

Inês Alves de Melo

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública



**Avaliação do potencial anti-inflamatório,
antioxidante e antimicrobiano de extratos de sálvia,
poejo e cebolinho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e
Segurança Alimentar

Orientador: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa

Co-Orientador: Maria Eduardo Costa Morgado Figueira, Professora
Auxiliar, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2016



Inês Alves de Melo

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

**Avaliação do potencial anti-inflamatório,
antioxidante e antimicrobiano de extratos de sálvia,
poejo e cebolinho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e
Segurança Alimentar

Orientador: Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa

Co-Orientador: Maria Eduardo Costa Morgado Figueira, Professora
Auxiliar, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa



Março de 2016

Avaliação do potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano de extratos de sálvia, poejo e cebolinho

Copyright © Inês Alves de Melo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração e apoio de diversas pessoas, às quais manifesto o meu profundo agradecimento.

A Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por me ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

A Professora Doutora Maria Paula Duarte, pela excelente orientação científica, pelo apoio em todas as fases deste trabalho, pela disponibilidade e simpatia demonstradas, pela compreensão e paciência ao longo do trabalho laboratorial. Foi um privilégio tê-la como orientadora.

A Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, pela excelente orientação e apoio durante o trabalho, e disponibilidade e simpatia que sempre demonstrou.

Ao Professor João Rocha e a Rosa Direito, por todo o apoio prestado e conhecimentos partilhados na realização dos ensaios anti-inflamatórios.

A Raquel, por todas as tardes e noites passadas no laboratório, em que a motivação foi mais necessária que nunca, obrigada pelas risadas partilhadas. E acima de tudo pela amizade. Sem ela não teria sido a mesma coisa

A Sandra, por toda a colaboração e pela presença amiga na realização deste trabalho. Sem esquecer a pequena Francisca que ainda sem saber já andava neste mundo de laboratório.

A todos os amigos e em especial, às amigas de sempre, Joana Clero e Inês Fernandes pela presença amiga, encorajadora, por me deixarem falar alto e ajudarem a por tudo em perspetiva.

A minha família por todo o apoio, força, amor e por terem sempre acreditado em mim.

Resumo

Estudos epidemiológicos sobre a relação entre os hábitos alimentares e o risco de desenvolvimento de doenças crônicas demonstram que a alimentação possui um impacto direto sobre a saúde. É geralmente aceite, que os alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, especiarias, plantas aromáticas entre outros, exercem efeitos benéficos na saúde humana. Como exemplo dessa situação pode apontar-se a dieta Mediterrânea, uma dieta caracterizada entre outros fatores por ser rica em plantas aromáticas.

Neste trabalho foram estudados extratos de três plantas aromáticas utilizadas em Portugal: Sálvia, Poejo e Cebolinho com o objetivo de serem determinados o seu teor em compostos fenólicos totais e em flavonóides e também estudadas as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Quer a atividade antioxidante quer a atividade antimicrobiana foram determinadas com recurso a ensaios *in vitro*. A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade redutora (FRAP e CUPRAC), capacidade de sequestro do radical DPPH[•] e do radical anião superóxido. A atividade antimicrobiana, foi determinada contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Escherichia coli*) e contra leveduras (*Candida albicans*). A atividade anti-inflamatória foi determinada em modelos de inflamação aguda (modelo de edema da pata induzido pela carragenina) e de inflamação crónica (modelo da colite ulcerativa induzida pelo ácido sulfónico trinitrobenzeno).

Os resultados mostraram que os extratos de todas as plantas aromáticas em estudo possuem capacidade antioxidante, sendo que o extrato de sálvia foi o que apresentou maior capacidade antioxidante em comparação com os extratos de poejo e de cebolinho em todos os testes realizados. Concordante com este resultado, pode acrescentar-se que o extrato de sálvia foi também o que apresentou maior teor em compostos fenólicos totais e flavonóides totais, o que sugere o envolvimento destes compostos nas atividades antioxidantes detetadas. O extrato de sálvia foi o único capaz de inibir o crescimento do *S. aureus*, o que também pode estar relacionado com o seu teor mais elevado em compostos fenólicos. A avaliação da atividade anti-inflamatória, efetuada apenas para o extrato de sálvia, revelou que este extrato exerceu um efeito positivo quer para o modelo de inflamação aguda quer para o modelo de inflamação crónica.

Palavras-Chave: Plantas aromáticas, sálvia, poejo, cebolinho, compostos fenólicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos

Abstract

Epidemiological studies on the relationship between food habits and the risk of developing chronic diseases showed that food habits have impact on Human's health. It's usually accepted that plant foods, as fruits, vegetables and herbs and spices have beneficial effects on Human health. As an example, the Mediterranean diet can be pointed out. This diet is characterized among other factors to be rich in the consumption of herbs.

In this work, three herb extracts commonly used in Portugal were studied: Sage, European Pennyroyal and Chives, in order to determine their total phenolic compounds and flavonoids content and also its antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities. Both antioxidant and antimicrobial activities were determined using in vitro assays. The antioxidant activity was determined by assessing the reducing capacity (FRAP and CUPRAC tests) and scavenge of DPPH[•] and superoxide anion radical. The antimicrobial activity was determined against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), gram negative (*Escherichia coli*) and against yeasts (*Candida albicans*). The anti-inflammatory activity was determined in acute models of inflammation (paw edema model induced by carrageenin) and chronic inflammation (colitis model induced by trinitrobenzene ulcerative sulfonic acid).

The results showed that all the herbs extracts processes antioxidant capacity, and that the sage extract showed the highest antioxidant activity compared with the extract of European pennyroyal and chives in all the assays. Concurring with this results, it was noticed that the sage's extracts also presented the highest content of total phenolic compounds and flavonoids, which suggests that these compounds may be involved in the antioxidant activity. The sage extract was the only one able to inhibit the growth of *S. aureus*, which can also be related to their higher content of phenolics. Assessment of anti-inflammatory activity, performed only for the sage extract, revealed that this has positive effects both for the acute inflammation and chronic inflammation models

Key words: herbs, sage, pennyroyal, chives, phenolic compounds, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Caracterização das plantas aromáticas estudadas	3
1.1.1	Sálvia.....	3
1.1.2	Poejo.....	4
1.1.3	Cebolinho	4
1.2	<i>Sistema de defesa antioxidante e Stress oxidativo</i>	5
1.2.1	Antioxidantes	7
1.3	Inflamação.....	10
1.3.1	Inflamação aguda.....	10
1.3.2	Inflamação crónica	11
1.4	Atividade antimicrobiana	13
1.5	Objetivo do trabalho	14
2	Materiais e métodos	15
2.1	Plantas aromáticas	15
2.2	Reagentes e meios de cultura.....	15
2.3	Preparação dos extratos de plantas aromáticas.....	15
2.4	Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteau.....	16
2.4.1	Quantificação dos Flavonóides Totais	16
2.4.2	Determinação da humidade das plantas aromáticas	17
2.4.3	Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas.....	17
2.4.4	Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas	22
2.4.5	Ensaio <i>in-vivo</i>	23
2.4.6	Análise estatística dos resultados	26
3	Resultados e Discussão.....	27
3.1	Determinação da percentagem de humidade	27
3.2	Determinação do teor em compostos fenólicos totais	27
3.3	Quantificação dos flavonóides totais.....	29

3.4	Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas	30
3.4.1	Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH	30
3.4.2	Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano	32
3.4.3	Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	33
3.4.4	Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC	34
3.5	Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas	36
3.6	Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de sálvia	38
3.6.1	Modelo de edema da pata induzido pela carragenina	38
3.6.2	Modelo da colite ulcerativa	39
4	Conclusão.....	41
5	Referências bibliográficas	42

Índice de Figuras

Figura 1.1.A- Folhas e flor de Sálvia. B- Ramo de Sálvia (A- https://orienteocidente.wordpress.com/2011/07/23/salvia-salvia-officinalis/ ; B- https://www.feiranetrj.com.br/salvia)	3
Figura 1.2: A- Aspetto dos poejos no solo; B- Folha de poejo ao pormenor (A- http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0110+2253 ; B- http://www.semstress.com/poejo-na-culinaria/)	4
Figura 1.3: A- Plantação cebolinho; B- Molho de cebolinho cortado (A- http://naturaldrug.tumblr.com/post/8997313577/allium-schoenoprasum ; B- http://receitas-culinaria.pt/22079/em-que-pratos-utiliza-o-cebolinho)	5
Figura 1.4: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a sua estrutura (Ferreira & Abreu, 2007).....	9
Figura 1.5: Estrutura nuclear de flavonóides (Heim <i>et al.</i> , 2002).....	10
Figura 2.1: Desativação do DPPH pelos antioxidantes	18
Figura 2.2: – Reação do NBT ²⁺ com o radical anião superóxido (O ₂ ^{•-}) dando origem a um diformazano.....	19
Figura 2.3: - Formação do complexo (Fe ³⁺ -TPTZ) após redução do Fe ³⁺ por um antioxidante .	20
Figura 2.4: Redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de antioxidantes	21
Figura 2.5: A- Pletismómetro; B- Medição do volume da pata	25
Figura 3.1: A - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de sálvia, poejo e cebolinho com o <i>S. aureus</i> ; B – Halo de inibição da sálvia.	36
Figura 3.2: Efeito da administração oral do extrato de sálvia e de outros fármacos comerciais (indometacina, trolox e tempol) no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina (* P<0,001 vs soro fisiológico (SF); ^o P<0,01 vs Carragenina, # P<0,001 vs carragenina)	38
Figura 3.3: Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente (A: Grupo Sham; B: Grupo Etanol; C: Grupo TNBS + Etanol; D: Grupo TNBS + Sálvia).	39

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Composição do reagente FRAP	20
Tabela 2.2: Caracterização dos grupos em estudo no modelo de edema da pata	24
Tabela 2.3: Caracterização ds grupos de estudo no modelo da colite ulcerativa	25
Tabela 3.1: Percentagem de humidade das diferentes plantas estudadas	27
Tabela 3.2: Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonóides dos extratos estudados	Erro! Marcador não definido.
Tabela 3.3: Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição química e as atividades de sequestro do radical DPPH, do radical anião superóxido e o ensaio FRAP	29
Tabela 3.4: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante dos extratos estudados	30
Tabela 3.5: Capacidade de sequestro do DPPH das diferentes amostras.....	31
Tabela 0.6: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e o ensaio do DPPH para as várias amostras em estudo.....	31
Tabela 0.7: Capacidade de sequestro do radical anião superóxido das várias amostras.....	32
Tabela 0.8: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e as atividades de sequestro do radical DPPH e do radical anião superóxido.....	33
Tabela 0.9: Valores de FRAP das diferentes amostras.....	33
Tabela 0.10: Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição química e as atividades de sequestro do radical DPPH, do radical anião superóxido e o ensaio FRAP.....	34
Tabela 0.11: Valores de CUPRAC das diferentes amostras.....	35
Tabela 0.12: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante dos extratos estudados.....	35
Tabela 0.13: Diâmetro dos halos de inibição dos diferentes extratos na determinação da atividade antimicrobiana.....	36
Tabela 0.14: – Observações morfológicas e funcionais no cólon limpo e aberto transversalmente logo após a colheita (#P<0,05 vs Sham; *P<0,05 vs TNBS + EtOH 50%)....	39
Tabela 0.15: Classificação da gravidade da diarreia.....	40

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AA – Ácido araquidónico

AOAC - Official Methods of Analysis. Agricultural chemicals

APCs – Células apresentadoras de antigénio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina trifosfato

BDH – Hidrogenofosfo de dipotássio

BHA – Butilhidroxianisol

BHT – Butilhidroxitolueno

C. albicans – *Candida albicans*

CAT – Catalase

CMH – Complexo major de histocompatibilidade

COX-1 – Ciclooxygenase-1

COX-2 – Ciclooxygenase-2

CU – Colite ulcerativa

CUPRAC – Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity

DPPH[•] – 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo

EAA – Equivalente de ácido ascórbico

EAG – Equivalente de ácido gálico

EC – Equivalente de catequina

E. coli – *Escherichia coli*

EtOH – Etanol

FRAP – Ferric Reduction Antioxidant Power

GP_x – Glutaciona peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

ICAM – Moléculas de adesão intravascular

IL – Interleucina

INF- γ – Interferão gama

iNOS - oxido nítrico sintase

LOX - Lipoxigenase

O₂⁻ – Radical anião superóxido

O₂ - Oxigénio

OH[•] – Radical hidroxilo

MHA – Muller Hinton Agar

MRSA - *Staphylococcus aureus* metilina resistentes

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NBT²⁺ – Azul de nitrotetrazólio

NF-κB – Fator nuclear-κB

NO – Óxido nítrico

PGs – Prostaglandinas

PMS – Metossulfato de fenazina

ROS – Espécies reativas de oxigénio

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SOD – Superóxido dismutase

TBHT - Tetrabutylhidroquinona

TNBS – Ácido sulfónico trinitrobenzeno

TNF – Fator de necrose tumoral

TPTZ – Tripiriditriazina

VCAM – Moléculas adesão vascular

1 Introdução

Desde a antiguidade que a Natureza tem sido uma fonte de recursos para o tratamento e melhoria da qualidade de vida do Homem. Muitos dos fármacos atualmente utilizados são derivados de produtos naturais (Maver *et al.*, 2015). Se antes as propriedades benéficas atribuídas a estas plantas eram baseadas em crenças, nas últimas décadas têm sido criadas linhas de investigação com o intuito de estabelecer as bases científicas desses efeitos benéficos para a saúde humana, identificar os compostos responsáveis por esses efeitos e conhecer em detalhe os seus mecanismos de ação.

Estudos epidemiológicos sobre a relação entre os hábitos alimentares e o risco de desenvolvimento de doenças crónicas demonstram que a alimentação possui um impacto direto sobre a saúde (Espín *et al.*, 2007). É geralmente aceite, que os alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, especiarias, plantas aromáticas entre outros, exercem efeitos benéficos na saúde humana, nomeadamente ao nível de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, doenças neurodegenerativas e doenças oncológicas. Como exemplo dessa situação pode apontar-se a dieta Mediterrânea. Com efeito, estudos epidemiológicos demonstraram uma associação positiva entre a adoção desta dieta e a prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes. Esta dieta caracteriza-se, entre outros fatores, pelo consumo elevado de alimentos de origem vegetal (cereais pouco refinados, produtos hortícolas, fruta, leguminosas secas e frescas e frutos secos e oleaginosos); consumo frequente de pescado e pouco frequente de carnes vermelhas; utilização do azeite como principal gordura para cozinhar ou temperar alimentos; baixo consumo de laticínios; consumo de água e de infusões como bebidas de eleição e baixo a moderado consumo de vinho a acompanhar as refeições principais (Associação Portuguesa de Nutricionistas, 2014). Esta dieta caracteriza-se, igualmente, por ser muito rica em plantas aromáticas, podendo pensar-se que as mesmas possam contribuir de forma significativa para o aumento do consumo de antioxidantes por parte das populações que pratiquem este tipo de alimentação (Bower *et al.*, 2015).

As plantas aromáticas são fornecedoras de proteínas, vitaminas (A, C e complexo B), minerais (cálcio, fósforo, sódio, potássio e ferro), fibras, componentes voláteis (óleos essenciais) e substâncias fitoquímicas (Direcção Geral de Saúde, 2015).

A capacidade de alguns alimentos, em particular das plantas aromáticas, para reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crónicas, tem em parte sido associada à ocorrência de metabolitos secundários que não são considerados nutrientes, mas que apresentam atividade biológica – os fitoquímicos (Bower *et al.*, 2015). Os glucosinolatos, compostos sulfúricos provenientes da família *Alliaceae*, os terpenóides e vários grupos de polifenóis (antocianinas, flavonas, flavonóides, isoflavonas, etc.), são exemplos de fitoquímicos que podem ser disponibilizados através da dieta (Espín *et al.*, 2007).

A produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) é um processo natural proveniente de

reações metabólicas. Estas espécies são capazes de reagir com quase todo o tipo de biomoléculas, e tendem a ser desativadas naturalmente por antioxidantes endógenos ou exógenos (fornecidos pela dieta). Contudo, quando estes antioxidantes não se encontram presentes em quantidades suficientes, podem não ser capazes de exercer a sua função protetora contra as ROS conduzindo assim à condição de *stress* oxidativo, em que se verifica uma acumulação de ROS com uma conseqüente acumulação de lesões induzidas por estas, que podem levar a perdas de funções fisiológicas, doenças e, potencialmente, à morte. Assim, estudos científicos recentes têm-se focado na procura e pesquisa de antioxidantes naturais, como é o caso daqueles que se encontram presentes nas plantas aromáticas, que possam ser veiculados pela alimentação como forma de tentar diminuir potenciais situações de *stress* oxidativo (Srinivasan, 2014)

Hoje em dia a utilização de plantas aromáticas tem vindo a registar um aumento considerável, podendo estas ser utilizadas na alimentação, como ingredientes na confeção de diversos pratos bem como de bebidas alcoólicas ou de infusões, ou mesmo ao nível da perfumaria e cosmética. Na alimentação o seu uso pode contribuir para enaltecer o sabor do prato, permitindo a redução do consumo de sal, e ainda dar cor, contudo devido ao seu conteúdo em fitoquímicos, as suas funções não passam apenas por melhorar o aspeto e sabor de um alimento, podendo igualmente, passar por conferir propriedade benéficas para a saúde (Direcção Geral de Saúde, 2013).

Têm sido reconhecidas muitas propriedades medicinais das plantas aromáticas que podem representar um impacto benéfico para a saúde. Dentro destas propriedades podem destacar-se, entre outras, a capacidade antioxidante, ação de estimulação da digestão, capacidade anti-inflamatória e antimicrobiana (Wojdyło *et al.*, 2007). Tais propriedades têm sido estudadas como modo de prevenção de doenças crónicas como doenças cardiovasculares, obesidade, artrite reumatóide, aterosclerose e mesmo doenças de cariz neurodegenerativo como a doença de Alzheimer (Soobrattee *et al.*, 2005; Wojdył *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2010; Miroddi *et al.*, 2014; Srinivasan, 2014).

Para além do impacto direto que podem ter na saúde, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas das plantas aromáticas, podem fazer com que estas desempenhem um papel importante ao nível da conservação e retardamento da degradação de géneros alimentícios (Peter *et al.*, 2004; Ignat *et al.*, 2011). Assim, a actividade antioxidante destas plantas, principalmente devida ao seu conteúdo em compostos fenólicos, pode retardar a oxidação lipídica dos alimentos, processo que gera a libertação de sabores e aromas indesejáveis, aumentando o seu tempo de prateleira (Soares, 2002), constituindo uma alternativa mais bem aceite pelos consumidores aos conservantes químicos, como o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e tetrabutylhidroquinona (TBHQ) (Hinneburg *et al.*, 2006; Falowo *et al.*, 2014).

Para além das alterações de sabor, aroma e aspeto que são perceptíveis aos consumidores, a oxidação dos alimentos conduz a uma diminuição da sua qualidade nutricional e pode dar

origem à formação de compostos tóxicos, que a longo ou curto prazo podem causar danos na saúde do Homem (Choe *et al.*, 2009; Embuscado, 2015).

Considerando o aumento do consumo e os potenciais efeitos para a saúde das plantas aromáticas, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro*, assim como a ação anti-inflamatória *in vivo* de três plantas aromáticas disponíveis comercialmente, nomeadamente sálvia (*Salvia officinalis*), poejo (*Mentha pulegium*) e cebolinho (*Allium schoenoprasum* L.).

1.1 Caracterização das plantas aromáticas estudadas

1.1.1 Sálvia

A *Salvia officinalis* L., comumente conhecida como sálvia ou salva, pertencente à família *Lamiaceae*, é um arbusto de folhas verdes acinzentadas, recobertas por uma penugem e de flores roxas (Figura 1.1) com origem na região do Mediterrâneo. Conhecida desde a antiguidade, a sálvia era considerada como uma planta milagrosa. Os antigos gregos cultivavam a sálvia como planta medicinal e os Druidas para curar febres, tosse, bronquite e reumatismo. Ao longo dos anos têm vindo a ser atribuídas a esta planta propriedade espasmolíticas, antissépticas e cicatrizantes. Para além do seu consumo na forma de infusão, as folhas de sálvia têm uma vasta aplicação culinária graças às suas qualidades aromáticas, sendo também empregues como estimulante do apetite. O seu cultivo tem como objetivo a obtenção de folhas secas ou frescas para utilização nas áreas da medicina, perfumaria e também em indústrias alimentares (Santos-Gomes *et al.*, 2002).



Figura 1.1.A- Folhas e flor de Sálvia. B- Ramo de Sálvia (A- <https://orienteocidente.wordpress.com/2011/07/23/salvia-salvia-officinalis/>; B- <https://www.feiranetrj.com.br/salvia>)

1.1.2 Poejo

O poejo (Figura 1.2), nome popular dado à espécie do género *Mentha*, *Mentha pulegium*, é uma planta muito aromática pertencente à família *Lamiaceae*. Esta planta teve origem na América e prosperou para o oeste, sul e centro da Europa e Ásia, entre outros locais. Em Portugal o poejo pode ser encontrado em locais húmidos e em linhas de água (Teixeira *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2014).



Figura 1.2: A- Aspeto dos poejos no solo; B- Folha de poejo ao pormenor (A- http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0110+2253; B- <http://www.semstress.com/poejo-na-culinaria/>)

Em Portugal, o poejo é principalmente utilizado na região do Alentejo, como condimento na confeção de pratos tradicionais, conferido um sabor característico aos pratos da região. Para além do seu uso culinário, as folhas do poejo têm vindo a despertar um crescente interesse no que diz respeito às suas propriedades medicinais, nomeadamente ao nível de distúrbios intestinais, gripes e constipações entre outras, indicando a possibilidade da existência de compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (Teixeira *et al.*, 2012, Shahmohamadi *et al.*, 2014).

De entre os compostos que estão presentes nas folhas do poejo, têm sido descritos por vários autores quatro principais compostos, responsáveis pelas atividades identificadas anteriormente: a pulegona, mentona, piperitona e isometona (Teixeira *et al.*, 2012)

1.1.3 Cebolinho

O *Allium schoenoprasum* L. (Figura 1.3), comumente conhecido por cebolinho é uma planta da família *Liliaceae*, e encontra-se amplamente distribuído nas regiões do Ártico, Ásia, Europa e Norte da América, sendo as zonas de maior cultivo encontradas no hemisfério norte (Chen, 2006). Do ponto de vista do seu cultivo é uma planta interessante uma vez que apresenta folhas com uma estrutura tubular, que funcionam como reservatórios de água, fazendo com que o cebolinho consiga adaptar-se quer a temperaturas frias quer quentes e a ambientes

secos. Para além disso, como tem um crescimento rápido, o cebolinho pode ser cultivado e apanhado várias vezes durante o ano (Viña *et al.*, 2009).



Figura 1.3: A- Plantação cebolinho; B- Molho de cebolinho cortado (A- <http://naturaldrug.tumblr.com/post/8997313577/allium-schoenoprasum>; B- <http://receitas-culinaria.pt/22079/em-que-pratos-utiliza-o-cebolinho>)

As folhas de cebolinho são muito usadas ao nível da culinária como condimento, uma vez que apresentam um sabor mais suave do que outras “plantas” do mesmo género. Tem sido descrita a utilização das folhas desta planta em diversas aplicações medicinais. Assim, estas folhas têm sido utilizadas para baixar a pressão arterial, alívio das dores provocadas por queimaduras pelo sol e de dores de garganta, assim como agentes antimicrobianos (Parvu *et al.*, 2014).

As propriedades antioxidantes do cebolinho advêm da sua composição em compostos sulfurados, assim como em outros compostos bioativos como é o caso dos polifenóis, que também apresentam propriedades anti-inflamatórias (Rattanachaikunsopon *et al.*, 2008).

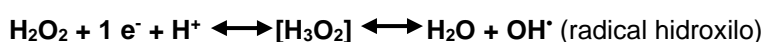
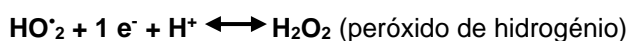
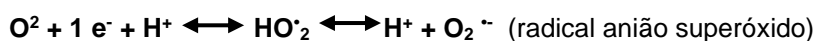
1.2 Sistema de defesa antioxidante e Stress oxidativo

Conforme já anteriormente referido, no decorrer das reações metabólicas que ocorrem nos organismos vivos são produzidas espécies reativas de oxigénio (ROS). Estas espécies podem apresentar-se quer na forma radicalar, como é o caso do radical anião superóxido, radical hidroxilo, ou radical peróxilo, quer na forma não radicalar como é o caso do peróxido de hidrogénio, oxigénio singlete ou ácido hipocloroso (Pisoschi *et al.*, 2015)

A denominação de radicais livres é atribuída às espécies químicas que possuem pelo menos um eletrão desemparelhado. A ocorrência de um eletrão desemparelhado na orbita externa resulta numa elevada reatividade destas espécies, devido à sua capacidade para doar ou receber eletrões de forma a obter estabilidade química. Desta forma, a maioria dos radicais tem um tempo de semi-vida curto, reagindo rapidamente com outras moléculas (Kohen & Nyska, 2002).

Os radicais originados a partir do oxigénio representam o grupo mais importante de radicais produzidas em organismos vivos (Valko *et al.*, 2007). O oxigénio funciona com aceitador de eletrões no processo transporte eletrónico que ocorre na mitocôndria e que é essencial para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) nas células dos organismos vivos. Neste processo, o oxigénio é reduzido a água através da aquisição de quatro eletrões (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010).

A formação de radicais pode, então, acontecer através dos seguintes passos:



Assim, através da redução do oxigénio são geradas espécies reativas de oxigénio como o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo (OH^\cdot) (Buonocore *et al.*, 2010).

O radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular seja através de processos metabólicos ou por processos de irradiação. No que se refere aos processos biológicos, a sua produção ocorre maioritariamente através da cadeia respiratória mitocondrial, podendo também ser originada por oxidação do ferro do grupo heme. A dismutação deste radical produz o peróxido de hidrogénio, que por sua vez pode ser reduzido a água e O_2 .

O radical hidroxilo tem uma reatividade muito elevada, sendo considerada a ROS mais perigosa. Este radical é maioritariamente produzido quando ocorre um excesso de produção do anião superóxido e peróxido de hidrogénio pela reação de Haber – Weiss. Devido à sua elevada reatividade, quando produzido *in vivo* este reage perto do seu local de formação, interagindo com a maior parte das moléculas orgânicas como o ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas, lípidos, aminoácidos ou açúcares.

Apesar de não se considerado um radical livre, o oxigénio singleto é considerado uma espécie oxigenada bastante reativa. Tal reatividade deve-se à inversão de *spin* de um dos seus dois eletrões desemparelhados, aumentando o seu poder oxidativo.

Para além da cadeia respiratória mitocondrial, que tal como foi mencionado anteriormente, constitui a principal fonte de produção endógena de ROS, existem outras formas de produção destas espécies, que incluem o sistema de citocromos P450 e enzimas oxidativas como a xantina oxigenase ou as lipoxigenases. Contudo as ROS podem também ser produzidas a partir de substâncias exógenas. Entre as fontes exógenas encontram-se a exposição a radiação ionizante e não ionizante; exposição a poluentes do ar; fármacos e xenobióticos, ou mesmo a infeção por agentes patogénicos, como bactérias e vírus que pode levar à produção

de ROS, seja por libertação direta pelo patogénico seja como resposta endógena induzida pelos fagócitos e neutrófilos (Kohen *et al.*, 2002; Juránek *et al.*, 2013).

A produção de ROS em baixa quantidade é benéfica para os organismos vivos, estando envolvidas, por exemplo, na resposta celulares de defesa contra agentes infecciosos ou em sistemas de sinalização celular (Valko *et al.*, 2007). Contudo, as ROS, quando em excesso acabam por ser prejudiciais para o organismo se não forem atempadamente neutralizadas por um sistema eficiente de antioxidantes. Surge assim o conceito de *stress oxidativo*, que se define como um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidativas e a capacidade do organismo para as neutralizar pela ação do seu sistema de proteção antioxidante (Valko *et al.*, 2007; Srinivasan, 2014; Pisoschi *et al.*, 2015). Tal desequilíbrio pode conduzir a uma acumulação de danos oxidativos em componentes celulares essenciais, nomeadamente lípidos, proteínas ou mesmo DNA, podendo estar na base de algumas doenças crónicas (Valko *et al.*, 2007). Com efeito, vários são os estudos que associam a superprodução de ROS com o desenvolvimento de patologias como cancro, doenças cardiovasculares, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes ou doença isquémica (Kohen & Nyska, 2002).

As membranas celulares devido à sua elevada composição em ácidos gordos insaturados, são estruturas muito suscetíveis à oxidação – peroxidação lipídica. A reação das ROS com os ácidos gordos poli-insaturados das membranas desencadeia uma oxidação em cadeia que pode levar à perda de integridade da membrana, à diminuição da sua fluidez e à inibição da atividade das proteínas transportadoras e assim alterar as suas funções de barreira e transporte (Castro *et al.*, 2001; Kohen *et al.*, 2002).

Para além dos ácidos gordos, também as proteínas, em particular as cadeias laterais dos aminoácidos que as constituem, em particular a cisteína e metionina, podem ser alvo de oxidação pelas ROS. Como consequência pode haver alteração das estruturas destas biomoléculas, perda da atividade enzimática e alteração das funções celulares como produção de energia e interferência nos potenciais de membrana (Kohen *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007).

As interações das ROS, e maioritariamente do radical hidroxilo, com o DNA pode levar a vários tipo de danos, como, por exemplo, alteração das bases do DNA, quebras das cadeias duplas e simples da sua estrutura ou *cross-links* entre o DNA e outras moléculas. Uma vez que estas alterações podem não ser reversíveis, tais danos oxidativos podem representar o primeiro passo nos processos de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento (Castro *et al.*, 2001; Kohen *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007).

1.2.1 Antioxidantes

As consequências prejudiciais, anteriormente descritas, associadas à condição de *stress oxidativo*, fazem com que seja absolutamente fundamental a existência de um sistema de defesa antioxidante eficaz que permita aos organismos a remoção direta de pró-oxidantes. Um antioxidante pode ser definido como uma substância que quando presente numa concentração

mais baixa do que o substrato oxidável consegue retardar ou mesmo inibir a oxidação desse mesmo substrato (Pisoschi *et al.*, 2015).

O mecanismo de defesa antioxidante pode ser realizado por antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) ou glutatona-peroxidase (GPx), ou antioxidantes não enzimáticos, onde estão incluídos os compostos fenólicos como os ácidos fenólicos ou os flavonóides, compostos organossulfurados, vitaminas e compostos azotados não proteicos.

Os antioxidantes podem ter uma origem endógena, como é o caso dos antioxidantes enzimáticos e de alguns não enzimáticos como a glutatona e ácido úrico. Contudo, muitos dos antioxidantes não enzimáticos, tais como as vitaminas, os carotenóides ou os polifenóis, são obtidos a partir de fontes alimentares (Ratnam *et al.*, 2006; Bouayed *et al.*, 2010).

Sem os antioxidantes provenientes da dieta, o sistema de defesa antioxidante humano seria insuficiente para combater o constante processo oxidativo a que este está sujeito (Ratnam *et al.*, 2006). A evolução do Homem levou também a uma evolução do tipo de dieta, tendo havido uma tendência para a diminuição do consumo de alimentos ricos em compostos com ação antioxidante (Benzie, 2003). De um modo geral têm sido descritos dois tipos de padrão alimentar, o padrão saudável e o padrão ocidental (*Western*). Este último, ao contrário do padrão saudável, que está associado ao maior consumo de frutas, legumes, vegetais, grãos, peixe e carnes brancas, caracteriza-se pelo consumo elevado de carnes vermelhas, gorduras e produtos processados (Nobbs *et al.*, 2016). A adoção do regime alimentar ocidental tem vindo a ser associado a doenças crónicas como inflamação do tecido intestinal, cancro, doença cardiovascular, entre outras (Lee *et al.*, 2015; Nobbs *et al.*, 2016). Contudo tem-se vindo a notar uma tentativa de alteração destes hábitos.

Os antioxidantes não enzimáticos podem exercer a sua atividade através de diferentes mecanismos, tais como, (Magalhães *et al.*, 2008; Oroian *et al.*, 2015):

- Inibição de produção ou remoção das espécies reativas capazes de iniciar as reações de oxidação;
- Atividade redutora
- Capacidade de quelação de metais, em especial Fe^{3+} e Cu^{+} , prevenindo a formação de radicais hidroxilo;
- Indução de enzimas antioxidantes;
- Inibição de enzimas oxidantes.

1.2.1.1 Compostos fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de metabolitos secundários sintetizados pelas plantas como forma de defesa contra patogénicos, parasitas e predadores,

sendo que muitos deles também conferem cor às suas flores (Soobrattee *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2015). Estes compostos são constituídos por um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo, sendo a variação desta estrutura que permite classificar os compostos fenólicos em vários sub-grupos: ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, estilbenos e cumarinas (Figura 1.4.). Os compostos fenólicos podem encontrar-se sob a forma livre ou sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros (Robards *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com o número e posição dos grupos hidroxilo ou outros substituintes e deve-se principalmente à sua capacidade de agirem como agentes redutores, doadores de hidrogénio ou também devido à sua capacidade de quelação de iões metálicos (Embuscado, 2015).

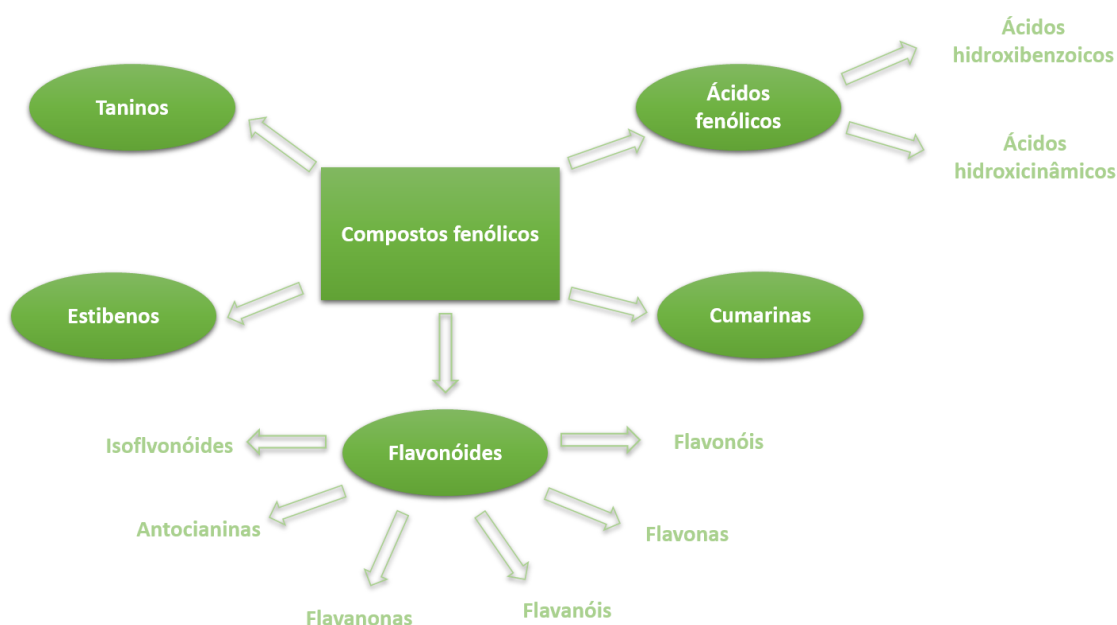


Figura 1.4: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a sua estrutura (Ferreira & Abreu, 2007).

De entre os compostos fenólicos com capacidades antioxidantes podem destacar-se os ácidos fenólicos e os flavonóides (Martins *et al.*, 2015). Os flavonóides são compostos amplamente encontrados em plantas sob a forma de glicosídeos. Estes são metabolitos de baixo peso molecular constituídos por quinze (15) átomos de carbono organizados na configuração C₆-C₃-C₆. A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos (anéis A e B), unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (anel C) (Figura 1.5). Das alterações que possam ocorrer no anel C resultam as várias classes de flavonóides (flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonóides e antocianidinas) (Rice-Evans *et al.*, 1997; Heim *et al.*, 2002; Procházková *et al.*, 2011; Embuscado, 2015).

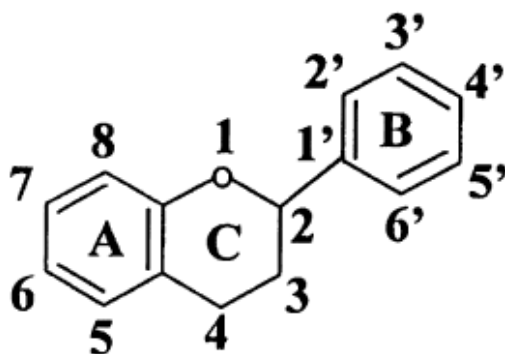


Figura 1.5: Estrutura nuclear de flavonóides (Heim *et al.*, 2002)

Os ácidos fenólicos são compostos que apresentam um anel benzênico, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo. Estes podem ser divididos em dois grupos: ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico, constituído por sete átomos de carbono (C₆-C₁), e os derivados do ácido cinâmico, que apresenta nove átomos de carbono (C₆-C₃) (Angelo *et al.*, 2007; Bernal *et al.*, 2011; Heleno *et al.*, 2015).

1.3 Inflamação

A inflamação, ou resposta inflamatória, é um mecanismo de defesa e de reparação do sistema imune inato, a danos celulares e tecidulares num determinado local. Esta pode assim surgir como uma resposta a traumas, queimaduras por temperaturas excessivas (agentes físicos); a substâncias químicas (agentes químicos); a microrganismos patogénicos (agentes biológicos) (Mattson, 2003; Ward, 2010; Mueller *et al.*, 2010; Jungbauer *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Se este processo for controlado é um mecanismo benéfico para os seres vivos protegendo-os contra os agentes agressores. Contudo, se a regulação da inflamação for disfuncional, há uma exacerbação do processo inflamatório o que poderá levar a uma perda de função (Wang *et al.*, 2013). A inflamação pode apresentar-se na forma aguda ou crónica.

A inflamação é caracterizada por vasodilatação e conseqüentemente por um aumento do volume de sangue na zona onde esta ocorre; aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo uma fuga de grandes quantidades de líquido para o espaço intersticial; migração de um grande número de granulócitos e monócitos para o tecido afetado; e inchaço dos tecidos (Guyton & Hall, 2006).

1.3.1 Inflamação aguda

Pode definir-se a inflamação aguda como uma resposta rápida e inicial ao agente agressor, sendo perceptível logo nas primeiras horas na inflamação e que vai regredindo gradualmente à medida que o agente agressor vai sendo eliminado (Pinto *et al.*, 2007, Ward, 2010). Os primeiros sinais são o rubor (vermelhidão), calor, inchaço e dor (Yoon *et al.*, 2005).

Nesta fase da resposta inflamatória há uma ativação das células endoteliais, interações de

adesão entre leucócitos e endotélio, recrutamento de leucócitos, ativação de macrófagos tecidulares, ativação e agregação plaquetária, ativação do complemento, da coagulação e sistema fibrinolítico e libertação de proteases e oxidantes pelas células fagocíticas (Ward, 2010).

A primeira linha de defesa contra as infeções são os macrófagos existentes nos tecidos afetados, que quando ativados aumentam de tamanho e iniciam a fagocitose. De seguida um grande número de neutrófilos, provenientes da corrente sanguínea, penetram a parede celular e infiltram-se na área lesada. Como estas células já se encontram no seu estado maduro, são capazes de começar de imediato o processo de fagocitose promovendo a eliminação do agente infeccioso. Em simultâneo com a migração dos neutrófilos, os monócitos presentes no sangue entram também no tecido lesado, onde ficam a maturar, aumentando de tamanho e transformando-se em macrófagos com as mesmas capacidades dos macrófagos tecidulares para fagocitar (Guyton *et al.*, 2006).

As alterações que ocorrem ao nível do local da inflamação são mediadas por mediadores inflamatórios: óxido nítrico (NO), histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária e substância P. A extravasação de neutrófilos é coordenada por moléculas de adesão intracelular, nomeadamente a ICAM-1, e moléculas de adesão vascular, nomeadamente a VCAM-1, quimiocinas, como a IL-8 e metabolitos gerados pela via do ácido araquidónico (AA) (Miguel, 2010; Gossiau *et al.*, 2011).

O AA é um precursor de eucosanóides (mediadores inflamatórios), e é um ácido gordo poli-insaturado, aparecendo no organismo apenas na forma esterificada como componente dos fosfolípidos de membrana. A enzima responsável pela sua libertação é a fosfolipase A2, quando estimulada por diversos fatores associados à inflamação (Pinto *et al.*, 2007; Miguel, 2010). Este ácido gordo tem um papel fundamental na inflamação, pois serve de substrato a enzimas como a ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), que por sua vez originam diferentes eucosanóides. Existem duas formas de COX conhecidas, denominadas COX-1, a isoforma responsável pela produção de prostaglandinas (PGs) e que controla os processos fisiológicos normais; e a COX-2, a isoforma cuja expressão é ativada nos processos inflamatórios (Gossiau *et al.*, 2011).

1.3.2 Inflamação crónica

O objetivo da inflamação é a eliminação total do agente agressor e regeneração do tecido lesado. Contudo, se este mecanismo falhar, o processo inflamatório persiste, evoluindo para um estado inflamatório crónico. Esta inflamação é causada por infeções persistentes, doenças inflamatórias imuno-mediadas ou exposição prolongada a agentes tóxicos, que pode durar semanas, meses ou uma vida inteira. Caracteriza-se pela presença de linfócitos e macrófagos, que possuem um tempo de vida de meses a anos e são responsáveis pela destruição dos tecidos. Neste tipo de inflamação há a formação de granuloma, juntamente com fibrose e/ou necrose, que originam danos irreversíveis (Ward, 2010, Gossiau *et al.*, 2011)

A inflamação crónica do intestino está relacionada com o aparecimento da colite ulcerativa (CU). A incidência e prevalência desta doença inflamatória, imunologicamente mediada, podem variar consoante a localização geográfica, sendo a América do Norte e o Norte da Europa as regiões como maior incidência. Na Europa a incidência varia entre o 1,5 a 20,3 por 100,000 habitantes e prevalência os 21 a 43 por 100,000 habitantes. (Sartor, 2006; Santos, 2011). Apesar de a sua etiologia não ser ainda bem conhecida, os estudos realizados até ao presente demonstram que existe uma anomalia genética que conduz a uma resposta excessiva por parte das células T a um conjunto de bactérias entéricas comensais. Este mecanismo pode ser desencadeado por fatores ambientais que quebram a barreira da mucosa, estimulando a resposta imunitária (Sartor, 2006; Wang *et al.*, 2013). Desta forma pensa-se que a interação dos vários fatores (bactérias comensais do intestino, fatores ambientais, suscetibilidade genética e a resposta imunitária) leva ao desenvolvimento desta inflamação crónica.

No que diz respeito aos fatores ambientais, a dieta, o uso de antibióticos e de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides, *stress* ou infeções têm sido apontados como principais fatores patogénicos. De uma maneira geral pensa-se que estes fatores possam alterar a integridade da mucosa, a resposta imunitária ou o lúmen, refletindo-se na suscetibilidade à inflamação.

O *stress* oxidativo representa também um importante papel na patogénese desta patologia. Embora os antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase, glutatona e catalase, sejam normalmente capazes de neutralizar o *stress* oxidativo na mucosa intestinal, a inflamação provoca um aumento da necessidade destes antioxidantes, causando um desequilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes com consequente dano da mucosa (Impellizzeri *et al.*, 2014)

Na CU quer a resposta imune inata (macrófagos e neutrófilos) quer a resposta imune adquirida (células T e B) estão ativadas e há uma perda de tolerância às bactérias comensais entéricas (Sartor, 2006).

Estas bactérias podem ativar o sistema imunitário funcionando quer como adjuvantes, quer como antigénios. Como adjuvantes há uma ativação da resposta imune inata, incluindo macrófagos e as células dendríticas. A ativação dos macrófagos estimula a produção de IL-1 β , TNF, IL-6, IL-8, citocinas fundamentais para o desenvolvimento da reação inflamatória. Como antigénios estimula a expansão clonal de células T. Alguns autores têm sugerido que a CU apresenta uma resposta T_H2 atípica, mediada por células T NK que segregam IL-13. Estas células T NK são ativadas por células apresentadoras de antigénios (APC) que expressam a molécula CD1d do complexo major de histocompatibilidade (CMH). As subpopulações das células T são estimuladas por APC, nomeadamente pelas células dendríticas, presentes no intestino, que têm a capacidade de ativar as células T nativas. As APCs interagem então com as células T quer pela apresentação do antigénio na superfície do CMH, ou pela secreção de citocinas como IL-6, IL-12, IL-23 e IL-10. Cada um destes sinais contribui para o estado ativado das células T (Sartor, 2006).

Para além da CU, os estados de inflamação crónica têm sido associados ao aparecimento de outras patologias, pelo que a presença na dieta de compostos com atividade anti-inflamatória pode representar uma importante mais valia na prevenção de todas essas doenças.

1.4 Atividade antimicrobiana

As bactérias patogénicas, em particular as passíveis de serem transmitidas por via alimentar, representam um grande problema de saúde pública a nível mundial, causando doenças quer em seres humanos quer em animais. De forma a combater o desenvolvimento e proliferação destes agentes patogénicos têm vindo a ser usados, pela indústria alimentar, conservantes químicos e antimicrobianos artificiais, os quais podem ser tóxicos para o Homem e mesmo causar resistência dos microrganismos a esses compostos. Tem havido assim um interesse, tanto por parte do consumidor como da indústria, na aplicação de compostos antimicrobianos naturais (Tajkarimi *et al.*, 2010; Mendez *et al.*, 2012).

A resistência dos microrganismos aos antibióticos constitui um problema cada vez mais actual. Por exemplo, o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é considerado uma das maiores causas de infeções relacionadas com o consumo de alimentos, estando as carnes, leite e queijos entre os principais alimentos envolvidos. Esta bactéria as fendas nasais de uma grande parte da população, podendo o Homem ser um dos veículos da sua transmissão (O'Hanlon *et al.*, 2009; Crago *et al.*, 2012; Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012; Gustafson *et al.*, 2015). Com a introdução e uso excessivo de antibióticos, como a metilina, no tratamento das infeções por *S. aureus*, estas bactérias foram capazes de adquirir mecanismos de resistência, tendo já sido identificado um elevado número de estirpes desta bactéria que apresenta resistência a esta classe de antibióticos – *MRSA* (O'Hanlon *et al.*, 2009; Crago *et al.*, 2012). Torna-se assim importante encontrar novos componentes que sejam capazes de ultrapassar esta resistência e prevenir a proliferação destes microrganismos nos alimentos.

Neste contexto, os compostos fenólicos podem uma vez mais desempenhar um papel importante, surgindo assim o interesse por avaliar o potencial antimicrobiano de plantas ricas nesta classe de compostos, como é o caso das plantas aromáticas (Shan *et al.*, 2007; Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012; Makwana *et al.*, 2015).

A ação antimicrobiana dos compostos fenólicos pode dever-se aos seguintes mecanismos: dano e/ou desintegração da membrana citoplasmática; dano das proteínas membranares; esvaziamento do conteúdo celular; coagulação do citoplasma; e inibição de síntese enzimática. Tal como descrito nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos, as propriedades antimicrobianas dos mesmos pode variar consoante o tipo e posição dos anéis aromáticos, assim como o comprimento das suas cadeias laterais. Para além disso as diferenças estruturais entre a parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, influenciam as propriedades antimicrobianas, sendo geralmente as bactérias Gram-positivas as mais suscetíveis (Aleksic *et al.*, 2014; Cetin-Karaca *et al.*, 2015).

1.5 Objetivo do trabalho

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano de três plantas aromáticas comumente utilizadas em Portugal: a sálvia, o poejo e o cebolinho. Esta avaliação foi efetuada em diversas etapas:

1. Preparação de extratos das plantas tal como são consumidas (plantas frescas);
2. Caracterização dos extratos em termos de compostos fenólicos totais e flavonóides totais;
3. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante dos vários extratos através de ensaios que detetem diferentes mecanismos de atividade antioxidante, nomeadamente atividade redutora e sequestro de radicais.
4. Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vivo* em modelos de inflamação aguda (edema da pata induzido pela carragenina) e de inflamação crónica (colite ulcerativa induzida pelo ácido sulfónico trinitrobenzeno)
5. Avaliação do potencial dos vários extratos contra bactérias gram-positivas (*S. aureus*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) e leveduras (*Candida albicans*).

2 Materiais e métodos

2.1 Plantas aromáticas

Neste trabalho analisaram-se os extratos hidroalcoólicos de três plantas aromáticas: sálvia (*Salvia officinalis* L.), poejo (*Mentha pulegium*) e cebolinho (*Allium schoenoprasum* L.). As amostras utilizadas foram adquiridas em superfícies comerciais. Os extractos foram preparados imediatamente após a compra das plantas.

2.2 Reagentes e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%), acetato de sódio trihidratado (Panreac, 99%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido ascórbico (Panreac, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido gálico (Merck, 99,5%), ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99% e Merck, 50%), ampicilina (Sigma-Aldrich), azul de nitrotetrazólio (NBT²⁺) (Sigma), carbonato de sódio (Panreac, 99%), carragenina- λ (Sigma-Aldrich), (+)-catequina monohidratada (Sigma > 96%), cetamina (Bio2 Produtos Veterinários), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto de sódio (Panreac, 99%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•], fluka), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), formol (Merck), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), meio de cultura Mueller-Hinton Agar (MHA – Becton Dickinson), indometacina (Sigma-Aldrich), metilicina (Sigma-Aldrich), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), nitrito de sódio (Merck, 99%), reagente de Folin-Ciocalteu (Merck), solução de cloreto de sódio 0,1% (Merck), solução fisiológica estéril (B.Braun), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99%), tempol (Sigma-Aldrich), tetraciclina (Sigma-Aldrich), tripiriditriazina (TPTZ) (Fluka, 99%), triton X-100, trolox (Sigma-Aldrich), vancomicina (Sigma-Aldrich) e xilazina (Bio2 Produtos Veterinários). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura utilizou-se sempre água ultrapura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.3 Preparação dos extratos de plantas aromáticas

Para a preparação dos extratos das plantas aromáticas em estudo utilizou-se a metodologia descrita por Maurício (2014), com algumas alterações. As plantas adquiridas em superfícies comerciais foram lavadas com água corrente e foram deixadas a secar ao abrigo da luz à temperatura ambiente, sendo posteriormente cortadas finamente. Para a preparação dos

extratos de poejo e cebolinho foram adicionados 100 mL de etanol 70% a cada 20 g da planta aromática. Para a preparação do extrato de sálvia, foram adicionados 100 mL de etanol a 70% a cada 15 g de sálvia. Todos os extratos foram preparados sob agitação magnética, ao abrigo da luz durante 24 horas. Findo este tempo, os extratos foram filtrados a vácuo, através de papel de filtro, e o filtrado foi lavado com etanol 70 % numa proporção de 30 mL deste para cada 100 mL de extrato. O etanol presente nos extratos foi evaporado em rotavapor (Heidolph LABOROTA 4001) a 40 °C, sendo as amostras posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então recolhido e separado em alíquotas de 1 mL que foram congeladas a -50 °C até utilização nas determinações seguintes.

2.4 Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu baseia-se na redução a pH alcalino do heteropolianião molibdotungsteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, efectuada pelos compostos fenólicos da amostra, na forma de ião fenolato, e que origina o aparecimento de uma coloração azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005). Este método é simples, sensível e preciso mas pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam, igualmente, reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, adenosina, alanina, ácido aminobenzóico, ácido ascórbico, benzaldeído, cisteína, creatinina, histamina, histidina, índole, frutose, sacarose, sulfito de sódio, sulfato de ferro e outros (Prior *et al.*, 2005).

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada tendo como referência o método descrito por Kosar *et al.* (2008) com algumas modificações. Em tubos de ensaio, colocou-se 3 mL de água ultrapura, um determinado volume das amostras ou suas diluições, 250 µL de reagente Folin-Ciocalteu, e aguardou-se um minuto à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 750 µL de solução de carbonato de sódio a 20% (p/v), perfazendo-se o volume a 5 mL com água ultrapura. As amostras foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro. Terminado o tempo de incubação, procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada de forma igual às amostras, mas substituindo-as por soluções de ácido gálico de modo a obter concentrações finais entre o 0,5 e os 5 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de extrato e por grama de planta seca.

2.4.1 Quantificação dos Flavonóides Totais

Esta determinação baseia-se no facto de, em meio alcoólico, ocorrer a formação de complexos

estáveis entre o alumínio e os flavonóides, que levam a um desvio para comprimentos mais elevados do máximo de absorção destes compostos. Dessa forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. Os ácidos fenólicos, apesar de formarem complexos com cloreto de alumínio, absorvem em comprimentos de onda menores (Lianda & Castro, 2008).

A quantificação dos flavonóides totais foi realizada de acordo com o método descrito por Barros *et al.* (2010), com pequenas adaptações. Assim, em tubos de ensaio colocou-se 1 mL de água ultrapura, 250 µL de amostra ou suas diluições e 75 µL de solução de nitrito de sódio 5% (p/v), aguardando-se 6 minutos. Em seguida adicionaram-se 75 µL de solução de cloreto de alumínio 10% (p/v), aguardando-se novamente 6 minutos. Por fim, adicionou-se 1 mL de solução de hidróxido de sódio 4% (p/v) e 100 µL de água ultrapura. Após uma incubação de 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 510 nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500) de todas as amostras contra o respetivo branco. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em flavonóides sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para as amostras mas substituindo as amostras por soluções de catequina com concentrações finais entre os finais entre os 15,6 e os 750 µM, tendo os resultados sido expressos em µmol equivalentes de catequina (EC) por mililitro de extracto e por grama de planta.

2.4.2 Determinação da humidade das plantas aromáticas

A determinação da humidade foi efectuada utilizando a metodologia descrita em AOAC (1990). Assim, a percentagem de humidade para cada uma das amostras em análise foi efectuada por gravimetria, após secagem em estufa (WTC Binder) a 103 ± 2 °C, até se atingir peso constante. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

2.4.3 Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas

2.4.3.1 Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH

O radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}) é um dos poucos radicais de azoto orgânico estáveis e disponíveis comercialmente (Prior *et al.*, 2005; Kedare *et al.*, 2011). A determinação baseia-se na medição da capacidade de desativação do DPPH^{*} por parte dos antioxidantes existentes na amostra, esta reação faz com que o radical de cor púrpura vá dando lugar à hidrazina correspondente, passado a cor de púrpura para amarelo (Figura 2.1). Assim a atividade antioxidante pode ser determinada através da avaliação da diminuição da absorção do DPPH^{*} a 517 nm. A percentagem final de DPPH^{*} é inversamente proporcional à concentração de compostos antioxidantes (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Kedare *et al.*, 2011).

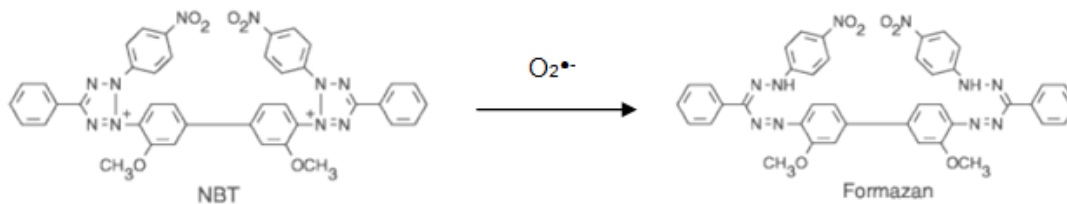


Figura 2.2: – Reação do NBT^{2+} com o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dando origem a um diformazano

Neste ensaio, o radical anião superóxido foi gerado pelo sistema metossulfato de fenazina (PMS) e NADH, em que, o PMS após ser reduzido pelo NADH reage com o oxigénio produzindo o radical anião superóxido (Nakamura *et al.*, 1992). Tendo em conta que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica (Magalhães *et al.*, 2008).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão *et al.* (2001). Numa cuvete adicionaram-se diferentes volumes de amostras ou suas diluições, de forma a testar diferentes concentrações, e completou-se com água até um volume de 200 μL . Em seguida adicionaram-se 300 μL de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300 μL de NBT^{2+} 430 μM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e por último tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950 μL . A reação iniciou-se com a adição de 50 μL de PMS 162 μM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a absorvância da amostra a 560 nm, com recurso ao programa WinASPECT, durante dois minutos à temperatura ambiente e determinado a variação desse valor. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água). As determinações foram realizadas em triplicado, no espectrofotómetro (SPEKOL 1500).

A percentagem de inibição da redução do NBT^{2+} de cada uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Declive médio}_{\text{controlo}} - \text{Declive médio}_{\text{amostra}}) / (\text{Declive médio}_{\text{controlo}})] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido das amostras foi expressa em μmol equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto e por grama de planta seca, após interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico de modo a obter concentrações finais entre os 3,9 e os 78,9 μM .

2.4.3.3 Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

Este método consiste na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺. Quando o Fe³⁺ do complexo de Fe³⁺-tripiriditriazina (Fe³⁺-TPTZ) é reduzido a Fe²⁺ forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul (Figura 2.3) passível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras presentes na amostra (Benzie & Strain, 1996).

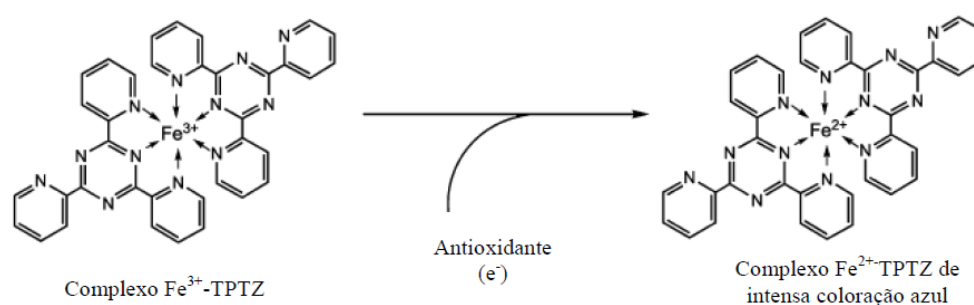


Figura 2.3: - Formação do complexo (Fe³⁺-TPTZ) após redução do Fe³⁺ por um antioxidante

O ensaio FRAP realizou-se de acordo com o método descrito por Benzie (1996) com as modificações de Ramful (2010). Assim, num tubo de ensaio adicionaram-se 100 µL de cada uma das amostras ou suas diluições, 300 µL de água ultrapura e 3 mL de reagente FRAP (Tabela 2.1) preparado de fresco e pré-aquecido a 37 °C.

Tabela 2.1: Composição do reagente FRAP

Reagentes	Quantidade
Tampão acetato 0.25 M pH 3,6	25 mL
TPTZ 10 mM em HCl 40 mM	2,5 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O 20 mM	2,5 mL

Os tubos foram incubados 4 minutos em banho de água a 37 °C. Após a incubação a coloração azul desenvolvida foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotômetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os

resultados foram expressos em μmol de Fe^{2+} por mililitro de extrato e por grama de planta seca.

2.4.3.4 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

O método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste na redução do Cu^{2+} a Cu^+ por ação de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. A forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu^+ -neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm. Desta forma, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu^{2+} -neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Figura 2.4) (Apak, et al., 2004).

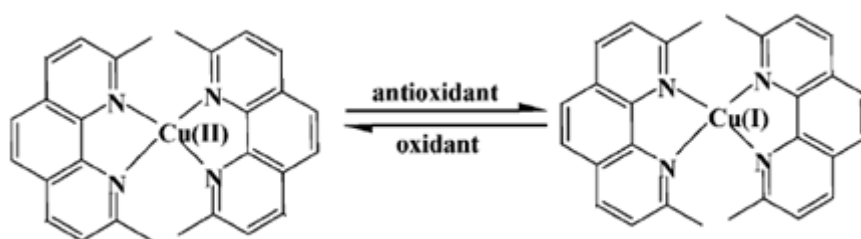


Figura 2.4: Redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de antioxidantes

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak *et al.* (2004) com algumas adaptações. Num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1 M e neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionou-se a amostra, ou suas diluições, e completou-se a 4100 μL com água. Os tubos foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água em vez da amostra.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a actividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL de soluções padrão de ácido ascórbico com concentrações entre 12,5 e 250 μM . Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por mililitro de extracto e por grama de planta seca.

2.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extractos de plantas aromáticas

A actividade antimicrobiana foi estudada testando a sensibilidade aos extractos dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538); *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Candida albicans* (ATCC10231). O procedimento seguido foi adaptado de Cavalieri et al. (2005)

A suspensão dos microrganismos para os ensaios foi preparada transferindo-se diversas colónias, com crescimento entre 18-24 horas, bem isoladas, do meio Muller Hinton Agar para um tubo contendo 10 mL de meio salino (0,85% NaCl), de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 na escala McFarland. Esta suspensão inicial foi diluída 10 vezes, tendo-se então plaqueado 1000 µL desta suspensão por incorporação em meio Muller Hinton Agar. Após completa solidificação do meio, efectuaram-se poços equidistantes de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um tubo de vidro estéril, tendo as diversas amostras sido introduzidas nesses poços. As placas foram depois colocadas durante 2 horas a 4 °C para difusão completa dos extractos e, em seguida, foram a incubar em estufa a 37 °C durante 24 horas, no caso das bactérias, ou a 30 °C durante 48 horas, no caso da levedura. Foram realizados triplicados de todas as amostras. A atividade antimicrobiana foi estimada a partir do diâmetro dos halos de inibição obtidos.

Em simultâneo, foram também determinadas as atividades antimicrobianas de antibióticos conhecidos, de modo servirem como controlos positivos. Para tal, a suspensão dos microrganismos foi preparada de forma idêntica à descrita anteriormente, tendo posteriormente sido distribuída uniformemente pela superfície de uma placa MHA com recurso a uma zaragatoa estéril. Com o auxílio de uma pinça estéril colocaram-se na superfície da placa discos esterilizados de papel de filtro com 6 mm de diâmetro (Roth), nos quais foram posteriormente aplicados 10 microlitros das respetivas soluções de antibiótico preparadas em água estéril (ampicilina 1 µg/µL; metilicina 1 µg/µL; tetraciclina 3 µg/µL e vancomicina 3 µg/µL). As placas foram colocadas durante 2 horas a 4 °C para difusão completa dos antibióticos e, em seguida, foram a incubar em estufa (Memmert B 50) a 37°C durante 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada a partir da medição do diâmetro dos halos de inibição de crescimento para cada um dos antibióticos.

2.4.5 Ensaios *in-vivo*

2.4.5.1 Animais

No ensaio do edema da pata foram utilizados 30 ratos machos da estirpe Wistar de peso compreendido entre 100 e 150 g. No ensaio de modelo de colite ulcerativa foram utilizados 24 ratinhos machos da estirpe CD-1 de peso compreendido entre 25 e 30 g. Todos os animais foram sujeitos a um período de aclimação no Biotério de Manutenção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, à temperatura de 25 °C e com ciclos de luz diários de 14 horas, com uma dieta de manutenção de IPM-R20 (Letica) e água *ad libitum*. Todos os animais foram manuseados de acordo com a Guidance in the Operation of Animals (Scientific Procedures) Act 1986, Reino Unido e com as regulamentações da União Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986)

2.4.5.2 Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de sálvia – ensaios *in vivo*

1.4.5.2.1 Modelo de edema da pata induzido pela carragenina

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas (Hui, 2006) e sua administração desencadeia um estímulo quimiotático que culmina na infiltração de neutrófilos e macrófagos no local da inflamação consequentemente desencadeia um processo inflamatório local. Os neutrófilos e macrófagos activados produzem anião superóxido através da reação catalisada pela NADPH oxidase. A produção deste radical livre então aumenta a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), que desta forma é ativada e catalisa a sua dismutação em peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular. Através da reação de Fenton, o peróxido de hidrogénio formado pode originar o radical hidroxilo. Segue-se então uma amplificação desta resposta, com libertação de outras moléculas como IL-6, o TNF- α , IL-1 β , o NO, peroxinitrito e variadas prostaglandinas (Rocha, 2009).

Este modelo permite assim testar o efeito de fármacos nas fases aguda e subaguda do processo inflamatório, dado o edema ser precisamente um dos sinais cardinais da inflamação (Freitas, 2011).

Os animais (n=30) foram identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em seis grupos (Tabela.2.2):

Tabela 2.2: Caracterização dos grupos em estudo no modelo de edema da pata

Grupo	Nº de animais (n)	Administração subplantar	Tratamento oral
SF (controlo negativo)	5	Soro fisiológico	Água desionizada
Carragenina (controlo positivo)	5	Carragenina- λ	Água desionizada
Sálvia	5	Carragenina- λ	Extrato de sálvia
Indometacina	5	Carragenina- λ	Indometacina
Trolox	5	Carragenina- λ	Trolox
Tempol	5	Carragenina- λ	Tempol

A cada um dos grupos foi administrado com sonda intra-gástrica extrato de sálvia (15 mg de fenóis/kg de peso corporal), indometacina, trolox, tempol e água desionizada respetivamente. As patas dos animais foram marcadas, e após 30 min da administração do fármaco, foi feita injeção subplantar de 100 μ L de uma solução de 1% de carragenina- λ em soro fisiológico, de modo a induzir-se o edema na pata nos grupos carragenina e sálvia. Em cada animal marcou-se com tinta (resistente à água) a articulação da pata esquerda (ao nível do maléolo, eminência óssea do tornozelo) procedendo-se em seguida à medição do volume da pata. Ao momento de administração de carragenina atribuiu-se o tempo zero ($t=0h$), procedendo-se imediatamente à medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 3 e 6 horas após a administração da carragenina ($t=3h$ e $t=6h$). O volume medido antes de qualquer administração foi designado por V , o volume medido ao tempo zero é designado por V_0 , e o volume medido às 3 e 6 horas é designado por V_3 e V_6 , respetivamente

Todas as medições do volume da pata foram efetuadas num pletismómetro (Digital Plethysmometer LE7500 – Letica Scientific Instruments). A pata foi imersa numa solução detergente [solução de Triton X-100 a 0,15% (v/v) e cloreto de sódio 0,1% (p/v)] contida num vaso pertencente a um sistema de dois vasos comunicantes (Figura 2.5). Ao imergir a pata fez-se coincidir a marcação desta com a marcação existente no vaso. A variação do volume por imersão da pata foi indicada diretamente pelo aparelho.



Figura 2.5: A- Pletismómetro; B- Medição do volume da pata

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do aumento do volume da pata relativamente ao volume inicial da pata (antes de qualquer administração). A fórmula utilizada para calcular essa percentagem foi: $\% = [(V_6 - V_0) / V_0] * 100$, onde V_6 corresponde ao volume da pata no final dos ensaios e V_0 o volume da pata inicialmente.

1.4.5.2.2 Modelo da colite ulcerativa

O ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS) promove uma indução química da colite, por instilação intra-rectal, resultando em inflamação aguda com úlceras em animais de experiência. Este composto é considerado um hapteno, uma vez que presumivelmente se liga a proteínas endógenas na mucosa do cólon e induz uma resposta imunológica local através da ativação de macrófagos e células T. O TNBS foi diluído em etanol (EtOH), de modo a facilitar a disrupção da barreira mucosa (Ishiguro *et al.*, 2010)

Este ensaio foi seguida a metodologia descrita por Impellizzeri (2014) com algumas modificações. Os animais (n=24) foram identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Caracterização ds grupos de estudo no modelo da colite ulcerativa

Grupo	Nº animais (n)	Administração intracolónica	Tratamento oral
Sham (controlo negativo)	4	Soro fisiológico	Água desionizada
Etanol	4	EtOH 50%	Água desionizada
TNBS+etanol	8	TNBS + EtOH 50%	Água desionizada
TNBS+Sálvia	8	TNBS + EtOH 50%	Extrato de sálvia

A utilização do modelo da colite ulcerativa foi realizada tendo como referência o trabalho

desenvolvido por Mandalari (2010) e Impellizzeri (2014) com algumas modificações. Após anestesia dos animais por via intra-peritoneal, com uma solução de cetamina e xitasina na proporção 2:1 (20 µL), foi administrado de ácido sulfônico trinitobenzeno (TNBS) (100 µL em 50% etanol), por via intra-rectal, através da introdução de uma sonda 4,5 cm proximalmente no ânus, como o objetivo de induzir o desenvolvimento de colite ulcerativa. Após este procedimento, os animais foram mantidos na posição de Trendelenburg durante 15 minutos, de modo a evitar refluxo. Durante quatro dias, aos animais pertencentes ao grupo sálvia foi administrado, por via de sonda oral, extrato de sálvia (15 mg fenóis/kg de peso corporal). Ao quarto dia, os animais de ambos os grupos foram pesados e anestesiados, o abdômem foi aberto por incisão da linha média. O cólon foi removido, liberto dos tecidos adjacentes, aberto ao longo da borda antimesentérica, lavado e pesado. De seguida, o cólon foi observado por microscópio cirúrgico de bancada (Zeiss OPMI) para avaliação das lesões. A consistência das fezes foi também avaliada após o sacrifício do animal.

2.4.6 Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos dados obtidos nos ensaios *in-vitro*, foi efetuado recorrendo à utilização do *software* Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes-t elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05, ou seja, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $P < 0,05$. Relativamente aos ensaios *in vivo*, os dados – apresentados na forma de média afetada do respetivo erro padrão associado de n observações (média \pm erro padrão), em que n corresponde ao número de animais em estudo – foram estudados através de uma análise de variância ANOVA de uma entrada, seguida de um pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas utilizando o *software* Graph Pad Prism Statistical Package (versão 5.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $P < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação da percentagem de humidade

Neste trabalho as plantas tal foram estudadas tal qual são utilizadas na alimentação, ou seja, os extratos foram preparados utilizando as plantas frescas. Esta opção teve por base o conhecimento de que durante o processo de secagem podem ocorrer alterações nos compostos fitoquímicos que levem a uma alteração das características bioativas dos extratos (Capecka *et al.*, 2005). Deste modo, o estudo das plantas frescas permite estimar de forma mais real os efeitos resultantes do seu consumo. No entanto, procedeu-se à quantificação da percentagem de humidade das amostras de forma a poder expressar os resultados por grama de planta seca, e, desta forma, poder comparar o potencial bioativo das plantas independentemente do seu maior ou menor teor em água.

O teor em humidade das três plantas em estudo variou entre os 66,65% para a sálvia e os 90,63% para o cebolinho (Tabela 3.1). Estas diferenças relacionam-se com diferenças de constituição das várias espécies.

Tabela 3.1: Percentagem de humidade das diferentes plantas estudadas

Amostras	Humidade (Percentagem)
Sálvia	66,65 ^c ± 0,69
Poejo	89,84 ^b ± 0,07
Cebolinho	90,63 ^a ± 0,06

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (P<0,05)

3.2 Determinação do teor em compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais dos extratos em estudo foram determinados através do método Folin-Ciocalteu, encontrando-se os resultados obtidos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Compostos fenólicos totais das diferentes amostras

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG/L)	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g planta seca)
Sálvia	6208 ^a ± 200	49,84 ^a ± 1,61
Poejo	1086 ^b ± 52	23,55 ^b ± 1,12
Cebolinho	323 ^c ± 10	6,97 ^c ± 0,21

Em cada coluna, médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($P < 0,05$)

Os resultados obtidos mostram uma variação significativa no teor de compostos fenólicos entre as várias amostras, quer quando estes se expressam em mg EAG/L de extrato, quer quando se expressam em mg EAG/g de planta seca. Assim, os valores variaram entre os 6204 mg EAG/L, para o extrato de sálvia e os 323 mg EAG/L, para o extrato de cebolinho, e entre 0s 49,84 mg EAG/g de planta seca, para a sálvia, e os 6,97 mg EAG/g de planta seca, para o cebolinho. Desta forma a sálvia foi a planta que apresentou um teor mais elevado, seguindo-se o poejo, e por último com menor composição em compostos fenólicos o cebolinho, sendo que todos os valores foram significativamente diferentes (teste t com $P < 0,05$).

A observação da tabela 3.2, permite ainda verificar que o extrato de sálvia apresenta um teor em compostos fenólicos cerca de seis vezes superior ao extrato de poejo e cerca de 19 vezes superior ao do extrato de cebolinho. Contudo, quando esta comparação é efetuada em termos de peso seco de planta, as diferenças não são tão acentuadas devido à menor percentagem de humidade que a sálvia possui. Ainda assim, a sálvia destaca-se em relação às outras duas plantas em estudo, principalmente em relação ao cebolinho, apresentando um teor em compostos fenólicos totais por grama de peso seco de planta cerca de duas vezes superior ao do poejo e cerca de sete vezes superior ao do cebolinho.

A comparação dos valores obtidos com os dados da literatura é bastante difícil de efetuar devido à grande disparidade de solventes utilizados na obtenção dos extratos, de métodos de extração, de formas como é utilizada a planta (seca, liofilizada, fresca) na forma como se expressam os resultados (mg equivalentes de ácido gálico, de ácido cafeico, de pirogalhol, etc.), ou ainda como estes se apresentam (mg de fenóis por peso de planta fresca, por peso de planta seca, por peso de extrato obtido, etc.). Chrpová *et al.* (2010) obtiveram um valor de compostos fenólicos totais de 24,3 mg EAG/g de folhas secas de sálvia. Tal valor é mais baixo do que o encontrado neste estudo. Segundo Farhat *et al.* (2013), dependendo das condições edafoclimáticas podem verificar-se variações da composição em compostos fenólicos totais da sálvia. Para além deste fator, o facto de, no presente trabalho, a extração ter sido efetuada com etanol 70%, enquanto que no estudo de Chrpová *et al.* (2010) foi efetuada com água quente, também poderá contribuir para o maior valor de compostos fenólicos determinado. Já em relação ao poejo, Brahmi *et al.* (2015) encontraram um valor de $6,1 \pm 0,5$ mg EAG/g de planta

seca, sendo o valor encontrado no presente estudo ($23,55 \pm 1,12$ mg EAG/g de planta seca) bastante superior. Mais uma vez, as diferenças podem relacionar-se com as condições de cultivo bem como com os diferentes métodos de preparação dos extratos.

3.3 Quantificação dos flavonóides totais

A determinação dos flavonóides totais foi realizada através do método de complexação com o alumínio na presença do nitrito de sódio em meio alcalino. O teor em flavonóides totais dos extratos de plantas aromáticas em estudo é apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Teor em flavonóides totais das diferentes amostras

Amostras	Flavonóides totais (mmol EC/L)	Flavonóides totais (μ mol EC/g planta seca)
Sálvia	$17,271^a \pm 0,522$	$138,7^a \pm 4,2$
Poejo	$2,786^b \pm 0,099$	$60,5^b \pm 2,2$
Cebolinho	$0,049^c \pm 0,002$	$1,07^c \pm 0,06$

Em cada coluna, médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($P < 0,05$)

Tal como verificado com os fenóis totais, também no caso da determinação dos flavonóides totais foi possível verificar uma variação significativa no teor destes compostos quer quando estes se expressam em mmol EC/L de extrato, quer quando se expressam em μ mol EC/g de planta seca. A ordem de variação dos flavonóides acompanhou a ordem de variação dos compostos fenólicos totais, ou seja, mais uma vez a sálvia foi a planta com maior teor, seguida do poejo e, por último, do cebolinho, sendo todos os valores obtidos sido significativamente diferentes (teste t com $P < 0,05$).

Também de acordo com o observado na determinação dos compostos fenólicos totais, quando os valores de flavonóides totais são comparados em termos de peso seco de planta, as diferenças verificadas entre as várias plantas não são tão acentuadas devido à menor percentagem de humidade que a sálvia possui. Ainda assim, a sálvia destaca-se em relação às outras duas plantas em estudo, principalmente em relação ao cebolinho, apresentando um teor em flavonóides totais por grama de peso seco de planta cerca de duas vezes superior ao do poejo e cerca de 130 vezes superior ao do cebolinho. Este resultado sugere que os flavonóides contribuam de forma menos expressiva para o total de compostos fenólicos do cebolinho do que para o total de compostos fenólicos da sálvia, uma vez que o teor em fenóis totais desta planta é cerca de sete vezes inferior ao da sálvia, enquanto que o teor em flavonóides totais é cerca de 130 vezes inferior.

Mais uma vez, a comparação dos valores obtidos com os dados da literatura é bastante difícil de efetuar devido à grande disparidade de solventes utilizados na obtenção dos extratos, de métodos de extração, de formas como é utilizada a planta (seca, liofilizada, fresca) na forma como se expressam os resultados (mg equivalentes de catequina, de quercetina, etc.), ou ainda como estes se apresentam (mg de fenóis por peso de planta fresca, por peso de planta seca, por peso de extrato obtido, etc.).

O coeficiente linear de Pearson, é um coeficiente que mede a intensidade de associação linear entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for este coeficiente, mais forte é a correlação positiva entre as variáveis.

O valor do coeficiente de Pearson para a correlação entre o teor em fenóis totais e o teor em flavonóides totais dos extratos das três plantas estudadas (Tabela 3.4) indica a existência de uma forte correlação entre o teor de fenóis totais e o teor de flavonóides totais. Os resultados obtidos para estes dois ensaios apontavam nesse sentido, uma vez que o extrato com maior teor em fenóis apresentou também o maior teor em flavonóides. Os flavonóides, são dos compostos fenólicos, os compostos que normalmente estão presentes em plantas em maior quantidade, tendo sido reportados como tendo uma forte atividade antioxidante (Wen *et al.*, 2014).

Tabela 3.4: Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonóides dos extratos estudados

	<i>Fenóis</i>	<i>Flavonóides</i>
<i>Fenóis</i> ^a	1	
<i>Flavonóides</i> ^b	0,99956242	1

Nota : a) mg EAG/L de extrato; b) mmol EC/L de extrato

3.4 Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas

Para a caracterização da atividade antioxidante dos diferentes extratos das ervas aromáticas em estudo procedeu-se à avaliação da sua capacidade redutora com os ensaios FRAP e CUPRAC, à avaliação da sua capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente dos radicais anião superóxido, e também à avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH.

3.4.1 Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH

Os valores da determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH^{*} são apresentados na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Capacidade de sequestro do DPPH das diferentes amostras

Amostras	DPPH (mg EAA/mL)	DPPH (mg EAA/g planta seca)
Sálvia	6,202 ^a ± 0,093	49,800 ^a ± 0,749
Poejo	0,878 ^b ± 0,019	19,038 ^b ± 0,404
Cebolinho	0,051 ^c ± 0,001	1,104 ^c ± 0,024

Em cada coluna, médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($P < 0,05$)

A capacidade de sequestro de DPPH variou de forma significativa ($P < 0,05$) entre as várias amostras, quer quando esta capacidade se expressa em mg EAA/mL de extrato, quer quando se expressa em mg EAA/g de planta seca. Assim, esta atividade variou entre os 0,051 mg EAA/mL de extrato, para o cebolinho e os 6,202 mg EAA/mL de extrato para a sálvia., ou entre os 1,104 mg EAA/g de planta seca para o cebolinho e os 19, 038 mg EAA/g de planta seca para a sálvia. Assim, tal como verificado nas determinações de fenóis e de flavonóides totais, a sálvia foi a planta que apresentou a maior capacidade de sequestro do radical DPPH, seguida do poejo e com menor capacidade apresentou-se o cebolinho.

De forma a estabelecer relações entre o teor em fenólicos totais e em flavonóides totais das amostras estudadas e a sua respetiva capacidade de sequestro do radical DPPH, efetuaram-se correlações lineares entre estes parâmetros, podendo observar-se os valores do coeficiente de Pearson na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e o ensaio do DPPH para as várias amostras em estudo

	Fenóis	Flavonóides	DPPH
Fenóis^a	1		
Flavonóides^b	0,99956242	1	
DPPH^c	0,999989244	0,999688865	1

Nota: a) mg EAG/L; b) mmol EC/L; c) mg EAA/mL

Verifica-se a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor de fenóis e em flavonóides totais e a atividade antioxidante determinada pelo ensaio DPPH. De facto os extratos com maior teor de fenóis totais e em flavonóides totais (sálvia e poejo) foram os que apresentaram maiores valores de DPPH, indicando assim que os polifenóis, e, em particular os flavonóides contribuem significativamente para a atividade antioxidante detetada.

Vladimir-Knežević *et al.* (2014), compararam a capacidade de sequestro do radical DPPH de extratos etanólicos de diversas plantas medicinais da Croácia, entre as quais se encontram a sálvia e o poejo. Nesse estudo, os investigadores obtiveram um valor de IC_{50} de $24,27 \pm 0,21$

µg/mL para o extrato de poejo e de $4,81 \pm 0,30$ para o extrato de sálvia. Desta forma, no estudo de Vladimir-Knežević *et al.* (2014), a sálvia apresentou igualmente uma capacidade de sequestro do radical DPPH superior ao poejo, uma vez que foi necessária uma menor concentração do extrato desta planta para desativar 50% do radical DPPH presente na mistura reacional. Este resultado vai de encontro aos resultados obtidos no presente estudo.

3.4.2 Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano

A determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido foi detetada através da diminuição da formação de formazano, sendo que na tabela 3.7 podem observar-se os resultados obtidos para as amostras em estudo.

Tabela 3.7: Capacidade de sequestro do radical anião superóxido das várias amostras

Amostras	Sequestro do superóxido (µmol EAG/mL)	Sequestro do superóxido (µmol EAG/g planta seca)
Sálvia	$55,99^a \pm 12,34$	$450^{a\pm} 99$
Poejo	$9,23^b \pm 3,29$	$200^b \pm 71$
Cebolinho	$12,05^b \pm 2,28$	$260^b \pm 49$

Em cada coluna, médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($P < 0,05$)

A determinação desta atividade apresenta grande relevância fisiológica, dado que a formação desta espécie radicalar ocorre *in vivo*. Pela análise da tabela pode observar-se que os valores variaram entre 55,99 e 9,23 mmol EAG/L de extrato, sendo o maior valor correspondente ao extrato de sálvia e o menor ao de poejo. Contudo, ao contrário do extrato de sálvia que apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos extratos de poejo e de cebolinho, estes dois últimos não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$). Os mesmos resultados foram observados quando os valores se expressaram em µmol EAG/g planta seca, ou seja, a sálvia apresentou uma atividade significativamente superior à das outras duas plantas, que não apresentaram diferenças significativas entre si. Desta forma, pode concluir-se que todas as plantas estudadas possuem compostos antioxidantes capazes de captar o radical anião superóxido gerado pelo sistema NADH/PMS causando uma diminuição da extensão de redução da NBT²⁺, com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm, sendo, mais uma vez, o extrato de sálvia o que mais se destacou.

Na tabela 3.8 podem observar-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade DPPH e a capacidade de sequestro do

radical anião superóxido

Tabela 3.8: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e as atividades de sequestro do radical DPPH e do radical anião superóxido

	<i>Fenóis</i>	<i>Flavonóides</i>	<i>DPPH</i>	<i>Superóxido</i>
Fenóis^a	1			
Flavonóides^b	0,99956242	1		
DPPH^c	0,999989244	0,999688865	1	
Superóxido^d	-0,441985329	-0,415258134	-0,437820028	1

Nota: a) mg EAG/L; b) mmol EC/L; c) mg EAA/mL; d) µmol EAG/mL

Os resultados indicam a existência de correlações negativas entre todos estes ensaios, sugerindo que podem ser outros compostos presentes nos extratos, diferentes dos compostos fenólicos, que sejam maioritariamente responsáveis pela capacidade de sequestro deste radical. Com efeito, o facto de se terem verificado grandes diferenças entre os teores em fenóis e flavonóides totais do poejo e do cebolinho, e de não se terem verificado diferenças significativas entre a capacidade de sequestro do radical anião superóxido destas duas plantas, já sugeria que outras classes de compostos pudessem ser maioritariamente responsáveis por esta atividade. É reconhecido que as propriedades antioxidantes do cebolinho, para além dos polifenóis, advêm, igualmente da sua composição em compostos sulfurados (Rattanachaikunsopon *et al.*, 2008). Apesar de não se ter efetuado nenhuma quantificação destes compostos no extrato de cebolinho, a sua presença é bastante provável devido ao odor característico que estes apresentavam. Desta forma, é possível que os compostos sulfurados do cebolinho contribuam de forma significativa para o sequestro do radical anião superóxido

3.4.3 Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

A determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) foi realizada através do ensaio FRAP (Tabela 3.9)

Tabela 3.9: Valores de FRAP das diferentes amostras

Amostras	FRAP (µmol de Fe²⁺/mL)	FRAP (µmol de Fe²⁺/g planta seca)
Sálvia	68,07 ^a ± 1,64	546,6 ^a ± 13,1
Poejo	10,29 ^b ± 0,63	223,2 ^b ± 13,7
Cebolinho	0,94 ^c ± 0,03	20,40 ^c ± 0,66

Em cada coluna, médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (P<0,05)

As amostras apresentaram valores de FRAP significativamente diferentes (teste t com P<

0,05), variando entre 0,944 μmol de Fe^{2+}/mL e 68,074 μmol de Fe^{2+}/mL , sendo o maior valor pertencente ao extrato de sálvia e o menor ao extrato de cebolinho. Quando os valores foram calculados por grama de planta seca esta ordem manteve-se, ou seja, a sálvia foi igualmente a planta que apresentou um valor de FRAP mais elevado (546,6 μmol de Fe^{2+}/g planta seca) e o cebolinho a que apresentou o mais baixo (20,40 μmol de Fe^{2+}/g planta seca). Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo de Shahmohamadi *et al.* (2014), que refere que as plantas da família *Lamiaceae* apresentam uma grande capacidade de redução do Fe(III) a Fe(II) . No presente estudo as plantas pertencentes a esta família são o poejo e a sálvia, que de facto apresentaram valores de FRAP muito superiores ao do cebolinho.

Na tabela 3.10 podem observar-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonóides totais, a capacidade de sequestro do DPPH e do radical anião superóxido e o ensaio FRAP.

Tabela 3.10: Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição química e as atividades de sequestro do radical DPPH, do radical anião superóxido e o ensaio FRAP

	<i>Fenóis</i>	<i>Flavonóides</i>	<i>FRAP</i>	<i>DPPH</i>	<i>Superóxido</i>
Fenóis^a	1				
Flavonóides^b	0,99956242	1			
FRAP^c	0,999956165	0,999795565	1		
DPPH^d	0,999989244	0,999688865	0,999988837	1	
Superóxido^e	-0,441985329	-0,415258134	-0,433567007	-0,437820028	1

Nota: a) mg EAG/L; b) mmol EC/L; c) μmol de Fe^{2+}/mL ; d) mg EAA/mL; e) μmol EAG/mL

Tal como verificado no ensaio DPPH também neste caso se verificou a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor em fenóis e flavonóides totais e a atividade antioxidante determinada pelo ensaio FRAP. De facto, os extratos com maior teor de fenóis e flavonóides totais apresentaram igualmente maiores valores de FRAP, indicando que os polifenóis contribuam significativamente para a atividade antioxidante detetada neste ensaio. As correlações verificadas entre o ensaio FRAP e os ensaios DPPH e sequestro do superóxido sugerem que apenas os compostos responsáveis pela atividade FRAP e DPPH sejam maioritariamente os mesmos.

3.4.4 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

A determinação da redução do Cu(II) foi realizada através do ensaio CUPRAC, encontrando-se os valores representados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11: Valores de CUPRAC das diferentes amostras

Amostras	CUPRAC ($\mu\text{mol EAA/mL}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol EAA/g de planta seca}$)
Sálvia	83,78 ^a \pm 5,50	672,64 ^a \pm 44,19
Poejo	13,80 ^b \pm 0,60	229,12 ^b \pm 13,01
Cebolinho	1,71 ^c \pm 0,07	36,90 ^c \pm 1,44

Em cada coluna, médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($P < 0,05$)

Os valores de CUPRAC obtidos para as diversas amostras apresentaram diferenças significativas entre si (teste t com $P < 0,05$). Mais uma vez a sálvia foi a planta que apresentou a mais elevada atividade CUPRAC e o cebolinho a que apresentou a mais baixa.

Na tabela 3.12 podem observar-se os valores de coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor de fenóis e flavonóides totais e todos os ensaios de atividade antioxidante realizados.

Tabela 3.12: Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante dos extratos estudados

	Fenóis	Flavonóides	FRAP	CUPRAC	DPPH	Superóxido
Fenóis^a	1					
Flavonóides^b	0,99956242	1				
FRAP^c	0,999956165	0,999795565	1			
CUPRAC^d	0,999850403	0,999924519	0,99996852	1		
DPPH^e	0,999989244	0,999688865	0,99998883	0,999919873	1	
Superóxido^f	-0,44198532	-0,41525813	-0,4335670	-0,42640381	-0,4378200	1

Nota: a) mg EAG/L; b) mmol EC/L; c) $\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{mL}$; d) $\mu\text{mol EAA/mL}$; e) mg EAA/mL; f) $\mu\text{mol EAG/mL}$

Os ensaios de FRAP e CUPRAC avaliam a atividade antioxidante dos extratos através da sua capacidade redutora. Como tal seria esperado observar-se uma concordância entre os resultados obtidos em cada um destes ensaios, o que é possível de ser observado na tabela 3.12. Da mesma forma, a correlação fortemente positiva que se verifica entre o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antioxidante determinada pelos ensaios de FRAP, CUPRAC e DPPH, indica que os polifenóis, e particularmente os flavonóides, contribuem significativamente para a atividade antioxidante detetada em todos estes ensaios.

3.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas

A atividade antimicrobiana das amostras foi determinada através da medição dos halos de inibição, em milímetros (Tabela 3.13 e Figura 3.1). A normal sensibilidade das bactérias utilizadas foi confirmada através da realização de ensaios com antibióticos (controlo positivo) ao longo do trabalho experimental, tendo os resultados obtidos ficado dentro das gamas esperadas.

Os extratos de poejo e de cebolinho não apresentaram halos de inibição contra nenhum dos microrganismos estudados. Por sua vez, no ensaio realizado com extrato de sálvia foi possível observar halos de inibição de 12 mm com a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Contudo, tal inibição não foi observada nos ensaios realizados com a bactéria gram-negativa *E.coli*, nem com a levedura *C. albicans*, microrganismos com os quais não foi observado qualquer halo de inibição.

Tabela 3.13: Diâmetro dos halos de inibição dos diferentes extratos na determinação da atividade antimicrobiana

Amostra	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Sálvia	12,0 ± 0,6	< 6	< 6
Poejo	< 6	< 6	< 6
Cebolinho	< 6	< 6	< 6

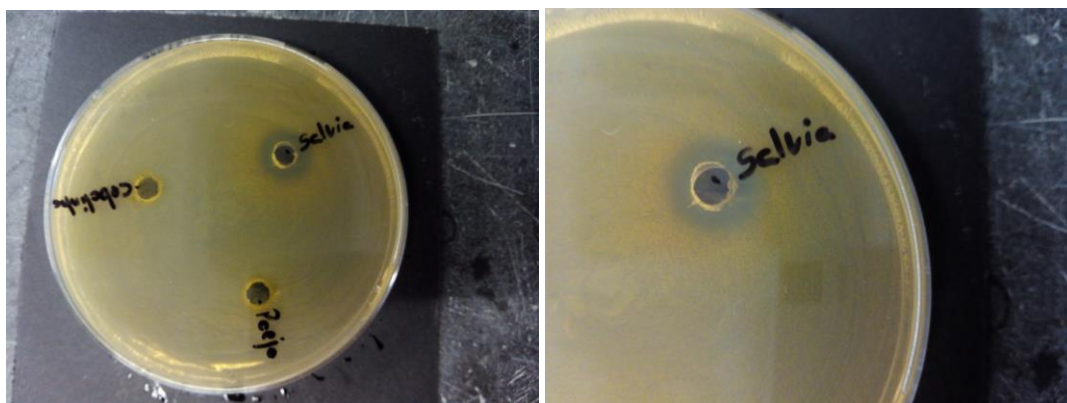


Figura 3.1: A - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de sálvia, poejo e cebolinho com o *S. aureus*; B – Halo de inibição da sálvia.

Num estudo anterior Garcia *et al.* (2013) demonstraram a existência de inibição de *S. aureus* e

C. albicans por parte do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis*. No entanto, nesse estudo a atividade antimicrobiana contra *C. albicans* só foi observada com a aplicação na placa e quantidades muito elevadas de extrato. Acresce ainda que, no estudo mencionado os extratos, foram produzidos com recurso à planta seca, pelo que podem apresentar uma maior concentração dos compostos antimicrobianos, o que poderá justificar o fato de no presente estudo não ter sido visível a inibição de *C. albicans* por parte do extrato de Sálvia.

Em relação ao extrato de poejo, Teixeira *et al.* (2012) verificaram que o extrato de poejo não apresentou inibição de *E.coli*, o que vai de encontro ao verificado no estudo aqui apresentado. Duarte *et al.* (2005) verificaram que os extratos de poejo e de cebolinho não apresentaram potencial antimicrobino em relação a *C. albicans*, tal como verificado neste estudo.

A capacidade antibacteriana de um extrato depende da concentração do extrato, das estirpes bacterianas e do procedimento de elaboração dos extratos (Khaled-Khodja *et al.*, 2014)

Observando-se os resultados obtidos nos ensaios de teor de fenóis totais e os obtidos no ensaio antimicrobiano, pode notar-se que existe uma correlação positiva entre os mesmos. As plantas com o menor teor de fenóis totais, cebolinho e poejo, não apresentam ação antimicrobiana. Pelo contrário a sálvia, que apresentou o maior teor destes compostos apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Tal fato foi também observado por Shan *et al.* (2007), em que foi demonstrada a existência de ligação entre a concentração de compostos fenólicos do extrato e a sua capacidade antimicrobiana.

Estudos sugerem que as bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, sejam mais sensíveis a extratos de plantas aromáticas do que bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*. Diferenças entre as ações microbianas dos compostos antimicrobianos podem estar relacionadas com as diferentes estruturas da parede celular e da membrana externa. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana polissacárida hidrofílica que funciona como barreira de penetração a agentes antibióticos e que também está associada a enzimas do espaço periplasmático, que são capazes de destruir moléculas provenientes do exterior. O fato de as bactérias Gram-positivas não possuírem esta membrana, faz com que as substâncias antibacterianas possam destruir a parede celular e membrana citoplasmática das mesmas, resultando num esvaziamento do citoplasma e a sua coagulação (Shan *et al.*, 2007; Weerakkody *et al.*, 2010; Cetin-Karaca *et al.*, 2015).

Uma das causas mais prevalentes de gastroenterites é a infecção por *S. auerus*, especialmente no que diz respeito ao consumo de leite e outros produto lácteos e pordutos carneos (Weerakkody *et al.*, 2010). Esta é uma bactéria presente nas fossas nasais do Homem, sendo que grande parte destes são enterotoxigénicos, devendo-se um número elevado de doenças alimentares à contaminação dos alimentos por operadores contaminados com esta bactéria (Gustafson, 2015).

3.6 Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de sálvia

3.6.1 Modelo de edema da pata induzido pela carragenina

A ação anti-inflamatória foi determinada, neste modelo, através da indução de edema da pata nos ratos pela carragenina. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.2.

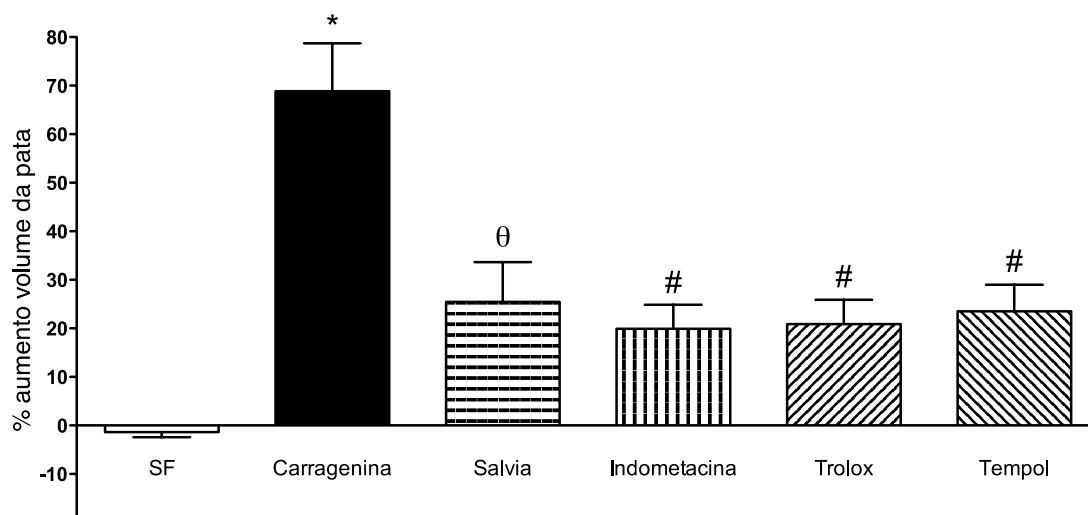


Figura 3.2: Efeito da administração oral do extrato de sálvia e de outros fármacos comerciais (indometacina, trolox e tempol) no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina (* P<0,001 vs soro fisiológico (SF); ^θP<0,01 vs Carragenina, # P<0,001 vs carragenina)

A administração de carragenina, tal como seria de esperar, provocou um aumento significativo (valor P<0,001), de cerca de 70% do volume da pata, comparativamente ao grupo controlo negativo, em que não se observou aumento de volume da pata. O extrato de sálvia reduziu a percentagem de aumento de volume da pata em mais de 50% quando comparado com o grupo carragenina (grupo controlo positivo). Esta evidência sugere que o extrato de sálvia estudado tenha uma ação anti-inflamatória com conseqüente redução do edema da pata, o que poderá estar relacionado como seu teor em compostos antioxidantes, uma vez que de entre as plantas estudadas, a sálvia foi a que apresentou o maior teor nestes compostos.

Em simultâneo foram analisados três fármacos anti-inflamatórios comerciais (indometacina, trolox e tempol) de modo a poder proceder-se à sua comparação com o extrato em estudo. Com a administração de tempol (mimético da SOD de baixo peso molecular) verificou-se uma percentagem de aumento de volume de aproximadamente 23%, do trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) um aumento do volume da pata de aproximadamente 20% e da indometacina (anti-inflamatório não-esteróide não seletivo para as cicloxigenases) um aumento do volume da pata de aproximadamente 20%. Estes resultados demonstram que o extrato de sálvia apresentou um efeito anti-inflamatório significativo, apesar do seu efeito ser ligeiramente inferior ao efeito evidenciado pelos fármacos.

3.6.2 Modelo da colite ulcerativa

A ação anti-inflamatória foi determinada, neste modelo, a partir da indução da colite ulcerativa em ratinhos. Para tal, foram obtidas observações a microscópio cirúrgico (figura 3.3), morfológicas e funcionais (tabela 3.14).

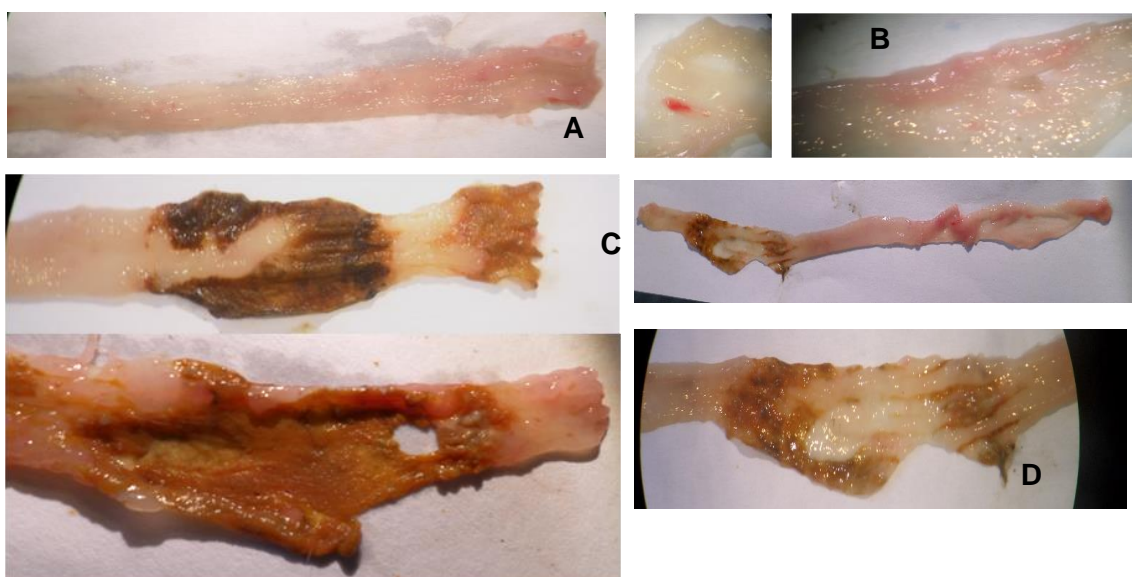


Figura 3.3: Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente (A: Grupo Sham; B: Grupo Etanol; C: Grupo TNBS + Etanol; D: Grupo TNBS + Sálvia).

Tabela 3.14: – Observações morfológicas e funcionais no cólon limpo e aberto transversalmente logo após a colheita (*P<0,05 vs Sham; *P<0,05 vs TNBS + EtOH 50%).

Grupo	Tamanho do intestino (cm)	Tamanho da lesão (cm)	Consistência das fezes
Sham	14,5 ± 0,082	0	0
Etanol	14,1 ± 0,2	0	0
TNBS + Etanol	11,8 ± 0,19 #	3,6 ± 0,14 #	3 #
TNBS + Sálvia	12,9 ± 0,23	0,8 ± 0,2 *	0,38 *

Pelas imagens em cima é possível verificar-se que o grupo Sham (controlo negativo) apresenta uma coloração rosada, quase translúcida. É assim visível que este não apresenta alterações histopatológicas. O grupo etanol, também ele apresenta uma cor normal, apesar de poder observar-se um pequeno derrame. Tal facto confirma que, apesar de o etanol ser um potenciador da ação do TNBS, as lesões ulcerativas são maioritariamente causadas por este último composto e não pelo etanol. No grupo TNBS+Etanol, pode observar-se uma inflamação dos tecidos do cólon, com necrose dos mesmos e lesões ulcerativas. No grupo ao qual foi administrado extrato de sálvia (TNBS+Sálvia) foram observadas melhorias relativamente ao

grupo TNBS+Etanol, com diminuição significativa da extensão e severidade das alterações morfológicas observadas.

A tabela 3.9 demonstra as alterações do cólon dos ratinhos acima mencionadas. Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o grupo TNBS+Etanol e o grupo Sham, nomeadamente nas lesões apresentadas ($3,6 \pm 0,14$ cm) e uma diminuição do intestino de $14,5 \pm 0,082$ cm para $11,8 \pm 0,19$ cm. Observando os resultados obtidos para o grupo TNBS+Sálvia, existem diferenças significativas entre este e o grupo TNBS+Etanol ($p < 0,05$), com uma diminuição do tamanho das lesões para $0,8 \pm 0,2$ cm.

Para além das alterações morfológicas, foram também tidas em conta alterações funcionais, nomeadamente a consistência das fezes dos ratinhos, classificada com *score* apresentado na tabela 3.15. Desta forma, observa-se que as fezes dos grupos Sham e Etanol apresentaram uma consistência normal (0), enquanto que as fezes do grupo TNBS+Etanol apresentaram uma consistência aquosa (3), significativamente diferente ($P < 0,05$) do grupo Sham. No grupo TNBS+Sálvia observaram-se fezes com uma consistência entre o normal e o ligeiramente mucoso (0,38), com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) relativamente ao grupo TNBS+Etanol.

Tabela 3.15: Classificação da gravidade da diarreia

Score	Consistência das fezes
0	Normal (<i>pellets</i> duros)
1	Ligeiramente mucosa
2	Mole
3	Aquosa

A análise dos resultados obtidos parece indicar que o extrato de sálvia apresenta ação anti-inflamatória, uma vez que diminui os efeitos nefastos provocados pela administração do TNBS. Assim, os resultados obtidos com o extrato de sálvia sugerem que este possa ter um papel importante na profilaxia das doenças inflamatórias do cólon.

Outros estudos demonstraram que o *stress* oxidativo, que surge quando os antioxidantes endógenos deixam de ter capacidade para neutralizar todas as espécies oxidativas que se formam na mucosa intestinal, tem um papel predominante na patogénese de doenças inflamatórias do intestino. Sabe-se também que os polifenóis provenientes da dieta, especialmente flavonóides, podem ser considerados um importante auxiliar na intervenção de doenças inflamatórias, como é o caso de doença inflamatória do intestino (Mandalari *et al.*, 2011; Impellizzeri *et al.*, 2014).

4 Conclusão

Com o crescente interesse da introdução das plantas aromáticas na alimentação como fonte de compostos que promovam uma melhor qualidade de vida, têm vindo a ser desenvolvidos trabalhos com o objetivo de confirmar essas propriedades benéficas das ervas aromáticas. O objetivo deste trabalho foi assim avaliar a composição em compostos fenólicos totais e em flavonóides de três plantas aromáticas utilizadas em Portugal: a sálvia, o poejo e o cebolinho, avaliando, igualmente, o seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano.

Os resultados mostraram que todas as plantas aromáticas estudadas possuem capacidade antioxidante, sendo que o extrato de sálvia foi o que apresentou maior capacidade antioxidante em comparação com os extratos de poejo e de cebolinho em todos os testes realizados. Concordante com este resultado, pode acrescentar-se que o extrato de sálvia foi também o que apresentou maior teor em compostos fenólicos e flavonóides, o que sugere o envolvimento destes compostos nas atividades antioxidantes detetadas. Entre os extratos de poejo e de cebolinho, o extrato de poejo apresentou um teor em compostos fenólicos e também uma atividade antioxidante superior ao extrato de cebolinho. No que diz respeito a ação antimicrobiana, o extrato de sálvia foi o único que apresentou ação antimicrobiana, embora apenas contra o *S. aureus*, o que poderá, igualmente, estar relacionado com a maior concentração que este extrato apresenta em compostos fenólicos.

A atividade anti-inflamatória foi apenas determinada para o extrato de sálvia, tendo-se observado efeitos positivos quer para o modelo de inflamação aguda quer para o modelo de inflamação crónica. Nomeadamente no modelo de inflamação crónica (colite) os resultados demonstraram uma diminuição significativa da extensão e sinais de inflamação em relação ao grupo controlo.

Para além do resultado positivo obtido, os resultados obtidos nos ensaios de atividade anti-inflamatória são particularmente importantes uma vez que demonstram, igualmente, que os compostos responsáveis por esta atividade ficam biodisponíveis, ou seja, são resistentes ao processo de digestão gastro-intestinal e são, pelo menos parcialmente absorvidos, uma vez que após administração oral dos extratos se observou redução da colite ulcerativa do cólon e redução do edema da pata.

Como verificado neste trabalho poderá existir uma relação entre os compostos fenólicos e as propriedades bioativas identificadas. Como tal, de modo a conseguir com melhor precisão estabelecer associações entre as atividades biológicas estudadas e os compostos que as originam, será interessante efetuar futuramente uma análise química detalhada dos extratos estudados, nomeadamente o seu perfil em compostos fenólicos. Seria igualmente importante realizar ensaios de toxicidade por forma a determinar as doses seguras de ingestão e a garantir que um consumo mais elevado destas plantas não poderá acarretar nenhum tipo de efeito adverso.

5 Referências bibliográficas

- Aleksic, V., & Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, **169**, 240- 254.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, **41**, 1 - 15.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, **66**, 1 - 9.
- AOAC (1990) Official Methods of Analysis. Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs. Volume 1, 15ª Edição. Association of Official Analytical Chemists, Arlinton, EUA.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **52(26)**, 7970-7981.
- Associação Portuguesa de Nutricionistas. (2014) Dieta Mediterrânica – um padrão de alimentação saudável. E-book nº34, ISBN: 978-989-8631-15-2. Disponível em http://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/Ebook_Dieta_Mediterranica.pdf.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M., Sousa, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. (2010). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, **132(2)**, 841-848.
- Benzie, I. F. (2003). Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **136**, 113 - 126
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239(1)**, 70-76.
- Bernal, J., Mendiola, J. A., Elbáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**, 758 - 774.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3:4**, 228 - 237.
- Bower, A., Marquez, S., & Mejiaab, E. G. (2015). The health benefits of selected culinary herbs and spices found in the traditional mediterranean diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Brahmi, F., Hauchard, D., Guendouze, N., Madani, K., Kiendrebeogo, M., Kamagaju, L., Stévigny, C, Chibane, M. & Duez, P. (2015). Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, **74**: 722-730.

- Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, **15**, 186-190.
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry*, **93**(2), 223–226.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* (**51**), 15-25.
- Castro, L., & Freeman, B. A. (2001). Reactive Oxygen Species in Human Health and Disease. *Nutrition*, **17**, 161 - 165.
- Cavaliere, S.J.; Rankin, I.D.; Harbeck, R.J.; Sautter, R.L.; McCarter, Y.S.; Sharp, S.E.; Ortez, J.H.; Spiegel, C.A. (2005). Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. Editado por Coyle, M.B., American Society for Microbiology, ISBN 1-55581-349-6, 241p.
- Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. *Food Bioscience*, 8 - 16.
- Chen, H. (2006). Chives. Em *Handbook of Herbs and Spices - Volume 3*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive reviews in food science and food*, **8**, 345 - 358.
- Chrpová, D., Kouřimská, L., Gordon, M.H., Heřmanová, V., Roubíčková, I. & Pánek, J. (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech Journal of Food Science*, **28**: 317-325.
- Crago, B., Ferrato, C., Drews, S. J., Svenson, L. W., Tyrrell, G., & Louie, M. (2012). Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiology*, **32**, 202 - 205.
- Direção Geral de Saúde (2013). Estratégia Nacional para a redução de consumo de sal na alimentação em Portugal, disponível em: <http://www.dgs.pt/?cr=24482>.
- Direção Geral de Saúde (2015). Utilização de ervas aromáticas & similares na alimentação, disponível em: <http://www.dgs.pt/?cr=24482>.
- Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratte, A., Rehder, V. L. G., Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 305 – 311.
- El-Alim, S. S., Lugas, A., Hóvári, J., & Dworschák, E. (1999). Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **79**, 277 - 285.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and

Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48:5**, 430-441.

Embuscado, M. E. (2015). Herbs and spices as antioxidants for food preservation. Em E. b. Shahidi, *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.

Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of functional foods*.

Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **68**, 2986 - 3008.

Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, **64**, 171 - 181.

Farhat, B. M., Landouls, A., Chaouch-Hamanda, R., Sotomayor, J. A., Jordar, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, **49**, 904 – 914

Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 3239

Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., Barroso, J. G., Trindade, H., Sanches, J., Oliveira, C., & Correia, M. (2014). *Mentha Pulegium* L. *Agrotec*, **10**, 32 - 35.

Freitas, C. F. (2011). Avaliação da atividade anti-inflamatória de um extrato de framboesa na Artrite Reumatóide. *Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos*. Lisboa.

Garcia, C.S.C., Ely, M.R., Wasum, R.A., Zoppa, B.C.D.A., Wolhheim, C., Neves, G.Â., Angeli, V.W. & Souza, K.C.B. (2013). Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **33(4)**: 509-514.

Gosslau, A., Li, S., Ho, C.-T., Chen, K. Y., & Rawson, N. E. (2011). The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, **55**, 74 - 82.

Gustafson, J. E., Muthaiyan, A., Dupre, J. M., & Ricke, S. C. (2015). *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. *Food Control*, 1 - 14.

Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R., & del Valle, P. (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, **26**, 555 - 563.

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). Resistance of the Body to Infection: I. Leukocytes, Granulocytes, the Monocyte-Macrophage System, and Inflammation. Em *Textbook of Medical Physiology - 11th Edition*. Philadelphia: Elsevier Saunders.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572 - 584.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, **173**, 501 - 513.
- Hinneburg, I., Dorman, H. D., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, **97**, 122 - 129.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841 - 1856.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., & Zhang, Y. (2010). Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*, **62**, 1 - 20.
- Hui, Y. (2006). *Handbook of food science, technology, and engineering*. CRC Press.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**, 1821 - 1835.
- Impellizzeri, D., Bruschetta, G., Paola, R. D., Ahmad, A., Campolo, M., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Navarra, M. (2014). The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition xxx*, 1 - 9.
- Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Watanabe, O., & Goto, H. (September de 2010). Novel mouse model of colitis characterized by hapten-protein visualization. *BioTechniques* **49**, 641-648.
- Jungbauer, A., & Medjakovic, S. (2012). Anti-inflammatory properties of culinary herbs and spices that ameliorate the effects of metabolic syndrome. *Maturitas*, **71**, 227 - 239.
- Juránek, I., Nikitovic, D., Kouretas, D., Hayes, A. W., & Tsatsakis, A. M. (2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **61**, 240 - 247.
- Kedare, S., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **48(4)**, 412–422.
- Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, **61**, 41-48.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, **30**, 620 - 650.
- Kosar, M., Fatih, G., & Baser, K.H.C. (2008). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**,

2369–2374.

Lee, D., Albenger, L., Compher, C., Baldossano, R., Piccoli, D., Lewis, J. D., Wu, G. D. (2015). Diet in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, **148**

Lianda, R., & Castro, R. (2008). Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova*, **31(6)**, 1472-1475.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613(1)**, 1-19.

Makwana, S., Choudhary, R., Haddock, J., & Kohli, P. (2015). In-vitro antibacterial activity of plant based phenolic compounds for food safety and preservation. *LWT - Food Science and Technology*, **62**, 935 - 939.

Mandalari, G., Bisignano, C., Genovese, T., Mazzon, E., Wickham, M. S., Paterniti, I., & Cuzzocrea, S. (2011). Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*, **11**, 915-924.

Martins, N., Barrosa, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, **74**, 648 - 670.

Mattson, C. (2003). *Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*. Lippincott Williams & Wilkins, 73-89.

Maurício, E. M. (2014) Estudo do potencial de aplicabilidade dos extractos de subprodutos da ginja na promoção da saúde e bem estar cutâneos. Tese de Doutoramento em Biomedicina. Universidad de Alcalá, Madrid, Espanha.

Maver, T., Maver, U., Kleinschek, K. S., Smrke, D. M., & Kreft, S. (2015). A review of herbal medicines in wound healing. *International Journal of Dermatology*, 1-12.

Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiza, J., Morales-Adameb, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. D., & Agu, C. N. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, **37**, 445 - 450.

Micelli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T.M., Güvenç, A. & Taviano, M.F., (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 6570–6577.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, **15**, 9252 - 9287.

Miroddi, M., Navarra, M., Quattropani, M. C., Calapai, F., Gangemi, S., & Calapai, G. (2014).

Systematic review of clinical trials assessing pharmacological properties of salvia species on memory, cognitive impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **20**, 485 - 495.

Mueller, M., Hobiger, S., & Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*, **122**, 987 - 996.

Nakamura, S., Kato, A., & Kobayashi, K. (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40(11)**, 2033-2037.

Nobbs, H. M., Yaxley, A., Thomas, J., Delarey, C., Koczwara, B., Luszcz, M., Miller, M. (2016). Do dietary patterns in older age influence the development of cancer and cardiovascular disease: A longitudinal study of ageing. *Clinical Nutrition*, **35**.

O'Hanlon, S. J., & Enright, M. C. (2009). A novel bactericidal fabric coating with potent in vitro activity against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**, 427 - 431.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, **74**, 10 - 36.

Parvu, A. E., Psrvu, M., Vlase, L., Miclea, P., Mot, A. C., & Silaghi- Dumitrescu, R. (2014). Anti-inflammatory effects of *Allium Schoenoprasum* L. leaves. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **65**, 309 - 315.

Peter, K. V., Babu, K. N., & Shylaja, M. R. (2004). Chapter 1 e 2. Em *Handbook of herbs and spices - Volume 2*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.

Pinto, A. M., & Rosa, M. S. (2007). Resposta Inflamatória. Em *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa: LIDEL - Edições Técnicas, Lda.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 55 - 74.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **53(10)**, 4290-4302.

Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, **82**, 513 - 523.

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. *Journal of Controlled Release*, **113**, 189 - 207.

Rattanachakunsoopon, P., & Phumkhachorn, P. (2008). Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **72**, 2987 - 2991.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, **2**, 152 - 159.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, **66**, 401 - 436.
- Rocha, J. (2009). Avaliação da actividade anti-inflamatória do ácido rosmarínico e de um extracto de *Rosmarinus officinalis*. *Tese de mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa*.
- Santos, M. A. (2011). Novas abordagens terapêuticas na colite ulcerosa . *Mestrado Integrado em Medicina*. Porto.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, **162**, 981 - 987.
- Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice gastroenterology & hepatology*, **3**, 390 - 407.
- Shahmohamadi, R., Sariri, R., Rasa, M., & Aghamali, M. (2014). Antioxidant activity of *Glian Mentha pulegium* during growth. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **17**, 380-387.
- Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**, 112 - 119.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela - Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, **15**, 71 - 81.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruomab, O. I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, **579**, 200 - 213.
- Srinivasan, K. (2014). Antioxidant Potential of Spices and Their Active Constituents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **54**, 352 - 372.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21**, 1199 - 1218.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, Neng, N., Nogueira, J. M.F, Saraiva, J. A. Nunes, M. L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, **36**, 81- 87.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P., Seabra, R., & Bastos, M. (2001).

Antioxidant activity of Centaurium erythraea infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49(7)**, 3476-3479.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazura, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44 - 84.

Viña, S. Z & Cerimele, E. L. (2009). Quality changes in fresh chives (*Allium schoenoprasum* L.) during refrigerated storage. *Journal of Food Quality*, **32**, 747 - 759.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D., & Brantner, A. H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, **19(1)**: 767-782.

Wang, Q., Kuang, H., Su, Y., Sun, Y., Feng, J., Guo, R., & Chan, K. (2013). Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **146**, 9 - 39.

Ward, A. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In: *Fundamentals of inflammation*, 1-252.

Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., & Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against. *Food Control*, **21**, 1408-1414.

Wen, L., Wu, D., Jiang, Y., Prasad, K. N., Lin, S., Jiang, G., He, J., Zhao, M., Lou, W., Yang, B. (2014). Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities. *Journal of Functional Foods*, **6**, 555-563.

Wojdyło, A., Oszmianski, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**, 940 - 949.

Yoon, J.-H., & Baek, S. J. (2005). Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. *Yonsei Medical Journal*, **46 (5)**, 585 - 596