

**Raquel Nobre Leandro**

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública



**Avaliação do potencial anti-inflamatório,  
antioxidante e antimicrobiano de extratos de  
segurelha, salsa e coentros**

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

Setembro de 2015



**Raquel Nobre Leandro**

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

**Avaliação do potencial anti-inflamatório,  
antioxidante e antimicrobiano de extratos de  
segurelha, salsa e coentros**

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



**Setembro de 2015**

**Avaliação do potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano de extratos de segurelha, salsa e coentros**

Copyright © Raquel Nobre Leandro, 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.

## Dedicatória

---

*Aos meus queridos avós, Maria e Herculano.*

## 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 Inês, pela amizade, companheirismo e apoio incondicional. Pelas risadas que nos alegraram as noites passadas no laboratório. Sem ela nada disto seria possível, ou pelo menos não seria a mesma coisa.

A Sandra e à pequena Francisca, por toda a colaboração e apoio e ainda pela sua presença amiga na realização deste trabalho.

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

## Resumo

---

Recentemente tem-se observado um crescente interesse pelo uso de plantas aromáticas, devido às inúmeras propriedades benéficas que lhes têm sido associadas, e a sua aplicação em diversas indústrias, como a indústria alimentar e farmacêutica.

Este estudo incidiu sob três ervas aromáticas utilizadas comumente em Portugal: coentros, salsa e segurelha. O objetivo do mesmo foi contribuir para um melhor conhecimento das propriedades bioativas das plantas estudadas, através da determinação do seu teor em compostos fenólicos totais e em flavonoides, e avaliação das suas atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. A atividade antioxidante foi determinada através de diferentes tipos de ensaios, nomeadamente avaliação da capacidade redutora, com os ensaios FRAP e CUPRAC, avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> e avaliação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando três estirpes microbianas, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Por sua vez, a ação anti-inflamatória foi determinada através de ensaios *in-vivo* apenas para a segurelha, utilizando dois modelos, um para a inflamação aguda (modelo de edema da pata induzido pela carragenina) e outro para a inflamação crónica (modelo da colite ulcerativa).

Os resultados demonstraram que todos os extratos de plantas aromáticas possuem atividade antioxidante, sendo que o extrato de segurelha foi aquele que apresentou um maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, bem como o que demonstrou possuir uma maior atividade antioxidante relativamente aos restantes extratos estudados, o que sugere o envolvimento destes compostos neste tipo de atividade antioxidante. Entre o extrato de coentros e salsa, o extracto de coentros apresentou um teor em compostos fenólicos e uma actividade antioxidante significativamente superior relativamente ao extracto de salsa. O extrato de segurelha foi o único que apresentou ação antimicrobiana, o que poderá indicar que os compostos fenólicos se encontram também interligados com esta propriedade. A atividade anti-inflamatória foi determinada apenas para o extrato de segurelha, sendo que se observou que este possui efeitos benéficos para a inflamação aguda e crónica, o que poderá estar novamente relacionado com o seu teor em fenóis e flavonoides. O efeito anti-inflamatório observado com o extrato de segurelha no modelo de colite pode ser muito útil do ponto de vista de profilaxia pois o extrato foi administrado aos animais logo a seguir à indução da colite e os resultados demonstram haver uma diminuição significativa da extensão e violência dos sinais da inflamação crónica observados no grupo controlo positivo.

**Palavras-chave:** Plantas aromáticas, Compostos fenólicos, Atividade antioxidante, Atividade antimicrobiana, Ação anti-inflamatória

## Abstract

---

Recently we have seen a growing interest in the use of herbs due to its association to beneficial properties and application in various industries such as food and pharmaceutical industry.

This study was focused on three commonly used herbs in Portugal: coriander, parsley and savory. Its main target was the contribution to a better understanding of the bioactive properties of the studied plants, by determining their content of phenolic compounds and flavonoids, and evaluate their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. The antioxidant activity was determined by different trials, such as, assessment of the reducing capacity with the FRAP and CUPRAC tests, scavenge of DPPH<sup>•</sup> and scavenge of superoxide anion radical. The antimicrobial activity was determined by using three microbial strains, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, on the other hand, the anti-inflammatory activity was determined by *in vivo* tests, using two templates, only for savory, one for acute inflammation (paw edema induced by carrageenan model) and another for chronic inflammation (ulcerative colitis model).

The results showed that all extracts from the herbs possess antioxidant activity, being that the savory extract presented the highest content of phenolics, and flavonoids, as well as a higher antioxidant activity regarding the other extracts studied, which suggests the association of these compounds to this type of antioxidant activity. The coriander extract showed a total phenolic content and antioxidant activity significantly higher than the parsley extract. The savory extract was the only one with antimicrobial activity, which may indicate that phenolic compounds are also linked with this property. The anti-inflammatory activity was only determined for the savory extract, due to limited resources, being noted that it has beneficial effects on acute and chronic inflammations, which, once again, may be associated with its content of phenols and flavonoids. The anti-inflammatory effect observed with savory extract in the colitis model could be very useful in the prophylaxis standpoint since the extract was administered to the animals immediately afterwards the induction of colitis and the results show that there is a significant reduction in extent and violence of the signs of chronic inflammation observed in the positive control group.

**Keywords:** Aromatic herbs, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory action

# Índice

---

1	Introdução.....	1
1.1	Plantas aromáticas como alimentos funcionais e nutracêuticos.....	2
1.2	Caracterização das plantas aromáticas estudadas .....	3
1.2.1	Coentros .....	3
1.2.2	Salsa.....	4
1.2.3	Segurelha .....	5
1.3	<i>Stress</i> oxidativo e Antioxidantes .....	6
1.3.1	Espécies reativas de oxigénio (ROS).....	7
1.3.2	Outras fontes de espécies reativas de oxigénio .....	10
1.3.3	Danos oxidativos no ADN, lípidos e proteínas .....	11
1.3.4	Mecanismos de defesa contra o <i>stress</i> oxidativo .....	11
1.3.5	Antioxidantes .....	12
1.3.6	Aplicação alimentar de antioxidantes .....	16
1.4	Atividade antimicrobiana .....	17
1.5	Inflamação.....	19
1.5.1	Inflamação aguda .....	19
1.5.2	Inflamação crónica .....	20
1.6	Enquadramento e objetivos do trabalho .....	23
2	Materiais e métodos .....	25
2.1	Caracterização dos extratos de plantas aromáticas .....	25
2.2	Materiais .....	25
2.2.1	Ensaio <i>in-vitro</i> .....	25
2.2.2	Ensaio <i>in-vivo</i> .....	25
2.3	Métodos.....	26
2.3.1	Preparação dos extratos de plantas aromáticas.....	26
2.3.2	Determinação da humidade das plantas aromáticas .....	26
2.3.3	Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu .....	27

2.3.4	Quantificação dos Flavonoides Totais .....	28
2.3.5	Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas .....	28
2.3.6	Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas .....	33
2.3.7	Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de segurelha – ensaios <i>in vivo</i>	33
2.3.8	Análise estatística dos resultados .....	36
3	Resultados e Discussão .....	37
3.1	Determinação da percentagem de humidade das plantas aromáticas .....	37
3.2	Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu .....	37
3.3	Quantificação dos flavonoides totais .....	39
3.4	Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas	40
3.4.1	Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP ....	40
3.4.2	Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC .....	41
3.4.3	Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH' .....	42
3.4.4	Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detetada pela diminuição da formação de formazano .....	43
3.5	Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas .....	44
3.6	Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de segurelha .....	47
3.6.1	Modelo de edema da pata induzido pela carragenina .....	47
3.6.2	Modelo da colite ulcerativa .....	48
3.7	Análise global dos resultados.....	51
4	Conclusão.....	54
5	Referências bibliográficas .....	56

## Índice de Figuras

---

Figura 1.1 – A: Ramo de coentros; B: Pormenor das folhas e sementes dos coentros (A - <a href="http://www.comofazertudo.com.br/casa-e-jardim/jardinagem-e-paisagismo/flora-e-plantas/como-cultivar-e-colher-coentro">http://www.comofazertudo.com.br/casa-e-jardim/jardinagem-e-paisagismo/flora-e-plantas/como-cultivar-e-colher-coentro</a> ; B - <a href="http://www.jardimdeflores.com.br/ervas/A46coentro.htm">http://www.jardimdeflores.com.br/ervas/A46coentro.htm</a> ).....	4
Figura 1.2 – A: Ramo de salsa; B: Pormenor da folha da salsa (A - <a href="http://www.fotosantesedepois.com/salsa/">http://www.fotosantesedepois.com/salsa/</a> ; B - <a href="http://casa.umcomo.com.br/articulo/como-plantar-salsa-em-casa-713.html">http://casa.umcomo.com.br/articulo/como-plantar-salsa-em-casa-713.html</a> ).....	5
Figura 1.3 – A: Ramo de segurelha; B: Pormenor das folhas e flôr da segurelha (A - <a href="http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-segurelha/">http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-segurelha/</a> ; B - <a href="http://www.fungoceva.it/erbe_ceb/image_erbe/satureja_hortensis2.jpg">http://www.fungoceva.it/erbe_ceb/image_erbe/satureja_hortensis2.jpg</a> ) .....	6
Figura 1.4 – Antioxidantes naturais separados por classes. A cor verde representa antioxidantes exógenos, enquanto a cor amarela representa antioxidantes endógenos (Carocho & Ferreira, 2013) .....	13
Figura 2.1 - Formação do complexo ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) após redução do $\text{Fe}^{3+}$ por um antioxidante ..	29
Figura 2.2 – Redução do Cu(II) para Cu(I) por acção de antioxidantes .....	30
Figura 2.3 – Desativação do DPPH' pelos antioxidantes.....	31
Figura 2.4 – Reação do $\text{NBT}^{2+}$ com o radical anião superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) dando origem a um diformazano.....	32
Figura 2.5 – A: Pletismómetro; B: Medição do volume da pata.....	35
Figura 3.1 – A - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana dos coentros, salsa e segurelha com o <i>S. aureus</i> ; B – Halo de inibição da segurelha.....	45
Figura 3.2 – Efeito da administração oral do extrato de segurelha e de outros fármacos comerciais no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina (* $P < 0,001$ vs soro fisiológico (SF); # $P < 0,001$ vs carragenina).....	47
Figura 3.3 – Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente (A: Grupo Sham; B: Grupo Etanol; C: Grupo TNBS + Etanol; D: Grupo TNBS + Segurelha). .....	48
Figura 3.4 – Efeito da administração de extrato de segurelha no tamanho do intestino dos ratinhos relativamente aos restantes grupos (* $P < 0,001$ vs Sham; # $P < 0,001$ vs TNBS). .....	50

## Índice de Tabelas

---

Tabela 2.1– Composição do reagente FRAP .....	29
Tabela 2.2 – Caraterização dos grupos em estudo .....	34
Tabela 2.3 – Caraterização dos grupos em estudo .....	36
Tabela 3.1 – Percentagem de humidade das diferentes amostras .....	37
Tabela 3.2 – Compostos fenólicos totais nas diferentes amostras.....	38
Tabela 3.3 – Teor em flavonoides totais nas diferentes amostras .....	39
Tabela 3.4 – Peso dos flavonoides no teor em fenóis totais .....	40
Tabela 3.5 – Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio FRAP .....	41
Tabela 3.6 – Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC .....	42
Tabela 3.7 – Valores obtidos com as diferentes amostras na determinação da capacidade de sequestro do DPPH* .....	43
Tabela 3.8 – Valores obtidos com as diferentes amostras na determinação da capacidade de sequestro do superóxido .....	44
Tabela 3.9 – Diâmetro dos halos de inibição das diferentes amostras na determinação da atividade antimicrobiana.....	44
Tabela 3.10 – Observações morfológicas e funcionais no cólon limpo e aberto transversalmente logo após a colheita ( <sup>#</sup> P<0,05 vs Sham; *P<0,05 vs TNBS + EtOH 50%). .....	49
Tabela 3.11 – Classificação da gravidade da diarreia .....	50
Tabela 3.12 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonoides das amostras estudadas .....	51
Tabela 3.13 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante das várias amostras .....	52

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

---

**5-LOX** – 5-lipoxigenase

**AA** – Ácido araquidónico

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BHA** – Hidroxianisol butilado

**BHT** – Hidroxitolueno butilado

***C. albicans*** – *Candida albicans*

**CAT** – Catalase

**Células-Th2** – Células - *T helper 2*

**COX-2** – Ciclooxygenase-2

**CUPRAC** – Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity

**DPPH<sup>•</sup>** – 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo

**EAA** – Equivalente de ácido ascórbico

**EAG** – Equivalente de ácido gálico

***E. coli*** – *Escherichia coli*

**EFSA** – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

**EtOH** – Etanol

**FRAP** – Ferric Reduction Antioxidant Power

**GPX** – Glutathione peroxidase

**GRAS** – Generally recognized as safe

**GSH** – Glutathione reduzida

**GSR** – Glutathione redutase

**GSSG** – Glutathione oxidada

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogénio

**ICAM-1** – Moléculas de adesão intracelular

**IL** – Interleucina

**INF-γ** – Interferão

**OH<sup>•</sup>** – radical hidroxilo

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – Radical anião superóxido

**OH<sup>•</sup>** – Radical hidroxilo

**MHA** – Muller Hinton Agar

**NBT<sup>2+</sup>** – Azul de nitrotetrazólio

**NF-κB** – Fator nuclear-κB

**NO** – Óxido nítrico

**PG** – Galato de propilo

**PLA<sub>2</sub>** – Fosfolipase A<sub>2</sub>

**PMS** – Sistema metossulfato de fenazina

**ROS** – Espécies reativas de oxigénio

**S. aureus** – *Staphylococcus aureus*

**SEs** – *Staphylococcal enterotoxins*

**SOD** – Superóxido dismutase

**TLR** – Receptores de reconhecimento de padrões moleculares

**TNBS** – Ácido sulfónico trinitrobenzeno

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**TPTZ** – Tripiriditriazina

**VCAM-1** – Moléculas de adesão vascular

# 1 Introdução

---

Ao longo da História da Humanidade houve um forte interesse por parte das sociedades civilizadas no papel da dieta alimentar diária na saúde dos indivíduos e da população (Andlauer & Furst, 2002).

O uso de produtos naturais, nomeadamente aqueles obtidos a partir de plantas, é comum desde os tempos primordiais na prevenção e tratamento de doenças humanas e animais. Vários estudos epidemiológicos demonstram o impacto direto dos alimentos na saúde, sendo que esse impacto poderá traduzir-se em efeitos benéficos ou nefastos, consoante o tipo de alimento em causa. Assim, a ingestão de alimentos como o vinho, frutas, vegetais, frutos secos e grãos, especiarias, etc., tem mostrado exercer efeitos benéficos na prevenção de diversas patologias, nomeadamente aquelas associadas ao envelhecimento, como as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes tipo II e inúmeros tipos de cancro, e nas quais é reconhecida a sua relação com os hábitos alimentares da população (Espin *et al.*, 2007; Bernal *et al.*, 2011).

A maioria das doenças degenerativas associadas ao envelhecimento está relacionada com processos oxidativos, em que são formadas várias espécies reativas, nomeadamente espécies reativas de oxigénio (ROS). Um nível elevado destas espécies pode provocar danos a nível celular, e levar a um aumento do *stress* oxidativo com consequências a nível da saúde. Existe na natureza uma grande variedade de substâncias antioxidantes que minimizam os efeitos negativos das ROS, através da sua estabilização ou desativação (Mishra *et al.*, 2012; Espin *et al.*, 2007).

A evolução do Homem ao longo dos tempos tem sido acompanhada do conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas. As plantas aromáticas consumidas mundialmente, principalmente pela sua aplicação a nível alimentar, possuem propriedades medicinais e um impacto benéfico na saúde, como atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, e potencial anti carcinogénico, entre outras (Wojdyło *et al.*, 2007).

A inflamação desempenha um papel crucial em diversas doenças com alta prevalência a nível global, como a artrite reumatoide, aterosclerose e asma. Embora a inflamação seja primariamente uma resposta do organismo face a microrganismos, toxinas ou alérgenos, quando se torna crónica leva a um detrimento dos tecidos. Ou seja, a inflamação aguda é uma defesa do organismo mediado por um mecanismo autorregulado que quando deixa de o ser passamos de inflamação aguda para crónica que é prejudicial e passa a doença, como artrite reumatoide ou colite, por exemplo. Desde a antiguidade que os processos inflamatórios têm sido tratados com plantas ou formulações derivadas de plantas (Mueller *et al.*, 2010).

As principais causas de deterioração dos alimentos advêm de processos oxidativos e do crescimento microbiano, causando perda de qualidade nutricional e sensorial dos mesmos, bem como a possível formação de compostos tóxicos (Gómez-Estaca *et al.*, 2014). A procura por parte dos consumidores de produtos alimentares “prontos-a-comer” e saudáveis leva ao uso de compostos antioxidantes e antimicrobianos naturais, provenientes de plantas e especiarias, com o intuito de promover a qualidade e segurança dos alimentos. A aplicação destes compostos poderá ser direta, em atmosferas modificadas ou embalagens ativas (Sindhi *et al.*, 2013; Gómez-Estaca *et al.*, 2014; Shan *et al.*, 2007).

A presente dissertação inicia-se com uma revisão bibliográfica em que se começa por realizar uma breve caracterização do uso de plantas aromáticas como alimentos funcionais e nutracêuticos. De seguida realiza-se uma caracterização das plantas aromáticas em estudo, englobando a sua origem, composição química e propriedades funcionais. No ponto seguinte é feita uma revisão bibliográfica sobre o *stress* oxidativo, espécies reativas de oxigénio, antioxidantes e sua aplicação alimentar. Na revisão efetuada aborda-se ainda a atividade antimicrobiana das plantas aromáticas e dos compostos fenólicos, os processos de inflamação aguda e crónica e a ação anti-inflamatória dos polifenóis. No capítulo dois é efetuada a caracterização das amostras estudadas e são descritos os procedimentos experimentais realizados. No capítulo três são apresentados os resultados e discussão dos resultados obtidos, e finalmente, no capítulo quatro são apresentadas as principais conclusões retiradas do trabalho realizado, tal como as perspetivas futuras.

## **1.1 Plantas aromáticas como alimentos funcionais e nutracêuticos**

As propriedades terapêuticas das plantas são conhecidas desde o tempo das civilizações primitivas, que se aperceberam de que as mesmas poderiam apresentar diferentes efeitos, tóxicos ou benéficos, sobre o organismo (Proença Da Cunha *et al.*, 2008).

O uso de plantas ou de medicamentos à base de plantas para tratar ou prevenir doenças designa-se por fitoterapia, sendo que as provas da sua eficácia e benefícios para o organismo humano, tornam-na numa aliada segura e eficiente na promoção da saúde (Proença Da Cunha, Pereira Da Silva, & Rodrigues Roque, 2003). Uma popularidade crescente do uso de plantas aromáticas como elementos auxiliares na prevenção e tratamento de certas patologias leva a um incremento na investigação destas plantas e das atividades biológicas dos seus compostos bioativos (Laribi *et al.*, 2015).

Os principais responsáveis pelos efeitos benéficos das plantas aromáticas são substâncias em que estas são ricas, denominadas de fitoquímicos. Os fitoquímicos são um grande grupo que inclui compostos fenólicos, nomeadamente flavonoides, carotenoides, esteróis, glucosinolatos e outros compostos com enxofre, e com elevada atividade biológica e potencial para a proteção

contra doenças (Embuscado, 2015). Apesar de apresentarem um baixo potencial como compostos bioativos em comparação com produtos farmacêuticos, quando ingeridos regularmente e numa quantidade significativa como parte de uma dieta saudável e equilibrada, os fitoquímicos, conferem efeitos fisiológicos benéficos a longo termo (Espin *et al.*, 2007).

Estudos demonstram o aumento da procura, por parte dos consumidores, de produtos alimentares promotores da saúde, assim como produtos não alimentares, como dietéticos e farmacêuticos, que contenham princípios ativos presentes nos produtos alimentares promotores da saúde. Assim, surgem os conceitos de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Alimentos funcionais são aqueles que, quando consumidos regularmente, exercem um determinado efeito benéfico para a saúde, para além das suas propriedades nutricionais, ou seja, proporcionam bem-estar e/ou têm a capacidade de diminuir o risco de doenças, sendo que estes efeitos deverão ser cientificamente provados. Nutracêuticos são suplementos alimentares que apresentam, numa matriz não-alimentar, um agente bioativo de um alimento numa forma concentrada, em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas a partir de uma alimentação normal, com o objetivo de melhorar a saúde. Estes produtos são comercializados em apresentações semelhantes à dos fármacos (comprimidos, extratos, etc.) (Espin *et al.*, 2007).

A diferença entre os dois conceitos referidos acima nem sempre é clara. No entanto, o principal ponto de disparidade entre ambos é o formato no qual são consumidos: os alimentos funcionais são consumidos como alimentos normais, enquanto os nutracêuticos são consumidos como cápsulas, comprimidos, etc. Contudo, se um fitoquímico for incluído numa formulação alimentar, este é considerado um alimento funcional, mas se o mesmo for incluído numa cápsula, já é considerado um nutracêutico (Bernal *et al.*, 2011).

## **1.2 Caracterização das plantas aromáticas estudadas**

### **1.2.1 Coentros**

Os coentros (*Coriandrum sativum* L.) (Figura 1.1) são uma planta herbácea anual, pertencente à família das Apiáceas. Embora sejam originários do Norte de África, Médio Oriente e Ásia apresentam uma ampla distribuição mundial, nomeadamente em toda a Europa e na América do Norte (Proença Da Cunha *et al.*, 2003). Esta planta é usada devido às suas folhas e sementes, que apresentam várias aplicações a nível alimentar, bem como a nível de medicina tradicional (Laribi *et al.*, 2015).



Figura 1.1 – A: Ramo de coentros; B: Pormenor das folhas e sementes dos coentros (A - <http://www.comofazertudo.com.br/casa-e-jardim/jardinagem-e-paisagismo/flora-e-plantas/como-cultivar-e-colher-coentro>; B - <http://www.jardimdeflores.com.br/ervas/A46coentro.htm>)

As folhas frescas e sementes desta planta são usadas na alimentação, como condimento em variados pratos, devido às suas propriedades organoléticas e *flavour* característico. Enquanto as sementes são usadas em pó, como uma especiaria, as folhas são principalmente usadas frescas, para aromatizar os alimentos (Barros *et al.*, 2011).

As folhas dos coentros apresentam inúmeros componentes, nomeadamente: lípidos, com predominância de ácidos gordos polinsaturados, como o ácido linoleico; polifenóis, como flavonoides, cumarinas e ácidos fenolcarboxílicos; e óleos essenciais, ricos em ácidos aromáticos (Laribi *et al.*, 2015).

Os benefícios desta planta vão além do seu sabor e características aromáticas, sendo há muito aplicada na medicina tradicional, auxiliando o tratamento de diversas condições, como distúrbios gastrointestinais, ansiedade, perda de apetite, reumatismo, entre outras. Em ensaios em laboratório os extratos preparados com diversas partes desta planta têm demonstrado atividades antioxidante, antidiabética, anticancerígena, e de inibição da peroxidação lipídica (Zhang *et al.*, 2014). Segundo Laribi *et al.* (2015), vários estudos em animais foram realizados com o intuito de demonstrar as referidas propriedades, que poderão estar relacionadas com o teor em polifenóis e outros fitoquímicos presentes nos coentros (Barros *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Salsa

*Petroselinum crispum*, (Figura 1.2) vulgarmente conhecida como salsa, é uma planta herbácea anual pertencente à família *Apiaceae*, que se encontra distribuída mundialmente, embora seja originária do Mediterrâneo. As folhas frescas da salsa são utilizadas devido à sua fragrância e às suas propriedades medicinais (Charles, 2004).



Figura 1.2 – A: Ramo de salsa; B: Pormenor da folha da salsa (A - <http://www.fotosantesedepois.com/salsa/>; B - <http://casa.umcomo.com.br/articulo/como-plantar-salsa-em-casa-713.html>)

Os principais componentes fitoquímicos presentes na *Petroselinum crispum* são: flavonoides, como luteína e apigenina; carotenoides; ácido ascórbico; tocoferóis; políinas; ftálicos; compostos voláteis; cumarinas; furanocumarinas; e sesquiterpenos (Ozsoy-Sacan *et al.*, 2006; Farzaei *et al.*, 2013).

A salsa é usada na medicina tradicional em diversas situações, como distúrbios do trato gastrointestinal e estimulação da digestão, problemas do trato urinário inferior e rins, e no tratamento de situações de dismenorreia, amenorreia, e hipertensão, entre outras (Doğru & Erat, 2012). A vasta gama de atividades farmacológicas desta planta, como atividades antioxidante, hepatoprotetora, antidiabética, analgésica, espasmolítica, imunossupressora, gastroprotetora, diurética, e antibacteriana, entre outras, levam ao seu uso na medicina moderna (Farzaei *et al.*, 2013).

### 1.2.3 Segurelha

O género *Satureja L.* (Figura 1.3) pertence à família *Lamiaceae*, subfamília *Nepetoideae* e tribo *Mentheae*, e engloba mais de trinta espécies (Hadian *et al.*, 2008). A *Satureja Hortensis L.*, ou segurelha, é uma dessas espécies, que prevalece principalmente na zona do Mediterrâneo, de onde é nativa. Esta planta é amplamente utilizada devido às suas características aromáticas e medicinais (Shojaee-Aliabadi *et al.*, 2013; Proença Da Cunha *et al.*, 2003).



Figura 1.3 – A: Ramo de segurelha; B: Pormenor das folhas e flôr da segurelha (A - <http://www.oleos essenciais.org/oleo-essencial-de-segurelha/>; B - [http://www.fungoceva.it/erbe\\_ceb/image\\_erbe/satureja\\_hortensis2.jpg](http://www.fungoceva.it/erbe_ceb/image_erbe/satureja_hortensis2.jpg))

As folhas da segurelha apresentam um sabor distinto, podendo ser adicionadas a diversos pratos de carne, aves ou vegetais, como aromatizantes (Dorman & Hiltunen, 2004; Sefidkon *et al.*, 2006).

Segundo Krasniewska *et al.* (2014) entre os principais componentes desta planta aromática incluem-se óleos voláteis, polifenóis, como flavonoides (por exemplo, apigenina), ácidos fenólicos (por exemplo, ácido labiático), carvacrol, taninos, resinas, carotenoides e compostos minerais. Os teores nestes compostos poderão variar consoante inúmeros fatores, como o clima, época da colheita e parte da planta.

A *Satureja Hortensis* é usada na medicina tradicional no tratamento de diversas condições, como náuseas, indigestão, diarreia, flatulência, dores musculares e expetoração (Dorman & Hiltunen, 2004; Sefidkon *et al.*, 2006). Vários estudos têm demonstrado que extratos preparados a partir da segurelha apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, antioxidante, antiespasmódica e antidiarreica e propriedades sedativas (Dorman & Hiltunen, 2004).

### 1.3 Stress oxidativo e Antioxidantes

Todos os organismos vivos, exceto aqueles que são anaeróbios, necessitam de oxigénio como recetor de eletrões para a produção adenosina trifosfato – ATP, a energia necessária à manutenção da vida. Contudo, dado que este é um forte oxidante, é impossível evitar oxidações secundárias independentes do metabolismo fisiológico, que dão origem a radicais livres, nomeadamente ROS. Devido aos malefícios causados por estas oxidações aleatórias, é necessária a existência de um sistema antioxidante eficiente (Sorg, 2004; Buonocore *et al.*, 2010).

As ROS podem apresentar efeitos prejudiciais ou benéficos, consoante a concentração em que se encontram presentes. Numa baixa/moderada quantidade, estas espécies estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos, incluindo mecanismos de regulação da proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e expressão de genes, imunidade celular, assim como na defesa do organismo face a agentes infecciosos, como bactérias ou fungos (Valko *et al.*, 2007; Pisoschi & Pop, 2015; Rajendran *et al.*, 2014). Em quantidades elevadas, estas espécies podem causar danos às proteínas e lípidos celulares ou formar aductos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que poderão promover atividade carcinogénica (Seifried *et al.*, 2007).

O efeito negativo das ROS, que engloba potenciais danos biológicos, é denominado de *stress* oxidativo, e ocorre em sistemas biológicos onde se verifica uma produção excessiva destas espécies reativas concomitante com uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Valko *et al.*, 2007). O *Stress* oxidativo consiste então na incapacidade do organismo manter um equilíbrio entre a formação das ROS e o sistema de proteção antioxidante, ou seja, há um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidativas e a sua respetiva neutralização pelos antioxidantes (Pisoschi & Pop, 2015).

O *stress* oxidativo, induzido pela formação de radicais livres, está assim implicado na patogénese e fisiopatologia de inúmeros problemas crónicos de saúde, tais como doenças neuro-degenerativas (Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, perda de memória, entre outras), doenças cardiovasculares (aterosclerose, doença isquémica, hipertensão, entre outras), desordens pulmonares (doenças inflamatórias do pulmão como asma e doença pulmonar obstrutiva crónica), doenças associadas a bebés prematuros (displasia bronco pulmonar, hemorragia intraventricular, entre outras), doenças autoimunes (artrite reumatoide), desordens renais severas (glomerulonefrite, falência renal crónica, proteinúria, entre outras), doenças gastrointestinais (úlceras pépticas, colite, entre outras), diabetes e vários tipos de tumores (Rajendran *et al.*, 2014).

### **1.3.1 Espécies reativas de oxigénio (ROS)**

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas, ou seus fragmentos, que contêm um ou mais eletrões não emparelhados em orbitas atómicas ou moleculares. Esta característica confere-lhes um considerável grau de reatividade, com baixas energias de ativação e tempos de vida curto. O seu pequeno tamanho permite a grande parte destas espécies penetrarem nas membranas celulares (Jensen, 2003; Valko *et al.*, 2007; Burton, 2011).

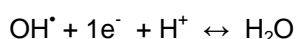
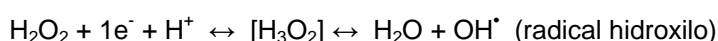
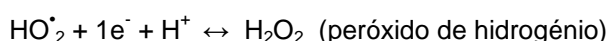
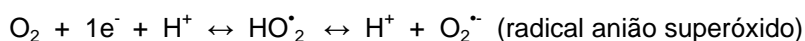
As ROS representam a principal classe de espécies reativas geradas nos organismos vivos, e incluem espécies radicalares, como o radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou o radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) e não radicalares, como o peróxido de hidrogénio ou o oxigénio singleto. Ou seja, todas as

espécies tóxicas de oxigénio são ROS, contudo nem todas as ROS são radicais de oxigénio (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010). O radical anião superóxido é considerado uma espécie reativa de oxigénio primária, por conseguir gerar outras ROS (ROS secundárias) através da sua interação com outras moléculas. Este radical é principalmente produzido na cadeia respiratória mitocondrial (Buonocore *et al.*, 2010).

A cadeia respiratória representa um papel fundamental na produção de ATP nas células animais. Ao longo do processo respiratório, o oxigénio é utilizado como recetor de eletrões, sendo reduzido a água através de aquisição de quatro eletrões (Buonocore *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2007):



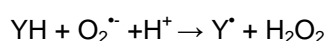
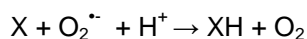
Através desta transformação do oxigénio, torna-se possível a formação de radicais através dos seguintes passos (Buonocore *et al.*, 2010):



Dos três produtos intermediários formados, radical anião superóxido, peróxido de hidrogénio e radical hidroxilo, o segundo é o mais estável, podendo por isso ser acumulado numa maior quantidade (Buonocore *et al.*, 2010).

### 1.3.1.1 Radical anião superóxido

Tal como referido anteriormente, o radical anião superóxido é um radical primário uma vez que pode gerar ROS secundários, e atua tanto como um fator redutor como oxidante, dado que é formado numa reação de redução do oxigénio molecular e produz peróxido de hidrogénio através de uma reação de oxidação (Buonocore *et al.*, 2010):

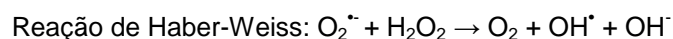
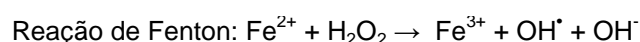


A sua formação ocorre fundamentalmente na fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial, por via da citocromo oxidase, e na oxidação do heme, durante a ligação do oxigénio ao Fe(II) do heme da desoxihemoglobina. O radical anião superóxido pode ainda resultar da ação de diversas oxidases sobre o oxigénio, como a dihidro-nicotinamida adenina

dinucleótido fosfatase oxidase, a xantina oxidase e a ciclooxigenase (Pisoschi & Pop, 2015; Buonocore *et al.*, 2010).

#### 1.3.1.2 Radical hidroxilo

O radical hidroxilo é a ROS mais reativa, devido ao seu forte poder oxidante, sendo estimado que seja responsável por mais de metade dos danos causados por radicais livres, apesar do seu curto tempo de vida (Jensen, 2003). A sua produção dá-se essencialmente devido a um excesso de peróxido de hidrogénio e radical anião superóxido, através da reação de Fenton e da reação de Haber-Weiss, respetivamente (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010):



A reação de Fenton pode desenvolver-se com outros iões metálicos além do  $\text{Fe}^{2+}$ , tais como o  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ti}^{3+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$ , embora esta ocorra em maior escala quando o metal de transição é o ferro (Valko *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2010).

#### 1.3.1.3 Radical peroxilo

O radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) apresenta um tempo de vida relativamente longo, assim como considerável alcance nos sistemas biológicos. Este radical é formado no decorrer do processo de peroxidação lipídica, apresentando um papel fulcral na propagação do mesmo (Kohen & Nyska, 2002; Gülçin, 2011).

#### 1.3.1.4 Oxigénio singleto

O oxigénio singleto é formado através dum rearranjo dos eletrões no oxigénio molecular por via de um *input* de energia, o que leva a que este apresente uma capacidade de oxidação bastante superior ao oxigénio molecular. Esta espécie consegue oxidar diretamente proteínas, lípidos e ADN (Buonocore *et al.*, 2010).

#### 1.3.1.5 Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio é uma ROS secundária produzida a partir do radical anião superóxido, sendo que pode resultar diretamente da transferência de dois eletrões para o

oxigénio molecular na presença de oxidases, como urato oxidase, glicose oxidase ou D-aminoácido oxidase. Esta espécie reativa apresenta um poder oxidante indireto, uma vez que embora não seja muito reativa isolada, é responsável pela síntese de radicais extremamente reativos, como o  $\text{OH}^\bullet$ , devido à sua reação com iões metálicos, nomeadamente com o  $\text{Fe(II)}$  (Pisoschi & Pop, 2015).

### 1.3.2 Outras fontes de espécies reativas de oxigénio

Apesar da principal fonte endógena de ROS ser a mitocôndria, existem outras fontes celulares de radicais livres, como a xantina oxidase, que catalisa a hidroxilação de purinas, e a ativação de células anti-inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. A ativação destes últimos leva a um aumento do consumo de oxigénio, o que origina uma ampla variedade de ROS (Buonocore *et al.*, 2010).

Além de poderem ter uma origem endógena, as ROS poderão ser também produzidas através de fontes exógenas, tais como a exposição a radiações ou a xenobióticos. As radiações ionizantes e não-ionizantes representam uma importante forma de produção de ROS, assim como os poluentes do ar (ex. fumo do escape de carros e de cigarros) e contaminantes industriais que podem causar danos no organismo através da interação direta com a pele ou por inalação. Medicamentos cujo mecanismo de ação seja mediado por ROS e xenobióticos (ex. toxinas, pesticidas e herbicidas) ou químicos (etanol) também podem gerar ROS como produto secundário do seu metabolismo *in-vivo* (Kohen & Nyska, 2002; Sorg, 2004; Buonocore *et al.*, 2010; Carochó & Ferreira, 2013).

A invasão do organismo por patogénicos, como bactérias e vírus, pode levar a uma produção de ROS, quer por libertação direta destas por parte do patogénico, quer pela resposta endógena do organismo mediada por fagócitos e neutrófilos (Kohen & Nyska, 2002).

Os alimentos constituem outra importante fonte exógena de ROS, dado que grande parte dos produtos alimentares consumidos sofre oxidação numa larga escala, assim como contém variados tipos de oxidantes na sua composição, como peróxidos, aldeídos, ácidos gordos oxidados e metais de transição (Kohen & Nyska, 2002).

Embora o organismo esteja altamente exposto a fontes exógenas de ROS, a sua exposição a fontes endógenas é mais extensa e apresenta uma maior importância, dado que se trata de um processo contínuo ao longo do período de vida de todas as células do organismo (Kohen & Nyska, 2002).

### 1.3.3 Danos oxidativos no ADN, lípidos e proteínas

A constante produção de ROS tem como resultado danos oxidativos, contínuos e cumulativos, a componentes celulares, com alteração de inúmeras funções celulares. Os componentes celulares mais suscetíveis destas alterações são proteínas, lípidos e o ácido desoxirribonucleico (ADN) (Kohen & Nyska, 2002).

Embora as moléculas de ADN sejam estáveis e bem protegidas, as ROS conseguem interagir com as mesmas, causando diversos danos, com um impacto negativo na transcrição e replicação de genes importantes. A principal ROS responsável pelos danos é o radical hidroxilo, que induz a formação de uma grande variedade de aductos, sendo a lesão mais estudada, a oxidação do nucleótido guanosina, com formação de 8-hidroxideoxiguanosina. As modificações permanentes do material genético resultantes destes danos oxidativos representam o primeiro passo envolvido na mutagénese, carcinogénese e envelhecimento (Kohen & Nyska, 2002; Valko *et al.*, 2007; Carochó & Ferreira, 2013; Pisoschi & Pop, 2015).

Os níveis elevados de ácidos gordos insaturados leva a que todas as membranas celulares sejam especialmente vulneráveis à oxidação, sofrendo facilmente peroxidação por parte do  $\text{OH}^\bullet$ . Este processo, designado de peroxidação lipídica, além dos danos na membrana celular, produz também aldeídos reativos, como malonildialdeído e o 4-hidroxinonenal, sendo que o primeiro é mutagénico em bactérias e mamíferos e carcinogénico em ratos, e o último, além de apresentar toxicidade, pode ligar-se a proteínas e alterar a sua estrutura (Valko *et al.*, 2007; Carochó & Ferreira, 2013; Pisoschi & Pop, 2015).

As proteínas são importantes constituintes celulares que podem sofrer oxidação por parte das ROS, causando danos a resíduos específicos de aminoácidos, alterações da estrutura terciária, degradação e fragmentação com consequente perda de atividade enzimática, alteração de funções, como produção de energia e interferência na criação de novas membranas. Os produtos mais comuns resultantes da oxidação proteica são ceto-compostos e aldeídos (Kohen & Nyska, 2002; Pisoschi & Pop, 2015).

### 1.3.4 Mecanismos de defesa contra o *stress* oxidativo

A exposição a radicais livres com consequente *stress* oxidativo leva à necessidade do organismo desenvolver uma série de mecanismos de defesa: 1) mecanismos preventivos; 2) mecanismo de reparação; 3) defesas físicas e 4) defesas antioxidantes (Valko *et al.*, 2007). Estes mecanismos têm como objetivo a manutenção de níveis mínimos de ROS, ou seja, manter a sua produção e eliminação equilibradas num determinado nível de ROS (Lushchak, 2014), e englobam atividades diretas e indiretas. De entre as abordagens indiretas, salientam-se o controlo da produção endógena de ROS, através da alteração da atividade de enzimas

que produzem metabólitos de oxigénio indiretamente, como é o caso da xantina oxidase. Um dos principais métodos utilizados pelo organismo para lidar com os danos oxidativos, é um sistema de reparação eficiente, que consiste na reparação de danos oxidativos em macromoléculas através de enzimas e pequenas moléculas. De todos os mecanismos de defesa, aquele que apresenta extrema importância envolve antioxidantes, dado que existe uma grande variedade destes compostos que garantem a proteção máxima dos locais de ação dos radicais livres, através da remoção direta destes últimos. Por exemplo, os tocoferóis podem conferir estabilidade às membranas celulares, prevenindo a ação das ROS constituindo assim um importante mecanismo de defesa da célula face ao *stress* oxidativo (Kohen & Nyska, 2002).

### 1.3.5 Antioxidantes

Um antioxidante tem sido definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparativamente a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato”, ou como “qualquer substância que atrase, previna ou remova os danos oxidativos na molécula-alvo” (Halliwell, 1996; Halliwell, 2007).

Os antioxidantes utilizam diversos mecanismos para evitar os danos oxidativos, nomeadamente: 1) remoção de espécies que iniciam a peroxidação; 2) quelação de iões metálicos de modo a torná-los incapazes de gerar espécies reactivas e decompor peróxidos; 3) eliminar  $O_2^{\cdot -}$  prevenindo a formação de peróxidos; 4) interromper a reação da cadeia auto-oxidativa; e/ou 5) redução de concentrações localizadas de  $O_2$  (Oroian & Escriche, 2015).

Como se pode observar na Figura 1.4, os antioxidantes dividem-se em duas classes: enzimáticos e não enzimáticos (Carocho & Ferreira, 2013; Pisoschi & Pop, 2015).

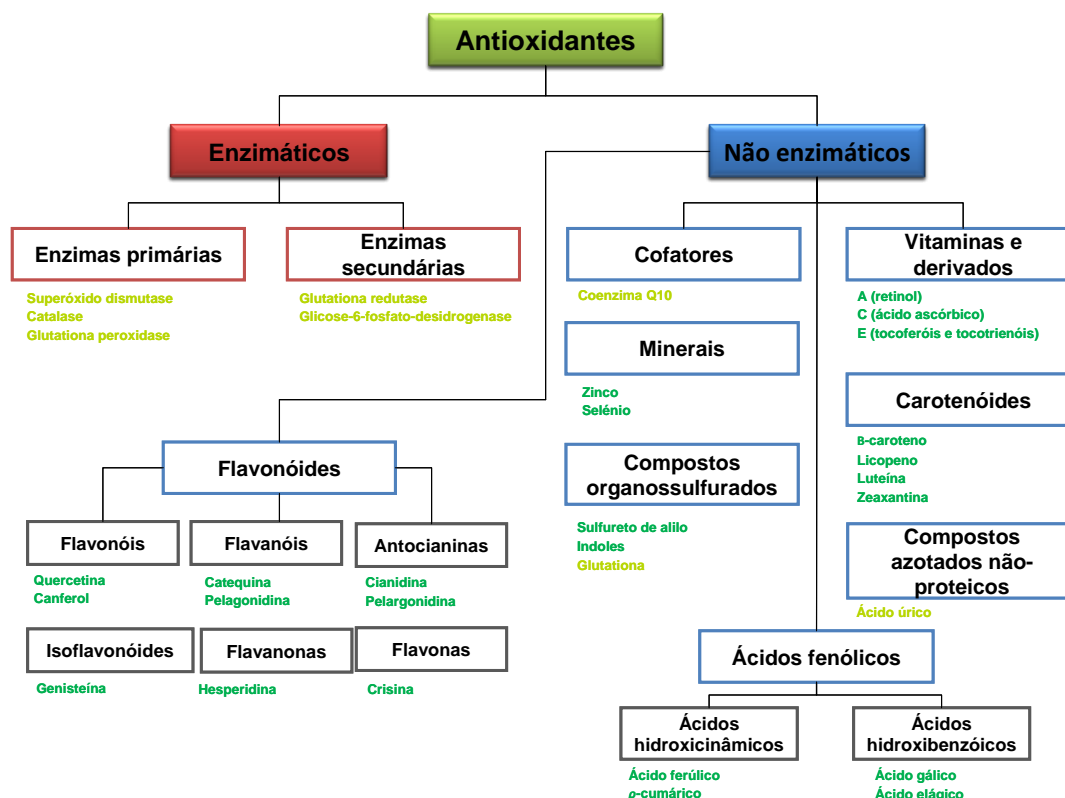
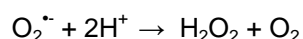


Figura 1.4 – Antioxidantes naturais separados por classes. A cor verde representa antioxidantes exógenos, enquanto a cor amarela representa antioxidantes endógenos (Carocho & Ferreira, 2013)

### 1.3.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos englobam as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase, todas elas de produção endógena.

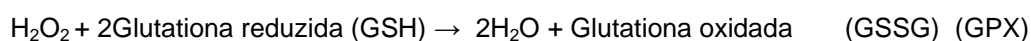
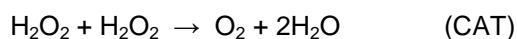
A superóxido dismutase (SOD) representa um papel vital no controlo da produção celular de  $O_2^{\cdot-}$ , ao catalisar a dismutação deste em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , representada pela seguinte reação:



O termo superóxido dismutase caracteriza uma família de proteínas enzimáticas, que diferem na estrutura e cofator, como a Cu-Zn SOD e a Mn-SOD (Rajendran *et al.*, 2014). Enquanto a primeira é uma proteína dimérica encontrada principalmente no citoplasma, a última trata-se de uma proteína homotetramérica, localizada na mitocôndria (Kohen & Nyska, 2002).

O produto final da reação de dismutação -  $H_2O_2$  – pode ser removido pelas enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPX). A catalase é uma enzima constituída por quatro proteínas, encontrada nos peroxissomas, capaz de remover  $H_2O_2$  quando este se encontra presente em concentrações elevadas, enquanto as glutaciona peroxidases são uma família de enzimas, presentes no citoplasma e mitocôndria, e que se dividem em dois grupos: enzimas selénio (Se)-independentes e Se-dependentes, e são capazes de reduzir o  $H_2O_2$  a água,

mesmo em baixas concentrações, uma vez que apresentam uma grande afinidade para este composto, e reduzir hidroperóxidos lipídicos aos seus álcoois correspondentes. A remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela CAT e GPX é descrita pelas seguintes reações (Matés & Sánchez-Jiménez, 2000; Kohen & Nyska, 2002; Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009; Al-Gubory *et al.*, 2010; Carochó & Ferreira, 2013):



Na reação mediada pela catalase, existem duas moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo que uma serve como um dador de eletrões, alcançando-se a destruição de ambas moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a produção de uma molécula de oxigénio. A glutaciona redutase (GSR) reduz a forma oxidada da glutaciona (GSSG) para a forma reduzida (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor, garantindo, deste modo, a manutenção dos níveis de GSH necessários para a reação da peroxidase (Al-Gubory *et al.*, 2010). A glucose-6-fosfato desidrogenase regenera o NADPH de modo a manter-se um meio redutor, necessário à regeneração do GSH (Carochó & Ferreira, 2013).

### 1.3.5.2 Antioxidantes não enzimáticos

Existem vários antioxidantes não-enzimáticos de origem endógena, como a coenzima Q10, ácido úrico e glutaciona (Carochó & Ferreira, 2013). A coenzima Q10 encontra-se presente em todas as células e membranas, sendo importante para a cadeia respiratória e outras vias metabólicas celulares. Esta coenzima previne a formação de radicais peróxilo, assim como está envolvida na regeneração da vitamina E (Carochó & Ferreira, 2013).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo de nucleótidos purínicos, e tem como funções a prevenção da produção em excesso de oxidantes resultantes da reação entre a hemoglobina e peróxidos e a prevenção da lise eritrocitária por peroxidação. Este ácido é ainda capaz de eliminar de forma muito eficaz o oxigénio singleto e os radicais hidroxilo e peróxilo (Carochó & Ferreira, 2013; Pisoschi & Pop, 2015).

A glutaciona é um tripéptido endógeno, cujo efeito antioxidante deriva de ser co-substrato de enzimas antioxidantes (GPX); de poder promover a eliminação direta de radicais hidroxilo e de oxigénio singleto; e, ainda, de participar na regeneração de outros antioxidantes como, por exemplo, as vitamina C e E, às suas formas ativas (Valko *et al.*, 2007).

Apesar da sua eficiência, o sistema antioxidante endógeno não é suficiente. A alimentação é maior fonte de antioxidantes exógenos, sendo que estes se encontram em abundância em vegetais, legumes, frutas, grãos, frutos secos e cereais, assim como especiarias e plantas

aromáticas (Rajendran *et al.*, 2014).

As principais classes de compostos com atividade antioxidantes são: vitaminas (vitamina C, E e A), carotenoides (carotenos e xantofilas); e polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros) (Oroian & Escriche, 2015).

As vitaminas constituem uma forte fonte de proteção contra os danos provocados pelas ROS, uma vez que atuam diretamente sobre estas, sendo as principais a vitamina C, E e A (Al-Gubory *et al.*, 2010). A vitamina A, também designada por retinol, atividade antioxidante, que resulta da sua capacidade de se combinar com radicais peróxido antes destes propagarem a peroxidação dos lípidos (Carocho & Ferreira, 2013). A vitamina C, ou ácido ascórbico, é considerada um dos mais importantes antioxidantes hidrofílicos, devido à sua eficiente remoção do radical anião superóxido, do peróxido de hidrogénio, do radical hidroxilo, do oxigénio singlete e de espécies reativas de azoto. Esta vitamina apresenta ainda a capacidade de regenerar vitamina E (Carocho & Ferreira, 2013; Oroian & Escriche, 2015). O termo vitamina E refere-se a um grupo de compostos químicos com propriedades antioxidantes e lipossolúveis, constituído por quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis. A forma mais ativa dos homólogos da vitamina E são os tocoferóis, uma vez que conferem proteção às membranas celulares contra a oxidação, dado que reagem com as ROS e com os radicais lipídicos provenientes das reações de lipoperoxidação (Al-Gubory *et al.*, 2010; Carocho & Ferreira, 2013).

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais lipossolúveis sintetizados por plantas e microrganismos, constituídos por dois grupos: os carotenos como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno (precursor da vitamina A), e as xantofilas, como a zeaxantina e a luteína. A sua atividade antioxidante deriva da sua capacidade de quelação do oxigénio singlete, que resulta em carotenoides excitados que dissipam a energia adquirida através de interações rotacionais e vibratórias com o solvente, retornando depois ao estado não excitado e interagindo novamente com mais espécies radicais (Gülçin, 2011; Carocho & Ferreira, 2013).

Os polifenóis representam uma ampla variedade de compostos orgânicos, que ocorrem naturalmente em vegetais, frutas, e plantas pois são metabolitos secundários produzidos por estes. São caracterizados pela presença de inúmeros grupos hidroxilo envolvidos nas estruturas fenólicas, podendo ser moléculas de baixo peso molecular, com apenas um anel aromático, até compostos mais complexos, como taninos e polifenóis derivados. Os principais grupos de polifenóis são flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas, sendo os flavonoides e os ácidos fenólicos aqueles que apresentam maior relevância no seu poder antioxidante (Al-Gubory *et al.*, 2010; Oroian & Escriche, 2015).

Os flavonoides são um grupo de compostos antioxidantes, abundantes na natureza, sendo que a grande maioria são pigmentos de plantas, e dividem-se em diversos sub-grupos: flavonóis, flavanóis, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas e flavonas (Carocho & Ferreira, 2013; Oroian & Escriche, 2015). As suas principais propriedades antioxidantes, que advêm dos

grupos hidroxilos fenólicos ligados a anéis estruturais, são: propriedades redutoras; doação de hidrogénios; quelação de oxigénio singleto e de metais; remoção de radicais superóxido; ativação de enzimas antioxidantes; redução de tocoferoxilos; inibição de oxidases; aumento dos níveis de ácido úrico e outras moléculas de baixo peso molecular (Carocho & Ferreira, 2013).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois principais grupos, dependendo da sua estrutura: os derivados do ácido cinâmico – ácidos hidroxicinâmicos, e os derivados do ácido benzóico – ácidos hidroxibenzóicos (Oroian & Escriche, 2015). Estes compostos apresentam propriedades quelantes e neutralizam radicais livres (radicais hidroxilo, peróxido e superóxido), o que lhes confere atividade antioxidante (Carocho & Ferreira, 2013).

### **1.3.6 Aplicação alimentar de antioxidantes**

Além da sua importância na redução dos processos oxidativos nos organismos vivos, os antioxidantes representam também um papel fulcral nos sistemas alimentares (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

A deterioração da qualidade dos alimentos ocorre durante o seu processamento e armazenamento, estando interligada a processos oxidativos, geralmente catalisados por iões metálicos, afetando principalmente lípidos, hidratos de carbono e proteínas (Hinneburg *et al.*, 2006). Os principais atributos afetados são o *flavor*, aroma, textura e cor, diminuindo assim a qualidade nutricional e organolética dos produtos alimentares (Elias *et al.*, 2008; Borneo *et al.*, 2009).

A estabilidade oxidativa dos alimentos está relacionada com o balanço entre fatores pro-oxidantes e antioxidantes. Enquanto nos organismos vivos, existem sistemas que garantem este balanço, nos produtos alimentares, devido ao processamento, tal não ocorre. Existem vários métodos de processamento que aumentam o *stress* oxidativo, como: introdução de oxigénio, através de operações de moagem, mistura e homogeneização; remoção de antioxidantes naturais, através de medidas de separação física e química na refinação de óleo; destruição de antioxidantes endógenos, através de inativação por calor; aumento de fatores pro-oxidantes, como exposição à luz com formação de oxigénio singleto e tratamentos térmicos que libertam metais de transição ligados a proteínas; e incorporação de ácidos gordos insaturados nos alimentos (Elias *et al.*, 2008).

Os antioxidantes são assim necessários para prevenir reações oxidativas durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Na indústria alimentar são amplamente utilizados antioxidantes sintéticos, como o hidroxitolueno butilado (BHT), o hidroxianisol butilado (BHA) e o galato de propilo (PG). Contudo, o uso destes compostos gera alguma controvérsia, dado que existem estudos que indicam a presença de problemas de segurança na sua utilização. Com efeito, o BHA tem dado resultados positivos em ensaios de

cancerigênese e o BHT parece desencadear hemorragias internas e externas em ratos e porquinhos-da-Índia, quando usado em elevadas concentrações (Borneo *et al.*, 2009). A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) estabeleceu doses diárias aceitáveis para estes aditivos (BHT – 0,25 mg/kg peso corporal/dia; BHA – 1,0 mg/kg peso corporal/dia; PG – 0,5 mg/kg peso corporal/dia), após reavaliar a informação contraditória existente relativa ao uso destes antioxidantes sintéticos, fazendo notar que é improvável a exposição de adultos e crianças a quantidades superiores às referidas (EFSA,2011; EFSA, 2012; EFSA, 2014).

A existência de informações contraditórias relativa ao uso de antioxidantes sintéticos associada ao crescente interesse dos consumidores relativamente ao consumo de alimentos naturais e saudáveis, leva à necessidade do uso de antioxidantes provenientes de fontes naturais como plantas, vegetais, frutas, ervas e especiarias ( Borneo *et al.*, 2009; Sindhi *et al.*, 2013; Shah *et al.*2014). Antioxidantes naturais como a vitamina C, tocoferóis, extratos de plantas, como o rosmaninho e a sálvia, e extratos de chá, são já comercializados como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

A aplicação de antioxidantes nos produtos alimentares poderá ser efetuada pela adição direta destes compostos sobre os alimentos. No entanto, este procedimento é limitado devido à presença de aromas intensos, o que poderá representar um problema quando a intensidade do mesmo exceder o aceitável pelo consumidor. De modo a solucionar esta limitação, a aplicação poderá ocorrer também através do uso de embalagens ativas, um mecanismo que modifica as condições do alimento de modo a garantir um aumento do seu tempo de prateleira ou melhorar as suas propriedades de qualidade e segurança, ou da encapsulação destes compostos em polímeros biodegradáveis e comestíveis ou em saquetas que irão permitir uma libertação lenta dos mesmos para a superfície do alimento ou para a sua atmosfera envolvente (Continia *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2015).

#### **1.4 Atividade antimicrobiana**

Atualmente existe uma procura por parte dos consumidores de produtos alimentares seguros e de elevada qualidade, assim como existe uma grande preocupação relativa à crescente ocorrência de doenças de origem alimentar originadas por microrganismos patogénicos (Tajkarimi *et al.*, 2010). Segundo Pesavento *et al.* (2015), as doenças de origem alimentar são um dos principais problemas de saúde pública, associadas a inúmeras complicações e mortes em todo o mundo. Estas doenças também proliferam nos países industrializados, principalmente devido aos novos hábitos de vida que requerem alimentos prontos-a-comer, prontos-a-cozinhar ou que necessitam apenas de ser aquecidos. Torna-se assim essencial a prevenção, com principal enfoque para a produção e conservação dos alimentos, de modo a reduzir-se o risco e incidência de doenças de origem alimentar.

A inibição do crescimento de microrganismos patogénicos e responsáveis pela deterioração

dos alimentos leva ao uso de conservantes químicos e antimicrobianos artificiais. Contudo, a procura por produtos alimentares saudáveis aumenta o interesse pelo desenvolvimento de novos tipos de compostos antimicrobianos eficientes e não tóxicos, nomeadamente a preservação de alimentos através de compostos antimicrobianos naturais, como extractos de plantas aromáticas e especiarias (Shan *et al.*, 2007). Um antimicrobiano ideal é aquele que se encontra disponível em grandes quantidades como co-produto, e que apresenta o estado geralmente reconhecido como seguro (“*generally recognized as safe*” – GRAS), por fazer parte da dieta humana típica durante anos (Calo *et al.*, 2015).

Os antimicrobianos são utilizados nos alimentos por dois principais motivos: controlo dos processos naturais de deterioração – conservação; e prevenção do crescimento de microrganismos, nomeadamente os patogénicos – segurança. Os antimicrobianos naturais, além de participarem na conservação e segurança dos alimentos, reduzem o desenvolvimento de resistências a antibioticos pelos microrganismos patogénicos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Os principais componentes responsáveis pelas propriedades antimicrobianas das plantas aromáticas e especiarias são ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides e alcalóides, sendo que variações na estrutura e composição química destes resulta em diferenças na sua acção antimicrobiana (Gyawali & Ibrahim, 2014; Makwana *et al.*, 2015). De um modo geral, existem seis possíveis mecanismos de acção antimicrobiana, que incluem: 1) desintegração da membrana citoplasmática; 2) interação com proteínas da membrana (ATPases, entre outras); 3) distúrbio da membrana externa das bactérias gram negativas com libertação dos lipopolissacáridos; 4) destabilização da força motriz de protões com perda de iões; 5) coagulação do conteúdo celular; e 6) inibição da síntese de enzimas (Aleksic & Knezevic, 2014; Cetin-Karaca & Newman, 2015). De modo a potenciar a acção antimicrobiana destes compostos, é frequente a utilização combinada de alguns, de modo a obter-se um efeito sinérgico com aumento da eficácia dos mesmos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

A capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos está relacionada com a presença de grupos hidroxilo nos mesmos, uma vez que estes grupos conseguem interagir com a membrana celular das bactérias, provocando a inibição das propriedades funcionais da célula, e eventualmente a perda de componentes internos celulares (Gyawali & Ibrahim, 2014). Os mecanismos de acção poderão relacionar-se com a capacidade dos compostos fenólicos em: alterar a permeabilidade das células microbianas; causar danos nas membranas citoplasmáticas; interferir no sistema de produção de energia celular; e interromper a força motriz de protões (Calo *et al.*, 2015).

No entanto, nem todas as bactérias se comportam da mesma forma face aos compostos antimicrobianos. De um modo geral, as bactérias gram-negativas são menos sensíveis a estes compostos comparativamente às bactérias gram positivas, devido à presença de lipopolissacáridos na membrana externa, que restringem a difusão de compostos hidrofóbicos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

A aplicação de compostos antimicrobianos na indústria alimentar pode ser realizada através de diferentes métodos de exposição, como vaporização, contacto directo ou libertação lenta pela embalagem, ou em combinação com técnicas de conservação tradicionais, como refrigeração e embalagem em atmosfera modificada ou vácuo, com o objectivo de inibir a multiplicação de microrganismos patogénicos e da flora responsável pela deterioração dos alimentos (Tajkarimi *et al.*, 2010; Pesavento *et al.*, 2015).

## **1.5 Inflamação**

A resposta inflamatória consiste num sistema inato de respostas celulares e humorais após lesão (por exemplo, exposição a calor ou frio, isquemia, trauma, entre outros), em que o corpo procede à tentativa de restaurar o tecido lesionado para o seu estado inicial (Ward, 2010).

A inflamação é caracterizada por: 1) vasodilatação dos vasos sanguíneos locais, com conseqüente afluxo sanguíneo excessivo; 2) aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo a saída de grandes quantidades de fluidos para os espaços intersticiais; 3) coagulação recorrente dos fluidos do espaço intersticial devido a quantidades excessivas de fibrinogénio e outras proteínas provenientes dos capilares; 4) migração de granulócitos e monócitos para o tecido; e 5) inchaço das células dos tecidos (Guyton & Hall, 2006).

A resposta inflamatória pode ser classificada em aguda ou crónica. De um modo geral, a resposta inflamatória aguda inicia-se em minutos e termina em horas, enquanto a resposta inflamatória crónica pode persistir durante semanas, meses ou anos (Gilroy & Lawrence, 2008). Nalgumas situações, caso a resposta inflamatória aguda se torne excessiva ou prolongada, poderá levar a lesões relevantes dos tecidos e órgãos (Ward, 2010).

### **1.5.1 Inflamação aguda**

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um série de eventos que envolvem: perda de água, sais e proteínas do compartimento vascular; ativação de células endoteliais; interações de adesão entre leucócitos e o endotélio vascular; recrutamento de leucócitos; ativação de macrófagos tecidulares; ativação de plaquetas e sua agregação; ativação dos sistemas do complemento, coagulação e fibrinolítico; e libertação de proteases e oxidantes pelas células fagocíticas (Ward, 2010).

A primeira linha de defesa contra infeções são os macrófagos tecidulares. Minutos após o início da inflamação, estas células iniciam a sua ação fagocítica, aumentando o seu tamanho e tornando-se móveis. De seguida, aproximadamente uma hora após o início da inflamação, a área inflamada é invadida por neutrófilos provenientes da corrente sanguínea. Esta invasão deve-se à libertação de produtos pelos tecidos inflamados, que iniciam as seguintes reações:

1) alteração da superfície interior do endotélio capilar, levando à adesão de neutrófilos nas paredes capilares da área inflamada – marginação; 2) formação de conexões intercelulares entre as células endoteliais dos capilares e vénulas, permitindo a passagem, por diapedese, de neutrófilos diretamente do sangue para os espaços tecidulares; 3) outros produtos da inflamação fazem a quimiotaxia dos neutrófilos para os tecidos lesados. Algumas horas após a inflamação poderá observar-se neutrofilia, ou seja, um aumento do número de neutrófilos no sangue, devido à mobilização dos mesmos na medula óssea, por produtos da inflamação (Guyton & Hall, 2006).

Aliada à invasão dos neutrófilos, observa-se a entrada de monócitos, provenientes do sangue, no tecido inflamado, que se tornam macrófagos, fagocitando uma maior quantidade de bactérias, partículas de maior tamanho e tecido necrótico relativamente aos neutrófilos. Uma vez que o número destas células é bastante inferior ao número de neutrófilos, circulantes e armazenados, necessitam de vários dias para serem eficientes. No entanto, mesmo após a chegada ao local alvo, os monócitos são ainda células imaturas, necessitando de aproximadamente oito horas para aumentarem de tamanho e desenvolverem grandes quantidades de lisossomas, sendo apenas nesta fase que estas células adquirem as capacidades de macrófagos fagocíticos. A linha de defesa final é o aumento marcante da produção de granulócitos e monócitos pela medula óssea (Guyton & Hall, 2006).

As alterações a nível vascular são mediadas por diversos fatores, como o óxido nítrico (NO), histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas e substância P. A marginação de neutrófilos é mediada por moléculas de adesão intracelular (ICAM-1), moléculas de adesão vascular (VCAM-1), quimiocinas (por exemplo, interleucina IL-8) e metabolitos gerados pela via do ácido araquidónico (AA). A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) providencia AA como substrato para a ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX) formando, respetivamente, uma ampla variedade de prostaglandinas e leucotrienos, iniciando assim a quimiotaxia e vasodilatação (Raso *et al.*, 2001; Gossiau *et al.*, 2011).

A resposta inflamatória é ainda mediada pela libertação de citocinas pro-inflamatórias, como a interleucina IL-1, fator de necrose tumoral (TNF), interferão (INF)- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL18 e fator estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos. Esta resposta é antagonizada por citocinas anti-inflamatórias, como o IL-4, IL-10, IL-13, INF- $\alpha$  e factor de crescimento transformante. O fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição, regula a expressão de vários genes que codificam citocinas pro-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimentos e enzimas como a COX-2 (Mueller *et al.*, 2010).

### **1.5.2 Inflamação crónica**

A inflamação crónica é caracterizada por uma longa duração, de meses ou anos, causada por infeções persistentes, doenças inflamatórias imuno-mediadas, ou exposição prolongada a

reagentes tóxicos, resultando em destruição severa dos tecidos principalmente por macrófagos mononucleares (Gosslau *et al.*, 2011).

Os macrófagos são as principais células envolvidas neste tipo de inflamação, sendo que possuem um tempo de vida de vários meses a anos. O principal diferenciador entre estes e os monócitos, além do tempo de vida (os monócitos apresentam tempo de semivida igual a um dia), é o modo de passagem do endotélio, mediado por moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) e quimiocinas (proteína quimiotática de monócitos-1 e proteína inflamatória de macrófagos-1) (Gosslau *et al.*, 2011).

### 1.5.2.1 Colite ulcerativa

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória dos intestinos bastante comum, caracterizada por inflamação severa com produção anormal de citocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão e infiltração celular, que levam a apoptose das células epiteliais e danos na mucosa (Impellizzeri *et al.*, 2014). De um modo geral, esta inflamação inicia-se no reto e estende-se proximalmente ao longo do cólon (Ordás *et al.*, 2012). Os principais sintomas desta patologia incluem diarreia, sangramento retal e cólicas abdominais (Ho *et al.*, 2007).

O diagnóstico da colite ulcerativa baseia-se principalmente em sintomas clínicos, com confirmação através de exames endoscópicos e histológicos. Do ponto de vista endoscópico, a inflamação é caracteristicamente confluyente, com aumento da granularidade e aparência hemorrágica. Numa fase inicial, observa-se uma subtil perda de padrões vasculares com hiperemia e edema da mucosa. Com o avançar da inflamação, a mucosa torna-se granular com presença de mucopus e sangramento por contacto. Em casos extremamente avançados, poderá observar-se ulceração profunda. Os principais factores críticos que influenciam o diagnóstico, e subsequente gestão desta patologia, são a extensão e a gravidade da mesma. Histologicamente, a colite ulcerativa é caracterizada pela presença de um processo inflamatório agudo, associado com a destruição de células da mucosa, principalmente células epiteliais, e pela perda de criptas (atrofia) e da sua arquitetura. Neste âmbito, existem duas características fundamentais para o diagnóstico desta patologia: cronicidade e distribuição da doença (Ho *et al.*, 2007).

Segundo Ho *et al.* (2007), estudos em animais e humanos sugerem que factores ambientais apresentam uma maior importância, relativamente a factores genéticos, no desenvolvimento da inflamação intestinal da colite ulcerativa. O fumo de tabaco e a apendicectomia são os dois factores que apresentam efeito protector relativamente a esta condição. O *stress* oxidativo representa também um importante papel na patogénese desta patologia. Embora 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).

#### 1.5.2.1.1 Fisiopatologia

A barreira epitelial, coberta por uma camada mucinosa, representa a primeira linha de defesa do sistema imune mucoso. Na colite ulcerativa, há uma diminuição da síntese e alteração da sulfatação de mucinas, e aumento da permeabilidade devido a danos na barreira epitelial, possivelmente devido a problemas na regulação de junções apertadas. Esta perda de barreira permite o aumento da absorção de antígenos luminiais (Ordás *et al.*, 2012).

Os antígenos activam o sistema imune inato, através de macrófagos e células dendríticas, que fazem o reconhecimento de bactérias comensais e outros antígenos no lúmen, através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (TLR), cujo principal objectivo é providenciar defesas contra patogénicos e protecção contra danos epiteliais, contribuindo assim para a homeostase intestinal e manutenção da barreira epitelial. A activação dos TLR activa respostas imunes adaptativas e inata, com consequente activação do NF- $\kappa$ B e outros fatores de transcrição importantes para a ativação da cascada inflamatória. A activação do NF- $\kappa$ B estimula a transcrição de genes pró-inflamatórios, resultando num aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-12, 23, 6, e 1 $\beta$ ) (Ordás *et al.*, 2012).

Após processamento dos antígenos, os macrófagos e células dendríticas apresentam-nos a células-T CD4 *naive*, promovendo a sua diferenciação em células-T *helper 2 (Th2) effector*, caracterizadas pela produção de IL-4. A colite ulcerativa está associada com uma resposta atípica das células-Th2 mediada por células-T *natural killer*, que produzem IL-13. Esta interleucina tem sido associada à disrupção da barreira celular epitelial, devido às suas propriedades citotóxicas, incluindo indução da apoptose e alteração da composição proteica das junções apertadas. A IL-13 e células-T *natural killer* são importantes na patogénese desta patologia, dado que o bloqueio da interleucina e depleção das células T pode impedir o desenvolvimento de colite (Ordás *et al.*, 2012).

Células T circulantes portadoras de integrina- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 ligam-se a células endoteliais da microvasculatura através da molécula de adesão celular de adressina vascular mucosal-1 (MadCAM-1), cuja expressão é aumentada no intestino inflamado, levando à adesão e extravasamento de células T específicas para os tecidos. A sobre-regulação de quimioquinas inflamatórias, tais CXCL1, CXCL3, e CXCL8, leva ao recrutamento de leucócitos circulantes, perpetuando o ciclo de inflamação.

## 1.6 Enquadramento e objetivos do trabalho

Inúmeros estudos demonstraram a associação entre a típica dieta ocidental, rica em amidos refinados, açúcares, ácidos gordos saturados e gorduras trans, e pobre em fruta, vegetais, fibra e ácidos gordos ómega-3, e uma tendência para desordens relacionadas com situações de *stress* oxidativo, processos inflamatórias e doenças relacionadas, como artrite e doenças cardiovasculares. Por sua vez, uma dieta rica em frutas e vegetais está negativamente correlacionada com inúmeras patologias associadas a estas situações oxidativas e/ou inflamatórias (Rubió *et al.*, 2013). Um dos exemplos deste tipo de alimentação é a Dieta Mediterrânica, caracterizada pelo elevado consumo de alimentos de origem vegetal, nomeadamente pão, massas, arroz, hortaliças, legumes, fruta fresca e frutos oleaginosos; consumo moderado de pescado, aves, laticínios e ovos; consumo de pequenas quantidades de carnes vermelhas; utilização de azeite como principal fonte de gordura; e ingestão moderada de vinho tinto, geralmente durante as refeições. Esta dieta caracteriza-se pelo seu baixo teor em ácidos gordos saturados, elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados, assim como de glúcidos complexos, fibra alimentar e compostos antioxidantes (Fundacion Dieta Mediterránea).

Conforme já anteriormente referido a associação entre danos oxidativos e processos inflamatórios é considerada importante no desenvolvimento de inúmeras situações, como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, tumores e envelhecimento. O uso de plantas e seus derivados é utilizado mundialmente em diversas culturas, desde os tempos primitivos, no tratamento de processos inflamatórios, sendo que a atividade anti-inflamatória de diversos extratos de plantas está cientificamente demonstrada (Mueller *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos, naturalmente presentes nas plantas, apresentam atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória, devido a inúmeros mecanismos, nomeadamente: inibição das enzimas COX-2 e LOX; diminuição das ROS; modulação de vias de sinalização; regulação negativa do NF- $\kappa$ B e da secreção de citocinas pro-inflamatórias (Mueller *et al.*, 2010; Impellizzeri *et al.*, 2014). Uma dieta rica nestes compostos pode, assim, apresentar um impacto benéfico em diversas patologias relacionadas com as situações de *stress* oxidativo e/ou inflamação (Jungbauer & Medjakovic, 2012), pelo que o uso de plantas aromáticas e de especiarias, utilizadas na Dieta Mediterrânica, como fonte de compostos bioativos no combate a estes processos requer interesse (Rubió *et al.*, 2013).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias de extratos de três plantas aromáticas comumente utilizadas na Dieta Mediterrânica: a segurelha, a salsa e os coentros, comparando as atividades exercidas com os respetivos conteúdos em compostos fenólicos. Para atingir este objetivo geral o trabalho foi estruturado nas seguintes etapas:

1. Preparação de extratos das três plantas aromáticas frescas (tal como são consumidas) e sua caracterização quanto ao teor em compostos fenólicos totais e em flavonoides totais;

2. Avaliação das propriedades antioxidantes desses extratos. Não havendo nenhum método padrão validado que possa avaliar todos os possíveis mecanismos de atividade antioxidante, esta foi avaliada através da conjugação de diversos dos métodos existentes, que detetam diferentes *endpoints*: capacidade de redução do cobre; capacidade de redução do ferro e capacidade de sequestro dos radicais anião superóxido e 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH').
3. Avaliação do efeito antimicrobiano contra bactérias gram-negativas e gram-positivas;
4. Avaliação das propriedades anti-inflamatórias *in vivo* no modelo de edema da pata do rato induzido pela carragenina (modelo de inflamação aguda) e no modelo de colite ulcerativa do ratinho induzida pelo ácido sulfônico trinitrobenzeno (modelo de inflamação crónica).

## 2 Materiais e métodos

---

### 2.1 Caracterização dos extratos de plantas aromáticas

Na realização deste trabalho foram analisados extratos de três plantas aromáticas: coentros (*Coriandrum sativum L.*), salsa (*Petroselinum crispum*) e segurelha (*Satureja Hortensis L.*). As amostras utilizadas foram adquiridas comercialmente em supermercados.

### 2.2 Materiais

#### 2.2.1 Ensaio *in-vitro*

##### 2.2.1.1 Reagentes e meios de cultura

Na realização dos ensaios *in-vitro* foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amônio (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%), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99%), ampicilina (Sigma-Aldrich), azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) (Sigma), carbonato de sódio (Panreac, 99%), (+)-catequina monohidratada (Sigma > 96%), 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<sup>•</sup>, fluka), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), meio de cultura Mueller-Hinton Agar (MHA – Becton Dickinson), metilicina (Sigma-Aldrich), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), nitrito de sódio (Merck, 99%), reagente de Folin-Ciocalteu (Merck), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99%), tetraciclina (Sigma-Aldrich), tripiriditriazina (TPTZ) (Fluka, 99%) e vancomicina (Sigma-Aldrich). 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).

#### 2.2.2 Ensaio *in-vivo*

##### 2.2.2.1 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).

#### **2.2.2.2 Reagentes e soluções**

Na realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS); carragenina- $\lambda$  (Sigma-Aldrich); cetamina (Bio2 Produtos Veterinários); cloreto de sódio 0,1% (Merck); etanol a 50% (Merck); formol (Merck); indometacina (Sigma-Aldrich); solução fisiológica estéril (B.Braun); triton X-100; tempol (Sigma-Aldrich); trolox (Sigma-Aldrich); xilazina (Bio2 Produtos Veterinários).

### **2.3 Métodos**

#### **2.3.1 Preparação dos extratos de plantas aromáticas**

As plantas foram lavadas com água corrente e deixadas a secar ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Depois de secas as plantas foram cortadas finamente. A preparação dos extratos baseou-se no procedimento descrito por Maurício (2014). Assim, os extratos de coentros, salsa e segurelha foram preparados adicionando 100 mL de etanol 70% a cada 20 g da planta aromática, sendo as extrações realizadas sob agitação magnética, ao abrigo da luz, durante 24 horas. Findo o 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. De forma a eliminar o etanol presente nos extratos, os mesmos foram evaporados com recurso ao rotavapor (Heidolph LABOROTA 4001) a 40 °C, centrifugados 15 minutos a 4°C, tendo o sobrenadante sido separado em alíquotas de 1 mL e congeladas a -50 °C até utilização nas determinações seguintes.

#### **2.3.2 Determinação da humidade das plantas aromáticas**

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

### 2.3.3 Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu foi originalmente desenvolvido em 1927, a partir de reagentes químicos usados para análises de tirosina, na qual a oxidação de fenóis pelo reagente molibdotungstato origina um produto corado com um máximo de absorção a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre os 745 e os 750 nm. Este é um método simples, sensível e preciso, contudo, ao ser realizado a pH ácido esta reação era lenta e pouco específica (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Singleton e Rossi melhoraram o método com o uso do reagente heteropolianião molibdotungnesteiofosfórico, capaz de reduzir fenóis de um modo mais específico, a um  $\lambda$  máximo de 765 nm, assim como implementaram uma série de passos e condições obrigatórias, de modo a obterem-se resultados fiáveis e previsíveis, minimizando a variabilidade e eliminando resultados erráticos (Singleton *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2005).

O método de Folin-Ciocalteu consiste na redução, a pH alcalino, do heteropolianião molibdotungnesteiofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos (sob a forma de ião fenolato) da amostra. Esta reação origina um produto de coloração azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a sua intensidade proporcional ao teor em compostos fenólicos presentes na amostra. No entanto, este método pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam igualmente reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, como, açúcares, aminas aromáticas ou ácido ascórbico, entre outros (Singleton *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2005).

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar *et al.* (2008). Para execução deste método colocou-se em tubos de ensaio 3 mL de água ultrapura, um determinado volume das amostras ou suas diluições, 250  $\mu$ L de reagente Folin-Ciocalteu, e aguardou-se um minuto à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 750  $\mu$ L de solução de carbonato de sódio 20 % (peso/volume), perfazendo-se o volume a 5 mL com água ultrapura. As amostras foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro. Terminado este tempo foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul. 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.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada de forma igual às amostras, mas substituindo estas por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG).

### **2.3.4 Quantificação dos Flavonoides Totais**

A quantificação dos flavonoides totais foi realizada de acordo com o método descrito por Barros *et al.* (2010), com pequenas adaptações. Assim, em tubos de ensaio colocaram-se 1 mL de água ultrapura, 250 µL de amostra ou suas diluições e 75 µL de solução de nitrito de sódio 5% (peso/volume), aguardando-se 6 minutos. Em seguida adicionaram-se 75 µL de solução de cloreto de alumínio 10% (peso/volume), aguardando-se mais 6 minutos. Por fim, adicionaram-se 1 mL de solução de hidróxido de sódio 4% (peso/volume) 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 (espectrofotômetro SPEKOL 1500) de todas as amostras contra o respectivo branco. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em flavonoides 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 15,6 e os 750 µM, tendo os resultados sido expressos em mmol de equivalentes de catequina.

### **2.3.5 Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas**

#### **2.3.5.1 Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP**

O ensaio FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power) foi originalmente desenvolvido por Benzie e Strain (1996) para determinar a capacidade redutora do plasma, tendo sido posteriormente adaptado para outro tipo de amostras (Prior *et al.*, 2005). Este método consiste na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II). Quando o Fe(III) do complexo de Fe(III)-tripiriditriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) é reduzido a Fe(II) forma-se, em meio ácido, uma intensa coloração azul (Figura 2.1) passível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras presentes na amostra (Benzie & Strain, 1996). O referido ensaio é simples rápido, pouco dispendioso e robusto, podendo ser realizado com o auxílio de métodos manuais, semiautomáticos ou automáticos (Prior *et al.*, 2005).

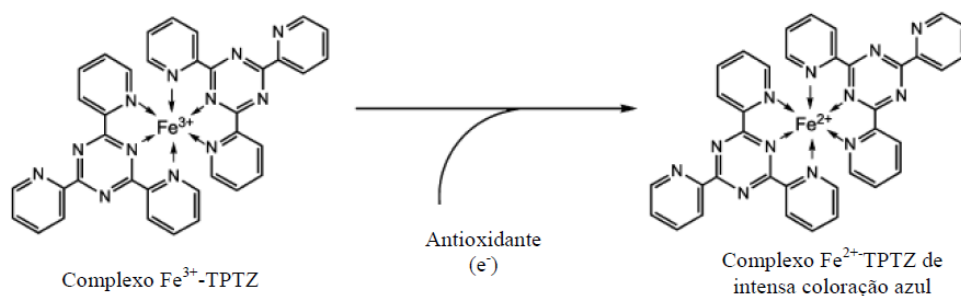


Figura 2.1 - Formação do complexo ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) após redução do  $\text{Fe}^{3+}$  por um antioxidante (adaptado de Prior *et al.*, 2005).

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 adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras ou suas diluições, 300  $\mu\text{L}$  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
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM	2,5 mL

Os tubos foram incubados 4 minutos a 37 °C. Após a incubação foi possível visualizar o aparecimento de uma coloração azul, que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP (Tabela 2.1).

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta 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 mmol de  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 2.3.5.2 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

O método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. A forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um

máximo de absorção a 450 nm. Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Figura 2.2). Este é um método rápido, não necessitando de aparelhos sofisticados, sendo a reação relativamente insensível ao ar, luz, humidade ou pH (Apak *et al.*, 2004).

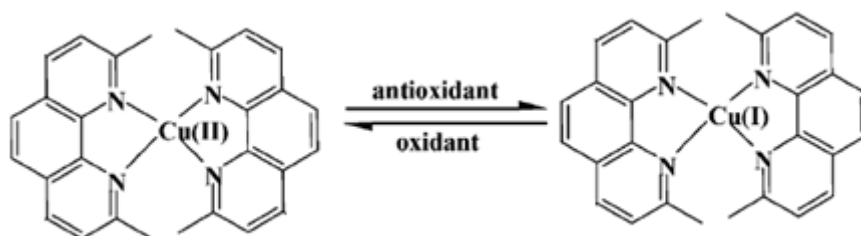


Figura 2.2 – Redução do Cu(II) para Cu(I) por acção de antioxidantes

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak *et al.* (2004) com algumas adaptações. Assim, 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, 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 atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta 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 mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA).

### 2.3.5.3 Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>

O ensaio da capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) foi desenvolvido por Blois em 1958, sendo que, atualmente o DPPH<sup>•</sup> é um dos poucos radicais de azoto orgânico estáveis e disponíveis comercialmente (Prior *et al.*, 2005; Kedare & Singh, 2011). Esta determinação baseia-se na medição da capacidade redutora dos antioxidantes relativamente ao DPPH<sup>•</sup>, sendo que o radical vai desaparecendo, à medida que recebe um átomo de hidrogénio dos antioxidantes, dando lugar à hidrazina correspondente, passando a cor de púrpura para amarelo (Figura 2.3). Desta forma, a atividade antioxidante pode ser determinada através da avaliação da diminuição da absorção do DPPH<sup>•</sup> a 517 nm. A percentagem final de DPPH<sup>•</sup> é proporcional à concentração de antioxidantes (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Kedare & Singh, 2011).

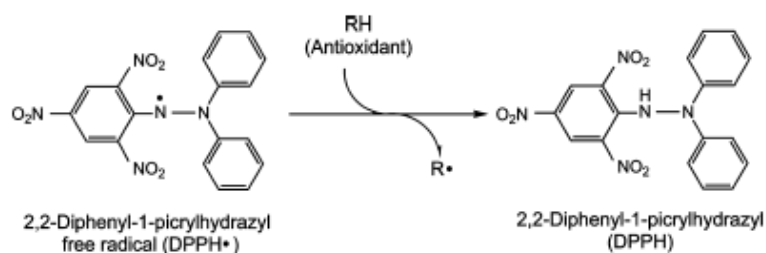


Figura 2.3 – Desativação do DPPH' pelos antioxidantes

Este é um método rápido, simples, pouco dispendioso e amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de alimentos (Kedare & Singh, 2011).

Este ensaio foi efetuado de acordo com o método descrito por Miceli *et al.* (2009) com pequenas adaptações. Assim, 500 µL de diversas diluições dos extratos foram misturados com 3 mL de uma solução de DPPH' (24mg/L em etanol). As misturas foram agitadas no vortex e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente, e no escuro, procedendo-se então à medição da absorvância a 517 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, no espectrofotómetro (SPEKOL 1500).

A percentagem de inibição da redução do DPPH' de cada uma das concentrações das amostras foi calculada utilizando a seguinte expressão:

$$[(Abs_{sem amostra} - Abs_{com amostra} / Abs_{sem amostra})] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical DPPH' das amostras foi expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico, após interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido ascórbico com concentrações entre os 0,0044 e 0,035 mg/mL.

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

O azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) reage com o radical anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) dando origem a um diformazano que possui um máximo de absorção a 560 nm (Figura 2.4). Desta forma se à mistura de reação se adicionar um composto com capacidade para captar o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> passarão a existir no meio reacional dois compostos a competir pelo radical anião superóxido, o que se traduz por uma diminuição da extensão da redução do NBT<sup>2+</sup>, com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Nakamura *et al.*, 1992; Valentão *et al.*, 2001)

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 oxigênio produzindo o radical anião superóxido (Nakamura *et al.*, 1992). Tendo em conta que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigênio 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).

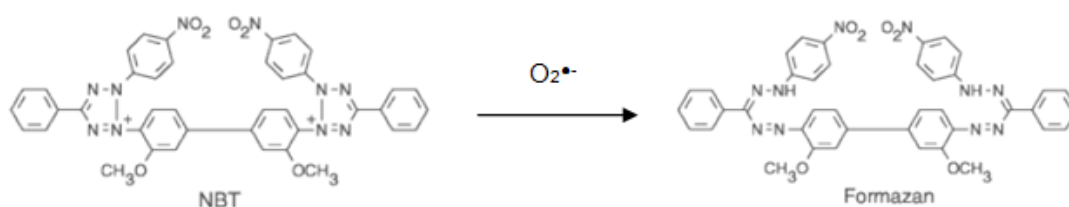


Figura 2.4 – Reação do  $NBT^{2+}$  com o radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) dando origem a um diformazano

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão *et al.* (2001) com pequenas adaptações. Assim, em cuvetes do espectrofotómetro adicionaram-se diferentes volumes de amostras ou suas diluições, de forma a testar diferentes concentrações, e completou-se com água até 200  $\mu$ L. Em seguida adicionaram-se 300  $\mu$ L de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300  $\mu$ L de  $NBT^{2+}$  430  $\mu$ M em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e por fim tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950  $\mu$ L. A reação iniciou-se com a adição de 50  $\mu$ L de PMS 162  $\mu$ M em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, determinado o declive dessa variação. 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:

$$\% \text{Inibição} = \left[ \frac{\text{Declive médio}_{\text{controlo}} - \text{Declive médio}_{\text{amostra}}}{\text{Declive médio}_{\text{controlo}}} \right] \times 100$$

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido das amostras foi expressa em  $\mu$ mol de equivalentes de ácido gálico, após interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 3,9 e os 78,9  $\mu$ M.

### **2.3.6 Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas**

A atividade antimicrobiana foi estudada testando a sensibilidade aos extratos dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) (bactéria gram-positiva); *Escherichia coli* (ATCC8739) (bactéria gram-negativa) e *Candida albicans* (ATCC10231) (levedura). Todas as estirpes foram gentilmente cedidas pela Doutora Elisabete Maurício (Elisa Câmara, Lda)

O procedimento seguido foi baseado no descrito em Maurício (2014). Assim, 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 (MHA) para um tubo contendo 10 mL de meio salino (0,85% NaCl), de modo a obter uma turbidez ótica 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, efetuaram-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 extratos 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.

A par das amostras, foram também determinadas as atividades antimicrobianas de antibióticos conhecidos, de modo servirem como controlos positivos. A suspensão dos microrganismos foi preparada transferindo-se diversas colónias, com crescimento entre 18-24 horas, bem isoladas, do meio MHA para um tubo contendo 10 mL de meio salino (0,85% NaCl), de modo a obter uma turbidez ótica comparável à da solução padrão 0,5 na escala McFarland. A suspensão assim obtida foi 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.

### **2.3.7 Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de segurelha – ensaios *in vivo***

#### **2.3.7.1 Modelo de edema da pata induzido pela carragenina**

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas (Hui, 2006) e a sua administração desencadeia um estímulo quimiotático que culmina na infiltração de neutrófilos e

macrófagos no local da inflamação desencadeando, conseqüentemente, um processo inflamatório local. Os neutrófilos e macrófagos ativados produzem o radical 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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.

Os animais foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em seis grupos, como descrito na tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Caracterização dos grupos em estudo

<b>Grupo</b>	<b>Nº de animais (n)</b>	<b>Administração subplantar</b>	<b>Tratamento oral</b>
SF (controlo negativo)	5	Soro fisiológico	Água desionizada
Carragenina (controlo positivo)	5	Carragenina- $\lambda$	Água desionizada
Segurelha	5	Carragenina- $\lambda$	Extrato de segurelha
Indometacina	5	Carragenina- $\lambda$	Indometacina
Trolox	5	Carragenina- $\lambda$	Trolox
Tempol	5	Carragenina- $\lambda$	Tempol

Numa primeira fase, administrou-se com sonda intra-gástrica extrato de segurelha (15 mg de fenóis/kg de peso corporal), indometacina, trolox, tempol e água desionizada aos respetivos grupos. As patas dos animais foram marcadas e após 30 minutos injetaram-se na planta da pata 100  $\mu$ L de uma solução de 1% de carragenina- $\lambda$  em soro fisiológico, de modo a induzir-se o edema na pata nos grupos carragenina e segurelha. Cada animal foi marcado com tinta (resistente a água) na articulação da pata esquerda ou de ambas, no caso do tamanho das patas ser diferente, ao nível do maléolo (eminência óssea do tornozelo), procedendo-se em seguida à medição do volume das patas. Ao momento da administração da carragenina atribuiu-se o tempo zero (t=0h), procedendo-se imediatamente a medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 3 e 6 horas depois, dando, então, por terminado o ensaio (t=6h).

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% (m/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 é 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. A fórmula utilizada para calcular essa percentagem foi:  $\% = [(V - V_0) / V_0] * 100$ , onde  $V$  corresponde ao volume da pata no final dos ensaios e  $V_0$  o volume da pata inicialmente.

### 2.3.7.2 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 (Morris *et al.*, 1989; Ishiguro *et al.*, 2010; Mateus *et al.*, 2013).

Os animais, ratinhos, foram identificados, pesados e aleatoriamente divididos em quatro grupos, como descrito na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Caracterização dos grupos em estudo

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+segurelha	8	TNBS + EtOH 50%	Extrato de segurelha

A colite foi induzida através do uso de uma baixa dose de ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS), como descrito por Mandalari *et al.* (2011). Após anestesia dos animais por via intraperitoneal, com uma solução de cetamina e xilazina, na proporção 2:1 (20 µL), foi administrado TNBS (100 µL, 50% etanol) por via intracolónica em dose única, através da inserção de um cateter 4,5 cm proximalmente ao ânus. Após este procedimento, os animais foram mantidos na posição de Trendelenburg durante 15 minutos, de modo a evitar refluxo. Durante quatro dias, os animais receberam uma dose de extracto por via oral (15 mg de fenóis/kg de peso corporal).

No quarto dia, os animais foram pesados e anestesiados, retirou-se sangue por punção cardíaca e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O abdómen foi aberto por uma incisão na linha média. O cólon foi removido, liberto dos tecidos adjacentes, aberto ao longo da borda antimesentérica, lavado e pesado. De seguida, 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.

### 2.3.8 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 das plantas aromáticas

Neste trabalho optou-se por realizar os extratos com as plantas tal como são utilizadas na alimentação, ou seja, optou-se pela utilização das plantas frescas. Esta opção prendeu-se com o facto dos processos enzimáticos e químicos que ocorrem durante a secagem poderem levar a oxidações e, outras alterações significativas da composição fitoquímica das plantas em análise (Capecka *et al.*, 2005). Deste modo, a avaliação das plantas aromáticas frescas, ao invés de secas, permite uma determinação mais real da sua aplicabilidade como alimento de elevada qualidade, com benefícios para a saúde humana.

A percentagem de humidade das três plantas em análise encontra-se na tabela 3.1. A segurelha apresentou um teor em humidade estatisticamente inferior quer ao da salsa quer ao dos coentros. Entre a salsa e os coentros não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na percentagem em humidade. As diferenças observadas no teor em humidade resultam de diferenças na constituição das próprias plantas e foram perceptíveis durante a sua manipulação.

Tabela 3.1 – Percentagem de humidade das diferentes amostras

Amostra	Humidade (Percentagem)
Coentros	87,367 <sup>a</sup> ± 0,420
Salsa	84,404 <sup>a</sup> ± 1,310
Segurelha	74,319 <sup>b</sup> ± 1,153

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

#### 3.2 Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos totais dos diversos 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 nas diferentes amostras

Amostra	Compostos fenólicos totais (mg eq. ác.gálico/L)	Compostos fenólicos totais (mg eq. ác.gálico/g peso fresco de planta)	Compostos fenólicos totais (mg eq. ác.gálico/g peso seco de planta)
<b>Coentros</b>	433,817 <sup>b</sup> ± 2,772	0,937 <sup>b</sup> ± 0,006	7,421 <sup>b</sup> ± 0,047
<b>Salsa</b>	353,630 <sup>c</sup> ± 11,334	0,705 <sup>c</sup> ± 0,023	4,520 <sup>c</sup> ± 0,145
<b>Segurelha</b>	3028,131 <sup>a</sup> ± 55,197	6,641 <sup>a</sup> ± 0,121	25,860 <sup>a</sup> ± 0,471

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

Através da análise da tabela 3.2 é possível verificar a existência de uma variação significativa no teor em compostos fenólicos totais entre os diferentes extratos de plantas aromáticas, com os valores a variarem entre os 353,630 e os 3028,131 mg de equivalentes de ácido gálico por litro de extrato. O extrato de salsa foi aquele que apresentou o valor mais baixo, seguido do de coentros, e finalmente, do de segurelha que foi aquele que apresentou o teor mais elevado em compostos fenólicos totais, sendo que todos os valores foram significativamente diferentes (teste t com P<0,05). Quando se analisa o teor em fenóis por grama de peso fresco ou por grama de peso seco de planta utilizada na preparação do extrato, os valores continuam a ser todos estatisticamente diferentes, mantendo-se a mesma ordem, ou seja, a salsa continua a ser a planta que apresentou o valor mais baixo e a segurelha o valor mais elevado. Contudo, quando os valores de compostos fenólicos totais são expressos por grama de peso seco de planta as diferenças são menos acentuadas devido ao menor teor em humidade apresentado pela segurelha. Assim, o teor em fenóis totais da segurelha é cerca de nove vezes superior ao teor em fenóis totais da salsa e cerca de 7 vezes superior ao teor em fenóis totais dos coentros, quando os valores são expressos em mg EAG por peso fresco de planta ou por litro de extrato, sendo cerca de seis vezes superior ao da salsa e três vezes aos dos coentros quando os valores são expressos por grama de peso seco de planta utilizada na preparação do extrato.

Comparando os valores publicados na literatura científica é possível observar a existência de inúmeras diferenças no conteúdo em fenóis da mesma planta aromática. Tal facto poderá dever-se a diferenças na origem da planta, nomeadamente à variedade utilizada, às condições de clima e de solo onde foi produzida, bem como a diferenças no método de extração aplicado e na técnica analítica utilizada. A preparação dos extratos com as plantas frescas ou secas constitui aqui um fator preponderante para a discrepância de resultados. Devido ao elevado grau de humidade das plantas aromáticas, o peso fresco é bastante diferente do peso seco, ou seja, os extratos realizados com as plantas secas são bastante mais concentrados do que aqueles realizados com as plantas frescas, resultando num maior teor de compostos fenólicos.

Num estudo de Ramkissoon *et al.* (2013), também realizado com as plantas frescas os investigadores obtiveram um teor em fenóis totais para extratos hidroalcoólicos (50% em etanol) de coentros aproximado ao obtido neste trabalho (0,443 mg EAG/mL), mas um valor superior para o extrato de salsa (1,583 mg EAG/mL). Por sua vez, Pandey *et al.* (2012) e Kamkar *et al.* (2014), realizaram extratos metanólicos a partir das ervas secas e obtiveram, respetivamente, valores de 38,828 mg EAG/g de extrato seco para os coentros e 96 mg EAG/g de extrato seco para a segurelha. O fato dos extratos terem sido efetuados com as plantas secas e, especialmente, o fato dos valores estarem expressos por peso de extrato seco torna impossível a comparação com os valores obtidos neste trabalho. No entanto, é possível verificar uma concordância entre as concentrações relativas dos extratos das duas plantas. Com efeito, verifica-se que o extrato de segurelha apresenta um teor em fenóis totais aproximadamente três vezes superior ao extrato de coentros, tal como verificado neste trabalho quando se comparam os valores de fenóis totais expressos por grama de peso seco de planta.

### 3.3 Quantificação dos flavonoides totais

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

Tabela 3.3 – Teor em flavonoides totais nas diferentes amostras

Amostra	Flavonoides totais (mmol eq. catequina/L)	Flavonoides totais ( $\mu$ mol eq. catequina/g peso seco de planta)
Coentros	0,462 <sup>b</sup> $\pm$ 0,005	7,898 <sup>b</sup> $\pm$ 0,094
Salsa	0,074 <sup>c</sup> $\pm$ 0,004	0,947 <sup>c</sup> $\pm$ 0,048
Segurelha	9,116 <sup>a</sup> $\pm$ 0,246	77,846 <sup>a</sup> $\pm$ 2,100

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

Através da análise dos resultados é possível verificar uma variação significativa no teor em flavonoides totais entre os extratos das diferentes plantas aromáticas, com os valores a variarem entre os 0,074 e os 9,116 mmol de equivalentes de catequina por litro de extrato, e sendo todos significativamente diferentes (teste t com  $P < 0,05$ ). O extrato de segurelha foi o que apresentou maior teor em flavonoides, seguido do extrato de coentros, com um valor bastante inferior, e finalmente, o de salsa com o menor teor em flavonoides totais. A ordem de valores mantém-se e as diferenças verificadas no teor em flavonoides totais continuam a ser significativas quando os resultados são expressos em  $\mu$ mol eq. catequina/g peso seco de planta (tabela 3.3). Neste caso o extrato de segurelha apresentou um teor em flavonoides totais

cerca de dez vezes superior ao do extrato de coentros. Noutro estudo, Kim *et al.* (2011) obtiveram também um valor de flavonoides para a segurelha (35,19 µg equivalentes de quercetina/g de extrato seco) cerca de dez vezes superior ao dos coentros (3,38 µg equivalentes de quercetina/g de extrato seco), o que vai ao encontro dos resultados obtidos neste ensaio. Assim, apesar de no trabalho de Kim *et al.*, (2011) os extratos terem sido preparados com as plantas secas e por extração em água quente e dos valores de flavonoides se encontrarem expressos em unidades diferentes, mais uma vez foi possível verificar uma concordância com as concentrações relativas dos flavonoides totais nas amostras de segurelha e de coentros determinadas neste trabalho quando se comparam os valores expressos por grama de peso seco de planta.

Para averiguar qual o peso dos flavonoides no teor em fenóis totais efetuou-se a razão entre o teor em flavonoides, expresso em µmol eq. catequina/L, e o teor em fenóis totais, expresso em mg EAG/L, dos diversos extratos (tabela 3.4). Os resultados mostraram que a segurelha é a amostra em que os flavonoides têm um maior peso nos fenóis totais e a salsa aquela em que têm um menor peso. Os flavonoides, como um dos grupos mais diversos e difundidos de compostos naturais são, provavelmente, dos fenólicos mais importantes. Estes compostos possuem diversas atividades químicas e biológicas como propriedades de eliminação de radicais (Foti *et al.*, 1996; Miliauskas *et al.*, 2004).

Tabela 3.4 – Peso dos flavonoides no teor em fenóis totais

<b>Amostra</b>	<b>Razão flavonoides/fenóis totais (µmol eq. catequina/mg EAG)</b>
<b>Coentros</b>	1,064 <sup>b</sup> ± 0,013
<b>Salsa</b>	0,210 <sup>c</sup> ± 0,011
<b>Segurelha</b>	3,010 <sup>a</sup> ± 0,081

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

### **3.4 Determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas**

A caracterização da atividade antioxidante dos diferentes extratos de plantas aromáticas em estudo foi realizada através da avaliação da sua capacidade redutora, com os ensaios FRAP e CUPRAC, bem como da sua capacidade de sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> e anião superóxido.

#### **3.4.1 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), expressa em µmol de Fe<sup>2+</sup> por mL

de extrato, foi realizada através do ensaio FRAP, encontrando-se os resultados na tabela 3.5. A análise desta tabela (tabela 3.5) permite verificar que as amostras apresentaram valores de FRAP significativamente diferentes (teste t com  $P < 0,05$ ), variando entre os 1,645 e os 39,055  $\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{mL}$ , sendo o menor valor pertencente ao extrato de salsa e o maior ao extrato de segurelha. Esta ordem de valores continua a manter-se mesmo depois de se eliminar a interferência da humidade, ou seja, quando se expressam os valores por peso seco de planta.

Tabela 3.5 – Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio FRAP

<b>Amostra</b>	<b>Valor de FRAP (<math>\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Valor de FRAP (<math>\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{g peso seco de planta}</math>)</b>
<b>Coentros</b>	2,229 <sup>b</sup> ± 0,070	38,134 <sup>b</sup> ± 1,900
<b>Salsa</b>	1,645 <sup>c</sup> ± 0,029	21,022 <sup>c</sup> ± 0,376
<b>Segurelha</b>	39,055 <sup>a</sup> ± 2,240	333,519 <sup>a</sup> ± 19,131

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

Num estudo realizado por Hinneburg *et al.* (2006), em que se comparou a atividade FRAP de hidrodestilados de salsa, manjeriço, anis, louro, zimbro, erva-doce, cominhos e gengibre, a salsa foi de todas estas plantas aromáticas a que apresentou a menor capacidade de redução do ferro, o que vai ao encontro dos valores determinados no presente estudo.

Procedendo-se à comparação entre os valores obtidos para o teor em fenóis totais (tabela 3.2), o teor em flavonoides totais (tabela 3.4) e os valores do ensaio FRAP (tabela 3.5) é possível verificar-se que se mantém sempre a mesma ordem, ou seja, os valores mais baixos foram sempre obtidos com a salsa e os valores mais elevados com a segurelha. É assim possível estabelecer uma certa correlação positiva entre o teor em fenóis totais e/ou o teor em flavonoides e a capacidade de redução do ferro medida pelo ensaio FRAP. Esta correlação não é surpreendente uma vez que a redução de Fe (III) é utilizada como um indicador de atividade de doação de eletrões (atividade redutora), que se sabe representar um importante mecanismo de ação antioxidante dos compostos fenólicos (Hinneburg *et al.*, 2006; Shahidi & Zhong, 2015).

### 3.4.2 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

A determinação da atividade de redução do Cu(II) das três plantas em estudo foi avaliada através do ensaio CUPRAC encontrando-se os valores obtidos na tabela 3.6. Os valores de CUPRAC obtidos com todas as amostras foram significativamente diferentes (teste t com  $P < 0,05$ ). Os valores variaram entre 3,461 e 39,888 mmol eq. ác. ascórbico/L de extrato, sendo o menor valor pertencente ao extrato de salsa e o maior ao extrato de segurelha. Tal como

verificado no ensaio FRAP, também no ensaio CUPRAC esta ordem de valores continuou a manter-se mesmo depois de se eliminar a interferência da humidade, ou seja, quando se expressaram os valores por peso seco de planta.

Tabela 3.6 – Valores obtidos com as diferentes amostras no ensaio CUPRAC

<b>Planta</b>	<b>Valor de CUPRAC (mmol eq. ác. ascórbico/L)</b>	<b>Valor de CUPRAC (<math>\mu</math>mol eq. ác. ascórbico/ g peso seco de planta)</b>
<b>Coentros</b>	3,461 <sup>b</sup> $\pm$ 0,058	59,203 <sup>b</sup> $\pm$ 0,392
<b>Salsa</b>	1,961 <sup>c</sup> $\pm$ 2,621	25,066 <sup>c</sup> $\pm$ 0,737
<b>Segurelha</b>	39,888 <sup>a</sup> $\pm$ 0,331	340,625 <sup>a</sup> $\pm$ 2,824

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

Comparando os valores obtidos no ensaio CUPRAC com os obtidos no ensaio FRAP (tabelas 3.5 e 3.6) é possível observar-se uma concordância entre os mesmos, ou seja, os valores do ensaio CUPRAC mantêm a mesma ordem verificada no ensaio FRAP: salsa < coentros < segurelha. A concordância de resultados demonstrada poderá ser um indicador de que os compostos responsáveis pelas atividades FRAP e CUPRAC sejam maioritariamente os mesmos. Esta concordância não é surpreendente visto que ambos os ensaios determinam a actividade antioxidante das amostras através da sua capacidade redutora.

### 3.4.3 Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH'

Os valores da determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH' são apresentados na tabela 3.7. De acordo com o teste t (P<0,05), todas as amostras diferiram de forma significativa. Os resultados para a capacidade de sequestro do DPPH' variam entre 0,112 e 3,055 mg equivalentes de ácido gálico por litro de extrato, para a salsa e segurelha, respetivamente. Tal como verificado nos ensaios anteriores, também no ensaio do DPPH os valores voltaram a apresentar a mesma ordem crescente quando se expressaram os valores por peso seco de planta.

Tabela 3.7 – Valores obtidos com as diferentes amostras na determinação da capacidade de sequestro do DPPH'

<b>Amostra</b>	<b>Valor de DPPH (mg eq. ác. ascórbico/L)</b>	<b>Valor de DPPH (µg eq. ác. ascórbico/g planta seca)</b>
<b>Coentros</b>	0,243 <sup>b</sup> ± 0,004	4,158 <sup>b</sup> ± 0,070
<b>Salsa</b>	0,112 <sup>c</sup> ± 0,003	1,434 <sup>c</sup> ± 0,040
<b>Segurelha</b>	3,055 <sup>a</sup> ± 0,045	26,090 <sup>a</sup> ± 0,380

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

Num estudo de Kim *et al.* (2011), os investigadores obtiveram um valor de DPPH' para extratos aquosos preparados com segurelha seca superiores ao valor obtido para extratos idênticos preparados a partir de coentros, o que vai ao encontro dos resultados obtidos neste estudo.

Através da comparação dos valores obtidos nos ensaios DPPH', FRAP e CUPRAC (tabelas 3.5 a 3.7) continua a observar-se uma concordância entre os mesmos, ou seja, os valores do ensaio DPPH' mantêm a mesma ordem verificada nos ensaios anteriores, com a salsa a exibir o valor mais baixo, e a segurelha a apresentar o valor mais elevado. A continuação desta concordância entre os resultados demonstrados continua a ser um indicador de que os compostos responsáveis pelas atividades FRAP, CUPRAC e DPPH' sejam maioritariamente os mesmos. Uma vez que esta concordância também se verifica em relação ao teor em compostos fenólicos totais e em flavonoides totais, os resultados sugerem um forte envolvimento dos compostos fenólicos, em particular dos flavonoides, na atividade antioxidante exercida pelos extratos destas plantas.

#### **3.4.4 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 oxidação do NBT com a concomitante formação de formazano. A determinação desta atividade apresenta grande relevância fisiológica, dado que a formação desta espécie radicalar ocorre *in vivo*. Os resultados obtidos no ensaio de sequestro do radical anião superóxido encontram-se na tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Valores obtidos com as diferentes amostras na determinação da capacidade de sequestro do superóxido

Planta	Sequestro do superóxido	
	(mg EAG/L)	( $\mu$ g EAG/g planta seca)
Coentros	4,453 <sup>b</sup> $\pm$ 1,316	76,167 <sup>b</sup> $\pm$ 22,509
Salsa	5,972 <sup>b</sup> $\pm$ 1,316	76,339 <sup>b</sup> $\pm$ 16,828
Segurelha	39,093 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000	333,843 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000

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

Através da análise da tabela 3.8 pode observar-se que os valores variaram entre 4,453 e 39,093 mg EAG/L de extrato, sendo o menor valor correspondente aos coentros e o maior à segurelha. Contudo, os extratos de coentros e salsa não apresentaram diferenças significativas entre si (teste t com  $P > 0,05$ ), enquanto a segurelha apresentou diferenças significativas relativamente a estes dois (teste t com  $P < 0,05$ ). A mesma sequência de resultados se continua a observar depois de eliminar a interferência da humidade da amostra (valores expressos por peso de planta seca). Assim, pode concluir-se que todas as amostras apresentam capacidade de sequestrar o radical anião superóxido, ou seja, as amostras possuem compostos antioxidantes, capazes de captar o radical anião superóxido gerado pelo sistema NADH/PMS, causando, deste modo, uma diminuição da extensão de redução da NBT<sup>2+</sup>, com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm, sendo a segurelha aquela que se destaca pela positiva.

### 3.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de plantas aromáticas

A atividade antimicrobiana das amostras foi determinada através do método de difusão em placa, pela da medição dos halos de inibição, em milímetros, que surgiram à volta da zona onde foi colocada a amostra (tabela 3.9 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.

Tabela 3.9 – Diâmetro dos halos de inibição das diferentes amostras na determinação da atividade antimicrobiana

Amostra	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Coentros	< 6	< 6	< 6
Salsa	< 6	< 6	< 6
Segurelha	11 $\pm$ 0,6	< 6	< 6

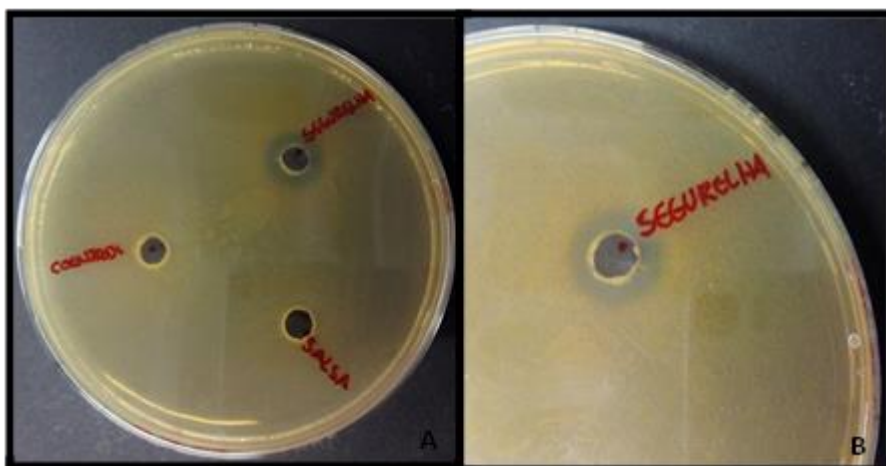


Figura 3.1 – A - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana dos coentros, salsa e segurelha com o *S. aureus*; B – Halo de inibição da segurelha.

Através da análise da tabela 3.9 bem como da figura 3.1 é possível observar-se que os extratos de coentros e salsa não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhum dos microrganismos estudados, dado que não se verificaram halos de inibição. Por sua vez, embora a segurelha não tenha também apresentado a referida atividade para dois dos microrganismos, *E. coli* e *C. albicans*, verificaram-se halos de inibição de 11 mm com a bactéria *S. aureus* (figura 3.1).

Segundo estudos anteriores, os extratos e óleos essenciais de segurelha apresentam uma significativa ação antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos (Kotana *et al.*, 2013). As propriedades antimicrobianas da *Satureja hortensis* não se encontram amplamente estudadas, no entanto, Sahin *et al.* (2003) demonstram a sensibilidade de *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Kocuria varians* e *Micrococcus luteus* a extratos desta erva. A diferença de resultados poderá residir no método de extração, uma vez que Sahin *et al.* (2003) utilizaram a planta seca e realizaram uma extração sequencial primeiro com hexano e depois com metanol. Desta forma podem ter sido extraídos compostos com diferente estrutura química e, igualmente, com diferente atividade biológica.

Relativamente aos coentros, existem também alguns estudos a indicar a sua capacidade antimicrobiana. Num estudo de Srinivasan *et al.* (2001) os investigadores não obtiveram inibição da *E. coli* e do *S. aureus*, o que está de acordo com os dados obtidos nesta investigação. No entanto, a *C. albicans* apresentou sensibilidade relativamente aos extratos desta planta aromática, ao contrário dos resultados obtidos nesta investigação.

Comparando os resultados obtidos neste ensaio com os valores obtidos para o teor de fenóis totais, pode observar-se que existe uma correlação entre os mesmos. Assim, as plantas aromáticas com um menor teor em fenóis totais, a salsa e coentros, não apresentaram ação antimicrobiana, enquanto a segurelha, que apresentou um maior teor neste compostos,

apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Estudos anteriores também encontraram correlações elevadas entre a atividade antimicrobiana e o teor em fenóis totais e a capacidade antioxidante. Num estudo, Shan *et al.* (2007) investigaram um total de 46 extratos de ervas e especiarias, demonstrando uma boa relação linear entre a atividade antimicrobiana e o teor em compostos fenólicos, enfatizando a importância destes compostos e das suas propriedades antioxidantes na referida actividade. Dentro dos compostos fenólicos, os taninos e os flavonóides, parecem ser importantes substâncias antimicrobianas (Shan *et al.*, 2007).

O modo de acção dos agentes antimicrobianos depende não só da sua composição, mas também do tipo de microrganismo, sendo principalmente relacionado com a estrutura da sua parede celular e da sua membrana externa. De um modo geral, as bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, são menos sensíveis a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus*, uma vez que as primeiras possuem uma membrana externa lipopolissacarídica, que constitui uma barreira contra a penetração de inúmeras moléculas antimicrobianas. Contudo, tal não significa que as bactérias Gram-positivas sejam sempre mais suscetíveis (Ceylan & Fung, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010).

Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos que podem apresentar-se isolados, em pares, tétradas ou em cachos. A espécie mais virulenta desta família é o *Staphylococcus aureus*, cujo reservatório natural nos humanos são as narinas dos adultos e pele incluindo as axilas e o períneo (Pádua, 2008). Estima-se que 20-50% da população apresente *S. aureus* nas suas fossas nasais, sendo que grande parte destes são enterotoxigénicos, sendo comum que grande parte das doenças alimentares se deva à contaminação dos alimentos por operadores contaminados com esta bactéria (Gustafson, 2015). A intoxicação alimentar por *S. aureus* é caracterizada por diversos sintomas, como vómitos, dor abdominal e de estômago, podendo levar a hospitalização em casos mais severos, nomeadamente em grupos de risco, como crianças, idosos e grávidas, sendo que a suscetibilidade individual às enterotoxinas, assim como a concentração ingerida destas, irão influenciar a severidade dos sintomas (Fetsch *et al.*, 2014). Além da sua importância no desenvolvimento de intoxicações alimentares, o *S. aureus* é também uma das principais causas de infeções nosocomiais e de infeções adquiridas na comunidade, estando associado, tal como as suas enterotoxinas, em patologias como dermatite atópica, polipose nasal e outras desordens mediadas pelo sistema imune (Gustafson, 2015). O sucesso do *S. aureus* como patogénico depende de diversos fatores, principalmente a sua capacidade de persistir como comensal, a sua frequente resistência e múltiplos agentes antimicrobianos e os seus determinantes de virulência (Uhlemann *et al.*, 2014).

### 3.6 Determinação da ação anti-inflamatória do extrato de segurelha

#### 3.6.1 Modelo de edema da pata induzido pela carragenina

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

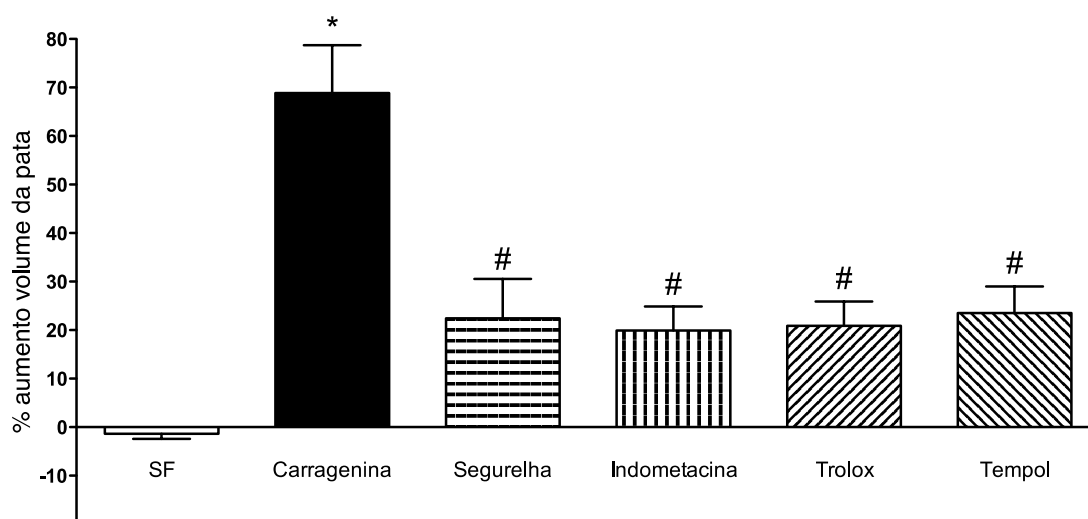


Figura 3.2 – Efeito da administração oral do extrato de segurelha e de outros fármacos comerciais no aumento do volume da pata 6 horas após a administração da carragenina (\*  $P < 0,001$  vs soro fisiológico (SF); #  $P < 0,001$  vs carragenina)

Pela observação da figura 3.2 verifica-se que, tal como esperado, a administração da carragenina provocou um aumento estatisticamente 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. Na mesma figura pode também observar-se que o extrato de segurelha reduziu a percentagem de aumento do volume da pata em cerca de 50%, quando comparando com o grupo controlo positivo (carragenina). Tal facto sugere que o extrato de segurelha teve uma ação anti-inflamatória com conseqüente redução do edema da pata, o que poderá estar relacionado com o seu teor em compostos antioxidantes dado que esta foi, entre as plantas aromáticas estudadas, a que apresentou um maior teor nestes compostos.

Concomitantemente ao extrato em estudo, a figura 3.2 apresenta também resultados de três fármacos anti-inflamatórios comerciais (indometacina, trolox e tempol), analisados de igual modo, de modo a poder proceder-se à sua comparação. A indometacina, um anti-inflamatório não-esteróide não seletivo para as ciclooxigenases apresentou uma percentagem de aumento do volume da pata de cerca de 18%, bastante semelhante ao resultado obtido para o trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. O tempol, um mimético da SOD de baixo peso molecular, apresentou uma percentagem de aumento do volume da pata ligeiramente superior, de cerca

de 20%.

Comparando o efeito anti-inflamatório exercido pelo extrato de segurelha com os restantes fármacos, é possível verificar que este é bastante semelhante ao tempol e ao trolox, dado que apresentaram uma percentagem semelhante, demonstrando assim que o extrato em estudo possui uma ação anti-inflamatória significativa. Esta ação poderá, eventualmente, dever-se às suas propriedades antioxidantes pois este é um dos mecanismos que podem ser responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias.

### 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 3.10).

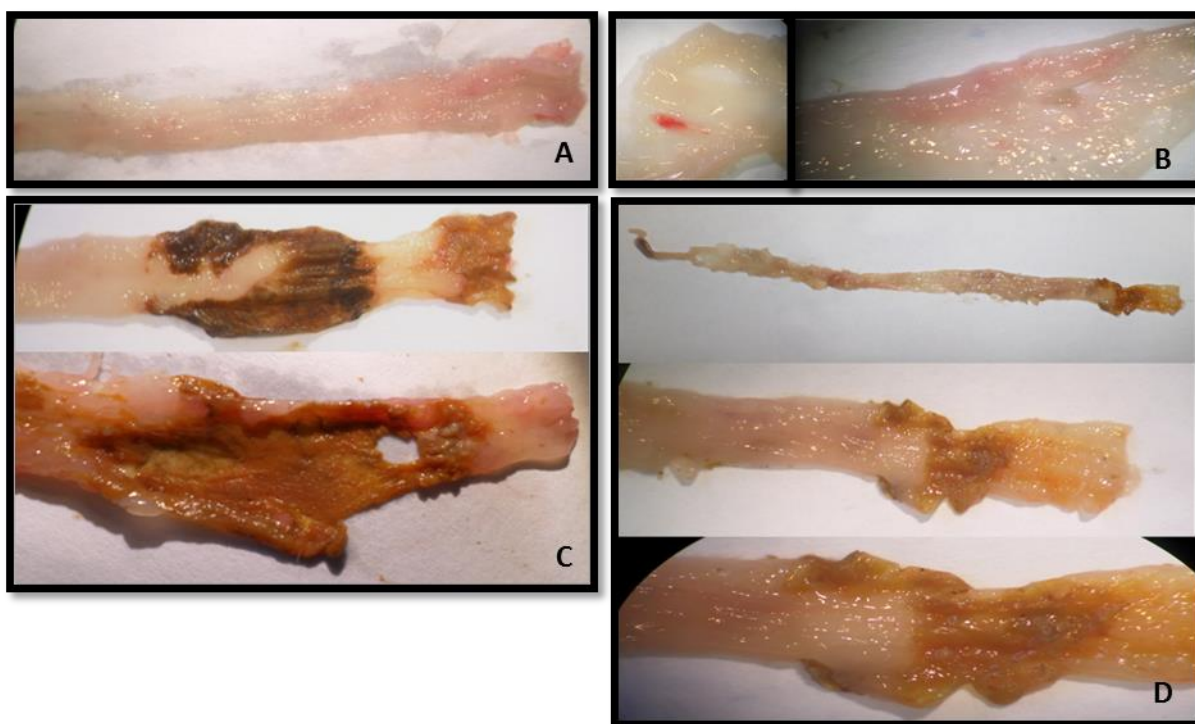


Figura 3.3 – Observações a microscópio cirúrgico do cólon aberto transversalmente (A: Grupo Sham; B: Grupo Etanol; C: Grupo TNBS + Etanol; D: Grupo TNBS + Segurelha).

Tabela 3.10 – 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%).

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho do intestino (cm)</b>	<b>Tamanho da lesão (cm)</b>	<b>Consistência das fezes</b>
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 + Segurelha	14,3 ± 0,09 *	0,5 ± 0,14 *	0,25 *

Através da observação da figura 3.3 é visível que não existem alterações histológicas no grupo Sham, dado que este apresenta uma cor rosada, quase translúcida, tal como esperado, uma vez que este é o controlo negativo. O grupo etanol, à semelhança do grupo Sham, apresenta uma cor normal, sendo que pode observar-se um pequeno derrame. Tal facto confirma-nos que, apesar do etanol potenciar a ação do TNBS, as lesões ulcerativas são maioritariamente causadas por este último composto. A observação do cólon do grupo TNBS+Etanol demonstra que a administração de TNBS+Etanol 50% provocou inflamação dos tecidos, com necrose dos mesmos e lesões ulcerativas. Finalmente, o grupo TNBS+Segurelha apresentou uma visível melhoria relativamente ao grupo TNBS+Etanol, com diminuição significativa da extensão e severidade das alterações morfológicas observadas.

A análise da tabela 3.10 confirma as alterações morfológicas do cólon dos ratinhos do grupo TNBS+Etanol, dado que foram observadas diferenças significativas (P<0,05) entre este e o grupo Sham, nomeadamente lesões de 3,6 ± 0,14 cm e uma diminuição do tamanho do intestino de 14,5 ± 0,082 cm para 11,8 ± 0,19 cm. Na figura 3.4 é possível visualizar-se as diferenças entre o tamanho do intestino dos diferentes grupos. Observando os resultados obtidos para o grupo TNBS+Segurelha, é visível que existem diferenças significativas entre este e o grupo TNBS+Etanol (P<0,05), com uma diminuição do tamanho das lesões para 0,5 ± 0,14 cm, assim como uma menor diminuição do tamanho do intestino, que é semelhante aos grupos Sham e Etanol (14,3 ± 0,09 cm).

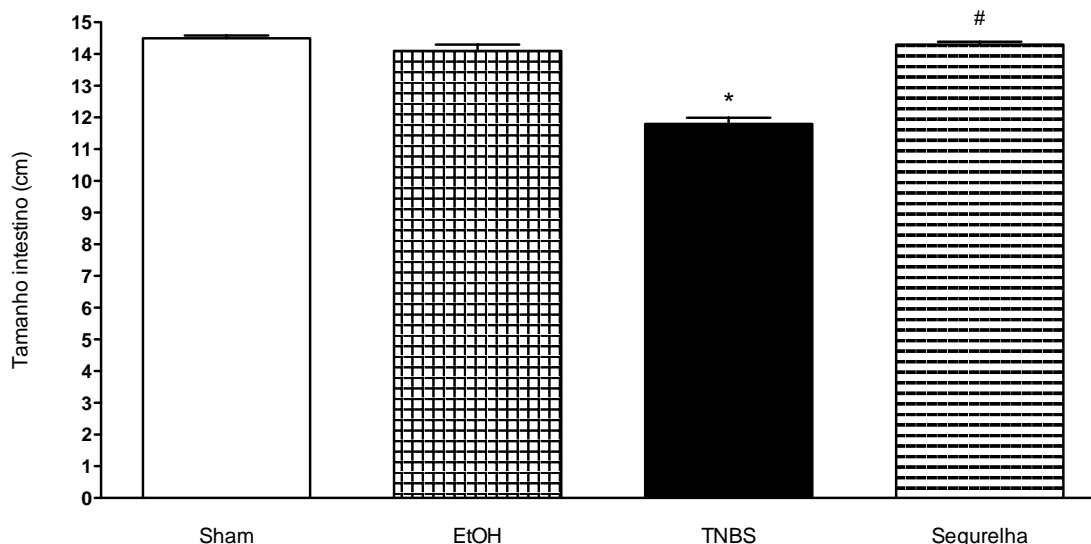


Figura 3.4 – Efeito da administração de extrato de segurelha no tamanho do intestino dos ratinhos relativamente aos restantes grupos (\* $P < 0,001$  vs Sham; # $P < 0,001$  vs TNBS).

Além das alterações morfológicas, foram também observadas alterações funcionais, nomeadamente a consistência das fezes dos ratinhos, que foi classificada com o *score* apresentado na tabela 3.11. Desta forma, através da análise da tabela 3.10, 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+Segurelha observaram-se fezes com uma consistência entre o normal e o ligeiramente mucoso (0,25), com diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao grupo TNBS+Etanol.

Tabela 3.11 – Classificação da gravidade da diarreia

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

A análise dos resultados obtidos parece indicar que o extrato de segurelha apresenta ação anti-inflamatória, uma vez que diminui os efeitos nefastos provocados pela administração do TNBS. Tal como referido no subcapítulo 3.6.1 esta ação poderá dever-se às propriedades antioxidantes do extrato. A mucosa intestinal é bastante vulnerável ao *stress* oxidativo resultante da exposição constante a ROS, sendo que os danos causados por estas representam um importante papel no desenvolvimento de doenças inflamatórias do intestino, como a colite ulcerativa. Neste sentido, existem evidências epidemiológicas e experimentais de que os polifenóis provenientes da dieta, nomeadamente os flavonoides, podem ser

considerados como um importante recurso na intervenção de desordens inflamatórias como as referidas acima (Mandalari *et al.*, 2011; Impellizzeri *et al.*, 2014).

O efeito anti-inflamatório observado com o extrato de segurelha pode ser muito útil do ponto de vista de profilaxia pois o extrato foi administrado aos animais logo a seguir à indução da colite e os resultados demonstram haver uma diminuição significativa da extensão e violência dos sinais da inflamação crônica observados no grupo controle positivo.

### 3.7 Análise global dos resultados

De modo a proceder-se a uma análise dos resultados obtidos neste estudo de um modo global, realizaram-se várias correlações lineares, de modo a sugerir relações entre a composição em compostos fenólicos e flavonoides das amostras estudadas e as suas respetivas atividades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias.

O coeficiente de correlação linear é uma medida do grau de associação linear entre variáveis, podendo tomar valores entre -1 e 1, sendo que este último significa uma relação linear perfeita e positiva (Reis, 2002). Assim, quanto mais próximo de 1 for o coeficiente de Pearson, mais perfeita a correlação entre as variáveis.

Na tabela 3.12 podem observar-se os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis e em flavonoides das amostras em estudo. O valor obtido ( $r=0,999933096$ ) indica a existência de uma correlação fortemente positiva entre ambos os parâmetros, sendo que os resultados obtidos nos ensaios apontavam nesse sentido, uma vez que as plantas com maior teor de fenóis também possuíam o maior nível de flavonoides.

Tabela 3.12 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre a composição em fenóis totais e em flavonoides das amostras estudadas

	Fenóis <sup>a</sup>	Flavonoides
Fenóis <sup>a</sup>	1	
Flavonoides	0,999933096	1

a) mg eq. ác. gálico/L de extrato; b) mol eq. catequina/L de extrato

A tabela 3.13 apresenta os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre o teor em fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante determinada pelos vários ensaios realizados para as amostras em estudo.

Tabela 3.13 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição química e atividade antioxidante das várias amostras

	Fenóis <sup>a</sup>	Flavonoides	FRAP <sup>c</sup>	CUPRAC <sup>d</sup>	DPPH <sup>e</sup>	Superóxido <sup>f</sup>
Fenóis <sup>a</sup>	1					
Flavonoides	0,999933096	1				
FRAP <sup>c</sup>	0,99991916	0,999705182	1			
CUPRAC <sup>d</sup>	0,999963245	0,999995518	0,999773394	1		
DPPH <sup>e</sup>	0,999915163	0,999998937	0,999668709	0,999990089	1	
Superóxido <sup>f</sup>	0,997876934	0,997056814	0,998624369	0,997281872	0,996943948	1

a) mg eq. ác.gálico/L; b) mg eq. catequina/L; c) µmol de Fe<sup>2+</sup>/mL; d) mmol eq. ác. ascórbico/L; e) mg eq. ác. ascórbico/L; f) mg eq. ác. gálico/L

Através da análise da tabela 3.13 é possível observar-se a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor em fenóis totais e a atividade antioxidante determinada em todos os ensaios realizados. De facto, os extratos com maior teor de fenóis totais apresentaram maiores valores em todos os ensaios antioxidantes, indicando assim que os polifenóis contribuem significativamente para a atividade antioxidante, tendo esta correlação positiva, entre o teor em fenóis totais e os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes, sido descrita noutros estudos (Zheng & Wang, 2001).

A correlação entre os flavonoides totais e as atividades antioxidantes estudadas foi, igualmente, fortemente positiva, podendo este facto indicar que, entre os inúmeros compostos fenólicos existentes nas amostras, os flavonoides sejam maioritariamente responsáveis pela atividade antioxidante detetada nos ensaios realizados. Capecka *et al.* (2005) refere que os ácidos fenólicos e os flavonóides são os principais responsáveis pela actividade antioxidante.

Pode ainda observar-se a existência de uma correlação fortemente positiva entre todos os ensaios antioxidantes, FRAP, CUPRAC, DPPH e sequestro do radical anião superóxido, o que pode sugerir o envolvimento, pelo menos parcial, dos mesmos compostos nos diferentes ensaios.

A análise de correlações foi realizada no sentido de sugerir possíveis associações entre os compostos (fenóis totais e flavonoides) e as atividades antioxidantes detetadas nos extratos. No entanto, esta análise baseia-se somente em ferramentas estatísticas, apresentando várias limitações. Assim, há que ter em conta que os extratos, ao serem misturas complexas, podem exibir atividades antioxidantes derivadas de diferentes compostos que pertençam ao mesmo grupo, bem como, podem existir compostos com atividades antagónicas, como por exemplo, a coexistência de compostos pró e antioxidantes, ou ainda a ocorrência de fenómenos de sinergia e/ou potenciação entre os vários compostos com conseqüente alteração dos resultados.

Procedendo-se à comparação dos resultados obtidos nesta correlação com a atividade antimicrobiana, pode constatar-se que se mantém uma correlação positiva entre o teor de

fenóis totais e de flavonoides e a referida atividade, uma vez que a segurelha, ao ser o extrato com o maior teor nestes compostos, foi também aquela que apresentou propriedades antimicrobianas.

Relativamente à ação anti-inflamatória, esta apenas foi estudada no extrato de segurelha. Em ambos os modelos, tanto da inflamação aguda como de inflamação crónica foi observada atividade anti-inflamatória. É de realçar o efeito obtido no modelo de colite que é um modelo muito agressivo e em que os sinais de inflamação foram minimizados pelo extrato de segurelha.

O efeito anti-inflamatório pode, eventualmente, ser justificado através de um mecanismo antioxidante já que determinámos a riqueza deste extrato em polifenóis, e também demonstramos a sua capacidade antioxidante.

## 4 Conclusão

---

Este estudo incidiu sob três ervas aromáticas utilizadas comumente em Portugal: coentros, salsa e segurelha. O objetivo do mesmo foi avaliar o teor em compostos fenólicos totais e em flavonoides, uma vez que estes têm sido indicados como alguns dos principais responsáveis pelas propriedades benéficas das ervas aromáticas, bem como avaliar as propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, contribuindo assim para um maior conhecimento das propriedades benéficas das plantas estudadas.

Os resultados demonstraram de todos os extratos de plantas aromáticas possuem atividade antioxidante, sendo que o extrato de segurelha foi aquele que apresentou um maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, bem como demonstrou possuir uma maior atividade antioxidante relativamente aos restantes extratos estudados, o que sugere o envolvimento destes compostos neste tipo de atividade antioxidante (capacidade redutora e sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> e anião superóxido). Entre o extracto de coentros e salsa, o extracto de coentros apresentou um teor em compostos fenólicos e uma actividade antioxidante significativamente superior relativamente ao extracto de salsa. O extrato de segurelha foi o único que apresentou ação antimicrobiana, o que poderá indicar que os compostos fenólicos se encontram também interligados com esta propriedade. A atividade anti-inflamatória foi determinada apenas para o extrato de segurelha, sendo que se observou que este possui efeitos benéficos para a inflamação aguda e crónica, o que poderá estar novamente relacionado com o seu teor em fenóis e flavonoides.

O efeito anti-inflamatório observado com o extrato de segurelha pode ser muito útil do ponto de vista de profilaxia pois o extrato foi administrado aos animais logo a seguir à indução da colite e os resultados demonstram haver uma diminuição significativa da extensão e violência dos sinais da inflamação crónica observados no grupo controlo positivo.

De modo a completar este estudo e estabelecer associações entre as atividades estudadas e os compostos que as originam com um maior rigor, seria fulcral realizar uma análise química detalhada dos extratos de ervas aromáticas estudadas, nomeadamente a determinação do seu perfil fenólico.

Embora os compostos fenólicos sejam bastantes comuns na dieta humana, nem todos são muito ativos no organismo, quer por baixa atividade intrínseca quer por fraca absorção no intestino, elevada metabolização ou rápida eliminação. As suas propriedades biológicas irão então depender tanto da quantidade ingerida como da sua biodisponibilidade (Scalbert & Williamson, 2000; Manach *et al.*, 2004).

Segundo um estudo de Manach *et al.* (2005) os polifenóis melhor absorvidos pelo Homem são o ácido gálico e as isoflavonas, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, sendo as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas os

polifenóis de mais difícil absorção. Há que ter ainda em conta a metabolização destes compostos pela flora intestinal, dado que apesar de não estar amplamente estudada, pode interferir nas suas actividades biológicas. Tal deve-se à possível metabolização dos polifenóis pelos microrganismos, quando não forem absorvidos no trato gastrointestinal, originando metabolitos passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e alcançar a corrente sanguínea. Segundo Williamson & Manach (2005) a proantocianidinas são um exemplo deste fenómeno, dado que demonstram alguns efeitos benéficos apesar da sua reduzida absorção intestinal, o que sugere que as actividades biológicas poderão resultar de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pela flora intestinal. Assim, seria de todo o interesse analisar aprofundadamente a biodisponibilidade dos compostos bioativos dos extratos estudados, avaliando a forma como decorre a sua digestão, absorção e biotransformação. Seria, igualmente, importante efetuar ensaios de toxicidade para se conhecerem as doses de ingestão seguras, visto que alguns compostos fenólicos em doses superiores às seguras, podem desencadear processos de toxicidade.

A indústria alimentar tem demonstrado um crescente interesse pelo uso de compostos naturais provenientes de plantas aromáticas e especiarias como aditivos alimentares, devido à procura por parte dos consumidores de alimentos mais saudáveis e seguros. A oxidação lipídica, seguida da deterioração microbiana, são as principais causas de deterioração dos alimentos, sendo que vários estudos demonstram que a adição de extratos e óleos essenciais de ervas aromáticas inibem as mesmas (Costa *et al.*, 2015). Assim, além dos efeitos benéficos para a saúde das propriedades estudadas, as actividades antioxidantes e antimicrobianas demonstram também que poderá existir interesse na aplicação destas plantas aromáticas a nível da indústria alimentar, nomeadamente a segurelha, com o intuito de prolongar o tempo de prateleira dos géneros alimentícios.

## 5 Referências bibliográficas

---

- Aleksic, V., & Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, **169(4)**, 240–254.
- Al-Gubory, K., Fowler, P., & Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42(10)**, 1634–1650.
- Andlauer, W., & Furst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, **35(2)**, 171–176.
- AOAC (1990) Official Methods of Analysis. Agricultural chemicals; Contaminants; Drugs. Volume 1, 15ª Edição. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(26)**, 7970-7981.
- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., & Nosrati, N. (2008). A comparison of antioxidant capacities of ethanol extracts of *Satureja Hortensis* and *Artemisia Dracunculus* leaves. *Pharmacologyonline*, **2**, 694-704.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M., Sousa, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. (2011). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, **132(2)**, 841-848.
- Begnami, A., Duarte, M., Furletti, V., & Rehder, V. (2010). Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chemistry*, **118(1)**, 74–77.
- 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., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55(4)**, 758–774.
- Borneo, R., León, A., Aguirre, A., Ribotta, P., & Cantero, J. (2009). Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, **112(3)**, 664–670.
- Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, **15(4)**, 186-190.

- Burton, G. J. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, **25**(3), 287–299.
- Calo, J., Crandall, P., O'Bryan, C., & Ricke, S. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, **54**, 111-119.
- 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. (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.
- Cetin-Karaca, H., & Newman, M. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. *Food Bioscience*, **11**, 8-16.
- Ceylan, E., & Fung, D. Y. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **12**(1), 1–55.
- Charles, D. (2004). Parsley. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices - Volume 2* (pp. 242-254). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Contini, C., Katsikogianni, M., O'Neill, F., O'Sullivan, M., Dowling, D., & Monahan, F. (2011). Development of active packaging containing natural antioxidants. *Procedia Food Science*, **1**, 224 – 228.
- Costa, D., Costa, H., Albuquerque, T., Ramos, F., Castilho, M., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, doi:10.1016/j.tifs.2015.06.009, (in press).
- Deurenberg, R., & Stobberingh, E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**(6), 747–763.
- Di Rosa, M., Giroud, J., & Willoughby, D. (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology*, **104**(1), 15-29.
- Doğru, Y. Z., & Erat, M. (2012). Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, *Apiaceae*). *Food Research International*, **49**(1), 411–415.
- Dorman, H., & Hiltunen, R. (2004). Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*, **88**(2), 193–199.

EFSA (2011). Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal*, **9(10)**, 2392.

EFSA (2012). Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal*, **10(3)**, 2588.

Elias, R., Kellerby, S., & Decker, E. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48(5)**, 430–441.

Embuscado, M. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidantes - A mini review. *Journal of Functional Foods*, doi: 10.1016/j.jff.2015.03.005, (in press).

Espin, J. C., Garcia-Conesa, M. T., & Tomas-Barberan, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **68(22-24)**, 2986–3008.

Farzaei, M. H., Abbasabadi, Z., Ardekani, M. R., Rahimi, R., & Farzaei, F. (2013). Parsley - a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, **33(6)**, 815-826.

Fetsch, A., Contzen, M., Hartelt, K., Kleiser, A., Maassen, S., Rau, J., Kraushaar, B., Layer, F. & Strommenger, B. (2014). Staphylococcus aureus food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *International Journal of Food Microbiology*, **187**, 1–6.

Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M., & Ruberto, G. (1996). Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, **44(2)**, 497–501.

Fundacion Dieta Mediterránea. (s.d.). Obtido em 27 de Julho de 2015, de <http://dietamediterranea.com/en/mediterranean-diet/what-is-the-mediterranean-diet/>

Gilroy, D., & Lawrence, T. (2008). The resolution of acute inflammation: A 'tipping point' in the development of chronic inflammatory diseases. In A. Rossi, & D. Sawatzky (Ed.), *The Resolution of Inflammation* (pp. 1-18). United Kingdom: Birkhäuser Verlag AG.

Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalán, R., & Gávora, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, **35(1)**,42-51.

Gossiau, A., Li, S., Ho, C.-T., Chen, K., & Rawson, N. (2011). The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, **55(1)**, 74–82.

- Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, **86(3)**, 345-391.
- 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*, doi:10.1016/j.foodcont.2014.10.016, (*in press*).
- Guyton, A., & Hall, J. (2006). Resistance of the Body to Infection: I. Leukocytes, Granulocytes, the Monocyte-Macrophage System, and Inflammation. In A. C. Guyton, & J. E. Hall (Eds.), *Textbook of Medical Physiology* (pp. 429-438). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, **46**, 412-429.
- Hadian, J., Tabatabaei, S., Naghavi, M., Jamzad, Z., & Ramak-Masoumi, T. (2008). Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, **115(2)**, 196–202.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, **16(1)**, 33-50.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, **35(5)**, 1147–1150.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33(7)**, 601-617.
- Hinneburg, I., Dorman, H., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, **97**, 122–129.
- Ho, G.-T., Lees, C., & Satsangi, J. (2007). Ulcerative colitis. *Medicine*, **35 (5)**, 277-282.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(6)**, 1841-1856.
- Hui, Y. (2006). *Handbook of food science, technology, and engineering*. CRC Press.
- Impellizzeri, D., Bruschetta, G., Di Paola, R., 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*, doi: 10.1016/j.clnu.2014.11.012, (*in press*)
- Ishiguro, K., Ando, T., & Maeda, O. (2010). Novel mouse model of colitis characterized by haptene protein visualization. *BioTechniques*, **49(3)**, 641-648.

- Jensen, S. (2003). Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **666–667**, 387–392.
- Jungbauer, A., & Medjakovic, S. (2012). Anti-inflammatory properties of culinary herbs and spices that ameliorate the effects of metabolic syndrome. *Maturitas*, **71(3)**, 227– 239.
- Kamkar, A., Tooriyan, F., Jafari, M., Bagherzade, M., Saadatjou, S., & Molaei Aghaei, E. (2014). Antioxidant Activity of Methanol and Ethanol Extracts of *Satureja hortensis* L. in Soybean Oil. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, **1(4)**, 113-119.
- Kedare, S., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, **48(4)**, 412–422.
- Kim, I.-S., Yang, M.-R., Lee, O.-H., & Kang, S.-N. (2011). Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. *Int. J. Mol. Sci.*, **12(6)**, 4120-4131.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30(6)**, 620–650.
- Kotan, R., Dadasoglu, F., Karagoz, K., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., & Dikbas, N. (2013). Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Scientia Horticulturae*, **153**, 34–41.
- 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.
- Krasniewska, K., Gniewosz, M., Synowiec, A., Przybył, J., Baczek, K., & Weglarz, Z. (2014). The use of pullulan coating enriched with plant extracts from *Satureja hortensis* L. to maintain pepper and apple quality and safety. *Postharvest Biology and Technology*, **90**, 63-72.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocesses Processing*, **89(3)**, 217–233.
- Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M., & Bettaieb, T. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*, **103**, 9–26.
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, **674(1-2)**, 137–147.

- Lushchak, V. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, **224**, 164–175.
- 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(2)**, 935-939.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79(5)**, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81(1)**, 230S– 42S.
- Mandalari, G., Bisignano, C., Genovese, T., Mazzon, E., Wickham, M., Paterniti, I. & Cuzzocrea, S. (2011). Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*, **11(8)**, 915–924
- Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J., & Araújo, M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, **103(3)**, 778–786.
- Matasyoh, J. C., Maiyo, Z. C., & Ngure, R. M. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, **113(2)**, 526–529.
- Matés, J., & Sánchez-Jiménez, F. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32(2)**, 157-170.
- Mateus, V., Faísca, P., Mota-Filipe, H., Sepodes, B., & Pinto, R. (2013). Development of TNBS-induced colitis: animal model to test new pharmacological approaches. *Acta Farm Port.*, **2(2)**, 29-35.
- 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.

- 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.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., & van Beek, T. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medical and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85(2)**, 231–237.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, **130(4)**, 1036–1043.
- Morris, G., Beck, P., Herridge, M., Depew, W., Szewczuk, M., & Wallace, J. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, **96(3)**, 795-803.
- Mueller, M., Hobiger, S., & Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*, **122(4)**, 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.
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D., & Sandborn, W. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet*, **380(9853)**, 1606–1619.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, **74**, 10–36.
- Ozsoy-Sacan, O., Yanardag, R., Orak, H., Ozgey, Y., Yarat, A., & Tunali, T. (2006). Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **104(1-2)**, 175–181.
- Pádua, M. M. (2008). *Patologia Clínica para Técnicos - Bacteriologia*. Lisboa: Lusociência.
- Pandey, M., Vijayakumar, M., Rastogi, S., & Rawat, A. (2012). Phenolic Content and Antioxidant Properties of Selected Indian Spices of *Apiaceae*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **18(3)**, 246–256.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M. C., & Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, **54**, 188-199.

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(10)**, 4290-4302.
- Proença Da Cunha, A., Pereira Da Silva, A., & Rodrigues Roque, O. (2003). *Plantas e Produtos Vegetais Em Fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Proença Da Cunha, A., Teixeira, F., Pereira Da Silva, A., & Rodrigues Roque, O. (2008). *Plantas na terapêutica: farmacologia e ensaios clínicos*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., Gopas, J. & Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, **436(25)**, 332–347.
- Ramkissoon, J., Mahomoodally, M., Ahmed, N., & Subratty, A. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **6(7)**, 561-569.
- Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., & Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*, **68(8)**, 921–931.
- Reis, E. (2002). *Estatística descritiva*. Lisboa: Edições Sílabo.
- 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*.
- Rubió, L., Motilva, M.-J., & Romero, M.-P. (2013). Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **53(9)**, 943–953.
- Sahin, F., Karaman, I., Güllüce, M., Ögütçü, H., Sengül, M., Adıgüzel, A., Oztürk, S. & Kotan, R. (2003). Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L.. *Journal of Ethnopharmacology*, **87(1)**, 61–65.
- Samaranayaka, A., & Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, **3(4)**, 229-254.

- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, **130**(8), 2073S-2085S.
- Sefidkon, F., Abbasi, K., & Khaniki, G. B. (2006). Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*, **99**(1), 19-23.
- Seifried, H., Anderson, D., Fisher, E., & Milner, J. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **18**(9), 567–579.
- Shah, M. A., Don Bosco, S. J., & Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, **98**(1), 21–33.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047, (in press).
- Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**(1), 112–119.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., Hosseini, S. M. & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial k-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, **52**, 116– 124.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants - A review. *Journal of Pharmacy Research*, **7**(9), 828-835.
- 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. In P. Lester (Ed), *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178: Academic Press.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C. R. Biologies*, **327**(7), 649–662.
- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Perumalsamy, P. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **74**(3), 217–220.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21**(9), 1199–1218.

Uhlemann, A.-C., Otto, M., Lowy, F., & DeLeo, F. (2014). Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, **21**, 563–574.

Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P., Seabra, R., & Bastos, M. (2001). Antioxidant activity of *Centaureum 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., Moncola, J., Cronin, M., Mazura, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39(1)**, 44–84.

Ward, P. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In C. N. Serhan, P. A. Ward, & D. V. Gilroy (Eds.), *Fundamentals of Inflammation* (pp. 1-16). Cambridge: Cambridge University Press.

Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81(1)**, 243S–255S.

Wojdyło, A., Oszmianski, J., & Czemie, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105(3)**, 940–949.

Zhang, C.-R., Dissanayake, A., Kevseroglu, K., & Nair, M. (2014). Evaluation of coriander spice as a functional food by using in vitro bioassays. *Food Chemistry*, **167**, 24-29.

Zheng, W., & Wang, S. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49(11)**, 5165–5170.