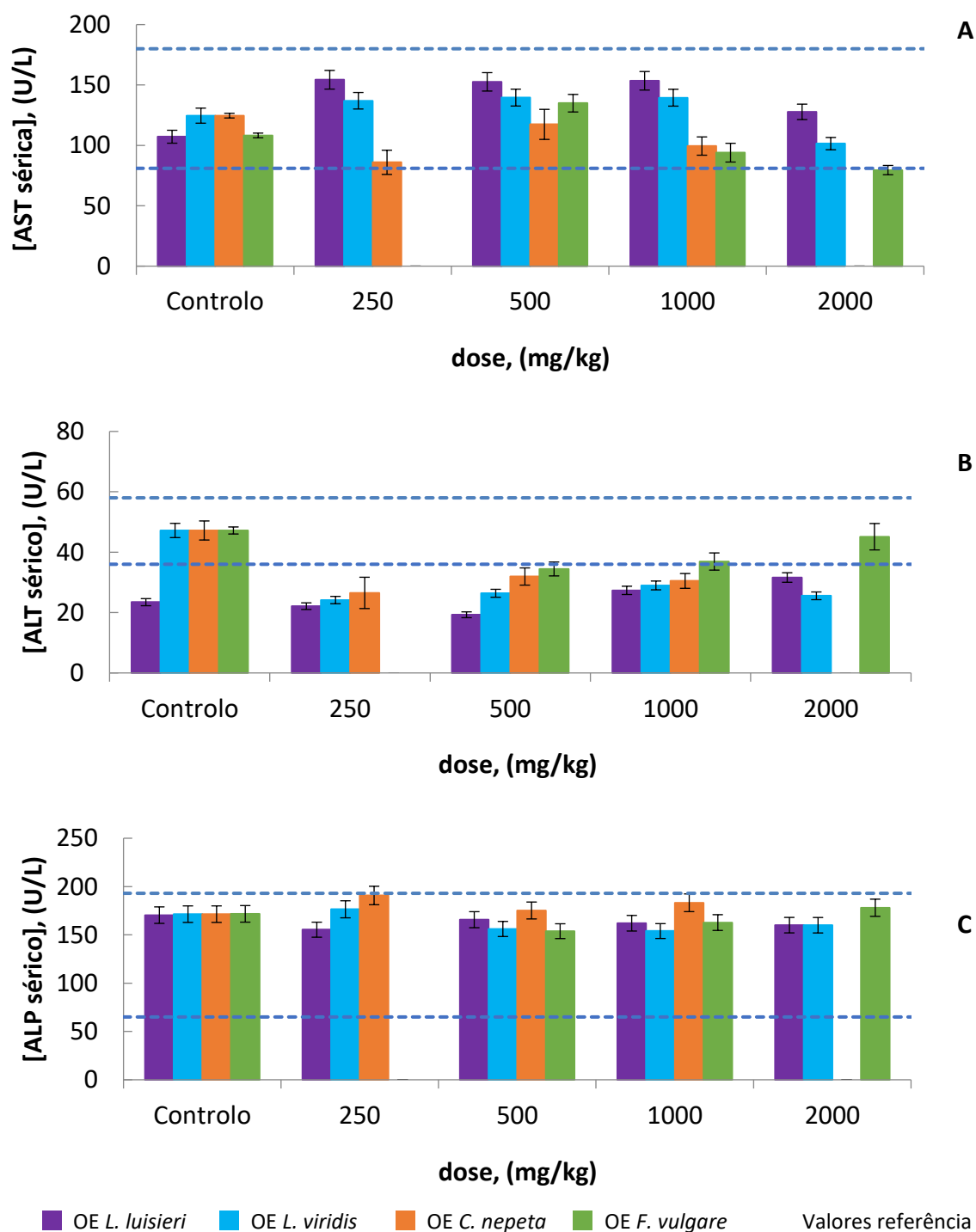


Figura 5.8 - Valores de atividade enzimática biomarcadores de função hepática
A – AST; B – ALT; C – ALP. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados $\pm$ desvio padrão.

Os valores normais do intervalo de referência para a atividade enzimática da alanina aminotransferase em ratos *Wistar* é de 36-58 U/L ⁴²¹. Nos animais administrados com óleo essencial de *L. luisieri* os valores de ALT observados foram inferiores aos valores de referência, observando-se um ligeiro aumento da atividade de ALT na dose mais elevada de 2000 mg/kg em relação aos valores do grupo controlo (Figura 5.8 B). Nos animais administrados com OE de *L. viridis*, *C. nepeta* e *F. vulgare* os valores da atividade ALT do grupo controlo estavam dentro do intervalo de referência, enquanto os grupos de teste apresentaram valores aos apresentados pelo respetivo grupo controlo (Figura 5.8 B). Nos animais administrados com a dose mais elevada de OE de *F. vulgare* (2000 mg/kg) observaram-se valores de atividade ALT dentro do intervalo de referência e com valores próximos dos valores do grupo controlo. ALT é um biomarcador específico de toxicidade hepática, evidenciando que não houve hepatotoxicidade nos animais administrados com os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta* e *F. vulgare*.

A atividade enzimática da fosfatase alcalina (Figura 5.8 C) foi determinada com vista a complementar o estudo de toxicidade hepática. Os animais administrados com OE de *L. luisieri* e *F. vulgare* apresentaram valores de atividade dentro do intervalo de referência (65-193) ⁴²¹ e próximos dos valores de atividade enzimática dos animais do grupo controlo respetivo. Os valores de atividade enzimática dos animais administrados com OE de *L. viridis* nas doses de 250 e 500 mg/kg estão acima do intervalo de referência e foram superiores aos valores observados para o grupo controlo, enquanto nas doses de 1000 e 2000 mg/kg os valores de atividade ALP são semelhantes aos observados no grupo controlo. Os valores de atividade enzimática ALP nos animais administrados com OE de *C. nepeta* nas doses de 250 e 500 mg/kg foram superiores aos valores de referência com valores superiores aos do grupo controlo, enquanto na dose de 1000 mg/kg o valor de atividade ALP está dentro do intervalo de referência e é semelhante ao valor observado no grupo controlo. Como os valores elevados da

atividade ALP podem estar correlacionados com a idade e crescimento do animal ou com patologias hepáticas ou do tecido ósseo ³⁷⁸, estes valores de atividade ALP não parecem estar relacionados com o potencial hepatotóxico. Os valores de atividade ALP independentes da dose e os valores normais de AST e ALT despistam a possibilidade de patologias hepáticas.

A ausência de hepatotoxicidade observada pelos ensaios enzimáticos foi confirmada pela análise histológica do fígado dos indivíduos administrados com OE de *L. luisieri* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg - Figura 5.9), *L. viridis* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg - Figura 5.10), *C. nepeta* (250, 500 e 1000 mg/kg - Figura 5.11) e *F. vulgare* (500, 1000 e 2000 mg/kg - Figura 5.12), por comparação com o grupo controlo. A análise histológica, por comparação com os grupos controlo, mostrou uma arquitetura hepatolobular normal com hepatócitos de contornos bem definidos e núcleos centrais redondos, independentemente da dose de OE administrada, não se observando anormalidades, degradação celular ou defeitos desfavoráveis.

Zarybnicky *et al.* ⁴²² descreve a hepatotoxicidade dos monoterpenos presentes nos óleos essenciais, entre os quais a pulegona, composto maioritário do OE de *M. pulegium* e de *C. nepeta*; cânfora, composto maioritário dos OE *L. pedunculata* e de *L. viridis*; e limoneno; presente em nos OEs em estudo. A bibliografia refere estudos de hepatotoxicidade realizados com alguns OEs e extratos de funcho mostraram que estes apresentam propriedades hepatoprotetoras, promovendo a recuperação do hepatócito ^{423,424}.

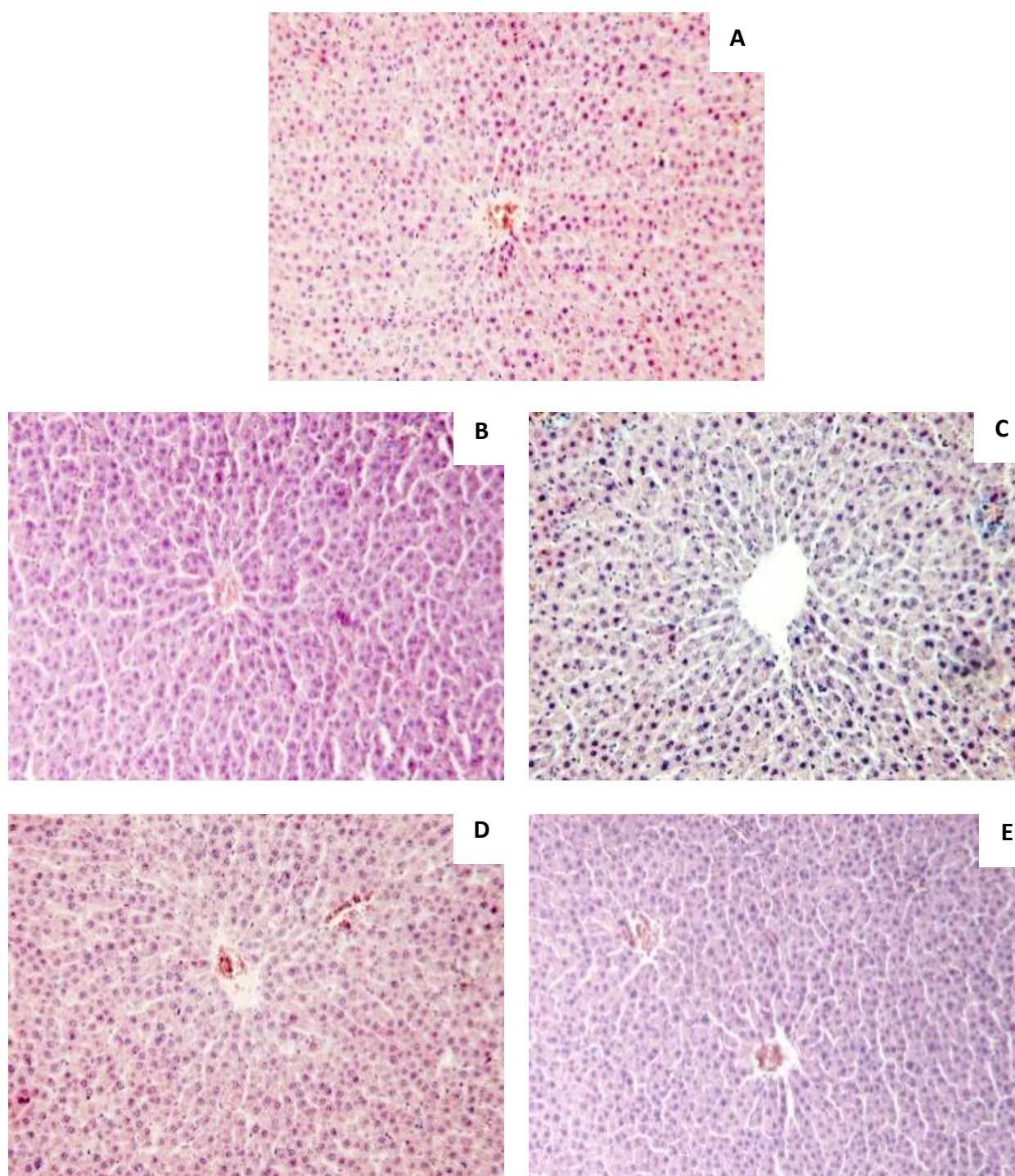


Figura 5.9 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *L. luisieri*
A – grupo controle; B – dose 250 mg/kg; C – dose 500 mg/kg; D – dose 1000 mg/kg; E – dose 2000 mg/kg.
Ampliação 100X

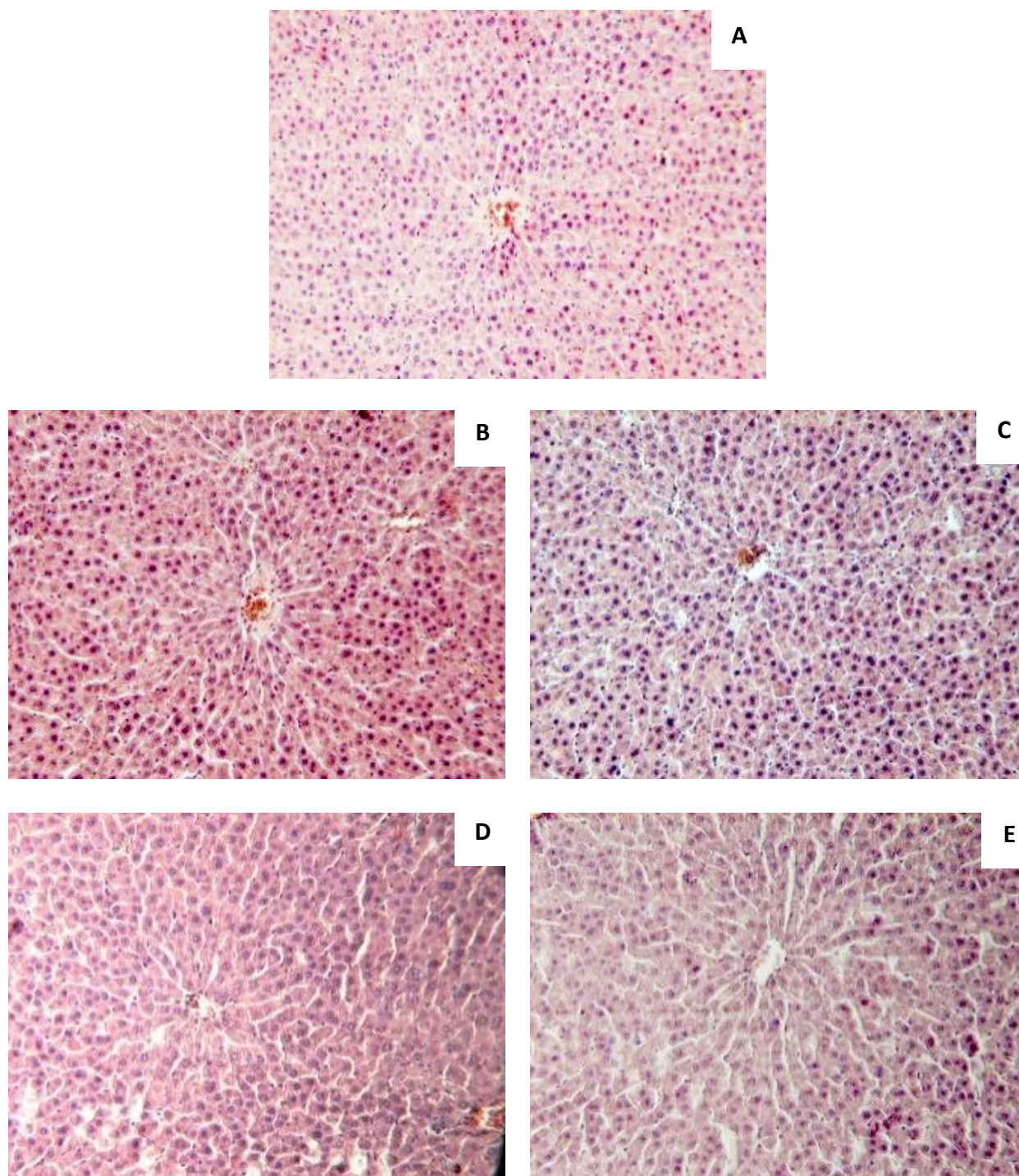


Figura 5.10 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *L. viridis*.

A – grupo controle; B – dose 250 mg/kg; C – dose 500 mg/kg; D – dose 1000 mg/kg; E – dose 2000 mg/kg.
Ampliação 100X

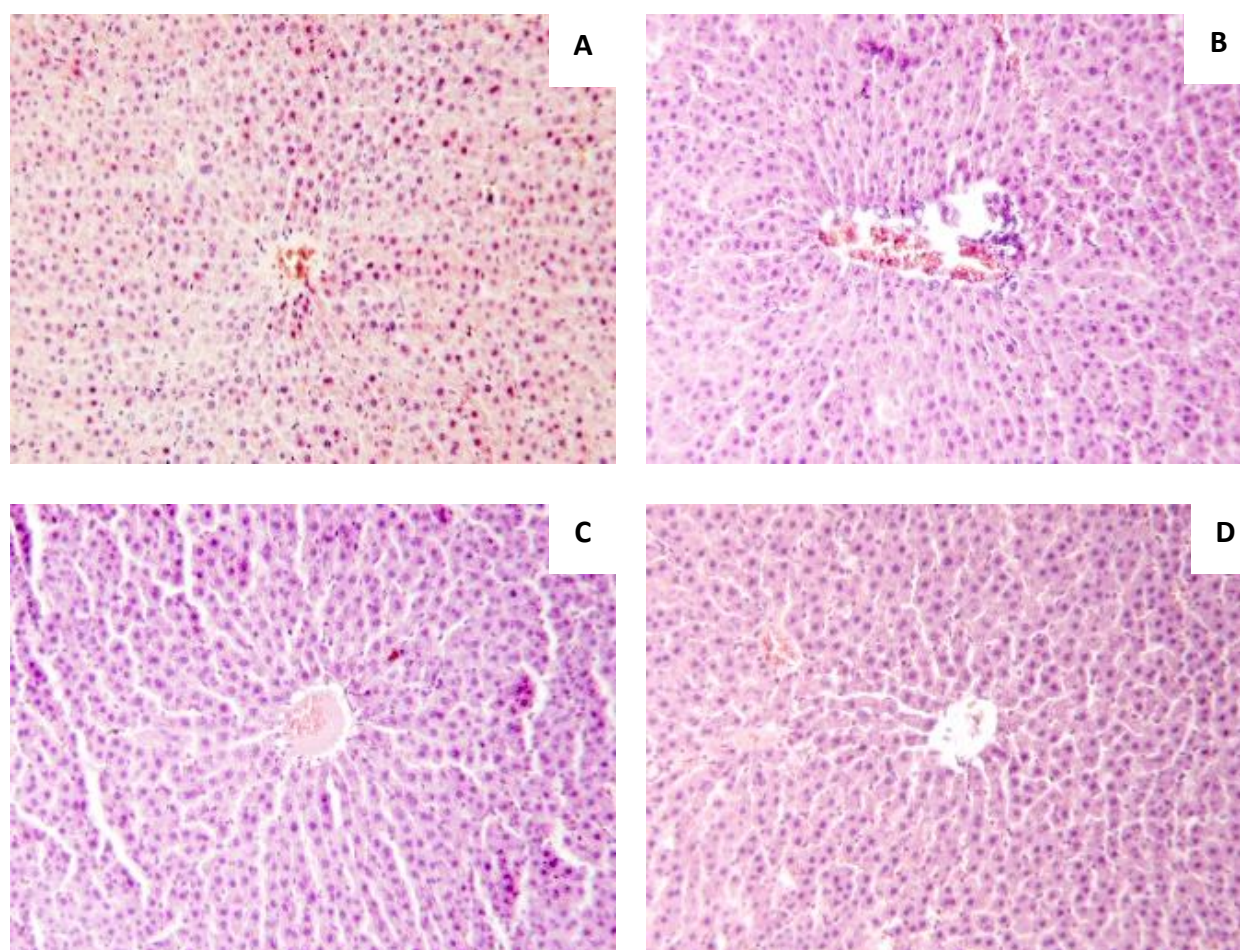


Figura 5.11 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *C. nepeta*

A – grupo controlo; B – dose 250 mg/kg; C – dose 500 mg/kg; D – dose 1000 mg/kg.

Ampliação 100X

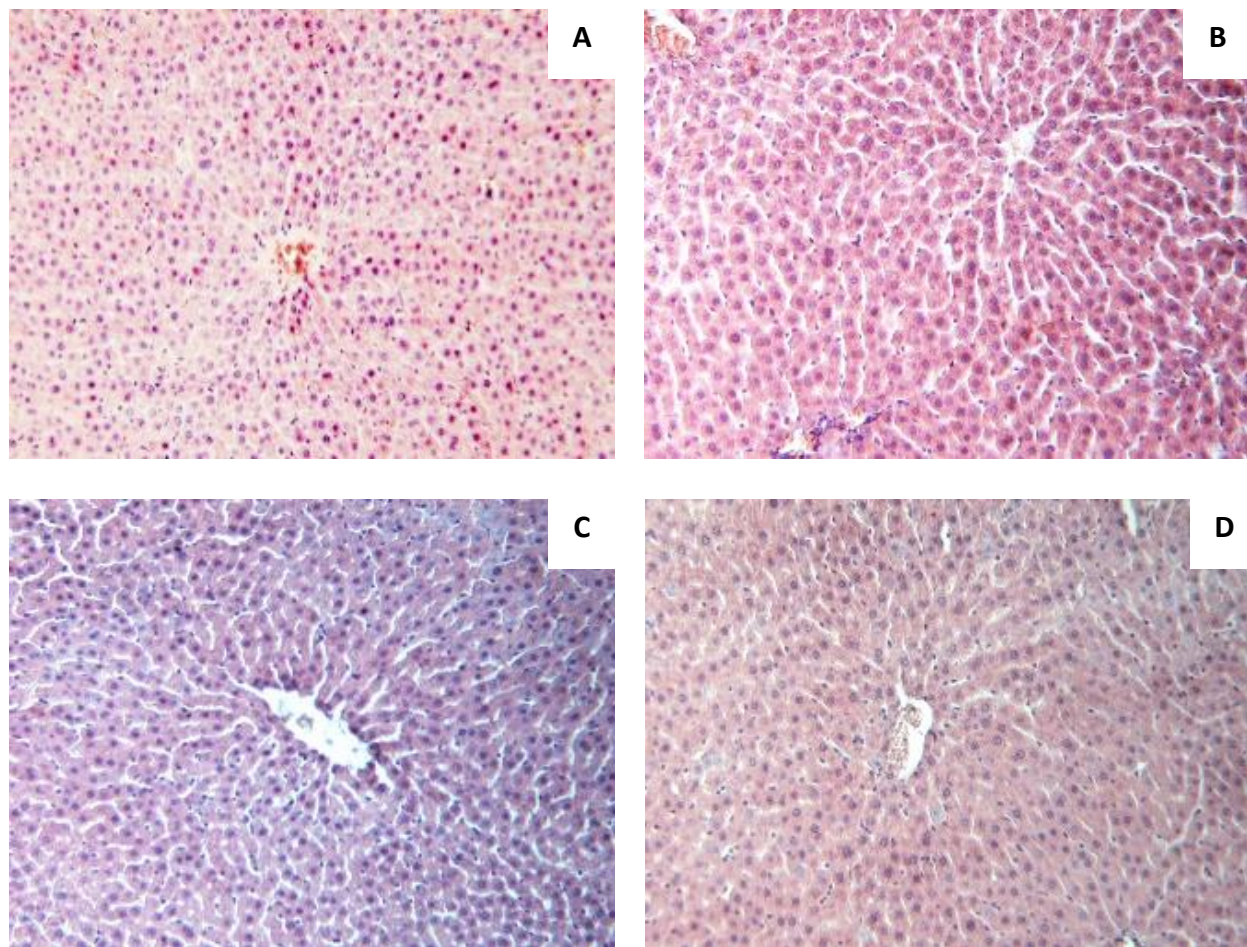


Figura 5.12 - Cortes histológicos de hepatócitos dos animais administrados com OE de *F. vulgare*

A – grupo controlo; B – dose 500 mg/kg; C – dose 1000 mg/kg; D – dose 2000 mg/kg.

Ampliação 100X

A avaliação da função renal foi avaliada nos grupos controlo e nos grupos administrados com OE de *L. luisieri* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg), *L. viridis* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg), *C. nepeta* (250, 500 e 1000) e *F. vulgare* (500, 1000 e 2000 mg/kg), recorrendo a testes de análise sumária da urina, e à quantificação da ureia e da creatinina, de modo monitorizar a função glomerular, com determinação da *clearance* da creatinina. (Figura 5.13).

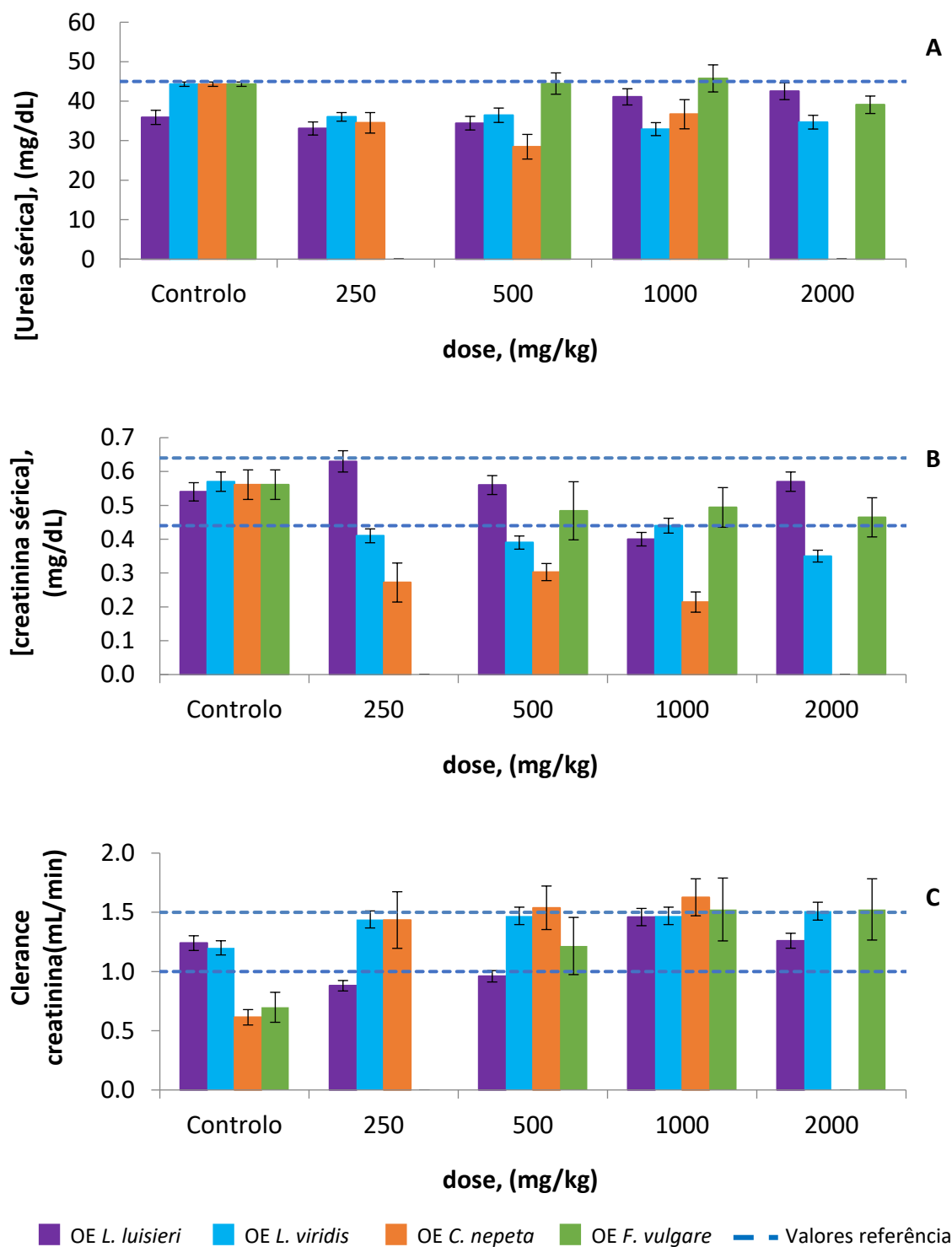


Figura 5.13 - Valores de atividade enzimática biomarcadores de função renal

A – Ureia; B – Creatinina; C – Clearance da creatinina. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados $\pm$ desvio padrão.

A análise sumária da urina (densidade, pH, leucócitos, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio, sangue) não revelou alterações quando comparamos os resultados dos grupos de teste com os resultados do grupo controlo. Ao longo do ensaio foi possível observar a presença de nitritos e corpos cetónico nas urinas, mas foram observados tanto nos grupos de teste como nos grupos controlo, sugerindo não haver correlação como o óleo essencial e dose em análise. A presença de nitritos está relacionada com a presença de bactérias que são capazes de reduzir o nitrato a nitrito. Por outro lado, a presença de corpos cetónicos na urina, está relacionado com o metabolismo dos ácidos gordos e a elevada ingestão ou absorção de hidratos de carbono, sendo este excesso metabolizado em gordos com consequente formação de corpos cetónicos posteriormente excretados na urina ³⁸⁸. Adicionalmente, foi possível observar que os animais administrados com óleo essencial de *F. vulgare* apresentaram um maior volume de urina, acompanhado de uma maior ingestão de água, nas primeiras 24 h em relação ao grupo controlo, sugerindo um efeito diurético. No que diz respeito aos outros parâmetros (ingestão de comida, excreção de fezes e variação de peso) os animais apresentaram valores semelhantes aos dos grupo controlo. Os animais administrados com os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. viridis* e *C. nepeta* não apresentaram alterações comportamentais nos parâmetros avaliados (ingestão de água e comida, excreção de urina e fezes e variação de peso).

Os resultados obtidos para a quantificação de ureia (Figura 5.13 A) dos animais do grupo controlo e dos grupos de teste apresentaram valores inferiores ao intervalo de referência (45-105 mg/dL) ⁴²¹. Nos animais administrados com óleo essencial de *L. luisieri* observou-se um aumento da ureia nos animais administrados com as doses de 1000 e 2000 mg/kg em relação ao grupo controlo, enquanto nos grupos de animais administrados com os óleos essenciais de *L. viridis* e *C. nepeta* observou-se uma diminuição dos valores da ureia, mesmo nas doses mais elevadas. Os animais administrados com OE de *F. vulgare*, nas três doses, apresentaram valores de ureia próximos aos valores apresentados pelo grupo controlo.

No que diz respeito à quantificação da creatinina (Figura 5.13 B), os grupos controle apresentaram valores dentro do intervalo de referência (0,44-0,64 mg/dL) ⁴²¹. Os grupos administrados com óleos essenciais apresentaram perfis de quantificação de ureia independentes da dose. Os grupos administrados com OE de *L. luisieri* apresentaram valores no intervalo de referência e mais elevados no grupo administrado com a dose mais baixa (250 mg/mL). Os grupos de animais administrados com OE de *L. viridis* apresentaram valores dentro do intervalo de referência, inferiores aos observados no grupo controle, sendo o valor mais baixo observado no grupo administrado com a dose mais elevada (2000 mg/kg). Os animais administrados com OE de *C. nepeta* apresentaram valores de creatinina inferiores ao grupo controle e fora do intervalo de referência, observando-se uma diminuição da concentração em creatinina com o aumento da dose administrada. Os animais administrados com óleo essencial de *F. vulgare* apresentaram valores de creatinina similares para as três doses testadas, dentro do intervalo de referência e inferiores aos valores observados no grupo controle.

A ureia e a creatinina são parâmetros que dependem de diversos fatores externos, tais como a massa muscular e o tipo de dieta proteica presente.

A *clearance* da creatinina é um parâmetro muito vital na avaliação da função renal, permitindo determinar a taxa de filtração glomerular e o despiste de disfunção renal quando os valores de ureia e creatinina são normais ⁴²¹. Os valores de *clearance* da creatinina (Figura 5.13 C) dos grupos controles estão dentro dos valores de referência para os grupos controle usados para os OEs de *L. luisieri* e *L. viridis*, enquanto os valores dos grupos controles dos OEs de *C. nepeta* e *F. vulgare* são bastante inferiores aos descritos na bibliografia como valores de referência. Os animais administrados com OE de *L. luisieri* nas doses mais baixas (250 e 500 mg/kg) apresentaram um valor de *clearance* da creatinina inferior ao valor apresentado pelo respectivo grupo controle, no entanto nas doses mais elevadas (1000 e 2000 mg/kg) o valor da *clearance* da creatinina está próximo do valor observado no grupo controle, sugerindo ausência de disfunção renal. Os valores de *clearance* da creatinina observados nos animais administrados com

OE de *L. viridis* apresentaram valores superiores aos observados no controlo, sendo superiores aos valores de referência ⁴²¹. Os valores de *clearance* da creatinina observados para os grupos administrados com OEs de *C. nepeta* e *F. vulgare* são superiores aos observados pelos respetivos grupos controlo. Os valores de *clearance* da creatinina observados sugerem que os OEs de *L. viridis*, *C. nepeta* e *F. vulgare* não apresentam nefrotoxicidade.

A função renal foi avaliada histologicamente nos grupos controlo e nos grupos administrados com OE de *L. luisieri* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg - Figura 5.14), *L. viridis* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg - Figura 5.15), *C. nepeta* (250, 500 e 1000 - Figura 5.16) e *F. vulgare* (500, 1000 e 2000 mg/kg - Figura 5.17) apresentaram histoarquitetura normal, independentemente da dose de OE administrada, assim como nos indivíduos do grupo controlo. A análise histológica está em conformidade com os dados obtidos para os marcadores de nefrotoxicidade, sugerindo a ausência de toxicidade renal.

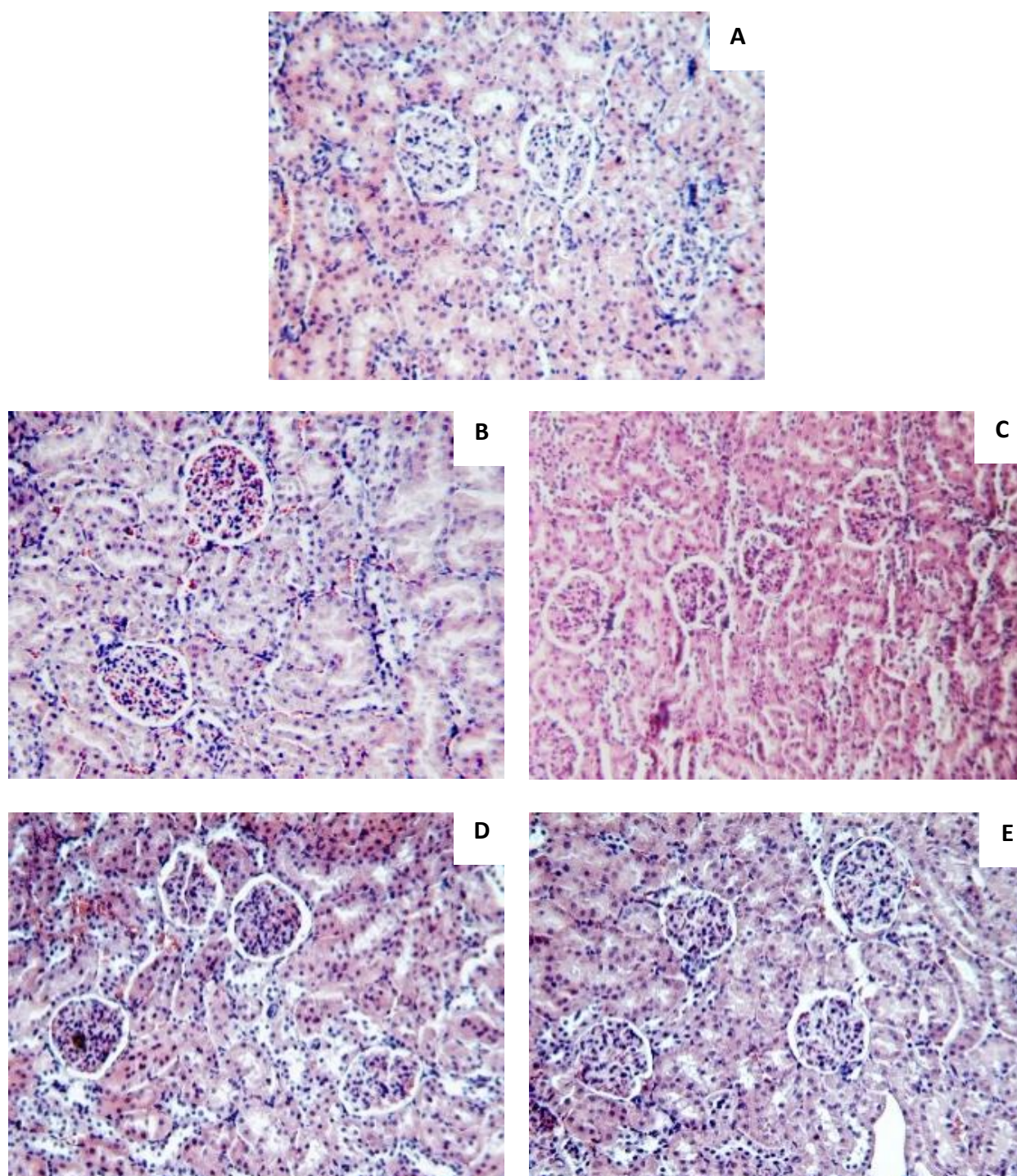


Figura 5.14 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de *L. luisieri*

A – grupo controle; B – dose 250 mg/kg; C – dose 500 mg/kg; D – dose 1000 mg/kg; E – dose 2000 mg/kg.
Ampliação 10 x

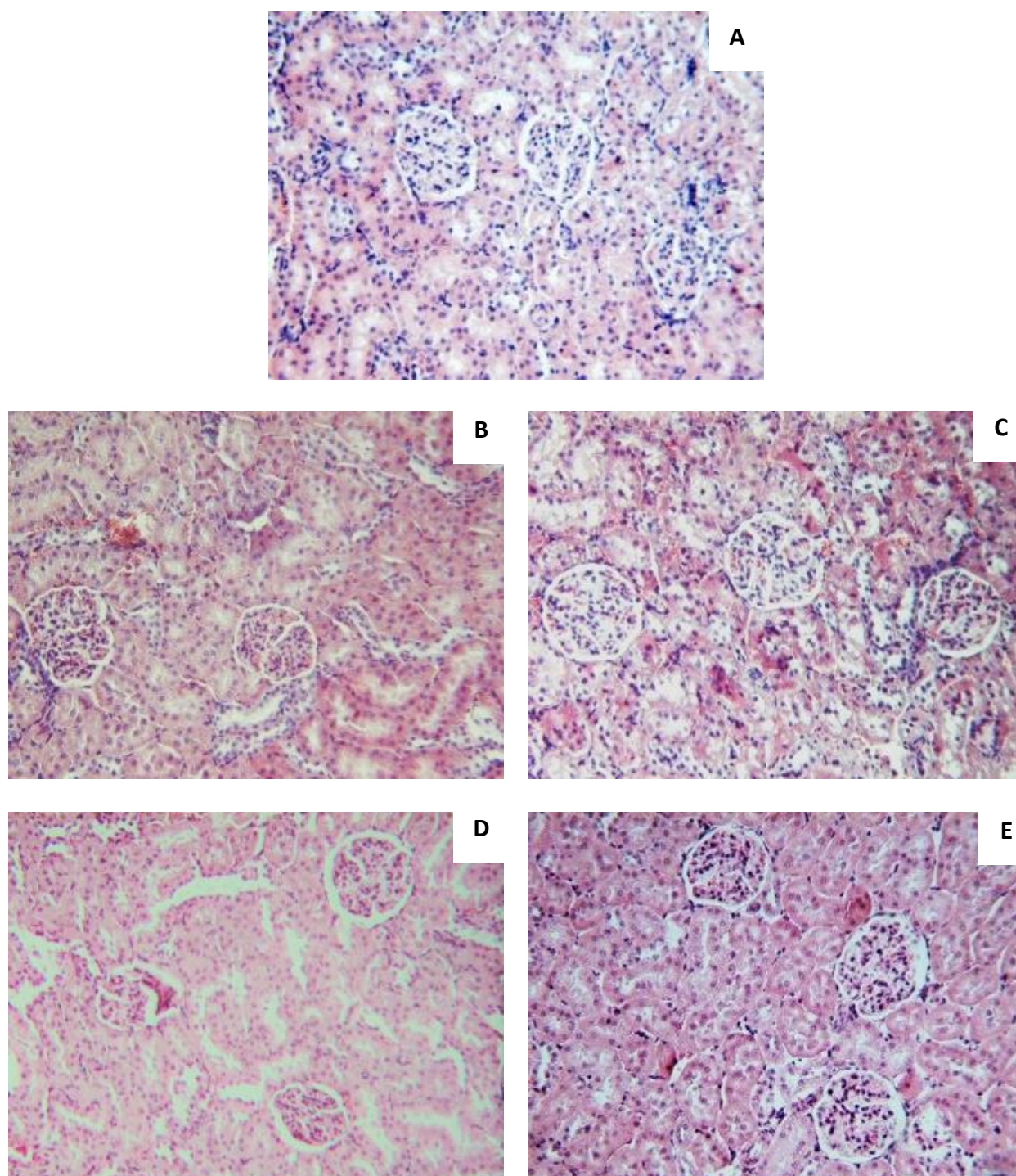


Figura 5.15 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de *L. viridis*

A – grupo controle; B – dose 250 mg/kg; C – dose 500 mg/kg; D – dose 1000 mg/kg; E – dose 2000 mg/kg.
Ampliação 100X

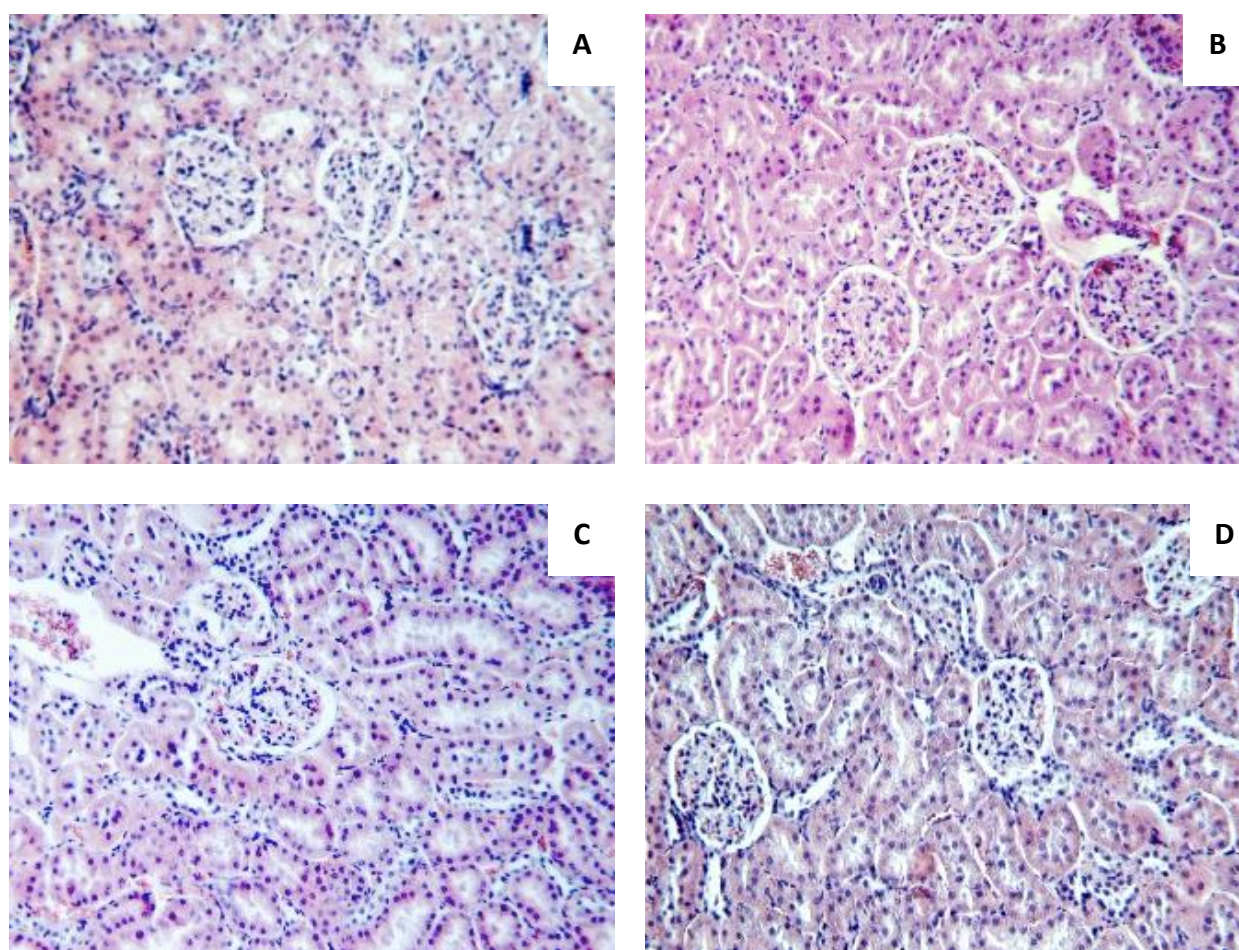


Figura 5.16 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de *C. nepeta*

A – grupo controle; B – dose 250 mg/kg; C – dose 500 mg/kg; D – dose 1000 mg/kg.
Ampliação 100X

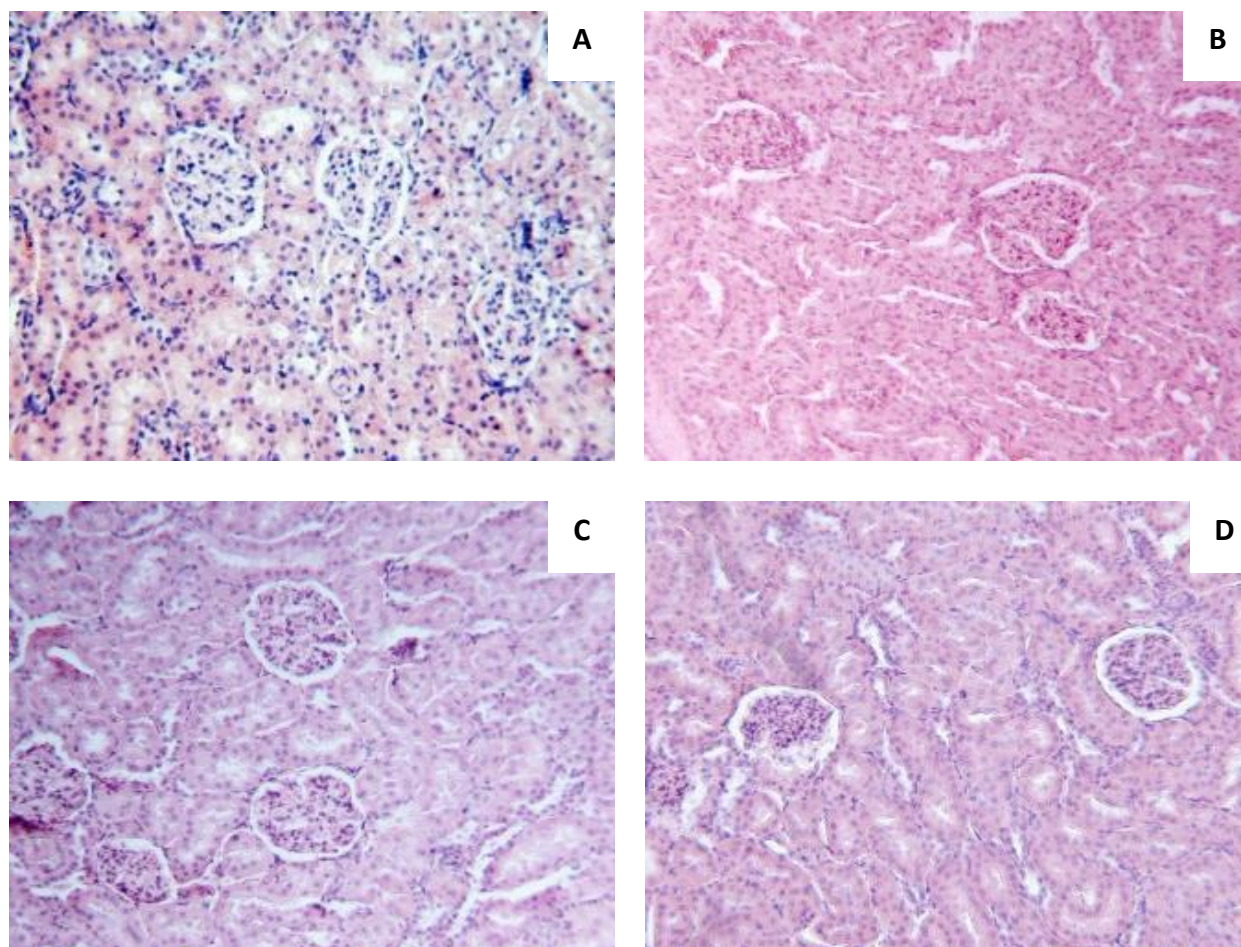


Figura 5.17 - Cortes histológicos do rim de animais administrados com OE de *F. vulgare*

A – grupo controle; B – dose 500 mg/kg; C – dose 1000 mg/kg; D – dose 2000 mg/kg.

Ampliação 100X

Concluindo, os óleos essenciais em estudo apresentaram DL₅₀ superior a 750 mg/kg, podendo ser classificados na categoria dos compostos de menor toxicidade (categorias 4 e 5) de acordo com o critério de classificação GSH (*Global Hazard Health*). A análise histológica dos tecidos hepático e renal, em conjunto com a análise dos biomarcadores permitiram monitorizar as funções destes órgãos e despistar possíveis efeitos tóxicos. Não se observaram as alterações histológicas significativas ao nível do fígado e do rim após a administração dos óleos essenciais comparativamente aos grupos

controle, e algumas das pequenas alterações estruturais transitórias poderão estar relacionadas com a necessidade de eliminação dos compostos administrados, dada a importância funcional destes órgãos no processo de desintoxicação.

A baixa toxicidade observada para os óleos essenciais de *Lavandula luisieri*, *Lavandula pedunculata*, *Lavandula viridis*, *Calamintha nepeta*, *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina* e *F. vulgare*, nas doses testadas, sugere a sua possível utilização como nutracêuticos ou agentes terapêuticos, no entanto serão necessários mais estudos, designadamente de toxicidade subaguda, com administração repetida dos OEs, com vista a definir a posologia mais eficaz e segura a aplicar.

Ensaaios de atividade farmacológica *in vivo*

Publicações efetuadas no âmbito deste capítulo

Sílvia Macedo Arantes, Andreia Piçarra; Marisa Guerreiro; Cátia Salvador; Fátima Candeias; A. Teresa Caldeira and M. Rosário Martins (2019). "Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal)", Food and Chemical Toxicology Vol. 133, pp. 110747.

Sílvia Arantes, Fátima Candeias, Orlando Lopes, Mónica Lima, Marízia Pereira, Teresa Tinoco, J Cruz-Morais, M Rosário Martins (2016). "Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*". Planta Medica, 82 (14), pp. 1266 - 1273.

Sílvia Arantes, Andreia Piçarra, M. Fátima Candeias, António Neto Vaz, M. Teresa Tinoco, Júlio Cruz-Morais, M. Rosário Martins (2015). "Antioxidant properties and analgesic and anti-inflammatory activity of *Calamintha nepeta* and *Foeniculum vulgare*". Experimental Pathology and Health Sciences Research, Clinics, Teaching and Society , 7 (1), pp. 57.

6.1. Introdução

Tradicionalmente, os produtos à base de extratos de plantas e/ou óleos essenciais (OEs) têm desempenhado um importante papel na saúde e bem-estar ^{16,425-427}. As plantas aromáticas, condimentares e medicinais integram a Dieta Mediterrânea, apresentando um crescente interesse na indústria alimentar e são cada vez mais usadas em terapêuticas alternativas/complementares à medicina convencional ⁴²⁸. Pela eficácia e, principalmente, pelo menor número de efeitos adversos, quando comparados aos fármacos sintéticos, a utilização de extratos de plantas aromáticas como alimentos funcionais poderá ser importante na prevenção de patologias, de elevada mortalidade e morbilidade, como cancro, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, infeções, doenças inflamatórias crónicas, diabetes e doenças autoimunes ^{2,19,22,149,152,156}.

A resposta inflamatória é um fenómeno dinâmico que envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares e constitui um dos mais importantes mecanismos de defesa do organismo, ocorrendo como uma resposta não específica das células ou dos tecidos à injúria celular por qualquer agente lesivo, seja físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microrganismo, reações imunológicas) ou químico (substância caustica), envolvendo, nos seus processos, células imunes do sistema hematopoiético e apresentando como sintomas característicos dor, calor, vermelhidão, inchaço e perda de funções ⁴²⁹⁻⁴³².

O processo inflamatório pode ser classificado em agudo ou crónico. A resposta inflamatória aguda caracteriza-se por um início rápido e curta duração, sendo responsável pela defesa do organismo, ajudando a eliminar bactérias, vírus e parasitas e ainda auxilia na reparação de feridas. Uma resolução inadequada e/ou a persistência do estímulo inflamatório promove a progressão da inflamação aguda a inflamação crónica. Assim, se por um lado a resposta inflamatória controlada é benéfica para o organismo uma resposta inflamatória disfuncional, cronicamente prolongada, afetará nefastamente o organismo, promovendo o desenvolvimento de patologias

degenerativas, como a artrite reumatoide, aterosclerose, doença cardíaca, asma, cancro, Alzheimer, entre outras, sendo necessário compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo inflamatório, permitindo desenvolver novos protocolos de tratamento e prevenção. A inflamação crónica é um fator agravante para danos nos tecidos, caracterizando-se histologicamente pela presença de linfócitos e macrófagos, resultando em fibrose e necrose tecidual ^{433,434}.

Os mediadores da resposta inflamatória são os leucotrienos (Leuc) e as prostaglandinas (PG), resultantes da conversão do ácido araquidónico. A via metabólica do ácido araquidónico (Figura 6.1) é responsável pela formação de uma grande variedade de metabolitos bioativos, denominados de eicosanoides, que estão envolvidos em várias patologias, incluindo a inflamação ^{435,436}.

O ácido araquidónico, sob ação das lipoxigenases (LOX) é convertido em ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) e leucotrienos (Leuc). As ciclooxigenases (COX) são os enzimas centrais responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e outros eicosanoides e desempenham um papel importante na mediação da resposta inflamatória do organismo ^{429,437,438}.

A COX-1, expressa constitutivamente, é responsável pela mediação de funções fisiológicas, controlando processos como a secreção da mucosa gástrica e a homeostasia vascular. A COX-3 tem sido reportada, recentemente, como duas pequenas proteínas derivadas da COX-1, sendo totalmente expressas no cérebro, medula espinhal e coração, cuja principal função é regular as respostas à dor e febre ⁴³⁹. Outra isoforma, COX-2, expressa de uma maneira constitutiva em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central, os rins e das gónadas, não é detetável na maioria dos tecidos normais e tem sido amplamente identificada como um enzima induzível quando estimulado por citocinas, fatores de crescimento, lesão súbita, inflamação, oncogenes e promotores tumorais, contribuindo para a síntese de PGs. As citocinas libertadas nos processos de

resposta anti-inflamatória, (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α ou fator de necrose tumoral) estão também associadas a outros processos de resposta do organismo, incluindo resposta imunológica e antitumoral, nomeadamente de apoptose ⁴⁴⁰⁻⁴⁴³.

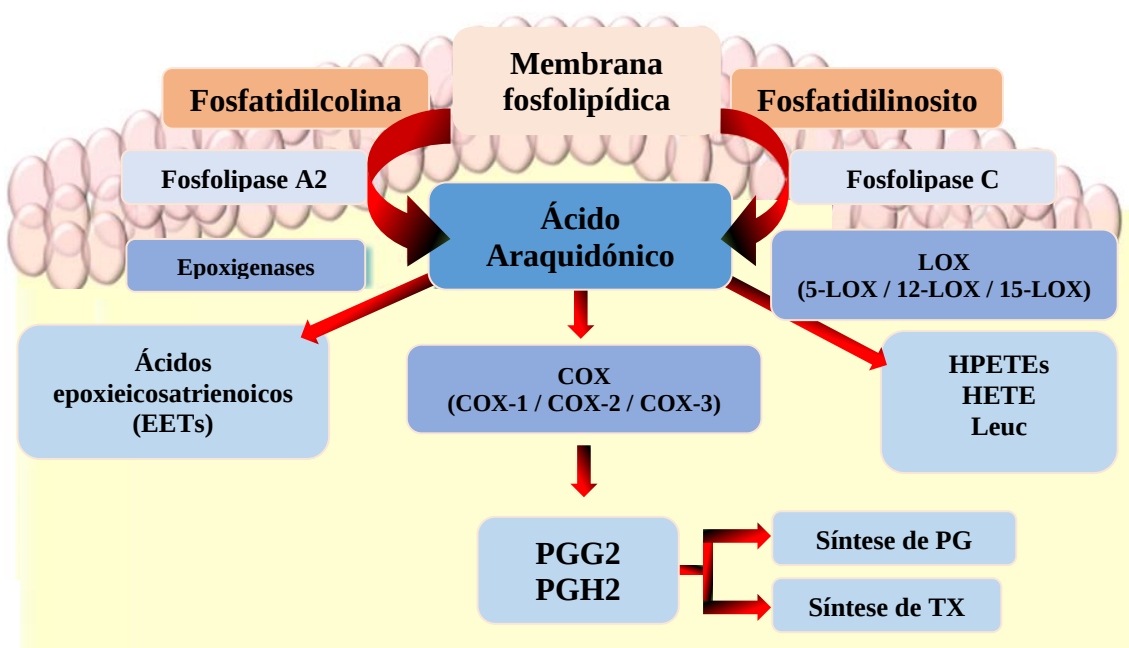


Figura 6.1 – Esquema da via metabólica do ácido araquidônico.

COX – ciclooxigenases; PGG2 - prostaglandina E2; PGH2 - Prostaglandina H2, PG – prostaglandinas; TX – tromboxanos; Leu – leucotrienos; HPETEs – ácidos hidroxieicosatetraenoicos; HETE - ácidos hidroxieicosatetraenoicos

Adaptado de Cathcart *et al.* ⁴³⁵

Os processos inflamatórios são, geralmente, acompanhados de dor. A dor é um campo complexo definida por uma sensação de mal-estar associada a atual ou potencial dano tecidual. Esta sensação é muitas vezes descrita como uma experiência multidimensional, envolvendo vários componentes: motivacional, emocional, discriminação sensorial, e aspetos afetivos e cognitivos, podendo compreender, na dor nociceptiva, os processos de transdução, condução, transmissão e percepção ⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁷. Estima-se que um grande número da população mundial seja afetado por algum tipo de

dor, levando à diminuição da qualidade de vida, e em muitos, casos representa o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças ⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁷.

Os analgésicos apresentam um papel central no tratamento da dor e, com a exploração de novos sistemas e abordagens, tem-se descoberto novos alvos de ação para os compostos que possuem propriedades analgésicas. Um dos grupos com ação analgésica são os opiáceos. Estes são os principais agentes com ação analgésica e atuam ao nível do sistema nervoso central (SNC), exercendo os seus efeitos nos recetores opioides e são especialmente importantes no tratamento da dor crónica. No entanto, estes compostos apresentam propriedades viciantes e efeitos secundários que incluem depressão respiratória, sonolência, diminuição da motilidade gastrointestinal, náuseas e várias alterações do sistema endócrino e do sistema nervoso autónomo ⁴⁴⁸. Uma outra classe de agentes analgésicos são os anti-inflamatórios não-esteroides (NSAIDs). O uso de anti-inflamatórios não-esteroides é a principal abordagem terapêutica para a reação anti-inflamatória, estimulando a busca por novas moléculas potencialmente uteis no tratamento da inflamação ⁴⁴⁰⁻⁴⁴³.

São várias as metodologias descritas para avaliar, *in vitro* e *in vivo*, as ações analgésicas e anti-inflamatória, permitindo avaliar processos inflamatórios agudos, subagudos e crónicos. No entanto, no que toca a avaliação da capacidade analgésica, os testes *in vitro* apenas podem substituir parcialmente os testes com animais. Além disso, a dor é um fenómeno inerente aos animais, e os efeitos analgésicos observados nos animais podem ser comparados aos efeitos terapêuticos no Homem ³⁹⁷. Para se estudar a capacidade analgésica de um fármaco é necessário primeiro provocar a dor física. A indução desta dor pode produzir-se por meios físicos ou por meios químicos. Neste estudo, os testes selecionados para avaliar a atividade analgésica dos OEs foram a prova do ácido acético, o teste da placa aquecida e a prova de *Amour-Smith*, enquanto a ação anti-inflamatória foi avaliada pelo método de indução de edema pela carragenina.

A prova do ácido acético tem sido usada para avaliar a atividade analgésica desde que se demonstrou que tanto os analgésicos centrais como os antipiréticos são capazes de reduzir de uma maneira dose-dependente as contorções abdominais induzidas em ratos por administração intra-peritoneal de diversos agentes irritantes, sendo a inibição destes movimentos considerada como índice de analgesia. Este teste permite avaliar a ação analgésica central e periférica, existindo uma boa correlação entre a ação analgésica no ensaio e na prática clínica. No entanto, alguns agentes psicoativos também apresentam capacidade para inibir as contorções induzidas neste ensaio ³⁹⁷.

O teste da placa aquecida permite avaliar a ação analgésica sobre o sistema nervoso central (SNC), em animais que a pata seja muito sensível ao calor a temperaturas que não provoquem danos na pele. Nas condições normais, o animal lambe as patas dianteiras e a seguir acaba por saltar. O tempo que decorre até estas respostas ocorrerem é prolongado pela administração de analgésicos centrais ³⁹⁷.

A prova de *Amour-Smith* (método do calor radiante) tem sido utilizada por muitos autores para avaliar a atividade analgésica em experiências com animais (roedores), medindo a alterações, induzida por fármacos, na sensibilidade ao *stress* térmico aplicado nas suas caudas. Este teste permite avaliar se o fármaco apresenta uma ação analgésica central semelhante à morfina ou se semelhante aos analgésicos não-opioides ³⁹⁷.

O teste de indução, pela carragenina, de edema na pata permite avaliar a ação anti-inflamatória. Este método baseia-se na capacidade de um composto inibir o edema produzido na pata posterior do rato após a injeção de um agente inflamatório, neste caso, a carragenina ^{27,397}.

Apesar do grande número de analgésicos e anti-inflamatórios disponíveis, muitos têm-se revelado de baixa eficácia, no tratamento da dor. Na busca por fármacos com maior especificidade e baixa toxicidade promoveu-se a exploração de novos

sistemas e abordagens, descobrindo-se novos alvos de ação para os compostos que possuem propriedades analgésicas ⁴⁴⁷. Muitas têm sido as terapias para o alívio da dor, entre elas, as plantas medicinais são destacadas devido à sua ampla utilização popular ^{448,449}.

A investigação farmacológica de produtos naturais que apresentam atividade sobre o sistema nervoso central (SNC) tem auxiliado a compreensão das bases neuroquímicas de muitas patologias ⁴⁵⁰. Alguns estudos demonstraram que os extratos vegetais de diversas plantas possuem atividade anti-inflamatória devido à presença de compostos bioativos como os terpenos e os flavonoides, descrevendo a ação destes compostos como intervenientes na captação de radicais livres gerados por neutrófilos e macrófagos e serem capazes de inibir a via das ciclo-oxigenases, sugerindo o seu importante papel na regulação dos mediadores inflamatórios ^{435,451,452}.

As propriedades farmacológicas das plantas aromáticas são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais. Muitas são as evidências que associam a inflamação crónica e o *stress* oxidativo ao processo de envelhecimento, indicando que uma resposta inflamatória crónica subclínica e a presença de espécies reativas nos processos inflamatórios estão presentes na etiologia de várias patologias, incluindo as resultantes de disfunções metabólicas, demonstrando o papel central da interação recíproca entre *stress* oxidativo e inflamação ⁴⁵³⁻⁴⁵⁸. A atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais pode ser atribuída não apenas às suas propriedades antioxidantes, mas também às interações com cascatas de sinalização que envolvem citocinas e fatores reguladores de transcrição e na expressão de genes pró-inflamatórios ^{226,459}. Estudos efetuados em modelos animais com terpenos presentes nos OEs, como linalol, limoneno, mirceno, 1,8-cineol, demonstraram que este compostos apresentaram atividade analgésica ^{445-447,460-466}.

6.2. Metodologia

6.2.1. Animais

Para os ensaios, os animais foram separados em grupos de 6 ratos (n=6). Todos os animais são provenientes do Biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora e foram usados de acordo com as linhas gerais para o uso responsável de animais em experimentações (Diretiva Europeia e legislação nacional Portaria 1005/92 de 23 de Outubro) ⁴⁶⁷. Os procedimentos de experimentação animal, previamente aprovados pela Comissão de Ética, Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais da Universidade de Évora (ORBEA-UÉ), foram supervisionados por uma investigadora acreditada como pessoa competente (investigadora coordenadora) pela Direção Geral de Veterinária (Portaria 1005/92 de 23 de Outubro) e pela FELASA (nº 020/08).

O potencial farmacológico dos óleos essenciais foi avaliado por quatro métodos. O potencial farmacológico dos OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *T. mastichina* foi avaliado utilizando o teste da placa aquecida e teste de contorção induzido pelo ácido acético. Pelos métodos prova de *Amour-Smith* e teste de edema de pata induzido pela carragenina foi avaliado o potencial analgésico e anti-inflamatório dos OEs *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata* e *F. vulgare*. As soluções de OEs (100 e 200 mg/kg) foram preparadas por diluição numa solução aquosa contendo *tween* 20 (1 %).

6.2.2. Prova da placa aquecida

Este ensaio foi realizado de acordo com Suseem *et al.* ⁴⁶⁸, com algumas modificações. Este teste foi avaliado em grupos de 6 animais *Swiss*, para determinar o tempo de resposta. A temperatura da placa foi ajustada para 50 ± 1 °C, e fixou-se como

tempo máximo 60 s para evitar queimaduras nas patas dos animais. Os animais foram colocados na placa aquecida para avaliar o tempo de resposta antes da administração. Avaliou-se o tempo de reação (t_i) do animal ao estímulo térmico 30, 60 e 90 minutos após a administração dos OEs. A atividade analgésica foi calculada com base na equação 5:

$$AAn (\%) = \frac{(t_i - t_0)_{\text{testemunha}} - (t_i - t_0)_{\text{amostra}}}{(t_i - t_0)_{\text{testemunha}}} \times 100 \quad \text{equação 5}$$

6.1.1. Teste de contorção induzido pelo ácido acético

O teste do ácido acético foi efetuado em ratos *Swiss*, de acordo com Quintans-Junior *et al.* ⁴⁶⁹, com algumas modificações. Para o efeito, os animais foram divididos em grupos de 6 animais/dose. Como controlos utilizou-se a solução veículo (grupo testemunha) e uma solução de diclofenac (40 mg/kg). Os animais foram administrados *per os*, 30 minutos antes da injeção do ácido acético. As contorções abdominais foram induzidas por administração intra-peritoneal de 0,1 ml de ácido acético 2 %. O número total de contorções de cada animal foi contado por um período de 10 min, iniciando a contagem 5 min após a administração do ácido acético.

A atividade analgésica foi calculada com base na equação 6:

$$AAn (\%) = 100 - \left(\frac{(\text{n}^\circ \text{ contorções})_{\text{amostra}}}{(\text{n}^\circ \text{ contorções})_{\text{testemunha}}} \times 100 \right) \quad \text{equação 6}$$

6.2.3. Prova de *Amour-Smith*

Este ensaio foi efetuado em grupos de 6 ratos machos *Wistar* (200 - 300 g). Como controlos utilizou-se a solução veículo (grupo testemunha) e uma solução de morfina (10 mg/kg) como padrão. Após um período de jejum de 16 h, os animais foram imobilizados em gaiolas individuais adequadas de maneira que a cauda repouse na calha do aparelho provida de uma célula fotoelétrica. Ligou-se a lâmpada (fonte de calor) e mediu-se o tempo de reação (t_0) do animal ao estímulo térmico, caracterizado pelo comportamento de levantar a cauda. Assumiu-se com tempo de exposição máxima 10 segundos para evitar lesão tecidual. Procedeu-se à administração por via oral dos óleos essenciais (100 e 200 mg/kg - grupos teste) e testemunha e à administração subcutânea da morfina. Avaliou-se o tempo de reação (t_i) do animal ao estímulo térmico após 30, 60 e 90 minutos. Os extratos e óleos essenciais foram diluídos numa solução de *tween* 20 (1 %).

A atividade analgésica foi calculada com base na equação 7:

$$AAn (\%) = \frac{(t_i - t_0)_{\text{testemunha}} - (t_i - t_0)_{\text{amostra}}}{(t_i - t_0)_{\text{testemunha}}} \times 100 \quad \text{equação 7}$$

6.2.4. Teste de edema de pata induzido pela carragenina

A atividade anti-inflamatória foi avaliada de acordo com Hajhashemi *et al.* ²⁷, com algumas modificações. Este ensaio foi efetuado em grupos de 6 ratos machos *Wistar* (200 - 300 g). Como controlos utilizou-se a solução veículo (grupo testemunha) e uma solução de dexametasona (1 mg/kg) como padrão. Após um período de jejum de 16 h, mediu-se o volume (V_0) da pata posterior esquerda, com o auxílio de um pleitismometro, e procedeu-se à administração dos extratos por via oral. Após 60

minutos da administração oral, injetou-se 0,1 ml da solução de carragenina 1 % (NaCl 0,9 %), subcutaneamente, na região plantar da mesma pata do animal. O volume da pata foi medido 4 horas após a produção da inflamação (V_t).

A atividade anti-inflamatória foi calculada com base na equação 8:

$$AAI (\%) = \frac{(V_t - V_0)_{\text{testemunha}} - (V_t - V_0)_{\text{amostra}}}{(V_t - V_0)_{\text{testemunha}}} \times 100 \quad \text{equação 8}$$

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Prova da placa aquecida

Os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *T. mastichina* apresentaram ação analgésica pela prova da placa aquecida (Figura 6.2), sendo possível observar que a atividade inibitória, variando com a dose e o tempo de latência.

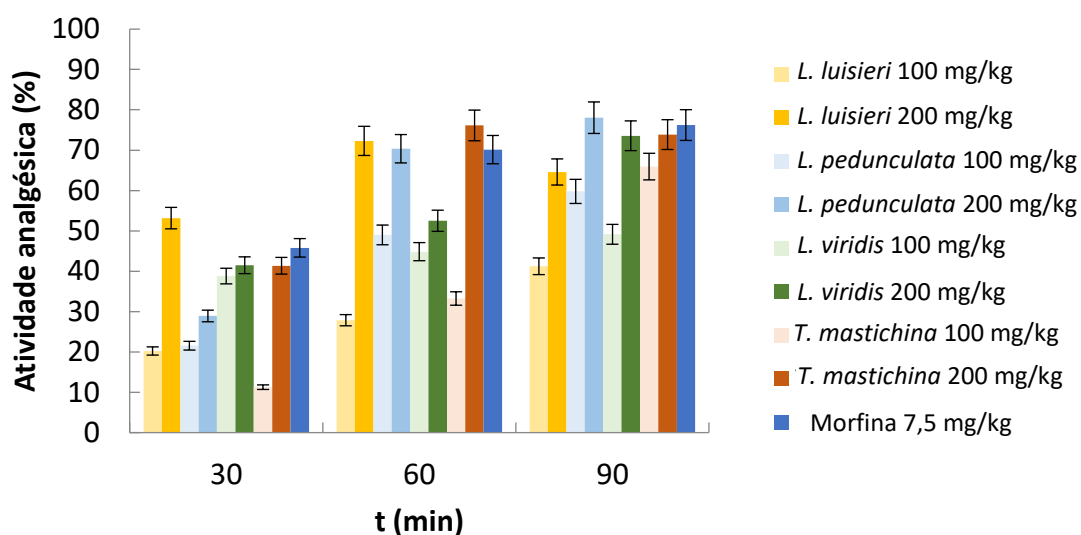


Figura 6.2 – Atividade analgésica dos OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *T. mastichina* pela prova da placa aquecida

Comparativamente com a morfina (7,5 mg/kg), os OEs de *L. luisieri*, *L. viridis* e *T. mastichina*, na dose de 200 mg/kg, apresentou valores de atividade analgésica muito próximos ou superiores, com valores de inibição analgésica superiores a 30 % e 60 % após 30 e 60 min, respetivamente. Na dose de 100 mg/kg, a atividade dos OEs variou entre 11 – 39 %, 28 – 49 %, e 41 – 78 % para os tempos de 30, 60 e 90 min

respectivamente. De salientar, ainda, que os OEs de *L. luisieri* (100 mg/kg), *L. viridis* (100 e 200 mg/kg) e *T. mastichina* (200 mg/kg) foram os que apresentaram um efeito analgésico mais rápido e com maior atividade nos primeiros 30 min.

O método da placa aquecida reflete um processo de analgesia mais complexo e integrado centralmente, sendo considerado seletivo para *screening* de compostos que atuam no recetor opioídeo, com a vantagem de poder ser repetido várias vezes sem provocar inflamação⁴⁶². Adicionalmente, tem sido observada uma boa correspondência entre os medicamentos que produzem antinocicepção neste teste e os medicamentos usados clinicamente para tratar a dor⁴⁶².

6.3.2. Teste de contorção induzido pelo ácido acético

Os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *T. mastichina* apresentaram capacidade para reduzir o número de contorções (Figura 6.3).

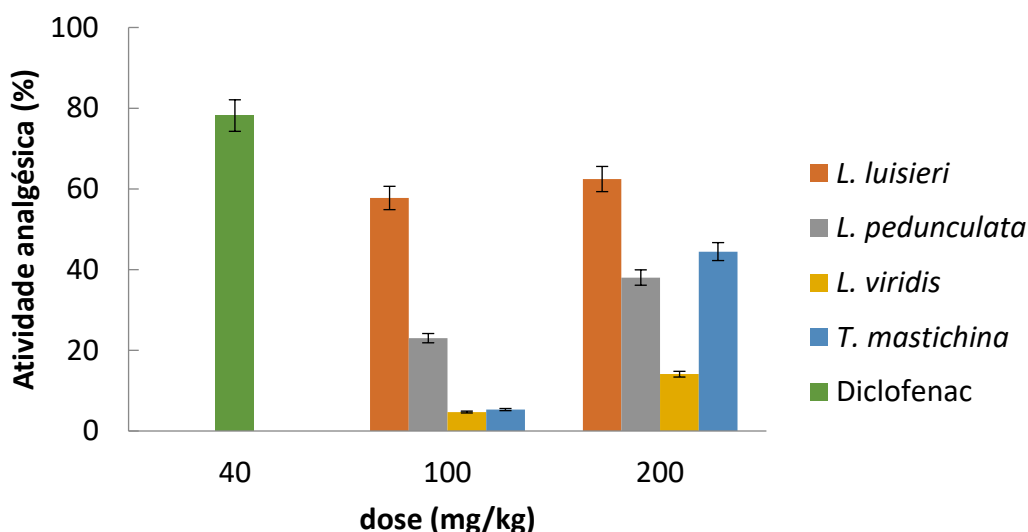


Figura 6.3 – Atividade analgésica dos OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis* e *T. mastichina* pelo teste de contorção induzido pelo ácido acético

O OE de *L. luisieri* foi o que apresentou melhor capacidade para inibir as contorções, apresentando valores de inibição de 58 e 62 % para as doses de 100 e 200 mg/kg, respectivamente. O OE de *L. pedunculata* apresentou capacidade para inibir 23 e 38 % das contorções na dose de 100 e 200 mg/kg, respectivamente. O OE de *L. viridis* foi o que apresentou menor atividade com valores inferiores a 20 % mesmo na dose 200 mg/kg. Na dose de 200 mg/kg, o OE de *T. mastichina* apresentou capacidade para inibir 45 % das contorções. No entanto, todos os OEs apresentaram valores de atividade inferiores ao observados pelo padrão diclofenac (40 mg/kg) com 78 % de atividade.

O teste do ácido acético é um modelo que permite testar a dor visceral, causada por substâncias endógenas e outros mediadores da dor. Este mecanismo é, também, considerado um modelo típico de estudo da dor inflamatória, devido à sua semelhança com os sinais de distúrbios viscerais humanos ^{462,470,471}. Embora seja um teste mais usado para avaliar a atividade analgésica, também permite inferir acerca da ação anti-inflamatória porque o ácido acético induz uma resposta inflamatória na cavidade abdominal, com subsequente ativação de nociceptores, surgindo uma reação dolorosa e uma inflamação aguda na área peritoneal. A constrição induzida pelo ácido acético é considerada um modelo antinociceptivo não seletivo, uma vez que o ácido acético atua indiretamente induzindo a liberação de mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos sensíveis a drogas anti-inflamatórias não-esteroides, a narcóticos e a outras drogas ativadas centralmente ⁴⁷².

6.3.3. Prova de *Amour-Smith*

Os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata* e *F. vulgare* apresentaram atividade analgésica pela prova de *Amour-Smith* (Figura 6.4).

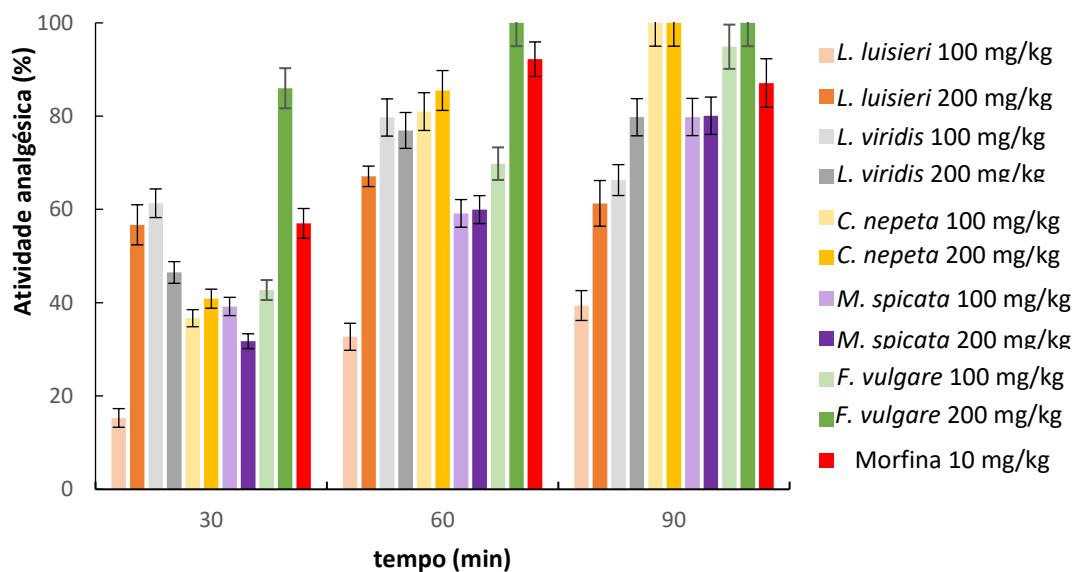


Figura 6.4 – Atividade analgésica dos OEs de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata* e *F. vulgare* pela prova de *Amour-Smith*

Podemos observar que os OEs apresentaram uma atividade analgésica dependente da dose e do tempo de latência. Tanto para os OEs como para o padrão morfina (10 mg/kg), observou-se um aumento da atividade analgésica com o aumento do tempo de latência.

Podemos observar que o OE que apresentou valores mais baixos de atividade analgésica pela prova de *Amour-Smith* foi o OE de *L. luisieri* (100 mg/kg), com valores de 15 %, 33 % e 39 % ao tempo 30, 60 e 90 min, respectivamente. Na dose de 200 mg/, os OEs de *L. luisieri* e *L. viridis* apresentaram valores de analgesia próximos ao observado para o padrão, no entanto, para tempos de latência superiores, a atividade analgésica foi inferior à observada para a morfina. Já o OE de *F. vulgare* (200 mg/kg) foi o que apresentou maior atividade, apresentando valores de analgesia (> 85 %) superiores ao da morfina nos três tempos de latência.

Após os 90 min de latência, todos os OEs à exceção do OE de *L. luisieri* 100 mg/Kg apresentaram valores de analgesia superiores a 60 %, sendo que os OEs de *C. nepeta* e *F. vulgare* apresentaram valores de analgesia superiores ao da morfina.

A prova de *Amour-Smith*, ou método do calor radiante, é uma variação do método do movimento da cauda. O método do movimento da cauda é um reflexo da coluna vertebral, altamente sensível aos medicamentos opiáceos, que, embora sujeito a influências que afetam o reflexo supraespinal, apresenta um modelo de dor altamente correlacionada com o alívio da dor humana ^{445,462}.

6.3.4. Teste de edema de pata induzido pela carragenina

Os óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata* e *F. vulgare* apresentaram capacidade para inibir o edema da pata induzido pela carragenina (Figura 6.5).

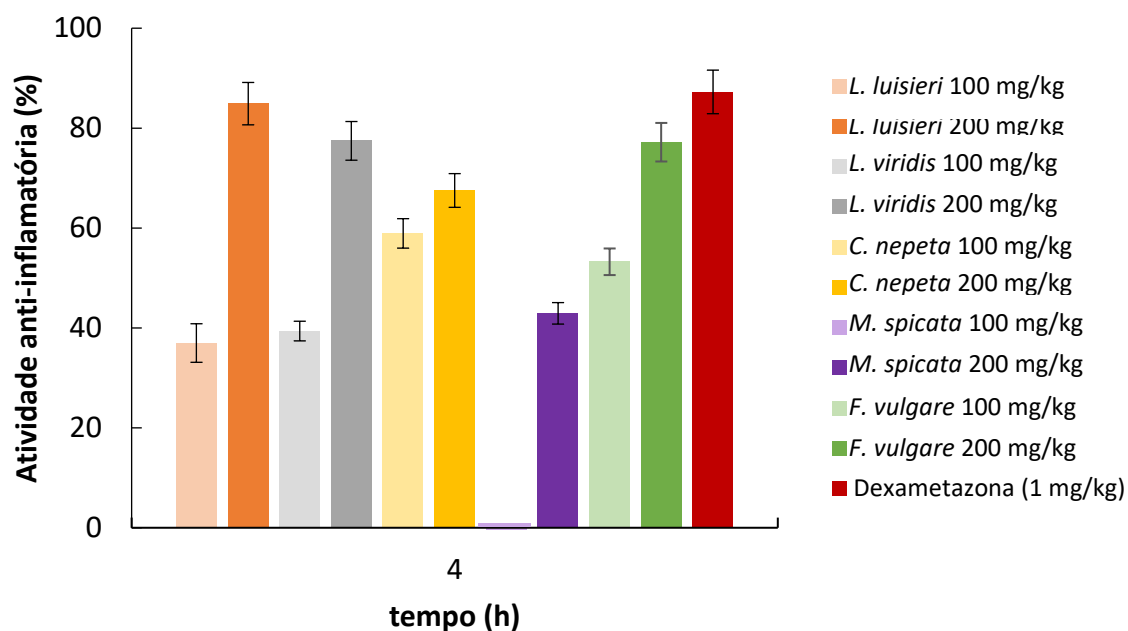


Figura 6.5 – Atividade anti-inflamatória dos OEs de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata* e *F. vulgare* pelo teste do edema da pata induzido pela carragenina

A atividade anti-inflamatória dos OEs variou entre 37 – 59 % para a dose de 100 mg/kg de OE de *L. luisieri* e *C. nepeta*, respetivamente. Na dose de 100 mg/kg, o OE de *M. spicata* não apresentou atividade anti-inflamatória.

Na dose de 200 mg/kg, a atividade anti-inflamatória variou entre 43 – 85 % para os OEs de *M. spicata* e *L. luisieri*, respetivamente. Comparativamente com padrão dexametasona (1 mg/kg – 87 %), os OEs de *L. luisieri* e de *F. vulgare* na dose de 200 mg/kg apresentaram valores de atividade com 85 % e 77 % de atividade, respetivamente.

De acordo com a bibliografia, a ação analgésica e anti-inflamatória dos OEs é preferencialmente atribuída ao elevado conteúdo em compostos terpénicos ^{25,445,446,461,473-475} e ao efeito combinado dos compostos maioritários e minoritários dos OEs que possuem ou não ação farmacológica, uma vez que os esses compostos podem influenciar a farmacocinética e a biodisponibilidade dos compostos com ação analgésica ⁴⁷⁶.

A bibliografia não refere estudos de atividade analgésica com OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis*. No entanto, a planta deste género mais estudada é *L. angustifolia* Mill., cujo OE é bastante conhecido e amplamente comercializado pelas indústrias cosmética, alimentar e farmacêutica. Na medicina tradicional, OE de *L. angustifolia* é utilizado para o tratamento da depressão, ansiedade e stress ⁴⁷⁷. Um estudo com OE e extratos das folhas de *L. angustifolia* refere que o OE apresentou atividade analgésica superior a 50 % (entre 83 e 90 %) e atividade anti-inflamatória de 48 % para a dose de 200 mg/Kg ²⁷. Recentemente, Sanna *et al.* ⁴⁷⁷, demonstrou que o OE de *L. angustifolia* possui uma importante atividade analgésica na dose de 100 mg/kg, pelo método da placa aquecida, com cerca de 30 % de analgesia, sugerindo que a administração oral deste pode representar uma abordagem terapêutica no tratamento

dos estados de dor neuropática. Cardia *et al.* ⁴⁷⁸ demonstrou que o OE de *L. angustifolia* possui atividade anti-inflamatória, incluindo pelo método do edema da pata induzido pela carragenina, sendo capaz de inibir, na dose de 100 mg/kg, por este método, a inflamação em 54 %, 56 % e 45 % após 30, 60 e 120 min, respectivamente, ponde na dose de 100 mg/kg. Adicionalmente, os efeitos analgésico e anti-inflamatório observados para os OEs das espécies de *Lavandula* podem ser atribuídos aos seus teores em monoterpenos, nomeadamente 1,8-cineol, fenchona, linalol ^{445-447,460-462}.

Mogosan *et al.* ⁴⁷⁹, num estudo efetuado com OEs de três espécies de *Mentha* cultivadas na Roménia, incluindo a *M. spicata*, observaram que o OE de *M. spicata* apresentou atividade analgésica pelos métodos da placa aquecida e pelo teste de contorção induzido pelo ácido acético, com valores de analgesia superiores a 24 % e a 39 %, respectivamente. Mogosan *et al.* ⁴⁷⁹, observaram ainda que o OE de *M. spicata* apresentou atividade anti-inflamatória pelo método do edema da pata induzido por carragenina, com valores atividade anti-inflamatória (4 h) de 14 %, 34 % e 62 % para as doses de 125, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. O efeito analgésico observado para o OE de *M. spicata* tem sido atribuído aos seus componentes principais, como carvona, limoneno e mentol, tendo sido observado um efeito na redução da dor observado em pacientes com osteoartrite ⁴⁸⁰.

Relativamente às espécies do género *Thymus*, a espécie mais estudada é *Thymus vulgaris*, sendo reconhecida a capacidade dos seus OEs e componentes maioritários como analgésicos e anti-inflamatórios ^{444,481,482}. Adicionalmente, a bibliografia refere que os monoterpenos anetol e fenchona, componentes maioritários do OE de *F. vulgare* (45 % e 20 %, respectivamente), 1,8-cineol e α -terpineol, presentes nos OEs de *C. nepeta* e *T. mastichina* apresentam atividade analgésica, podendo ser os responsáveis pelos efeitos analgésico e anti-inflamatórios observados ^{445-447,460-466}.

Capítulo VII

Conclusões gerais e perspectivas futuras

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar quimicamente os OEs de plantas aromáticas e condimentares, a maioria autóctones da região Alentejo e Algarve e avaliar as propriedades biológicas, toxicológicas e farmacológicas dos OEs selecionados, com vista à sua valorização como nutracêuticos e/ou posterior aplicação na terapêutica. Neste estudo pretendeu-se correlacionar a composição química com as propriedades farmacológicas dos OEs, validar a sua aplicação e possibilitar a transferência de conhecimento sobre o potencial nutracêutico e fitoterapêutico destes EOs para o sector da produção de PAMs e contribuir para a valorização desta fileira, de reconhecido valor cultural e científico.

Com base nos estudos descritos nos capítulos anteriores, foi possível inferir algumas conclusões gerais, que a seguir se descrevem.

A análise da composição química dos oito óleos estudados, revelou diferenças na composição química, quanto à diversidade e à proporção dos seus constituintes presentes. Os óleos essenciais de *L. luisieri* apresentaram um perfil químico rico em monoterpenos oxigenados (> 50 %) e hidrocarbonetos sesquiterpénicos (5-11 %), apresentando como compostos maioritários o 1,8-cineol (9-19 %), acetato de *trans*- α -necrodilo (9 - 24 %), α -*trans*-necrodol (8 - 10 %). O óleo essencial *L. pedunculata* é rico em monoterpenos oxigenados (> 75 %), apresentando como constituintes maioritários a cânfora (23 – 39 %) e a fenchona (28 – 42 %). O óleo essencial de *L. viridis* revelou elevado teor de monoterpenos oxigenados (< 66 %), nomeadamente, 1,8-cineol (3 - 49 %), cânfora (12 - 43 %), linalol (7 - 21 %) e borneol (2 - 5 %).

O óleo essencial de *C. nepeta* na fase vegetativa (Primavera) e na fase de floração (Outono) apresentou variabilidade sazonal na composição química dos seus OEs, com um elevado conteúdo em monoterpenos oxigenados (85 % e 91 %), hidrocarbonetos monoterpénicos (10 % e 7 %) e hidrocarbonetos sesquiterpénicos (1,7 % e 1 %), para os OEs da Primavera e Outono respetivamente. O óleo essencial das plantas colhidas na Primavera apresentou como componentes maioritários o 1,8-cineol (23 %), o limoneno

(8 %), a isomentona (13 %), a mentona (13 %), a isopulegona (15 %), o mentol (9 %) e a pulegona (6 %), enquanto o óleo essencial obtido no Outono apresentou como componentes majoritários o mentona (22 %), o mentol (16 %), o 1,8-cineol (28 %) e pulegona (5 %).

Os óleos essenciais de *M. spicata* apresentaram uma composição rica em monoterpenos oxigenados (> 70 %) e hidrocarbonetos monoterpênicos (> 17 %), apresentando como componentes majoritários o limoneno (14 % e 18 %) e a carvona (65 % e 63 %) para os óleos do Outono e da Primavera, respetivamente. O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou como componentes majoritários a pulegona (79 %) e a isomentona (10 %), expressando o quimiótipo pulegona e um perfil químico maioritariamente constituído por monoterpenos oxigenados (> 90 %).

O OE de *O. virens* apresentou um perfil químico com uma elevada composição em hidrocarbonetos monoterpênicos (50 %) e monoterpenos oxigenados (46 %), apresentando como constituintes majoritários o timol (19 %), γ -terpineno (20 %), o éter metílico de timol (13 %) e o *m*-cimeno (12 %).

O OE de *T. mastichina* apresentou como constituintes majoritários o 1,8-cineol (72 %), o α -terpineol (9 %), com um perfil químico rico em monoterpenos oxigenados (86 %) e hidrocarbonetos monoterpênicos (7 %), expressando o quimitipo do 1,8-cineol.

O OE do *F. vulgare* verde (Primavera), com um perfil químico rico em fenilpropanóides (53 %), monoterpenos oxigenados (24 %) e hidrocarbonetos monoterpênicos (21 %), apresentando elevados teores em anetol (> 46 %) e fenchona (> 20 %), pertencendo ao quimiótipo anetol/fenchona.

Os óleos essenciais testados apresentaram atividade antioxidante pelos três métodos estudados, observando-se maior atividade pelo método do β -caroteno/ácido linoleico. Os OEs que apresentaram maior atividade foram os OEs de *L. viridis* (radical DPPH), *L. luisieri* (redução do Fe^{3+}) e *O. virens* (proteção do substrato lipídico). Tendo em conta os resultados obtidos, podemos concluir que OEs com maiores teores de monoterpenos oxigenados apresentaram boa capacidade para capturar radicais livres e

OEs com elevados teores de monoterpenos oxigenados possuem elevada capacidade para inibirem a peroxidação lipídica.

Os estudos de avaliação do potencial neuroprotetor dos OEs revelou que os OEs em estudo possuem capacidade para inibir a ação de colinesterases AChE e BChE, designadamente os OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *C. nepeta*, *M. spicata*, *T. mastichina* e *F. vulgare*. Os OEs de *M. spicata* e *T. mastichina* apresentaram elevada capacidade inibidora de AChE, com valores de IC₅₀ inferiores a 80 mg/L. Os OEs de *C. nepeta* e *L. luisieri* apresentaram elevada capacidade inibitória de BChE.

Nos estudos de atividade antitumoral, os OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *O. virens* e *T. mastichina*, apresentaram capacidade para inibir o crescimento e induzir a morte celular das células MDA-MB-231. Foi ainda possível observar que os OEs testados apresentaram melhores resultados antitumorais para as células MDA-MB-231 do que a doxorrubicina (DOX), apresentando valores de EC₅₀ bastante inferiores ao valor descrito para a DOX.

Nos estudos de avaliação do potencial antimicrobiano observamos que os OEs apresentaram um largo espectro de ação, com capacidade para inibir o crescimento de estirpes bacterianas *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e de fungos filamentosos. No entanto, no que diz respeito às estirpes bacterianas observou-se que as bactérias *Gram*-(-) apresentaram maior resistência aos óleos essenciais do que as *Gram*-(+). Foi ainda possível observar que o OE que apresentou o maior largo de espectro antimicrobiano foi o OE de *O. virens*. Os resultados sugerem o seu potencial uso como agentes antimicrobianos naturais com potencial aplicação na indústria alimentar e farmacêutica.

Nos estudos da avaliação toxicológica, os OEs apresentaram elevada toxicidade para *A. salina* e baixa toxicidade em ratinhos *Swiss* e ratos *Wistar*, sendo classificados na categoria 4 e 5 de acordo com as categorias de perigo GHS. Os ensaios dos biomarcadores da função hepática e renal corroboraram os resultados, não tendo sido

detetados sinais de toxicidade nos animais administrados com OEs de *L. luisieri*, *L. viridis*, *C. nepeta* e *F. vulgare*.

Nos estudos de atividade farmacológica *in vivo* foi possível observar que os OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *M. spicata*, *T. mastichina* e *F. vulgare* possuem capacidades analgésica e anti-inflamatória, tendo sido os OEs de *Lavandula* spp. e *T. mastichina* os mais efetivos para o teste da placa aquecida, enquanto para o teste do ácido acético o OE que apresentou melhores resultados foi OE de *L. luisieri*. Os OEs de *C. nepeta* e *F. vulgares* foram os mais efetivos no teste de *Amour-Smith*. Os OEs de *L. luisieri*, *C. nepeta* e *F. vulgare* foram os que apresentaram maior efeito anti-inflamatório.

No sentido de aprofundar os estudos efetuados, seria relevante realizar mais alguns estudos, designadamente:

- Desenvolver modelos computacionais, baseados em inteligência artificial, de modo a correlacionar a composição e proporção dos constituintes presentes nos OEs com os géneros e espécies de PAM e inferir sobre a sua potencial atividade farmacológica e toxicológica, tendo também em conta outras variáveis como a época do ano e as condições ambientais;
- Avaliar as atividades dos OEs na atividade de enzimas envolvidos na mediação da resposta antioxidante em extratos hepáticos, nomeadamente, glutatióno transferase, glutatióno redutase, superóxido dismutase e catálase;
- Avaliar a atividade dos OEs como inibidores das atividades acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) lipoxigenase (5-LOX), envolvidos na mediação de patologias neurodegenerativas utilizando plantas da mesma espécie, mas colhidas em diferentes regiões e épocas do ano;

- Avaliar do efeito sinérgico dos OEs e o uso potencial de misturas de OEs para inibir o crescimento de microrganismos multirresistentes a fármacos;
- Avaliar o efeito dos OEs na produção de óxido nítrico, bem como à avaliação da capacidade de inibição das isoformas COX-1 e COX-2 e de prostaglandinas (PGE2).
- Quantificar as citocinas pro-inflamatórias séricas (IL-1, e TNF- α) por métodos enzimáticos e imunoensaios e avaliar os alvos moleculares envolvidos na resposta anti-inflamatória por quantificação da expressão de proteínas específicas (iNOS e COX-1 e 2) por métodos imunoenzimáticos (Western blot) em tecidos inflamados, na presença e ausência de OEs.
- Avaliar os mecanismos de sinalização envolvidos no processo de carcinogénese, designadamente, regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, indução de apoptose, diferenciação, proliferação e viabilidade celular, para o desenvolvimento de novas terapias;
- Avaliar o efeito antitumoral dos OEs ensaios de viabilidade celular utilizando linhas celulares derivadas de outros tipos de tumores, como por exemplo, fígado (HepG2), mama (MCF-7), cólon (Caco-2), próstata (LNCaP), glioblastoma (A-172) e leucemias (K562).

Referências bibliográficas

-
- [1] Camejo-Rodrigues, J., Ascensao, L., Bonet, M. A., & Valles, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de Sao Mamede" (Portugal). *J Ethnopharmacol*, 89(2-3), 199-209.
- [2] Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1-2), 1-14. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007
- [3] Mendes, S. S., Bomfim, R. R., Jesus, H. C., Alves, P. B., Blank, A. F., Estevam, C. S., . . . Thomazzi, S. M. (2010). Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacol*, 129(3), 391-397. doi:10.1016/j.jep.2010.04.005
- [4] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- [5] Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(C3), 217-233. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008
- [6] Ssegawa, P., & Kasenene, J. M. (2007). Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda. *J Ethnopharmacol*, 113(3), 521-540. doi:10.1016/j.jep.2007.07.014
- [7] Cunha, A. P. d., Ribeiro, J. A., & Roque, O. R. (2007). *Plantas aromáticas em Portugal: Caracterização e Utilizações*. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Glubenkian.
- [8] Dixon, R. A. (2005). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.
- [9] Venkataramanan, R., Komoroski, B., & Strom, S. (2006). *In vitro* and *in vivo* assessment of herb drug interactions. *Life Sci*, 78(18), 2105-2115. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.021
- [10] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839-851.
-

- [11] Oksman-Caldentey, K. M., & Inze, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci*, 9(9), 433-440. doi:10.1016/j.tplants.2004.07.006
- [12] Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913-920. doi:10.1016/j.cropro.2010.05.008
- [13] Prats, M. (2007). Aromaterapia. *Farmacia profesional*, 21.
- [14] Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
- [15] Ascensão, L. (2007). Estruturas secretoras em plantas: Uma abordagem morfo-anatômica. In F. A. C., J. G. Barroso, & L. G. Pedro (Eds.), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (3th ed., pp. 19-28). Lisboa, Portugal: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal.
- [16] Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 209-228. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014
- [17] Chiang, H.-M., Chiu, H.-H., Lai, Y.-M., Chen, C.-Y., & Chiang, H.-L. (2010). Carbonyl species characteristics during the evaporation of essential oils. *Atmospheric Environment*, 44, 2240-2247.
- [18] Nagegowda, D. A. (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett*, 584(14), 2965-2973. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.045
- [19] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2), 446-475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- [20] Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A., & Esquível, M. M. (2002). Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluídos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia-Industria Alimentar*, 14-21.

-
- [21] Chiu, H.-H., Chiang, H.-M., Lo, C.-C., Chen, C.-Y., & Chiang, H.-L. (2009). Constituents of volatile organic compounds of evaporating essential oil. *Atmospheric Environment*, 43, 5743-5749.
- [22] Paur, I., Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., & Blomhoff, R. (2011). Antioxidants in Herbs and Spices: Roles in Oxidative Stress and Redox Signaling. In nd, I. F. F. Benzie, & S. Wachtel-Galor (Eds.), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* (2nd ed.). Boca Raton (FL): CRC Press.
- [23] Del Chierico, F., Vernocchi, P., Dallapiccola, B., & Putignani, L. (2014). Mediterranean diet and health: food effects on gut microbiota and disease control. *Int J Mol Sci*, 15(7), 11678-11699. doi:10.3390/ijms150711678
- [24] Rubel, F., & Kottek, M. (2010). Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. *Meteorologische Zeitschrift*, 19(2), 135-141. doi:10.1127/0941-2948/2010/0430
- [25] Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Res*, 27(5A), 3293-3299.
- [26] Cavanagh, H. M., & Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res*, 16(4), 301-308. doi:10.1002/ptr.1103
- [27] Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J Ethnopharmacol*, 89(1), 67-71. doi:10.1016/s0378-8741(03)00234-4
- [28] Upson, T., & Andrews, S. (2002). The taxonomy of the genus *Lavandula* L. In M. Lis-Balchin (Ed.), *Lavander, the genus Lavandula, Medicinal and Aromatic Plants-Industrial profiles* (Vol. 2, pp. 2). Londres and Nova Iorque: Taylor and Francis.
- [29] Miguel, M. G., Matos, F., Duarte, J., Venancio, F., Moiteiro, C., Correia, A. I. D., . . . Pedro, L. G. (2009). Antioxidant Capacity of the Essential Oils From *Lavandula luisieri*, *L stoechas* subsp. *lusitanica*, *L stoechas* subsp. *lusitanica* x *L luisieri* and *L viridis* Grown in Algarve (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*, 21, 327-337.

- [30] Castroviejo, S. (2010). *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares* (Vol. XII (Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae)). Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- [31] Lavoine-Hanneguelle, S., & Casabianca, H. (2004). New Compounds from the Essential Oil and Absolute of *Lavandula luisieri* L. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 445-448. doi:10.1080/10412905.2004.9698768
- [32] Baldovini, N., Lavoine-Hanneguelle, S., Ferrando, G., Dusart, G., & Lizzani-Cuvelier, L. (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry*, 66(14), 1651-1655. doi:10.1016/j.phytochem.2005.04.040
- [33] Delgado, F. (2010). *Conservação e valorização de Asphodelus bento-rainhae P.Silva e Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas -Martínez da Beira Interior*. (Doutoramento), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- [34] Zuzarte, M., Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vaz, S., . . . Salgueiro, L. (2012). *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. *Food Chemistry*, 135(3), 1505-1510. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.090
- [35] Franco, J. d. A. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)* (Vol. 2). Lisboa Editora, Portugal.
- [36] Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., & Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 580-587. doi:10.1016/j.indcrop.2010.07.010
- [37] Zuzarte, M., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Dinis, A. M., Canhoto, J. M., & Salgueiro, L. R. (2009). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. *Chemistry & Biodiversity*, 6(8), 1283-1292. doi:10.1002/cbdv.200800170
- [38] Nogueira, J. M., & Romano, A. (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochem Anal*, 13(1), 4-7. doi:10.1002/pca.609

-
- [39] Gonçalves, S., Serra, H., Nogueira, J. M. F., Almeida, R., Custódio, L., & Romano, A. (2008). Headspace-SPME of *in vitro* shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Biologia Plantarum*, 52(1), 133-136.
- [40] Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M. J., . . . Salgueiro, L. (2011). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 612-618.
- [41] Costa, P., Grosso, C., Gonçalves, S., Andrade, P. B., Valentão, P., Bernardo-Gil, M. G., & Romano, A. (2012). Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chemistry*, 135, 112-121.
- [42] Negro, C., Notarnicola, S., De Bellis, L., & Miceli, A. (2013). Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* from Southern Italy (Apulia). *Nat Prod Res*, 27(4-5), 331-339. doi:10.1080/14786419.2012.691495
- [43] Hammer, K., Laghetti, G., & Pistrick, K. (2005). *Calamintha nepeta* (L.) Savi and *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch cultivated in Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(2), 215-219. doi:10.1007/s10722-004-1500-1
- [44] Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Goncalves, M. J., . . . Salgueiro, L. (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Nat Prod Res*, 24(18), 1734-1742. doi:10.1080/14786410903108944
- [45] Araniti, F., Lupini, A., Sorgona, A., Statti, G. A., & Abenavoli, M. R. (2013). Phytotoxic activity of foliar volatiles and essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Nat Prod Res*, 27(18), 1651-1656. doi:10.1080/14786419.2012.746337
- [46] Araniti, F., Grana, E., Reigosa, M. J., Sanchez-Moreiras, A. M., & Abenavoli, M. R. (2013). Individual and joint activity of terpenoids, isolated from *Calamintha nepeta* extract, on *Arabidopsis thaliana*. *Nat Prod Res*, 27(24), 2297-2303. doi:10.1080/14786419.2013.827193
- [47] Formisano, C., Oliviero, F., Rigano, D., Saab, A. M., & Senatore, F. (2014). Chemical composition of essential oils and in vitro antioxidant properties of extracts and essential oils of *Calamintha origanifolia* and *Micromeria myrtifolia*, two

- Lamiaceae from the Lebanon flora. *Industrial Crops and Products*, 62, 405-411. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.043
- [48] Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S.-P., Marciano, S., . . . Monaco, P. (2015). Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Research International*, 69(1), 121-132. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.019
- [49] Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., Barroso, J. G., Trindade, H., Sanches, J., Oliveira, C., & Correia, M. (2014). *Mentha pulegium* L. *Hortofruticultura & Floricultura*, 32-35.
- [50] Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L., & Silva, A. G. d. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, 408-413.
- [51] FLORA-ON. Flora de Portugal Interativa. Sociedade Portuguesa de Botânica. <https://flora-on.pt/>. Retrieved from <http://www.flora-on.pt>
- [52] Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100(2), 451-458. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.066
- [53] Yasa, H., Onar, H. Ç., & Yusufoglu, A. S. (2012). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bodrum, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 1040-1043. doi:10.1080/0972060x.2012.10662609
- [54] Mahboubi, M., & Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol*, 119(2), 325-327. doi:10.1016/j.jep.2008.07.023
- [55] Kintzios, S. E. (2002). *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. London: CRC Press.
- [56] Ortega-Ramirez, L. A., Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano (*Origanum* spp.) Oils. In V. R. Preedy (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 625-631). San Diego: Academic Press.

-
- [57] Vale-Silva, L., Silva, M. J., Oliveira, D., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., & Pinto, E. (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their *in vitro* activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *J Med Microbiol*, 61(Pt 2), 252-260. doi:10.1099/jmm.0.036988-0
- [58] Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., . . . Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J Sci Food Agric*, 93(11), 2707-2714. doi:10.1002/jsfa.6089
- [59] Méndez-Tovar, I., Martín, H., Santiago, Y., Ibeas, A., Herrero, B., & Asensio-S.-Manzanera, M. C. (2015). Variation in morphological traits among *Thymus mastichina* (L.) L. populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(8), 1257-1267. doi:10.1007/s10722-015-0229-3
- [60] Salgueiro, L. R., Vila, R., Tomas, X., Canigueral, S., DaCunha, A. P., & Adzet, T. (1997). Composition and variability of the essential oils of *Thymus* species from section *mastichina* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(7), 659-672. doi:Doi 10.1016/S0305-1978(97)00046-X
- [61] Amiri, M. S., & Joharchi, M. R. (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(6), 621-635.
- [62] Tinoco, M. T., Martins, M. R., & Cruz-Morais, J. (2007). Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. *Revista de Ciências Agrárias*, pp. 448-454.
- [63] de Morais, L. A. S. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. bras*, 27(2), S4050-S4063.
- [64] Lima, H. R. P., Kaplan, M. A. C., & Cruz, A. (2003). Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*, 10(2), 71-77.
- [65] Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213-226. doi:10.1002/ffj.1875
-

- [66] Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel)*, 3(4), 1-16. doi:10.3390/medicines3040025
- [67] Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29-35. doi:10.1016/j.cofs.2015.07.003
- [68] Ferreira, A. R. A. (2014). *Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos*. (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- [69] Barata, A. M., Rocha, F. A., Lopes, V. M., Morgado, J., Maia, J., Bettencourt, E., . . . Figueiredo, A. C. (2011). Networking on Conservation and Use of Medicinal, Aromatic and Culinary Plants Genetic Resources in Portugal. *Xxviii International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (Ihc2010): A New Look at Medicinal and Aromatic Plants Seminar*, 925, 21-35.
- [70] Nogueira, M. T. D. (2007). Boas práticas agrícolas, de colheita e conservação de plantas medicinais. In J. B. Figueiredo AC, LG Pedro (Eds) (Ed.), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (3th ed., pp. 63-71). Lisboa, Portugal: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal.
- [71] Peter, K. V. (2001). *Handbook of herbs and spices* (Vol. 1). Cambridge CB1 6AH, England: Published by Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington.
- [72] Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53. doi:10.1111/1541-4337.12006
- [73] Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications*: CRC.
- [74] Zhao, C.-X., Liang, Y.-Z., Fang, H.-Z., & Li, X.-N. (2005). Temperature-programmed retention indices for gas chromatography–mass spectroscopy analysis of plant essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1096, 76-85.

-
- [75] Kaal, E., & Janssen, H. G. (2008). Extending the molecular application range of gas chromatography. *J Chromatogr A*, 1184(1-2), 43-60. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.114
- [76] Marriott, P. J., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936(1-2), 1-22. doi:10.1016/s0021-9673(01)01314-0
- [77] Oprean, R., Tamas, M., Sandulescu, R., & Roman, L. (1998). Essential oils analysis. I. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprints. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4-5), 651-657. doi:10.1016/S0731-7085(98)00283-0
- [78] Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2003). Modern developments in gas chromatography–mass spectrometrybased environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1000, 125-151.
- [79] Viegas, M. C., & Bassoli, D. G. (2007). Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Química Nova*, 30(8), 2031-2034. doi:10.1590/s0100-40422007000800040
- [80] Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 043101-043101 - 043101-043147. doi:10.1063/1.3653552
- [81] Inczedy, J., Lengyel, T., & Ure, A. M. (1998). *Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997*. Oxford: Blackwell Science.
- [82] Collins, C. H., Braga, G. L., & Bonato, P. S. (1995). *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 6ª ed. Campinas: Unicamp.
- [83] Cachet, T. (2012). IOFI recommended practice for the quantitative analysis of volatile flavouring substances using coupled gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring (SIM). *Flavour and Fragrance Journal*, 27(3), 224-226. doi:10.1002/ffj.3092

- [84] Jalali-Heravi, M., Moazeni, R. S., & Sereshti, H. (2011). Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2569-2576.
- [85] Prista, L. N., Alves, A. C., & Morgado, R. M. R. (1991). *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*. Lisboa, Portugal.
- [86] Infarmed. (2005). *Farmacopeia Portuguesa VIII*. Lisboa, Portugal: Infarmed, ed.
- [87] COE. (2007). *European Pharmacopoeia, 6th edition*. Strasbourg: Council of Europe (COE).
- [88] Martins, M. R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., & Cruz-Morais, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol*, 151(1), 485-492. doi:10.1016/j.jep.2013.10.063
- [89] Brevard, H., Cantergiani, E., Cachet, T., Chaintreau, A., Demyttenaere, J., French, L., . . . Sherlock, A. (2011). Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour and Fragrance Journal*, 26(5), n/a-n/a. doi:10.1002/ffj.2061
- [90] Davies, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*, 503, 1-24. doi:10.1016/s0021-9673(01)81487-4
- [91] Adams, R. P. (2004). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*: USA: Allured Publishing.
- [92] Sanz, J., Soria, A. C., & García-Vallejo, M. C. (2004). Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024, 139–146.
- [93] Lourenço, J. A. A. (2007). Destilação industrial de óleos essenciais. In J. B. Figueiredo AC, LG Pedro (Eds) (Ed.), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (3th ed., pp. 80-94). Lisboa, Portugal: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal.

-
- [94] Serafini, L. A., Santos, A. C. A., Touguinha, L. A., Agostini, G., & Dalfovo, V. (2002). *Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais*. Caxias do Sul: EDUCS.
- [95] Cunha, A. P. d., Roque, O., & Nogueira, M. (2012). *Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações*. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- [96] Garcia-Vallejo, M. I., Garcia-Vallejo, M. C., Sanz, J., Bernas, M., & Velasco-Negueruela, A. (1994). Necrodane (1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentana) derivatives in *Lavandula luisieri*, new compounds to the plant kingdom. *Phytochemistry*, 36, 43-45.
- [97] Sanz, J., Soria, A. C., & Garcia-Vallejo, M. C. (2004). Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1024(1-2), 139-146. doi:10.1016/j.chroma.2003.10.024
- [98] Matos, F., Miguel, M. G., Duarte, J., Venancio, F., Moiteiro, C., Correia, A. I. D., . . . Pedro, L. G. (2009). Antioxidant capacity of the essential oils from *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* grown in Algarve (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*, 21, 327-337.
- [99] González-Coloma, A., Martín-Benito, D., Mohamed, N., García-Vallejo, M. C., & Soria, A. C. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(8), 609-616. doi:10.1016/j.bse.2006.02.006
- [100] Garcia-Vallejo, M. C., Garcia-Vallejo, M. I., & Velasco-Negueruela, A. (1990). *Essential oils of genus Lavandula L. in Spain*. Paper presented at the Proceedings of the 11th International Congress of essential oils, fragrances and flavours. Chemistry analyses and structure, New Delhi. Índia.
- [101] Costa, P., Goncalves, S., Valentao, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M., & Romano, A. (2013). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chem*, 141(3), 2501-2506. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.055
-

- [102] Negueruela, A. V., Perez-Alonso, M. J., Maria, J., & Rico, M. M. (1987). Essential oil of Iberian Lamiaceae with pulegone as basic component. *Anales de Bromatologia*, 39, 357-372.
- [103] Akgül, A., Pooter, H. L. d., & Buyck, L. F. d. (1991). The essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and ssp. *glandulosa* and *Ziziphora clinopodioides* from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 3, 7-10.
- [104] Risstorcelli, D., Tomi, F., & Casanova, J. (1996). Essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and subsp. *glandulosa* from Corsica (France). *Journal of Essential Oil Research*, 8, 363-366.
- [105] Flamini, G., Cioni, P. L., Puleio, R., Morelli, I., & Panizzi, L. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother Res*, 13(4), 349-351.
doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199906)13:4<349::AID-PTR446>3.0.CO;2-Z
- [106] Cozzolino, F., Fellous, R., Vernin, G., & Parkanyi, C. (2000). GC/MS analysis of the volatile constituents of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* from Southeastern France. *Journal of Essential Oil Research*, 12(4), 481-486.
doi:10.1080/10412905.2000.9699571
- [107] Couladis, M., & Tzakou, O. (2001). Essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 13(1), 11-12.
- [108] Kitic, D., Palic, R., Stojanovic, G., Ristic, M., & Jovanovic, T. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball from Montenegro. *Journal of Essential Oil Research*, 14, 150-150. doi:10.1080/10412905.2002.9699802
- [109] Kitic, D., Stojanovic, G., Palic, R., & Randjelovic, V. (2005). Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 701-703. doi:10.1080/10412905.2005.9699036
- [110] Fraternale, D., Giamperi, L., Ricci, D., & Manunta, A. (1998). Composition of the essential oil as a taxonomic marker for *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta*. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 568-570.

-
- [111] Miguel, G., Caçador, H., Faleiro, M., Galego, L., Almeida, V., & Costa, M. (2006). *Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Origanum spp. and Calamintha baetica*. Paper presented at the Conference Traditional Food Processing and Technological Innovation in Peripheral Regions, Faro-Portugal.
- [112] Galego, L., Almeida, V., Goncalves, V., Costa, M., Monteiro, I., Matos, F., & Miguel, G. (2008). Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina*, and *Calamintha baetica*. *Proceedings of the International Symposium on Plants as Food and Medicine: The Utilization and Development of Horticultural Plants for Human Health*, 765(765), 325-333. doi:10.17660/ActaHortic.2008.765.43
- [113] Baser, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Tarımcılar, G., & Kaynak, G. (1999). Essential Oils of *Mentha* Species from Northern Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 11(5), 579-588. doi:10.1080/10412905.1999.9701218
- [114] Telci, I., Sahbaz, N. I., Yilmaz, G., & Tugay, M. E. (2004). Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. *Economic Botany*, 58(4), 721-728.
- [115] Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabaci, O., & Kacar, O. (2010). Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 588-592. doi:10.1016/j.indcrop.2010.07.009
- [116] Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., & De Feo, V. (2015). *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20(8), 14402-14424. doi:10.3390/molecules200814402
- [117] Kokkini, S., Karousou, T. R., & Lanaras, T. (1995). Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the Island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(4), 425-430.
- [118] Chauhan, R. S., Kaul, M. K., Shahi, A. K., Kumar, A., Ram, G., & Tawa, A. (2009). Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 654-656. doi:10.1016/j.indcrop.2008.12.003
-

- [119] Sarer, E., Toprak, S. Y., Otlu, B., & Durmaz, R. (2011). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Mentha spicata* L. subsp *spicata*. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1), 105-108.
- [120] 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. *J Phcog*, 3(1), 39-44.
- [121] Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., & Canigueral, S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 519-524. doi:10.1590/S1516-89132002000600016
- [122] Rodríguez-Solana, R., Daferera, D. J., Mitsi, C., Trigas, P., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Comparative chemotype determination of Lamiaceae plants by means of GC–MS, FT-IR, and dispersive-Raman spectroscopic techniques and GC-FID quantification. *Industrial Crops and Products*, 62, 22-33. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.003
- [123] Fleisher, A., & Sneer, N. (1982). Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(5), 441-446. doi:10.1002/jsfa.2740330508
- [124] Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., & Johnson, C. B. (1999). A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry*, 52(4), 649-657. doi:10.1016/s0031-9422(99)00268-x
- [125] Mockute, D., Bernotiene, G., & Judzentiene, A. (2003). The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(3), 269-278. doi:10.1016/s0305-1978(02)00151-5
- [126] Kofidis, G., Bosabalidis, A. M., & Moustakas, M. (2003). Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). *Ann Bot*, 92(5), 635-645. doi:10.1093/aob/mcg180
- [127] Pande, C., Tewari, G., Singh, S., & Singh, C. (2012). Chemical markers in *Origanum vulgare* L. from Kumaon Himalayas: a chemosystematic study. *Nat Prod Res*, 26(2), 140-145. doi:10.1080/14786419.2010.535150

-
- [128] Carmo, M. M., Frazão, S., & Venancio, F. (1989). The chemical composition of portuguese *Origanum vulgare* oils. *Journal of Essential Oil Research*, 1(2), 69-71. doi:10.1080/10412905.1989.9697753
- [129] Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venancio, F., Teixeira, A., . . . Pedro, L. G. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *J Agric Food Chem*, 53(21), 8162-8168. doi:10.1021/jf0510079
- [130] Moldão-Martins, M., Beirão-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. g., & Luísa Beirão-da-Costa, M. (2004). Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha × piperita* and *Thymus mastichina* L. *Food Quality and Preference*, 15(5), 447-452. doi:10.1016/j.foodqual.2003.08.001
- [131] Mota, A. S., Martins, M. R., Arantes, S., Lopes, V. R., Bettencourt, E., Pombal, S., . . . Silva, L. A. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* fruits. *Nat Prod Commun*, 10(4), 673-676.
- [132] Telci, I., Demirtas, I., & Sahin, A. (2009). Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 126-130. doi:10.1016/j.indcrop.2009.02.010
- [133] Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44, 437-445. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.012
- [134] Khalid, S., Mhamed, R., Mohammed, B., Chakib, A., & Lhoussaine, E. R. (2014). Chemical composition and bioactivity of essential oils of seed and leaf from *Foeniculum vulgare* Mill cultivated in Southeast of Morocco. *JNSR*, 4(17), 33-39.
- [135] Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H., & Xu, J. G. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35(1), 109-116. doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.056
-

- [136] Pasrija, A., Singh, R., & Katiyar, C. K. (2011). Standardization of Fennel (*Foeniculum vulgare*), Its Oleoresin and Marketed Ayurvedic Dosage Forms. *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.*, 3(3), 265-269.
- [137] Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. doi:10.1016/j.indcrop.2014.05.055
- [138] Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Trouillas, J., & Remmal, A. (2004). Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(5), 909-914. doi:10.1093/jac/dkh436
- [139] Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Plantas aromáticas e medicinais: Factores que afectam a produção. In J. B. Figueiredo AC, LG Pedro (Ed.), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (3th ed., pp. 1-18). Lisboa, Portugal: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal.
- [140] Croteau, R., Munck, S. L., Akoh, C. C., Fisk, H. J., & Satterwhite, D. M. (1987). Biosynthesis of the sesquiterpene patchoulol from farnesyl pyrophosphate in leaf extracts of *Pogostemon cablin* (patchouli): mechanistic considerations. *Arch Biochem Biophys*, 256(1), 56-68.
- [141] Khatri, M. (2013). Circulating biomarkers of oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia and efficacy of antioxidant supplementation. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 2(3), 304-310.
- [142] Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What Is Oxidative Stress? *Journal of the Japan Medical Association*, 45(7), 271-276.
- [143] Rashid, K., Sinha, K., & Sil, P. C. (2013). An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol*, 62, 584-600. doi:10.1016/j.fct.2013.09.026
- [144] Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., . . . Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 55-99.

-
- [145] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
- [146] Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*, 7(2), 97-110. doi:10.1016/j.drug.2004.01.004
- [147] Hussain, S. P., Hofseth, L. J., & Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(4), 276-285. doi:10.1038/nrc1046
- [148] Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., . . . Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact*, 188(2), 334-339. doi:10.1016/j.cbi.2010.07.010
- [149] Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J*, 173(3), 502-511. doi:10.1016/j.tvjl.2006.06.005
- [150] Niki, E. (2012). Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Letters*, 586, 3767-3770.
- [151] Perrone, S., Salvi, G., Bellieni, C. V., & Buonocore, G. (2007). Oxidative stress and nutrition in the preterm newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45 Suppl 3, S178-182. doi:10.1097/01.mpg.0000302968.83244.d2
- [152] Yang, S., Feskanich, D., Willett, W. C., Eliassen, A. H., & Wu, T. (2014). Association Between Global Biomarkers of Oxidative Stress and Hip Fracture in Postmenopausal Women: A Prospective Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(12), 2577-2583.
- [153] Schraufstatter, I., Hyslop, P. A., Jackson, J. H., & Cochrane, C. G. (1988). Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest*, 82(3), 1040-1050. doi:10.1172/JCI113660
- [154] Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream
-

- antioxidant therapeutic options. *Curr Neuroparmacol*, 7(1), 65-74.
doi:10.2174/157015909787602823
- [155] Shibamoto, T. (2006). Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *J Pharm Biomed Anal*, 41(1), 12-25. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.047
- [156] Nunes, X. P., Silva, F. S., Almeida, J. R. G. d. S., Ribeiro, L. A. d. A., Lima, J. T. d., Júnior, L. J. Q., & Filho, M. B. (2012). Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. In D. V. Rao (Ed.), *Phytochemicals as Nutraceuticals – Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health* (Vol. 2012, pp. 278). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Brazil: InTech.
- [157] Albano, S. M., Lima, A. S., Miguel, M. G., Pedro, L. G., Barroso, J. G., & Figueiredo, A. C. (2012). Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants. *Records of Natural Products*, 6(1), 35-48.
- [158] Descalzo, A. M., & Sancho, A. M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 423-436.
- [159] Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release*, 113(3), 189-207. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.015
- [160] Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseon, F., Feinstein, D. L., . . . Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405. doi:10.1016/s1474-4422(15)70016-5
- [161] Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*, 4, 575-590. doi:10.1016/j.trci.2018.06.014
- [162] Sawikr, Y., Yarla, N. S., Peluso, I., Kamal, M. A., Aliev, G., & Bishayee, A. (2017). Chapter Two - Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals. In R. Donev (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 108, pp. 33-57): Academic Press.

-
- [163] Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., & Ceylan, R. (2016). Antioxidant Potential and Inhibition of Key Enzymes Linked to Alzheimer's Diseases and Diabetes Mellitus by Monoterpene-Rich Essential Oil from *Sideritis galatica* Bornm. Endemic to Turkey. *Records of Natural Products*, 10(2), 195-206.
- [164] 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. *Prim Care Companion CNS Disord*, 15(2), 20. doi:10.4088/PCC.12r01412
- [165] Savelev, S. U., Okello, E. J., & Perry, E. K. (2004). Butyryl- and acetylcholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res*, 18(4), 315-324. doi:10.1002/ptr.1451
- [166] Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., & Stankiewicz, M. (2017). Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System-A Review. *Molecules*, 23(1), 1-20. doi:10.3390/molecules23010034
- [167] Ayaz, M., Sadiq, A., Junaid, M., Ullah, F., Subhan, F., & Ahmed, J. (2017). Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. *Front Aging Neurosci*, 9(168), 1-16. doi:10.3389/fnagi.2017.00168
- [168] Owokotomo, I. A., Ekundayo, O., Abayomi, T. G., & Chukwuka, A. V. (2015). In-vitro anti-cholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. *Toxicol Rep*, 2, 850-857. doi:10.1016/j.toxrep.2015.05.003
- [169] Syad, A. N., & Devi, K. P. (2014). Botanicals: a potential source of new therapies for Alzheimer's disease? *Botanics: Targets and Therapy*, 2014(4), 11–26. doi:10.2147/btat.S33554
- [170] Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243. doi:10.3390/agriculture2030228
- [171] Benny, A., & Thomas, J. (2019). Essential Oils as Treatment Strategy for Alzheimer's Disease: Current and Future Perspectives. *Planta Med*, 85(3), 239-248. doi:10.1055/a-0758-0188
-

- [172] Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), 239-267. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851
- [173] Pérez-González, C., Pérez-Ramos, J., Alberto Méndez-Cuesta, C., Serrano-Vega, R., Martell-Mendoza, M., & Pérez-Gutiérrez, S. (2019). Cytotoxic Activity of Essential Oils of Some Species from Lamiaceae Family. In *Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds* (pp. 1-16).
- [174] Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., . . . Maxwell, C. A. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol*, 35 Suppl, S5-S24. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.005
- [175] Mansano-Schlosser, T. C., & Ceolim, M. F. (2012). Qualidade de vida de pacientes com câncer no período de quimioterapia. *Texto contexto - enferm*, 21(3), 600-607. doi:10.1590/S0104-07072012000300015
- [176] Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., & Marques, M. P. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*, 26(6), 747-766. doi:10.1002/med.20060
- [177] Graßmann, J. (2005). Terpenoids as Plant Antioxidants. In G. Litwack (Ed.), *Plant Hormones* (Vol. 72, pp. 505-535): Academic Press.
- [178] Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., & Pires, I. M. (2018). Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-12. doi:10.1155/2018/3149362
- [179] Pavithra, P. S., Mehta, A., & Verma, R. S. (2019). Essential oils: from prevention to treatment of skin cancer. *Drug Discov Today*, 24(2), 644-655. doi:10.1016/j.drudis.2018.11.020
- [180] Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. *Biomed Research International*, 2014, 1-23. doi:10.1155/2014/154106

-
- [181] Tepe, B., Daferera, D., Tepe, A.-S., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. *Food Chemistry*, 103, 1358-1364.
- [182] Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6), 307-315.
- [183] Arantes, S., Picarra, A., Candeias, F., Caldeira, A. T., Martins, M. R., & Teixeira, D. (2017). Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo. Full article and supplementary material. *Nat Prod Res*, 31(18), 2183-2187 and S2181-S2188. doi:10.1080/14786419.2017.1278598
- [184] Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., . . . Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol*, 45(11), 2287-2295. doi:10.1016/j.fct.2007.06.004
- [185] Silva, E. R. d., Martino, H. S. D., Moreira, A. V. B., Arriel, N. H. C., Silva, A. C., & Ribeiro, S. M. R. (2011). Antioxidant capacity and chemical composition of whole grains of cream and black sesame. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, 46(7), 736-742.
- [186] Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., & Linssen, J. P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 140-146. doi:Doi 10.1002/(Sici)1097-0010(199805)77:1<140::Aid-Jsfa18>3.3.Co;2-B
- [187] Deciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castaneda-Corral, G., Angeles-Lopez, G. E., Navarrete, A., & Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, 110(2), 334-342. doi:10.1016/j.jep.2006.10.001
- [188] Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food Chemistry*, 92(1), 89-92. doi:10.1016/j.foodchem.2004.07.016

-
- [189] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7(2), 88-95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- [190] 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), 261-264. doi:10.1016/j.jep.2003.08.008
- [191] Lewalter, J., & Domik, C. (2002). Acetylcholinesterase (AChE; Acetylcholine-Acetylhydrolase EC 3.1. 1.7) and Cholinesterase (ChE; Acylcholine-Acylhydrolase EC 3.1. 1.8)[Biomonitoring Methods, 1991]. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety: Annual Thresholds and Classifications for the Workplace*, 45-61. doi:10.1002/3527600418.bi900081e0003
- [192] Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8-9), 581-588. doi:10.1016/j.phymed.2009.12.008
- [193] Luo, H., Wang, F., Bai, Y., Chen, T., & Zheng, W. (2012). Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 94, 304-308. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.02.006
- [194] Mota, I., Rodrigues Pinto, P. C., Novo, C., Sousa, G., Guerreiro, O., Guerra, Â. R., . . . Rodrigues, A. E. (2012). Extraction of Polyphenolic Compounds from *Eucalyptus globulus* Bark: Process Optimization and Screening for Biological Activity. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(20), 6991-7000. doi:10.1021/ie300103z
- [195] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- [196] Lü, L., Zhang, L., Wai, M., Yew, D., & Xu, J. (2012). Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*, 26, 636-644. doi:10.1016/j.tiv.2012.02.006

-
- [197] Wang, S., Yu, H., & Wickliffe, J. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro*, 25, 2147-2151.
- [198] Sun, S. H., Huang, H. C., Huang, C., & Lin, J. K. (2012). Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. *Eur J Pharmacol*, 690(1-3), 22-30. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.036
- [199] Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B., & Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106(3), 929-936. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.006
- [200] Dutta, R. K., & Maharia, R. S. (2012). Antioxidant responses of some common medicinal plants grown in copper mining areas. *Food Chemistry*, 131(1), 259-265. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.075>
- [201] Roginsky, V., & A. Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235–254.
- [202] Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K.-W., Heo, M.-S., Yeo, I.-K., Lee, Y.-D., & Jeon, Y.-J. (2005). Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*, 220, 363-371.
- [203] Albano, S. M., & Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 338-343. doi:10.1016/j.indcrop.2010.11.012
- [204] González-Coloma, A., Delgado, F., Rodilla, J. M., Silva, L., Sanz, J., & Burillo, J. (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 1-8.
- [205] Pombal, S., Rodrigues, C. F., Araujo, J. P., Rocha, P. M., Rodilla, J. M., Diez, D., . . . Silva, L. A. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of Portuguese *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martinez and its relation with their chemical composition. *Springerplus*, 5(1), 1-11. doi:10.1186/s40064-016-3415-7
-

- [206] 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), 778-786. doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.017
- [207] Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., HA, A. L., Rezzoug, M., Gherib, A., & Flamini, G. (2018). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 201-207. doi:10.1186/s12906-018-2274-x
- [208] Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., . . . Ji, P. (2019). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. *Molecules*, 24(15), 1-16. doi:10.3390/molecules24152825
- [209] Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633-640. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.024
- [210] Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., & Boskou, D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift fr Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 197(1), 20-23. doi:10.1007/bf01202694
- [211] Tsimidou, M., & Boskou, D. (1994). Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi* (pp. 273–284). Amsterdam: Elsevier.
- [212] Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruberto, G. (1998). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10(6), 618-627. doi:10.1080/10412905.1998.9700989
- [213] Ruberto, G., Baratta, M. T., Sari, M., & Kaâbeche, M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 251-254. doi:10.1002/ffj.1101

-
- [214] Puertas-Mejía, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., & Winterhalter, P. (2002). *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(5), 380-384. doi:10.1002/ffj.1110
- [215] Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2018). Thymus mastichina L. essential oils from Murcia (Spain): Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities. *PLoS ONE*, 13(1), e0190790. doi:10.1371/journal.pone.0190790
- [216] Miguel, M. G., Falcato-Simoes, M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. M. G., Pedro, L. G., & Carvalho, L. M. (2005). Evaluation of the Antioxidant Activity of Thymbra Capitata, Thymus Mastichina and Thymus Camphoratus Essential Oils. *Journal of Food Lipids*, 12(3), 181-197. doi:10.1111/j.1745-4522.2005.00015.x
- [217] Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., & Codina, C. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J Agric Food Chem*, 56(6), 1912-1920. doi:10.1021/jf073083c
- [218] Mohamad, R. H., El-Bastawesy, A. M., Abdel-Monem, M. G., Noor, A. M., Al-Mehdar, H. A., Sharawy, S. M., & El-Merzabani, M. M. (2011). Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*). *J Med Food*, 14(9), 986-1001. doi:10.1089/jmf.2008.0255
- [219] Choi, E. M., & Hwang, J. K. (2004). Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*, 75(6), 557-565. doi:10.1016/j.fitote.2004.05.005
- [220] Miguel, M. G., Cruz, C., Faleiro, L., Simoes, M. T., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2010). Foeniculum vulgare essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Commun*, 5(2), 319-328.
- [221] Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69(2), 167-174. doi:10.1016/s0308-8146(99)00247-2
- [222] Shahat, A. A., Ibrahim, A. Y., Hendawy, S. F., Omer, E. A., Hammouda, F. M., Abdel-Rahman, F. H., & Saleh, M. A. (2011). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically
-

- cultivated fennel cultivars. *Molecules*, 16(2), 1366-1377.
doi:10.3390/molecules16021366
- [223] Lobo, A. P., García, Y. D., Sánchez, J. M., Madrera, R. R., & Valles, B. S. (2009). Phenolic and antioxidant composition of cider. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 644-648.
- [224] Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- [225] Smeriglio, A., Alloisio, S., Raimondo, F. M., Denaro, M., Xiao, J., Cornara, L., & Trombetta, D. (2018). Essential oil of Citrus lumia Risso: Phytochemical profile, antioxidant properties and activity on the central nervous system. *Food Chem Toxicol*, 119, 407-416. doi:10.1016/j.fct.2017.12.053
- [226] Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
doi:10.3390/molecules15129252
- [227] Dohi, S., Terasaki, M., & Makino, M. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J Agric Food Chem*, 57(10), 4313-4318. doi:10.1021/jf804013j
- [228] Ferreira, A., Proenca, C., Serralheiro, M. L., & Araujo, M. E. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*, 108(1), 31-37.
doi:10.1016/j.jep.2006.04.010
- [229] Murray, A. P., Faraoni, M. B., Castro, M. J., Alza, N. P., & Cavallaro, V. (2013). Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol*, 11(4), 388-413.
doi:10.2174/1570159X11311040004
- [230] Perry, N. S., Houghton, P. J., Theobald, A., Jenner, P., & Perry, E. K. (2000). In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol*, 52(7), 895-902. doi:10.1211/0022357001774598

-
- [231] Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S., Wilkins, R. M., & Perry, E. K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol Biochem Behav*, 75(3), 661-668. doi:10.1016/S0091-3057(03)00125-4
- [232] Bonesi, M., Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M. R., Conforti, F., Passalacqua, N. G., . . . Menichini, F. (2010). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(5), 622-628. doi:10.3109/14756360903389856
- [233] Fujiwara, M., Yagi, N., & Miyazawa, M. (2010). Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Baker (yellow batai) and Bisabolane-type sesquiterpenoids. *J Agric Food Chem*, 58(5), 2824-2829. doi:10.1021/jf9042387
- [234] Miyazawa, M., & Yamafuji, C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J Agric Food Chem*, 53(5), 1765-1768. doi:10.1021/jf040019b
- [235] Souza, S. P. d., Valverde, S. S., Silva, R. L. N. R. d., Lima, K. S. C., & Lima, A. L. S. (2012). Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. *Revista Fitos*, 7(4), 259-266.
- [236] Hakkim, F. L., Al-Buloshi, M., & Achankunju, J. (2016). Chemical composition and anti-proliferative effect of Oman's *Ganoderma applanatum* on breast cancer and cervical cancer cells. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(2), 145-151. doi:10.1016/j.jtumed.2016.01.007
- [237] Aras, A., Iqbal, M. J., Naqvi, S. K., Gercek, Y. C., Boztas, K., Gasparri, M. L., . . . Farooqi, A. A. (2014). Anticancer activity of essential oils: targeting of protein networks in cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(19), 8047-8050. doi:10.7314/apjcp.2014.15.19.8047
- [238] Bayala, B., Bassole, I. H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J. M., & Simpore, J. (2014). Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research*, 4(6), 591-607.
- [239] Bhalla, Y., Gupta, V. K., & Jaitak, V. (2013). Anticancer activity of essential oils: a review. *J Sci Food Agric*, 93(15), 3643-3653. doi:10.1002/jsfa.6267
-

- [240] Farooqi, A. A., Sohail, R., Fayyaz, S., & Shatynska-Mytsyk, I. (2015). Clinical Advances in Anticancer Essential Oils. In P. D. de Sousa (Ed.), *Bioactive Essential Oils and Cancer* (pp. 125-133). Cham: Springer International Publishing.
- [241] Lesgards, J. F., Baldovini, N., Vidal, N., & Pietri, S. (2014). Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother Res*, 28(10), 1423-1446. doi:10.1002/ptr.5165
- [242] Ong, T. P. (2015). Dietary Essential Oils and Cancer Chemopreventive Potential. In P. D. de Sousa (Ed.), *Bioactive Essential Oils and Cancer* (pp. 237-250). Cham: Springer International Publishing.
- [243] Salazar, A. T., Hoheisel, J., Youns, M., & Wink, M. (2011). Anti-inflammatory and anti-cancer activities of essential oils and their biological constituents. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49(1), 93-95.
- [244] Doll-Boscardin, P. M., Sartoratto, A., Sales Maia, B. H., Padilha de Paula, J., Nakashima, T., Farago, P. V., & Kanunfre, C. C. (2012). In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012, 342652. doi:10.1155/2012/342652
- [245] Zhong, Z. C., Zhao, D. D., Liu, Z. D., Jiang, S., & Zhang, Y. L. (2017). A New Human Cancer Cell Proliferation Inhibition Sesquiterpene, Dryofraterpene A, from Medicinal Plant *Dryopteris fragrans* (L.) Schott. *Molecules*, 22(180), 2-7. doi:10.3390/molecules22010180
- [246] Carvalho, A. A., Andrade, L. N., de Sousa, E. B., & de Sousa, D. P. (2015). Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. *Biomed Research International*, 2015, 392674. doi:10.1155/2015/392674
- [247] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3), 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- [248] Nunes, R., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Szewczyk, A., Szlosarczyk, M., & Carvalho, I. S. (2017). Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. *Pharm Biol*, 55(1), 114-123. doi:10.1080/13880209.2016.1230636

-
- [249] Ali, M. A., Abul Farah, M., Al-Hemaid, F. M., & Abou-Tarboush, F. M. (2014). In vitro cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3981-3990. doi:10.4238/2014.May.23.9
- [250] Tayarani-Najaran, Z., Amiri, A., Karimi, G., Emami, S. A., Asili, J., & Mousavi, S. H. (2014). Comparative studies of cytotoxic and apoptotic properties of different extracts and the essential oil of *Lavandula angustifolia* on malignant and normal cells. *Nutr Cancer*, 66(3), 424-434. doi:10.1080/01635581.2013.878736
- [251] Zhao, Y., Chen, R., Wang, Y., Qing, C., Wang, W., & Yang, Y. (2017). In Vitro and In Vivo Efficacy Studies of Lavender *angustifolia* Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 16(2), 215-226. doi:10.1177/1534735416645408
- [252] Gezici, S. (2018). Promising anticancer activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil through induction of both apoptosis and necrosis. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*, 7(2), 38-45. doi:10.21276/ap.2018.7.2.5
- [253] Niksic, H., Kovac-Besovic, E., Sober, M., Mulabegovic, N., Kralj, M., & Duric, K. (2016). Phytochemical and pharmacological (antiproliferative) effects of essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Lamiaceae. *Planta Medica*, 82(S 01), P323. doi:10.1055/s-0036-1596452
- [254] Niksic, H., Kovac-Besovic, E., Omeragic, E., Muratovic, S., Kusturica, J., & Duric, K. (2017). Antiproliferative, antimicrobial, and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil. *Journal of Health Sciences*, 7(1), 35-43. doi:10.17532/jhsci.2017.412
- [255] Mesquita, L. S. S. d., Luz, T. R. S. A., Mesquita, J. W. C. d., Coutinho, D. F., Amaral, F. M. M. d., Ribeiro, M. N. d. S., & Malik, S. (2019). Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Reviews International*, 35(2), 105-131. doi:10.1080/87559129.2018.1467443
- [256] Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225-232. doi:10.1016/j.indcrop.2014.07.011
-

- [257] Mantovani, A. L. L., Vieira, G. P. G., Cunha, W. R., Groppo, M., Santos, R. A., Rodrigues, V., . . . Crotti, A. E. M. (2013). Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(6), 877-884. doi:Doi 10.1590/S0102-695x2013000600004
- [258] Donadu, M. G., Usai, D., Mazzarello, V., Molicotti, P., Cannas, S., Bellardi, M. G., & Zanetti, S. (2017). Change in Caco-2 cells following treatment with various lavender essential oils. *Nat Prod Res*, 31(18), 2203-2206. doi:10.1080/14786419.2017.1280489
- [259] Marrelli, M., Statti, G. A., & Conforti, F. (2018). *Origanum* spp.: an update of their chemical and biological profiles. *Phytochemistry Reviews*, 17(4), 873-888. doi:10.1007/s11101-018-9566-0
- [260] Leyva-Lopez, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 22(6), 1-24. doi:10.3390/molecules22060989
- [261] Kang, S. H., Kim, Y. S., Kim, E. K., Hwang, J. W., Jeong, J. H., Dong, X., . . . Park, P. J. (2016). Anticancer Effect of Thymol on AGS Human Gastric Carcinoma Cells. *J Microbiol Biotechnol*, 26(1), 28-37. doi:10.4014/jmb.1506.06073
- [262] Islam, M. T., Khalipha, A. B. R., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S. Z., Uddin, S. J., . . . Rouf, R. (2019). Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life*, 71(1), 9-19. doi:10.1002/iub.1935
- [263] Aydin, E., Turkez, H., Tasdemir, S., & Hacimuftuoglu, F. (2017). Anticancer, Antioxidant and Cytotoxic Potential of Thymol in vitro Brain Tumor Cell Model. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 17(2), 116-122. doi:10.2174/1871524916666160823121854
- [264] Grbovic, F., Stankovic, M. S., Curcic, M., Dordevic, N., Seklic, D., Topuzovic, M., & Markovic, S. (2013). In Vitro Cytotoxic Activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Plants (Basel)*, 2(3), 371-378. doi:10.3390/plants2030371

-
- [265] Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., . . . Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190. doi:10.1016/j.indcrop.2013.10.006
- [266] Miguel, M. G., Gago, C., Antunes, M. D., Megias, C., Cortes-Giraldo, I., Vioque, J., . . . Figueiredo, A. C. (2015). Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Essential Oils from *Thymbra capitata* and *Thymus* Species Grown in Portugal. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 851721. doi:10.1155/2015/851721
- [267] Cha, J.-D., Kim, Y.-H., & Kim, J.-Y. (2010). Essential oil and 1,8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. *Food Science and Biotechnology*, 19(1), 185-191. doi:10.1007/s10068-010-0025-y
- [268] Catauro, M., Bollino, F., Tranquillo, E., Sapio, L., Illiano, M., Caiafa, I., & Naviglio, S. (2017). Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania *Thymus Vulgaris* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 29(6), 461-470. doi:10.1080/10412905.2017.1351405
- [269] Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M. D., Biqiku, L., Bramucci, M., Lupidi, G., . . . Maggi, F. (2017). Essential Oil of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria: Chemotypification and in vitro Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 14(3), 1-9. doi:10.1002/cbdv.201600299
- [270] OMS. (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. In *World Health Organization* (29 April 2015 ed., pp. 42).
- [271] Gonzalez-Bello, C. (2017). Antibiotic adjuvants - A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(18), 4221-4228. doi:10.1016/j.bmcl.2017.08.027
- [272] Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004
- [273] Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and
-

- management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383-e392.
doi:10.1016/s1473-3099(17)30316-x
- [274] Poorabbas, B., Mardaneh, J., Rezaei, Z., Kalani, M., Pouladfar, G., Alami, M. H., . . . Alborzi, A. (2015). Nosocomial Infections: Multicenter surveillance of antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and Gram negative rods isolated from blood and other sterile body fluids in Iran. *Iran J Microbiol*, 7(3), 127-135.
- [275] Ribeiro, D. S., Melo, D. B., Guimaraes, A. G., & Velozo, E. S. (2012). Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2), 687-696.
doi:10.5433/1679-0359.2012v33n2p687
- [276] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., . . . Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia*. *Food Chemistry*, 103(4), 1449-1456. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.061
- [277] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2010). *Brock Biology of Microorganisms (13th Edition)* (13 th ed.). Southern Illinois University: Benjamin Cummings, 2010.
- [278] Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem*, 20(19), 5678-5698. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.045
- [279] Prescott, L. M. (2005). *Microbiology* (6th ed.): McGraw-Hill.
- [280] Rosado, T., Gil, M., Caldeira, A. T., Martins, M. R., Dias, C. B., Carvalho, L., . . . Candeias, A. E. (2014). Material Characterization and Biodegradation Assessment of Mural Paintings: Renaissance Frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal. *International Journal of Architectural Heritage*, 8(6), 835-852. doi:10.1080/15583058.2012.751466
- [281] Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.023

-
- [282] Dwivedy, A. K., Kumar, M., Upadhyay, N., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2016). Plant essential oils against food borne fungi and mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 11, 16-21. doi:10.1016/j.cofs.2016.08.010
- [283] Hashem, M., Moharam, A. M., Zaied, A. A., & Saleh, F. E. M. (2010). Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection*, 29(10), 1111-1117. doi:10.1016/j.cropro.2010.04.020
- [284] Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
- [285] Queiroga, M. C., Coelho, M. P., Arantes, S. M., Potes, M. E., & Martins, M. R. (2018). Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lamiaceae Aromatic Spices Towards Sheep mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(5), 1155-1165. doi:10.1080/0972060X.2018.1491330
- [286] Solorzano-Santos, F., & Miranda-Navales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, 23(2), 136-141. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005
- [287] Lis-Balchin, M., Deans, S. G., & Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2), 98-104. doi:10.1002/(sici)1099-1026(199803/04)13:2<98::Aid-ffj705>3.0.Co;2-b
- [288] Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In (Vol. 3, pp. 1143-1156).
- [289] Tabassum, N., & Vidyasagar, G. M. (2013). Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 19-28.
- [290] Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*, 10(10), 813-829. doi:10.2174/0929867033457719

- [291] Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119, 731-737.
- [292] Kumar, A., & Kudachikar, V. B. (2017). Antifungal properties of essential oils against anthracnose disease: a critical appraisal. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125(2), 133-144. doi:10.1007/s41348-017-0128-2
- [293] Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(6), 1914-1920.
- [294] Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., . . . von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590-3595. doi:10.1021/jf980154m
- [295] Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*, 10(86), 1-20. doi:10.3390/ph10040086
- [296] Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., . . . Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog*, 134, 103580. doi:10.1016/j.micpath.2019.103580
- [297] Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*, 88(1), 170-175.
- [298] Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88(2), 308-316. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x
- [299] Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, 91(3), 453-462.

-
- [300] Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568. doi:10.1128/aem.68.4.1561-1568.2002
- [301] Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., & Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol*, 174(4), 233-238. doi:10.1007/s002030000199
- [302] Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595.
- [303] Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, N., Weigand, N., & Weis, H. M. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119-128.
- [304] Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*, 59(2), 201-222.
- [305] Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmatic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, 49(4), 359-378.
- [306] Conner, D. E., & Beuchat, L. R. (1984). Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeasts. *Journal of Food Science*, 49(2), 429-434. doi:10.1111/j.1365-2621.1984.tb12437.x
- [307] Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112(4), 874-879. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.061
- [308] Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility. Tests for Bacteria Isolated From Animals, 22 C.F.R. (2008).
- [309] Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 23 C.F.R. (2003).
- [310] NCCLS. (2009). Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. *Approved Standard 10th Edition, NCCLS document M2-A9*, 29.
-

- [311] Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*, 18(6), 435-448. doi:10.1002/ptr.1465
- [312] Aboul Ela, M. A., el-Shaer, N. S., & Ghanem, N. B. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 51(12), 993-994.
- [313] Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 29 C.F.R. (2009).
- [314] Naghetini, C. C. (2006). *Caracterização físico-química e actividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma*. (MSc), Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia da UFMG Belo Horizonte, MG.
- [315] Boukhebt, H., Chaker, A., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3, 267-275.
- [316] Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111-119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- [317] Bozovic, M., & Ragno, R. (2017). *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, 22(2), 290-340. doi:10.3390/molecules22020290
- [318] Vieira, M., Bessa, L. J., Martins, M. R., Arantes, S., Teixeira, A. P. S., Mendes, A., . . . Belo, A. D. F. (2017). Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chemistry & Biodiversity*, 14(6), 1-12. doi:10.1002/cbdv.201700006
- [319] Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 13-39. doi:10.1002/ffj.2082

-
- [320] Rodríguez, A., Batlle, R., & Nerín, C. (2007). The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings*, 60, 33-38.
- [321] Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., & Dykes, G. A. (2010). *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21(10), 1408-1414.
- [322] Koroch, A. R., Rodolfo Juliani, H., & Zygodlo, J. A. (2007). Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In R. G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances* (pp. 87-115). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [323] Nazemiyeh, H., Lotfipoor, F., Delazar, A., Razavi, S. M., Asnaashari, S., Kasebi, N., . . . Sarker, S. D. (2011). Chemical Composition, and Antibacterial and Free-Radical-Scavenging Activities of the Essential Oils of a Citronellol Producing New Chemotype of *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak. *Records of Natural Products*, 5(3), 184-192.
- [324] Koziol, A., Stryjewska, A., Librowski, T., Salat, K., Gawel, M., Moniczewski, A., & Lochynski, S. (2014). An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. *Mini Rev Med Chem*, 14(14), 1156-1168.
- [325] Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I., & Michel, G. (1996). Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Med*, 62(3), 275-277. doi:10.1055/s-2006-957877
- [326] Murthy, H. N., Hanamanthagouda, M. S., Kakkalameli, S. B., Naik, P. M., Nagella, P., & Seetharamareddy, H. R. (2010). Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 118, 836-839.
- [327] Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Cieciewicz, J., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2011). Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med Chem*, 7(6), 674-689.
- [328] Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 6(39), 39. doi:10.1186/1472-6882-6-39

- [329] Zuzarte, M., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M. J., . . . Sagueiro, L. (2011). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. *J Med Microbiol*, 60(Pt 5), 612-618. doi:10.1099/jmm.0.027748-0
- [330] Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, 96, 15-25. doi:10.1016/j.phytochem.2013.08.005
- [331] Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., . . . Mliki, A. (2013). Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 49, 883-889. doi:10.1016/j.indcrop.2013.06.032
- [332] Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., . . . Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45(1), 313-319. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.004
- [333] Oliveira, J. L. T. M. d., Diniz, M. d. F. M., Lima, E. d. O., Souza, E. L. d., Trajano, V. N., & Santos, B. H. C. (2009). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 45-50. doi:10.1590/s1516-89132009000100006
- [334] de Souza, E. L., de Barros, J. C., de Oliveira, C. E., & da Conceicao, M. L. (2010). Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 137(2-3), 308-311. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.025
- [335] Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., & Perea, A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Apmis*, 113(1), 1-6. doi:10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130101.x
- [336] Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., . . . Geissler, M. (2009). Correlation of Antimicrobial Activities of Various Essential Oils and Their Main Aromatic Volatile Constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5), 459-463. doi:10.1080/10412905.2009.9700218

-
- [337] Pina-Vaz, C., Goncalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., . . . Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 18(1), 73-78. doi:10.1111/j.1468-3083.2004.00886.x
- [338] Lattaoui, N., & Tantaoui-Elaraki, A. (1994). Individual and combined antibacterial activity of the main constituents of three essential oils. *EPPOS*, 3, 13-19.
- [339] Cosentino, S., Tuberoso, C. I., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol*, 29(2), 130-135. doi:10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x
- [340] Faleiro, L., Miguel, G. M., Guerrero, C. A. C., & Brito, J. M. C. (1999). Antimicrobial, activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L) L. ssp. *Mastichina* and *Thymus albicans* Hofmanns & Link. *Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare Wocmap-2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicines, Toxicology*(501), 45-48. doi:10.17660/ActaHortic.1999.501.4
- [341] Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., . . . Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett Appl Microbiol*, 36(1), 35-40. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01259.x
- [342] Candy, K., Nicolas, P., Andriantsoanirina, V., Izri, A., & Durand, R. (2018). *In vitro* efficacy of five essential oils against *Pediculus humanus capitis*. *Parasitol Res*, 117(2), 603-609. doi:10.1007/s00436-017-5722-5
- [343] Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057-3064. doi:10.1016/j.foodres.2011.07.030
- [344] Janssen, A. M., Scheffer, J. J., & Baerheim Svendsen, A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med*, 53(5), 395-398. doi:10.1055/s-2006-962755

- [345] Hili, P., Evans, C. S., & Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol*, 24(4), 269-275.
- [346] Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*, 86(6), 985-990.
- [347] Campos, S. C., Silva, C. G., Campana, P. R. V., & Almeida, V. L. (2016). Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(1 suppl 1), 373-382. doi:10.1590/1983-084x/15_057
- [348] Asiedu-Gyekye, I. J., Antwi, D. A., Awortwe, C., N'Guessan B, B., & Nyarko, A. K. (2014). Short-term administration of an aqueous extract of *kalanchoe integra* var. *crenata* (Andr.) Cuf leaves produces no major organ damage in Sprague-Dawley rats. *J Ethnopharmacol*, 151(2), 891-896. doi:10.1016/j.jep.2013.11.050
- [349] Woolf, A. (1999). Essential Oil Poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(6), 721-727. doi:10.1081/CLT-100102450
- [350] Ezeja, M. I., Anaga, A. O., & Asuzu, I. U. (2014). Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *J Ethnopharmacol*, 151(3), 1155-1164. doi:10.1016/j.jep.2013.12.034
- [351] Cavaleiro, C. (2007). Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. In J. B. Figueiredo AC, LG Pedro (Ed.), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (3th ed., pp. 55-62). Lisboa, Portugal: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal.
- [352] Chang, J. (2000). Medicinal herbs: drugs or dietary supplements? *Biochem Pharmacol*, 59(3), 211-219.
- [353] Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, V. F., Grynberg, N. F., & Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25(3), 429-438.
- [354] Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60(1), 9-18

-
- [355] Hirota, B. C. K., Paula, C. S., Miguel, O. G., & Miguel, M. D. (2012). Avaliação de toxicidade *in vitro*: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. *Visão Acadêmica*, 13(2), 42-48.
- [356] de las M. Oliva, M., Gallucci, N., Zygodlo, J. A., & Demo, M. S. (2008). Cytotoxic Activity of Argentinean Essential Oils on *Artemia salina*. *Pharmaceutical Biology*, 45(4), 259-262. doi:10.1080/13880200701214557
- [357] Hossain, S., Kader, G., Nikkon, F., & Yeasmin, T. (2012). Cytotoxicity of the rhizome of medicinal plants. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(2), 125-127. doi:10.1016/S2221-1691(11)60205-0
- [358] Bastos, M. L. A., Lima, M. R. F., Conserva, L. M., Andrade, V. S., Rocha, E. M., & Lemos, R. P. (2009). Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (*Bignoniaceae*) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(16), 1-6.
- [359] Pimentel, M. P., Silva-Júnior, F. C. G., Santaella, S. T., & Lotufo, L. V. C. (2011). O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 6(1), 15-22. doi:10.5132/jbse.2011.01.003
- [360] Cazarin, K. C. C., Corrêa, C. L., & Zambrone, F. A. D. (2004). Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(3), 289-299.
- [361] Bastos, M. L. A., Lima, M. R. F., Conserva, L. M., Andrade, V. S., Rocha, E. M. M., & Lemos, R. P. L. (2009). Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (*Bignoniaceae*) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8(16), 1-6.
- [362] Hutchinson, T. H., Bogi, C., Winter, M. J., & Owens, J. W. (2009). Benefits of the maximum tolerated dose (MTD) and maximum tolerated concentration (MTC) concept in aquatic toxicology. *Aquat Toxicol*, 91(3), 197-202. doi:10.1016/j.aquatox.2008.11.009
-

- [363] Duffus, J. (1993). Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(9), 2003-2122. doi:10.1351/pac199365092003
- [364] Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardinas, 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), 395-400. doi:10.1078/0944-7113-00044
- [365] Vicente, A. M., & Costa, M. C. d. (2014). Experimentação animal e seus limites: core set e participação pública. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, 24(3), 831-849. doi:10.1590/s0103-73312014000300009
- [366] Brake, K., Gumireddy, A., Tiwari, A., Chauhan, H., & Kumari, D. (2017). In vivo Studies for Drug Development via Oral Delivery: Challenges, Animal Models and Techniques. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 08(09). doi:10.4172/2153-2435.1000560
- [367] 113/2013, D.-L. n. (2013). Uso de animais para fins científicos. *Diário da República n.º 151/2013, Série I de 2013-08-07*, 4709 - 4739.
- [368] Hau, J., & Schapiro, S. J. (2010). *Handbook of Laboratory Animal Science* (J. Hau & S. J. Schapiro Eds. Vol. Volume I). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- [369] Davis, M. A., Eldridge, S., & Loudon, C. (2013). Chapter 10 - Biomarkers: Discovery, Qualification and Application. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (pp. 317-352). Boston: Academic Press.
- [370] Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
- [371] Fuchs, T. C., & Hewitt, P. (2011). Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *AAPS J*, 13(4), 615-631. doi:10.1208/s12248-011-9301-x

-
- [372] Fowler, B. A. (2016). Chapter 1 - Molecular Biological Markers for Toxicology and Risk Assessment. In B. A. Fowler (Ed.), *Molecular Biological Markers for Toxicology and Risk Assessment* (pp. 1-16). Boston: Academic Press.
- [373] Timbrell, J. A. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129(1), 1-12. doi:10.1016/s0300-483x(98)00058-4
- [374] Singh, A., Bhat, T. K., & Sharma, O. P. (2014). Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*, 04(01), 1-32. doi:10.4172/2161-0495.S4-001
- [375] Ramaiah, S. K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol*, 45(9), 1551-1557. doi:10.1016/j.fct.2007.06.007
- [376] Zhang, Z., & Tang, W. (2018). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharm Sin B*, 8(5), 721-732. doi:10.1016/j.apsb.2018.04.003
- [377] Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 1-20. doi:10.1016/j.cld.2016.08.001
- [378] Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2008). *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Riverport Lane St. Louis, Missouri Saunders - Elsevier Health Sciences.
- [379] Hasan, K. M. M., Tamanna, N., & Haque, M. A. (2018). Biochemical and histopathological profiling of Wistar rat treated with Brassica napus as a supplementary feed. *Food Science and Human Wellness*, 7(1), 77-82. doi:10.1016/j.fshw.2017.12.002
- [380] Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V., Math, A. A. K., Vernekar, S. N., & Kulkarni, S. S. (2009). A review on laboratory liver function tests. *The Pan African medical journal*, 3, 17-17.
- [381] Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205. doi:10.1016/j.tox.2007.11.021

- [382] Allan, G., Michael, J. M., Rajeev, S., Robert, A. C., & Denis St, J. O. R. (2013). *Clinical Biochemistry: An Illustrated Colour Text, Fifth Edition* (5 ed.): Elsevier Health Sciences - UK.
- [383] Fernandez, N. J., & Kidney, B. A. (2007). Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(3), 223-233. doi:10.1111/j.1939-165X.2007.tb00216.x
- [384] Brunner, L., & Suddarth, D. (1977). Enfermagem medico-cirúrgica. *Interamericana*, 26, 675-727.
- [385] Hall, J. E. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*: Elsevier Health Sciences.
- [386] Chadwick, L., & Macnab, R. (2015). Laboratory tests of renal function. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 16(6), 257-261.
- [387] Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A., & Vernekar, S. N. (2010). Markers of renal function tests. *North American journal of medical sciences*, 2(4), 170-173.
- [388] McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2017). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- [389] Sharififar, F., Moshafi, M. H., Nudehe, G. D.-., Ameri, A., Alishahi, F., & Pourhemati, A. (2009). Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(.3), 317-322.
- [390] Geethaa, S., Thavamany, P. J., Chiew, S. P., & Thong, O. M. (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of Artemia salina lethality test. *J Adv Pharm Technol Res*, 4(4), 179-182. doi:10.4103/2231-4040.121411
- [391] OECD. (2001). Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS*, 423.
- [392] Vogel, H. G., & Vogel. (2002). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

-
- [393] Akhila, J. S., Shyamjith, D., & Alwar, M. C. (2007). Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science*, 93(7), 917-920.
- [394] OECD. (2008). *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*.
- [395] OECD. (2002). *Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure*.
- [396] OECD. (2002). *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*.
- [397] Vogel, H. G., Vogel, W. H., Schölkens, B. A., Sandow, J., Müller, G., & Vogel, W. F. (2002). *Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays* (H. G. Vogel Ed. 2nd ed.): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [398] Hau, J., & Schapiro, S. J. (2003). *Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Animal Models* (Vol. III). New York: CRC Press; 2 edition (October 28, 2002).
- [399] Arantes, S. M., Picarra, A., Guerreiro, M., Salvador, C., Candeias, F., Caldeira, A. T., & Martins, M. R. (2019). Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal). *Food Chem Toxicol*, 133, 1-8. doi:10.1016/j.fct.2019.110747
- [400] Arantes, S., Candeias, F., Lopes, O., Lima, M., Pereira, M., Tinoco, T., . . . Martins, M. R. (2016). Pharmacological and toxicological studies of essential oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*. *Planta Med*, 82(14), 1266-1273. doi:10.1055/s-0042-104418
- [401] Arantes, S. A. M. (2013). *Caracterização química e actividade biológica dos óleos essenciais e extractos aquosos de algumas Lavandula spp. do Sul de Portugal*. (Mestrado em Bioquímica), Universidade de Évora, Évora.
- [402] Devaraj, S., Ismail, S., Ramanathan, S., & FeiYam, M. (2013). *In vivo* toxicological investigations of standardized ethanolic extract of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. rhizome. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 3(1), 67-73.
- [403] Ullah, M. O., Haque, M., Urmi, K. F., Zulfiker, A. H., Anita, E. S., Begum, M., & Hamid, K. (2013). Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(1), 1-7. doi:10.1016/S2221-1691(13)60015-5
-

- [404] Naidu, J. R., Ismail, R., & Sasidharan, S. (2014). Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 101-107. doi:10.4314/tjpr.v13i1.15
- [405] Martins, R. L., Simoes, R. C., Rabelo, E. M., Farias, A. L., Rodrigues, A. B., Ramos, R. D., . . . de Almeida, S. S. (2016). Chemical Composition, an Antioxidant, Cytotoxic and Microbiological Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. *PLoS ONE*, 11(12), e0166684. doi:10.1371/journal.pone.0166684
- [406] Carballo, J., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2(1). doi:10.1186/1472-6750-2-17
- [407] Winder, C., Azzi, R., & Wagner, D. (2005). The development of the globally harmonized system (GHS) of classification and labelling of hazardous chemicals. *J Hazard Mater*, 125(1-3), 29-44. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.05.035
- [408] Cavanagh, H. M., & Wilkinson, J. M. (2005). Lavender essential oil: a review. *Australian Infection Control*, 10(1), 35-37.
- [409] Dobetsberger, C., & Buchbauer, G. (2011). Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(5), 300-316. doi:10.1002/ffj.2045
- [410] Monforte, M. T., Tzakou, O., Nostro, A., Zimbalatti, V., & Galati, E. M. (2011). Chemical composition and biological activities of *Calamintha officinalis* Moench essential oil. *J Med Food*, 14(3), 297-303. doi:10.1089/jmf.2009.0191
- [411] Gordon, W., Huitric, A., Seth, C., McClanahan, R., & Nelson, S. (1987). The metabolism of the abortifacient terpene, (R)-(+)-pulegone, to a proximate toxin, menthofuran. *Drug Metabolism and Disposition*, 15(5), 589-594.
- [412] Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*, 3(7), 408-414. doi:10.1038/nchembio.2007.5

-
- [413] Shirazi, F. H., Ahmadi, N., & Kamalinejad, M. (2004). Evaluation of northern Iran *Mentha pulegium* L. cytotoxicity. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 106-110.
- [414] Ramos, C. A. F., Sa, R., Alves, M. F., Benedito, R. B., de Sousa, D. P., Diniz, M., . . . de Almeida, R. N. (2015). Histopathological and biochemical assessment of d-limonene-induced liver injury in rats. *Toxicol Rep*, 2, 482-488. doi:10.1016/j.toxrep.2015.01.001
- [415] Llana-Ruiz-Cabello, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., & Camean, A. M. (2017). A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. *Food Chem Toxicol*, 101, 36-47. doi:10.1016/j.fct.2017.01.001
- [416] Dires, K., Mengiste, B., & Lulekal, E. (2018). Evaluation of Acute, Sub-acute and Skin Irritation Toxicity on Essential Oil of *Thymus schimperi* in Ankober, North Shewa, Debre Berhan, Ethiopia. *Journal of Clinical Toxicology*, 08(03). doi:10.4172/2161-0495.1000386
- [417] Mesfin, M., Asres, K., & Shibeshi, W. (2014). Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 14(310), 310. doi:10.1186/1472-6882-14-310
- [418] Ostad, S., Soodi, M., Shariffzadeh, M., Khorshidi, N., & Marzban, H. (2001). The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea, pharmacology and toxicology study. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 299-304.
- [419] Badgujar, S. B., Patel, V. V., & Bandivdekar, A. H. (2014). *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Research International*, 2014, 1-32. doi:10.1155/2014/842674
- [420] Kooti, W., Moradi, M.-T., Ali-Akbari, S., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., & Ashtary-Larky, D. (2014). Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1), 1-9.
- [421] Waynforth, H. B., & Flecknell, P. A. (1992). *Experimental and surgical technique in the rat* (2nd edition ed.): Academic press limited.
-

- [422] Zarybnicky, T., Bousova, I., Ambroz, M., & Skalova, L. (2018). Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Arch Toxicol*, 92(1), 1-13. doi:10.1007/s00204-017-2062-2
- [423] Ozbek, H., Ugras, S., Dulger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Ozturk, G., & Ozturk, A. (2003). Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia*, 74(3), 317-319. doi:10.1016/S0367-326X(03)00028-5
- [424] Rabeh, N. M., & Aboraya, A. O. (2014). Hepatoprotective Effect of Dill (*Anethum graveolens* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) Oil on Hepatotoxic Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 13(6), 303-309.
- [425] Ishfaq, P. M., Shukla, A., Beraiya, S., Tripathi, S., & Mishra, S. K. (2018). Biochemical and Pharmacological Applications of Essential Oils in Human Health Especially in Cancer Prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents*, 18(13), 1815-1827. doi:10.2174/1871520618666181002130240
- [426] Elshafie, H. S., & Camele, I. (2017). An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *Biomed Research International*, 2017, 9268468-9268468. doi:10.1155/2017/9268468
- [427] Cho, K. S., Lim, Y. R., Lee, K., Lee, J., Lee, J. H., & Lee, I. S. (2017). Terpenes from Forests and Human Health. *Toxicol Res*, 33(2), 97-106. doi:10.5487/TR.2017.33.2.097
- [428] Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, 1830(6), 3670-3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
- [429] Calvello, R., Panaro, M. A., Carbone, M. L., Cianciulli, A., Perrone, M. G., Vitale, P., . . . Scilimati, A. (2012). Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells. *Pharmacol Res*, 65(1), 137-148. doi:10.1016/j.phrs.2011.09.009
- [430] Stewart, A. G., & Beart, P. M. (2016). Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules. *Br J Pharmacol*, 173(4), 631-634. doi:10.1111/bph.13389

-
- [431] Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov*, 15(8), 551-567. doi:10.1038/nrd.2016.39
- [432] Carvalho, W. A., & Lemônica, L. (1998). Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 48(2), 137-158.
- [433] Wang, Q., Kuang, H., Su, Y., Sun, Y., Feng, J., Guo, R., & Chan, K. (2013). Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 146(1), 9-39. doi:10.1016/j.jep.2012.12.013
- [434] Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(25), 2868-2885.
- [435] Cathcart, M. C., O'Byrne, K. J., Reynolds, J. V., O'Sullivan, J., & Pidgeon, G. P. (2012). COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention. *Biochim Biophys Acta*, 1825(1), 49-63. doi:10.1016/j.bbcan.2011.09.004
- [436] Foegh, M. L., Hecker, M., & Ramwell, P. W. (1998). The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and related compounds. In B. G. Katzung (Ed.), *Basic and clinical pharmacology* (pp. 304-318). Appleton and Lange, Connecticut.
- [437] Li, C. J., Chang, J. K., Wang, G. J., & Ho, M. L. (2011). Constitutively expressed COX-2 in osteoblasts positively regulates Akt signal transduction via suppression of PTEN activity. *Bone*, 48(2), 286-297. doi:10.1016/j.bone.2010.09.020
- [438] Utar, Z., Majid, M. I., Adenan, M. I., Jamil, M. F., & Lan, T. M. (2011). Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E(2) production induced by lipopolysaccharide in RAW264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol*, 136(1), 75-82. doi:10.1016/j.jep.2011.04.011
- [439] Resnik, R. R. (2018). 10 - Postoperative Complications. In R. R. Resnik & C. E. Misch (Eds.), *Misch's Avoiding Complications in Oral Implantology* (pp. 364-401): Mosby.
-

- [440] Jeon, J., Park, K. A., Lee, H., Shin, S., Zhang, T., Won, M., . . . Hur, G. M. (2011). Water extract of *Cynanchi atrati Radix* regulates inflammation and apoptotic cell death through suppression of IKK-mediated NF- κ B signaling. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 626-634.
- [441] Rios, J. L. (2010). Effects of triterpenes on the immune system. *J Ethnopharmacol*, 128(1), 1-14. doi:10.1016/j.jep.2009.12.045
- [442] Kumar, A., Ahmad, I., Chhikara, B. S., Tiwari, R., Mandal, D., & Parang, K. (2011). Synthesis of 3-phenylpyrazolopyrimidine-1,2,3-triazole conjugates and evaluation of their Src kinase inhibitory and anticancer activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 21(5), 1342-1346. doi:10.1016/j.bmcl.2011.01.047
- [443] Suresh, V., Sruthi, V., Padmaja, B., & Asha, V. V. (2011). *In vitro* anti-inflammatory and anti-cancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb. *J Ethnopharmacol*, 134(3), 872-877. doi:10.1016/j.jep.2011.01.043
- [444] Juhas, Š., Bujňáková, D., Rehák, P., Čikoš, Š., Czikková, S., Veselá, J., . . . Koppel, J. (2008). Anti-Inflammatory Effects of Thyme Essential Oil in Mice. *ACTA VET. BRNO*, 77, 327–333. doi:10.2754/avb300877030327
- [445] de Sousa, D. P. (2011). Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16(3), 2233-2252. doi:10.3390/molecules16032233
- [446] Sarmiento-Neto, J. F., do Nascimento, L. G., Felipe, C. F., & de Sousa, D. P. (2015). Analgesic Potential of Essential Oils. *Molecules*, 21(1), E20. doi:10.3390/molecules21010020
- [447] Guimaraes, A. G., Quintans, J. S., & Quintans, L. J., Jr. (2013). Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. *Phytother Res*, 27(1), 1-15. doi:10.1002/ptr.4686
- [448] Almeida, R. N., Navarro, D. S., & Barbosa-Filho, J. M. (2001). Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, 8(4), 310-322. doi:10.1078/0944-7113-00050
- [449] McCurdy, C. R., & Scully, S. S. (2005). Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sci*, 78(5), 476-484. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.006

-
- [450] Passos, C. S., Arbo, M. D., Rates, S. M. K., & Poser, G. L. v. (2009). Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1a), 140-149. doi:10.1590/s0102-695x2009000100024
- [451] Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol*, 83(1), 6-15. doi:10.1016/j.bcp.2011.08.010
- [452] Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z., & Jameel, K. (2011). A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J Ethnopharmacol*, 133(2), 261-277. doi:10.1016/j.jep.2010.10.041
- [453] Valacchi, G., Virgili, F., Cervellati, C., & Pecorelli, A. (2018). OxInflammation: From Subclinical Condition to Pathological Biomarker. *Front Physiol*, 9, 1-15. doi:10.3389/fphys.2018.00858
- [454] Rohleder, N. (2019). Stress and inflammation - The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. *Psychoneuroendocrinology*, 105, 164-171. doi:10.1016/j.psyneuen.2019.02.021
- [455] Monti, D., Ostan, R., Borelli, V., Castellani, G., & Franceschi, C. (2017). Inflammaging and human longevity in the omics era. *Mech Ageing Dev*, 165(Pt B), 129-138. doi:10.1016/j.mad.2016.12.008
- [456] Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1, S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
- [457] Fulop, T., Witkowski, J. M., Olivieri, F., & Larbi, A. (2018). The integration of inflammaging in age-related diseases. *Semin Immunol*, 40, 17-35. doi:10.1016/j.smim.2018.09.003
- [458] Baylis, D., Bartlett, D. B., Patel, H. P., & Roberts, H. C. (2013). Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longevity & Healthspan*, 2(8).
- [459] de Lavor, E. M., Fernandes, A. W. C., de Andrade Teles, R. B., Leal, A., de Oliveira Junior, R. G., Gama, E. S. M., . . . da Silva Almeida, J. R. G. (2018). Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A
-

- Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 1-24. doi:10.1155/2018/6468593
- [460] Schabauer, L., Steflitsch, W., & Buchbauer, G. (2017). Essential Oils and Compounds against Pains in Animal Studies. *Natural Product Communications*, 12(7), 1137 - 1143.
- [461] de Cassia da Silveira, E. S. R., Lima, T. C., da Nobrega, F. R., de Brito, A. E. M., & de Sousa, D. P. (2017). Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. *Int J Mol Sci*, 18(12), 1-40. doi:10.3390/ijms18122392
- [462] Lenardão, E. J., Savegnago, L., Jacob, R. G., Victoria, F. N., & Martinez, D. M. (2015). Antinociceptive Effect of Essential Oils and Their Constituents: an Update Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), 435-474. doi:10.5935/0103-5053.20150332
- [463] Santos, F. A., & Rao, V. S. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res*, 14(4), 240-244. doi:10.1002/1099-1573(200006)14:4<240::aid-ptr573>3.0.co;2-x
- [464] Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721-726. doi:10.1078/094471102321621322
- [465] Miller, S. G., & Pritts, T. A. (2013). Linalool: a novel natural anti-inflammatory agent?: Commentary on "Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model". *J Surg Res*, 185(1), e69-70. doi:10.1016/j.jss.2013.02.014
- [466] de Cassia da Silveira e Sa, R., Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18(1), 1227-1254. doi:10.3390/molecules18011227
- [467] Hau, J., Schapiro, S. J., & Van Hoosier Jr, G. L. (2004). *Handbook of Laboratory Animal Science* (Vol. III). New York: CRC Press; 2 edition (October 28, 2002).
- [468] Suseem, S. R., Mary Saral, A., Neelakanda Reddy, P., & Marslin, G. (2011). Evaluation of the analgesic activity of ethyl acetate, methanol and aqueous

- extracts of *Pleurotus eous* mushroom. *Asian Pac J Trop Med*, 4(2), 117-120. doi:10.1016/S1995-7645(11)60049-7
- [469] Quintans-Junior, L., Moreira, J. C., Pasquali, M. A., Rabie, S. M., Pires, A. S., Schroder, R., . . . Gelain, D. P. (2013). Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. *ISRN Toxicol*, 2013, 1-12. doi:10.1155/2013/459530
- [470] Lee, G., Park, J., Kim, M. S., Seol, G. H., & Min, S. S. (2019). Analgesic effects of eucalyptus essential oil in mice. *The Korean journal of pain*, 32(2), 79-86. doi:10.3344/kjp.2019.32.2.79
- [471] Gawade, S. P. (2012). Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. *J Pharmacol Pharmacother*, 3(4), 348-349. doi:10.4103/0976-500X.103699
- [472] Dzoyem, J. P., McGaw, L. J., Kuete, V., & Bakowsky, U. (2017). Chapter 9 - Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 239-270): Academic Press.
- [473] Dragomanova, S., Tancheva, L., Georgieva, M., & Klisurov, R. (2019). Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenoid Myrtenal in Rodents. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*, 25(1), 2406-2413. doi:10.5272/jimab.2019251.2406
- [474] Pergolizzi, J. V., Jr., Taylor, R., Jr., LeQuang, J. A., Raffa, R. B., & Group, N. R. (2018). The role and mechanism of action of menthol in topical analgesic products. *J Clin Pharm Ther*, 43(3), 313-319. doi:10.1111/jcpt.12679
- [475] Sengupta, R., Sheorey, S. D., & Hinge, M. (2012). Analgesic and anti-inflammatory plants: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 12, 114-119.
- [476] Padhan, D. K. (2017). Topical Analgesic Activity of Essential Oil Extracted from *Spharenthus Indicus* (Asteraceae). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(5), 275-277. doi:10.22159/ajpcr.2017.v10i5.17594

- [477] Sanna, M. D., Les, F., Lopez, V., & Galeotti, N. (2019). Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Essential Oil Alleviates Neuropathic Pain in Mice With Spared Nerve Injury. *Frontiers in pharmacology*, 10, 472-472. doi:10.3389/fphar.2019.00472
- [478] Cardia, G. F. E., Silva-Filho, S. E., Silva, E. L., Uchida, N. S., Cavalcante, H. A. O., Cassarotti, L. L., . . . Cuman, R. K. N. (2018). Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 1-10. doi:10.1155/2018/1413940
- [479] Mogosan, C., Vostinaru, O., Oprean, R., Heghes, C., Filip, L., Balica, G., & Moldovan, R. I. (2017). A Comparative Analysis of the Chemical Composition, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Effects of the Essential Oils from Three Species of *Mentha* Cultivated in Romania. *Molecules*, 22(2), 263-274. doi:10.3390/molecules22020263
- [480] Mahboubi, M. (2017). *Mentha spicata* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients. *Complement Ther Clin Pract*, 26, 1-4. doi:10.1016/j.ctcp.2016.11.001
- [481] Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. d. B., Cunha, J. M., Grespan, R., . . . Cuman, R. K. N. (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012, 657026-657026. doi:10.1155/2012/657026
- [482] Goncalves, J. C., de Meneses, D. A., de Vasconcelos, A. P., Piauilino, C. A., Almeida, F. R., Napoli, E. M., . . . de Araujo, D. A. (2017). Essential oil composition and antinociceptive activity of *Thymus capitatus*. *Pharm Biol*, 55(1), 782-786. doi:10.1080/13880209.2017.1279672

. Anexo I

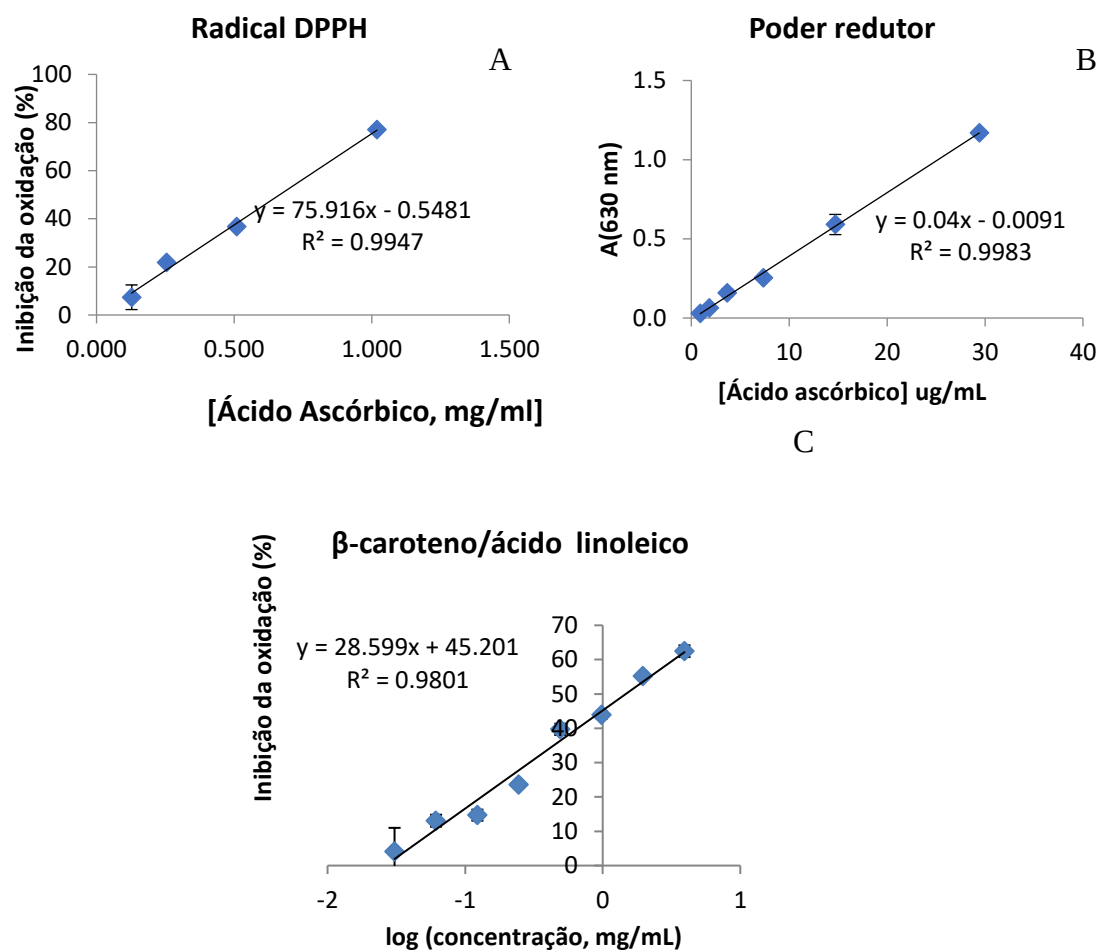


Figura A.1 – Curvas de calibração do ácido ascórbico para o radical DPPH (A); poder redutor (B) e sistema β-caroteno/ácido linoleico (C)

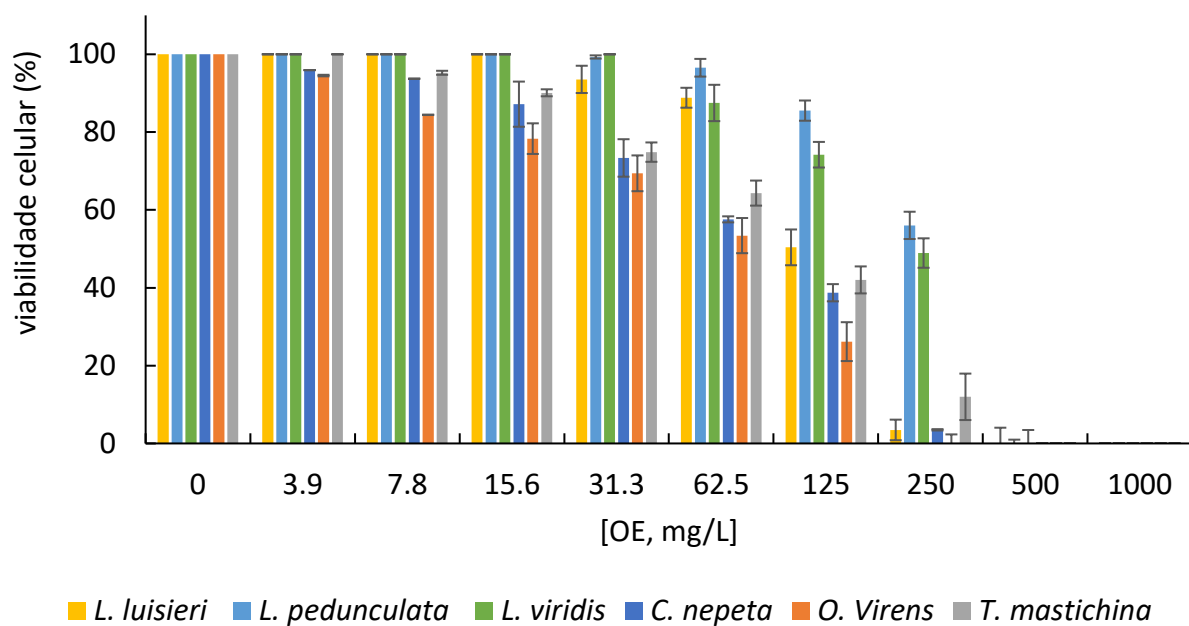


Figura A.2 – Efeito antiproliferativo dos OEs de *L. luisieri*, *L. pedunculata*, *L. viridis*, *C. nepeta*, *O. virens* e *T. mastichina* nas células de cancro da mama MDA-MB-231

. Anexo II

Quadro A.1 - Valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) e CMB/CMF ($\mu\text{g/ml}$) dos antimicrobianos de síntese

		Cloridrato de tetraciclina		Nistatina		Econazol		
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
Bactérias	Gram-(+)	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7.8	>1000	-	-	-	-
		<i>E. faecalis</i> LFG 1001	125	>1000	-	-	-	-
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1.0	>1000	-	-	-	-
		<i>S. aureus</i> LFG 1007	1.0	125	-	-	-	-
		<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	62.5	>1000	-	-	-	-
	Gram-(-)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	62.5	500	-	-	-	-
		<i>E. coli</i> LFG 1003	500	1000	-	-	-	-
		<i>M. morganii</i> LFG 1008	250	1000	-	-	-	-
		<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	250	500	-	-	-	-
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	125	1000	-	-	-	-
		<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	15.6	250	-	-	-	-
		<i>S. enteritidis</i> LFG 1005	7.8	>1000	-	-	-	-
		<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	500	>1000	-	-	-	-
Fungos	<i>A. japonicus</i>	-	-	1,9	3,8	0,06-0,1	0,1	
	<i>A. niger</i>	-	-	7,5	>30,0	0,1-0,3	0,3	
	<i>A. flavus</i>	-	-	7,5	30,0	0,06-0,1	0,1	
	<i>F. oxysporum</i>	-	-	7,5	30,0	1,0-2,0	2,0	
	<i>Penicillium commune</i>	-	-	3,8	7,5	> 2,0	n. d.	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	15,0	30,0	0,5-1,0	1,0	
	<i>R. oryzae</i>	-	-	30,0	n. d.	1,0-2,0	2,0	
	<i>R. stolonifera</i>	-	-	15,0	>30,0	1,0-2,0	2,0	

Legenda: n. d. – não determinado.



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Contactos:

Universidade de Évora

Instituto de Investigação e Formação Avançada - IIFA

Palácio do Vimioso | Largo Marquês de Marialva, Apart. 94

7002-554 Évora | Portugal

Tel: (+351) 266 706 581

Fax: (+351) 266 744 677

email: iifa@uevora.pt