



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
EXTRACTOS DE *MENTHA CERVINA*

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

por

Joana Sofia Martins da Rocha

Julho de 2011



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE  
EXTRACTOS DE *MENTHA CERVINA*

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

por

Joana Sofia Martins da Rocha

Orientação: Prof. Doutora Manuela Pintado

Co-orientação: Doutora Susana Carvalho; Doutor Matteo Politi; Prof. Doutora Paula Castro

Julho de 2011

## Resumo

A *Mentha cervina* L. Opiz (Lamiaceae) é um tipo de menta que cresce selvagem nas margens dos rios nas regiões do noroeste da Península Ibérica. É uma planta aromática utilizada para fins culinários, especialmente para aromatizar pratos de peixe, e pelas suas propriedades medicinais em infusões com propriedades digestivas. O objectivo principal deste trabalho foi analisar a actividade antioxidante e antimicrobiana de extractos da *Mentha cervina* - aquosos, hidroetanólicos e óleo essencial -, de modo avaliar o seu potencial para o desenvolvimento de ingredientes funcionais para aplicação na indústria alimentar e cosmética. Os extractos obtidos das tinturas (misturas etanol/água) e das infusões foram caracterizadas quanto à actividade antioxidante pelo método de ABTS<sup>+</sup>, ao teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e ao seu perfil de compostos fenólicos por LC-MS/MS. A actividade antioxidante do óleo essencial foi avaliada pelo método de TEAC. A actividade antimicrobiana do óleo foi avaliada pelo método de difusão em disco e CMI, sendo que esta, nas tinturas e infusões, foi avaliada pelo método de difusão em agar por poços. O potencial biológico de actividade antioxidante de todos os extractos foi avaliado pelo método de protecção do ADN da oxidação. Os extractos hidroetanólicos do caule a 65% de etanol e da folha a 40% de etanol apresentaram a maior actividade antioxidante na solução, mas quando avaliada com base no extracto seco foi o caule a 65 % de etanol que demonstrou a maior actividade. Em relação ao teor de fenólicos totais, o extracto das folhas a 65 % etanol evidenciou o maior teor na solução. No entanto, usando o extracto seco, para além das folhas, o caule a 65 % etanol apresentou também um elevado teor de compostos fenólicos. Todos os extractos, excepto o óleo essencial, protegeram o ADN da degradação por oxidação, porém os extractos hidroetanólicos demonstraram maior protecção. Os principais compostos fenólicos identificados por LC-MS/MS nos extractos aquosos e hidroetanólicos foram o ácido caféico e o ácido clorogénico. As tinturas e as infusões não inibiram o crescimento de qualquer dos microrganismos testados, contudo o óleo essencial foi capaz de inibir a *E. coli*, a *Salmonella* spp., o *S. aureus*, a *Listeria innocua*, o *B. cereus*, a *Candida albicans* e a *Yarrowia lipolytica*, com concentrações mínimas inibitórias diferenciadas para cada microrganismo testado. O óleo essencial da *Mentha cervina* demonstrou maior eficácia sobre as bactérias Gram negativas e as leveduras, o que se confirmou pela inibição total observada na sua curva de crescimento.

## Abstract

*Mentha cervina* (L.) Opiz (Lamiaceae) is a type of mint that grows wild in the river banks of the north-western regions of the Iberian Peninsula. It is an aromatic plant used for culinary purposes, especially to aromatize fish dishes, and for its medicinal properties, namely in infusions with digestive properties. The main objective of this work was to analyze the antioxidant and antimicrobial activity of *Mentha cervina* extracts - infusions, tinctures and essential oils - in order to assess its potential for the development of functional ingredients that may be applied in the food or cosmetic industries. The antioxidant activity of the tinctures (ethanol/water mixtures) and of the infusions was assessed by the ABTS<sup>•+</sup> method, total phenol content by the Folin-Ciocalteu method and the LC-MS/MS analysis was performed directly on the crude extracts for the identification of phenolic compounds. For the essential oil the TEAC method was applied to evaluate the antioxidant properties. The antimicrobial activity of essential oil was assessed by disc diffusion and MIC assays, being this property, in the tinctures and infusions, analysed by the agar well diffusion method. The biologic potential for antioxidant activity of all extracts was analysed by the protection of DNA from oxidation. The hydroethanolic extracts of stem at 65 % ethanol and of leaves at 40 % ethanol showed the highest antioxidant activity. However, when the analysis was based on dry matter only the stem at 65% ethanol exhibited the highest antioxidant capacity. The extract obtained from leaves at 65 % ethanol presented a highest total phenol content in solution. Nevertheless, when the study was based on dry matter, the stem at 65 % ethanol revealed the highest content of phenolic compounds. All extracts, except for the essential oils, protected DNA from degradation by oxidation, but hydroethanolic extracts showed the highest protection. The main phenolic compounds identified by LC-MS/MS in the extracts were caffeic acid and chlorogenic acid. Both tinctures and infusions didn't inhibit the pathogenic or food contaminants microorganisms, but the essential oil inhibited *E. coli*, *Salmonella* spp., *S.aureus*, *S. aureus* ATCC, *Listeria innocua*, *B. cereus*, *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica*. Essential oil of *M. cervina* showed better efficiency against Gram negative bacteria and yeast, demonstrated by the complete inhibition observed in their growth curve.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Escola Superior de Biotecnologia – UCP por ter proporcionado a realização da Tese nas suas instalações.

À Professora Doutora Manuela Pintado e Doutora Susana Carvalho, pela orientação, apoio e discussão de ideias que levaram ao desenvolvimento e conclusão desta Tese de Mestrado.

Agradeço aos meus pais, Henrique Rocha e M<sup>a</sup> Adelina Rocha, por terem me proporcionado uma nova oportunidade para evoluir a nível académico e profissional, e pelo seu apoio incondicional nesta nova etapa da minha vida, sem eles não teria alcançado este objectivo.

Aos meus amigos e aos colegas do Laboratório do 6<sup>o</sup> piso da Escola Superior de Biotecnologia pelo incentivo e apoio constante.

# Índice

Lista de abreviaturas e símbolos .....	3
I. Introdução .....	4
1. Tipos de <i>Mentha</i> spp. ....	6
2. Obtenção de extractos .....	8
3. Composição química .....	9
3.1. Compostos Fenólicos .....	9
3.1.1. Flavonóides .....	10
3.1.2. Ácidos fenólicos .....	13
3.1.3. Taninos .....	13
3.2. Terpenos .....	14
3.3. Composição química da <i>Mentha cervina</i> .....	14
4. Características biológicas .....	16
4.1 Actividade antioxidante.....	16
4.1.1. Métodos de análise da actividade antioxidante .....	18
4.1.2. Actividade antioxidante da <i>Mentha cervina</i> .....	20
4.2. Actividade Antimicrobiana .....	20
4.2.1 Actividade antimicrobiana da <i>Mentha cervina</i> .....	22
5. Aplicação de <i>Mentha</i> spp. ....	22
6. Objectivo .....	23
II. Material e Métodos .....	24
1. Material Vegetal.....	24
2. Extractos da <i>Mentha cervina</i> .....	24
3. Capacidade antioxidante total .....	25
3.1. ABTS <sup>+</sup> .....	25
3.2. TEAC .....	26
3.3. Teor de fenólicos totais .....	27
3.4. Determinação da degradação do ADN por oxidação. ....	27
3.5. LC-MS/MS.....	28
4. Actividade Antimicrobiana .....	29
4.1. Estirpes microbianas .....	29
4.2. Método de difusão em agar por poços .....	29
4.3. Método de difusão em disco.....	30

4.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória .....	30
5. Análise Estatística .....	31
III. Resultados e Discussão .....	32
1. Extractos de <i>Mentha cervina</i> .....	32
2. Actividade Antioxidante Total .....	33
2.1. Concentração antioxidante total (método ABTS <sup>+</sup> ).....	34
2.2. Teor de fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu) .....	37
2.3. Correlação entre o método Folin-Ciocalteu e o método ABTS <sup>+</sup> .....	42
3. Protecção da degradação do ADN por oxidação.....	44
4. Identificação dos compostos fenólicos.....	46
5. Actividade antimicrobiana .....	48
5.1. Difusão em agar por poços e discos .....	48
5.2. Concentração mínima inibitória .....	50
5.3. Curvas de inibição.....	51
IV. Conclusões gerais.....	56
V. Trabalho Futuro .....	58
VI. Bibliografia .....	60
VII. Anexos .....	66

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

Abs. - Absorvância

ABTS<sup>·+</sup> - 2,2-azinobis(3-ethylbenzothizoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CML – Concentração Mínima Letal

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

LC-MS/MS – Liquid-Chromatography – Mass Spectrometry

ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

PI – Percentagem de Inibição

PMA - Plantas Medicinais e Aromáticas

TEAC – TROLOX Equivalent Antioxidant Capacity

# I. Introdução

As plantas têm um extenso histórico de propriedades medicinais que ao longo dos tempos lhes têm sido atribuídas. Este conhecimento acompanhou a evolução do homem, que cedo se apercebeu que ao lado das plantas comestíveis existiam outras dotadas de propriedades particulares sobre o organismo, quer com o seu efeito tóxico quer com o seu potencial curativo (Cunha *et al.* 2007a; Cunha *et al.* 2007b).

A Sociedade Ocidental encontra-se actualmente direccionada para uma tendência de consumo “verde”, tendo aumentado a procura de alimentos com menos aditivos sintéticos nos alimentos e de produtos com baixo impacto sobre o meio ambiente. Esta recente tendência do consumidor tem levado a um aumento do interesse científico nos extractos de plantas e seus compostos para o uso na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (Ivanova *et al.* 2005). Paralelamente na indústria alimentar existe ainda uma grande preocupação no que respeita a contaminação por microrganismos patogénicos, quer nas matérias-primas quer nos alimentos processados nas diferentes fases de produção, venda e distribuição, uma vez que estes microrganismos têm aumentado a sua resistência a drogas/químicos. Assim as plantas medicinais e aromáticas (PAM) têm um papel importante na indústria devido às suas propriedades biológicas (Gullace *et al.* 2007). Os seus compostos têm a capacidade de protecção das células de danos biológicos, fornecendo protecção contra a degradação oxidativa dos alimentos, aumentando assim o seu tempo de vida (Kähkönen *et al.* 1999; Gulcin *et al.* 2008; Nickavar *et al.* 2008). As PAM possuem constituintes activos de natureza química, que diferem de espécie para espécie e que lhes conferem diferentes propriedades biológicas, nomeadamente ao nível da actividade antimicrobiana e antioxidante. Porém, a mesma quantidade de um dado constituinte activo isolado tem muitas vezes menor actividade que em planta ou em extracto (Cunha *et al.* 2007a; Cunha *et al.* 2007b). O tipo de extracto utilizado (aquoso, alcoólico ou óleos essenciais), a parte da planta (caules, folhas, flores ou mistura) assim como o modo de preparação do mesmo (e.g. utilizando material fresco ou seco, macerado ou não) pode influenciar a eficácia do método de extracção e consequentemente a composição e as propriedades do extracto final (Singh *et al.* 2006; Gião *et al.* 2007a; Gullace *et al.* 2007). De forma a avaliar e otimizar o potencial das PAM no desenvolvimento de ingredientes ou alimentos funcionais é indispensável a realização de estudos fitoquímicos tendo em vista a caracterização das propriedades biológicas de diferentes extractos de plantas (Cunha *et al.* 2007a; Cunha *et al.* 2007b).

As mentas (*Mentha* spp.) são plantas aromáticas com elevado valor a nível industrial e comercial, sendo usadas na indústria alimentar como condimento, bem como em preparações da indústria cosmética e farmacêutica.

A *Mentha cervina* é uma espécie que cresce de modo espontâneo na Península Ibérica e é frequentemente utilizada como condimento alimentar, no tratamento de infecções cutâneas e infusão com propriedades digestivas (Gonçalves *et al.* 2007; Politi *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2008).

O objectivo principal deste trabalho foi o estudo da actividade antioxidante e antimicrobiana de extractos de *Mentha cervina* de forma a verificar o seu potencial para o desenvolvimento de ingredientes funcionais que podem ser aplicados na indústria alimentar e cosmética. Para tal foi analisada a actividade antioxidante de diferentes extractos recorrendo a técnicas de avaliação *in vitro*, as quais foram correlacionadas com a sua composição em compostos fenólicos, bem como o seu efeito na inibição de microrganismos patogénicos ou contaminantes alimentares.

Na revisão bibliográfica que se segue encontram-se descritas as propriedades biológicas das *Mentha* spp., nomeadamente actividades antioxidante e antimicrobiana, bem como métodos de obtenção de extractos e caracterização da sua composição química.

## 1. Tipos de *Mentha* spp.

Para além da sua reconhecida aplicação na indústria alimentar e cosmética algumas das espécies do género *Mentha* spp. são utilizadas na medicina popular como anti-convulsivo, colerético e carminativo e os seus óleos essenciais como anti-inflamatórios, conhecendo-se desde a antiguidade as suas propriedades antimicrobianas (Gonçalves *et al.* 2007).

Existem nove espécies de *Mentha* spp. em Portugal, a *Mentha x piperita* L., *M. spicata* L., *M. pulegium*, sendo estas três as mais estudadas, *M. aquatica* L., *M. gentilis* L., *M. longifolia* L., *M. requienii*, *M. suaveolens* e *M. cervina*.

A *Mentha x piperita* L., de todas a mais popular, é um híbrido triplo da *M. spicata* (*M. longifolia x M. rotundifolia*) x *M. aquática* estável e infecundo. Pelo facto de ter sido obtida artificialmente não tem origem fitogeográfica, sendo cultivada na Europa, Ásia e América do Norte por via vegetativa. Esta planta tem como nomes vulgares: hortelã-pimenta, hortelã-apimentada, hortelã-de-água-de-cheiro e hortelã-das-damas. Trata-se de uma espécie vivaz (hemiptófito) de aroma picante, com tonalidades purpúreas. As folhas desta menta têm actividade anti-séptica, tranquilizante e analgésica devido ao seu óleo essencial. No entanto, também têm uma acção espasmolítica, antitússica, mucolítica, expectorante e descongestionante nasofaríngeo pelos seus polifenóis (Cunha *et al.* 2007a).

A *Mentha spicata* L. é um híbrido de *M. longifolia x M. rotundifolia*, oriundo da região mediterrânica, cultivado por todo mundo. Esta espécie comporta-se como aloploplóide derivado de hibridação e duplicação cromossómica. Ao contrário da menta referida anteriormente embora seja propagada normalmente por via vegetativa, por vezes reproduz-se por semente sendo um híbrido fértil. Os nomes vulgares desta menta são hortelã, hortelã-comum, hortelã-das-cozinhas, hortelã-das-hortas, hortelã-dos-temperos e hortelã-verde. É uma espécie hemiptófito de forte e agradável aroma originando frutos (mericarpos) castanho-avermelhados a negros. As partes utilizadas são as folhas para obter infusões e utilizar como condimentos alimentares, e o óleo essencial é obtido a partir da parte aérea. O óleo essencial e os flavonóides são os responsáveis pela sua acção anti-séptica, espasmolítica e estimulante das secreções gástricas (Cunha *et al.* 2007a).

A *M. pulegium*, conhecida por poejo ou hortelã-dos-açores ou hortelã-pimenta-mansa, tal como as restantes mentas é uma planta herbácea vivaz, sendo nativa da Europa e Ásia Ocidental tendo-se naturalizado no Continente Americano. O seu aparecimento é muito vulgar nas zonas húmidas do Continente e Açores. Normalmente utilizam-se as partes aéreas desta planta onde é extraído o seu óleo essencial (1 a 2%) composto por pulegona (60 a 90%),

mentona (10 a 20%), isomentona, piperitenona, mentol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno. Esta planta também apresenta substâncias amargas, taninos, ácidos fenólicos e flavonóides. O óleo essencial desta menta é estimulante do apetite e da digestão, espasmolítico, anti-séptico, colagogo e cicatrizante em uso externo. A presença de pulegona e de outras substâncias torna esta planta hepatotóxica, sendo que o uso de doses superiores a 3 g de óleo essencial origina vômitos e até depressão cardiorespiratória (Lorenzo *et al.* 2002; Cunha *et al.* 2007a).

A *Mentha aquatica* L. encontra-se normalmente nos charcos e cursos de água no Centro e Sul do País sendo por isso conhecida pela hortelã-da-água. O seu óleo essencial tem como principais hidrocarbonetos o limoneno, o cariofileno e o D-germacreno ( $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -bourboneno,  $\gamma$ -muuroleno e  $\delta$ -cadineno) e como compostos oxigenados os mentafurano, viridiflunol e 1,8-cineol (Malingré *et al.* 1974; Cunha *et al.* 2007a).

A *Mentha gentilis* L. é um híbrido da *M. arvensis* x *M. spicata*, normalmente cultivada nos jardins devido ao seu aroma agradável, sendo conhecida por Vergamota. Não existe até à data nenhum estudo sobre a composição do óleo essencial desta planta (Cunha *et al.* 2007a).

A *M. longifolia* L. também designada *M. sylvestris* L. encontra-se em pequenas zonas das margens dos rios Minho e Douro. É uma espécie polimórfica o que torna a composição dos seus óleos essenciais muito variada, no entanto os compostos predominantes são a pulegona, a piperitenona, a mentona, o timol e isomentona. Esta planta apresenta ainda ácidos fenólicos e polifenóis.

A *M. requienii* está presente na flora da Córsega e da Sardenha e aparece como subespontânea nas margens dos rios Neiva e Douro, próximo do Porto. Esta menta apresenta um aroma semelhante ao da hortelã-pimenta, no entanto segundo esta pesquisa bibliográfica não há referência da composição do seu óleo essencial (Cunha *et al.* 2007a)

A *M. suaveolens* também designada de *M. rotundifolia* L. é uma espécie que tal como as outras mentas aparece frequentemente em locais húmidos, o seu óleo essencial é constituído principalmente por piperitenona, mentona e pulegona (Lorenzo *et al.* 2002; Cunha *et al.* 2007a).



Figura 1- *Mentha cervina*

A *Mentha cervina* (L.) Opiz sin. *Preslia cervina* (L.) Opiz (Fig.1), espécie em estudo neste trabalho, é comumente designada por erva peixeira ou hortelã da ribeira. É uma espécie que apresenta caules esbranquiçados, prostrados e radicantes inferiormente, erectos em cima, de folhas pequenas, linear-lanceoladas, sésseis e glabras, inteiras ou sinuado-dentadas, flores lilacíneas ou brancas, em verticilastros multifloros, com tubo da corola recto (Cunha *et*

al. 2007a; Gonçalves *et al.* 2007). Esta espécie autóctone, cresce selvagem em lugares pedregosos, nas margens dos rios, em regiões da Península Ibérica. Em Portugal a *Mentha cervina* encontra-se nas regiões interiores (tais como ao longo do Rio Sabor) e é consumida para aromatizar pratos de peixe de rio, motivo para a designação comum de erva peixeira dada a esta planta. A planta seca é ainda usada para a preparação de infusões, pelas suas propriedades digestivas. Ao contrário das outras espécies de menta, a *Mentha cervina* não é competitiva pelo que esta é actualmente difícil de encontrar a crescer espontaneamente em habitat natural (Cunha *et al.* 2007a; Politi *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2008).

Os estudos científicos existentes sobre a *Mentha cervina* reportaram a variação de constituintes de óleo essencial durante diferentes épocas do ano e a sua respectiva actividade antifúngica (Gonçalves *et al.* 2007). No entanto, nenhum estudo foi efectuado de modo a analisar a actividade antibacteriana deste extracto. Rodrigues *et al.* (2008) analisaram a morfologia e distribuição das estruturas secretoras de várias populações tal como a sua estabilidade na composição química do óleo essencial. Já Politi *et al.* (2008b) estudaram a composição química e actividade antioxidante do extracto aquoso (infusão).

## **2. Obtenção de extractos**

O processo de extracção dos compostos das plantas pode ser realizado seguindo diferentes metodologias nomeadamente a destilação (óleo essencial), maceração (tinturas) e fervura (ou infusão) (Cunha *et al.* 2007a). Os extractos podem ser obtidos através de solventes químicos, orgânicos e aquosos como por exemplo o benzeno, clorofórmico, éter sulfúrico, metanol, etanol e água (Mancini 1999; Pérez-Jiménez *et al.* 2008). A metodologia utilizada na preparação dos extractos, o solvente utilizado, assim como o tratamento do produto/planta (inteira ou reduzida a pó) influenciam a extracção de compostos antioxidantes (Gião *et al.* 2007a). No entanto, não existe nenhum solvente que seja inteiramente satisfatório para a extracção de todos os antioxidantes presentes no produto/planta, principalmente aqueles que estão associados a hidratos de carbono complexos (Pérez-Jiménez *et al.* 2008). De acordo com os estudos realizados por Singh *et al.* (2006) os extractos obtidos com diferentes solventes apresentam capacidades antimicrobianas diferentes. O material de planta seca pode ser extraído com uma grande variedade de solventes, sendo considerada como prática mais comum a utilização de solventes de forma sequencial de polaridade mais baixa para a mais alta. Os solventes polares como acetato de etilo (baixa polaridade) e metanol são usados

frequentemente. Teoricamente, o acetato de etilo extrai os compostos por lixiviação e os solventes alcoólicos por ruptura da membrana celular extraindo material intracelular. O uso de metanol seguido de acetato de etilo e butanol numa extracção permite a separação de compostos lipofílicos de materiais solúveis em água (Davidson *et al.* 2005).

De um modo geral, os métodos de extracção mais utilizados para análise das diferentes propriedades bioquímicas das várias mentas foram: a infusão em água (Gião *et al.* 2007a), hidrodestilação (óleo essencial) (Gonçalves *et al.* 2007), maceração em etanol (Nickavar *et al.* 2008), destilação por metanol usando o extractor Soxhlet (Gulluce *et al.* 2007) e extracção supercrítica com dióxido de carbono.

### **3. Composição química**

Como todos os organismos, as plantas possuem constituintes de natureza química. Os compostos activos são normalmente protegidos da oxidação, hidrólise e isomerização por outros compostos presentes na planta. Estes inibem sistemas enzimáticos, ou permitem uma melhor absorção pelos organismos facilitando a passagem de membranas. Desta forma a planta ou o seu extracto têm muitas vezes mais actividade do que a mesma quantidade de um dado constituinte activo isolado (Cunha *et al.* 2007b).

Verifica-se ainda que existe uma grande variedade química entre espécies de plantas e muitas vezes populações morfologicamente idênticas são quimicamente diferentes, ou seja a mesma espécie com igual fenotipo mas com genotipos diferentes influenciam a composição química da planta (Cunha *et al.* 2007a).

#### **3.1. Compostos Fenólicos**

Existem mais de 4000 fenóis identificados, sendo as classes principais de fenólicos presentes na dieta os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos, estes compostos ocorrem nos alimentos num intervalo de 1 mg/kg a 3000 mg/kg. No entanto, existe uma grande dificuldade em quantificar os fenóis devido à sua quantidade presente na planta e a factores que afectam a sua presença como o cultivo, a maturidade, as condições de crescimento (fertilizantes, temperatura, predadores, luz e água), as partes da planta testadas, o processamento e armazenamento (King *et al.* 1999).

### 3.1.1. Flavonóides

Os flavonóides encontram-se em grande variedade em muitas plantas medicinais e nos seus respectivos extractos, o que levou a que nas duas últimas décadas tenha havido um grande esforço por parte da farmacologia para quantificar alguns destes (Cunha *et al.* 2005).

Este é o principal grupo dos fenóis das plantas, compostos de baixo peso molecular que normalmente ocorrem associados a moléculas de açúcar, como a glucose ou ramanose embora outros açúcares também possam estar envolvidos. Os flavonóides encontram-se amplamente distribuídos no Reino Vegetal, estando presentes principalmente na parte aérea das plantas. Estas moléculas têm como base de estrutura dois anéis aromáticos (A e B) que estão ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (anel C) (Fig.2). Em geral estes compostos são hidroxilados, metoxilados e/ou derivados de glicosilados. Normalmente são hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3',4' e 5' e a sua ligação glicosídica está muitas vezes na posição 3 e 7. Os flavonóides quando se encontram sob a forma glicosilada são solúveis em solventes aquosos, alcoólicos ou a mistura dos dois. Os flavonóides estão agrupados em antocianinas (que apresentam moléculas com pigmentos vermelhos, azuis e roxos), flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanois e isoflavonois, moléculas incolores, brancas ou amarelas, sendo a catequina o flavanol mais conhecido (King *et al.* 1999, Manach *et al.* 2004, Cunha *et al.* 2005, Ramassamy *et al.* 2006).

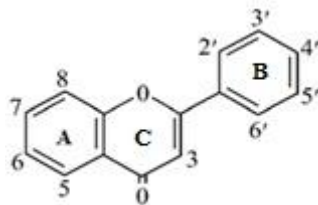
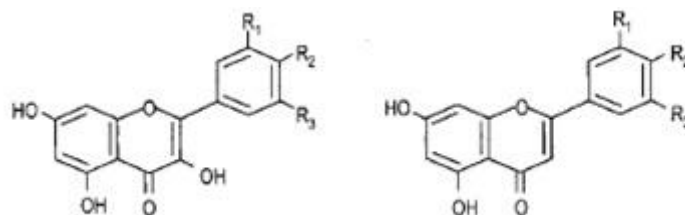


Figura 2 – Estrutura da flavona. Fonte: Ramassamy *et al.* (2006)

#### *Flavonóis e Flavonas*

Os flavonóis são os flavonóides mais amplamente distribuídos nos alimentos, sendo a quercetina, o caempferol e a miricetina os mais comuns. Estes compostos apresentam-se em formas glicolisadas e estão associadas a açúcares como glucose, ramanose, galactose entre outros. As flavonas são menos comuns do que os flavonóis na fruta e nos vegetais. Estas consistem principalmente em glicosídeos de luteolina e apigenina. Os cereais como o milho e o trigo apresentam flavonas C-glicosídeas e as frutas grandes quantidade de flavonas polimetoxiladas como a nobiletina, tangeretina e sinensetina. As flavonas polimetoxiladas são flavonóides muito hidrofóbicos (King *et al.* 1999, Manach *et al.* 2004). Os flavonóis diferem

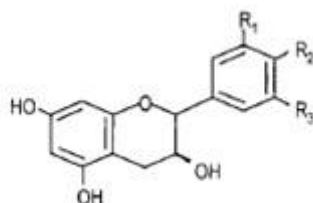
das flavonas (Fig. 3) por possuírem um grupo hidroxilo na posição 3 e ambos têm uma ligação dupla entre C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> (Cunha *et al.* 2005)



**Figura 3 – Estrutura dos flavonóis e das flavonas. Fonte: Manach *et al.* (2004).**

### *Flavanóis*

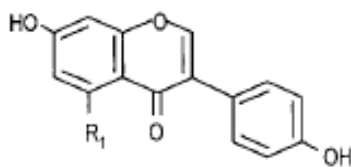
Os flavanóis são muito parecidas com os flavonóis, no entanto diferem destes por não possuírem o grupo carbonilo característico no anel C (Fig.4) (Cunha *et al.* 2005). A catequina e epicatequina são flavanóis, que ocorrem de forma combinada com ácido gálico no chá, como epigallocatequina galato e epicatequina galato ou como polímeros de taninos condensados em frutas, legumes e grãos. Ao contrário de outras classes de flavonóides, os flavanóis não estão glicolisados nos alimentos (King *et al.* 1999, Manach *et al.* 2004).



**Figura 4 – Estrutura dos Flavanóis. Fonte: Manach *et al.* (2004).**

### *Isoflavonas*

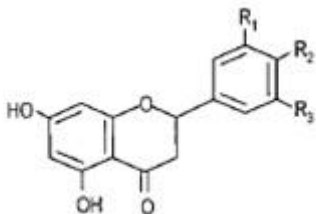
As isoflavonas apresentam estruturas (Fig. 5) semelhantes a estrogênios, embora não sejam esteróides estes têm um grupo hidroxilo na posição 7 e 4' na configuração análoga aos hidroxilos da molécula estradiol. As isoflavonas têm a capacidade de se ligarem á receptores de estrogênio sendo classificados como fitoestrógenos, encontrando-se exclusivamente nos legumes e ocorrem em grandes quantidades na soja. As principais isoflavonas são: a daidzeína, a genisteína e a gliciteína. Estas moléculas são estáveis ao calor, pouco solúveis em água e muito solúveis em álcool. (King *et al.* 1999, Manach *et al.* 2004).



**Figura 5 – Estrutura das isoflavonas. Fonte: Manach *et al.* (2004).**

### *Flavanonas*

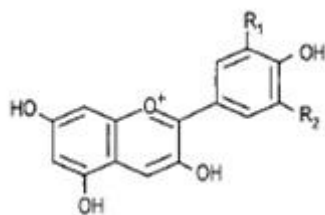
As flavanonas (Fig. 6) apesar de estarem presentes em várias plantas como as mentas, estas encontram-se apenas em altas quantidades nos citrinos. As principais agliconas são naringenina, hesperetina e eriodictiol. As flavanonas encontram-se geralmente glicosiladas por um dissacarídeo na posição 7 (Manach *et al.* 2004).



**Figura 6 – Estrutura das flavanonas. Fonte: Manach *et al.* (2004).**

### *Antocianinas*

As antocianinas (Fig.7) são altamente instáveis na forma aglicona (antocianidinas) enquanto estão nas plantas, no entanto apresentam-se resistentes à luz, pH e a condições de oxidação que os vão degradar. A degradação é impedida pela glicosilação, geralmente com uma glicose na posição 3, a esterificação com diferentes ácidos orgânicos (ácido cítrico e málico) e ácidos fenólicos. Além disso, as antocianinas são estabilizadas pela formação de complexos com outros flavonóides. Na dieta humana, as antocianinas são encontradas no vinho e numa grande variedade de cereais e leguminosas, mas estes são mais abundantes nas frutas (Manach *et al.* 2004).



**Figura 7 – Estrutura das antocianidinas (antocianina glicosilada). Fonte: Manach *et al.* (2004).**

### 3.1.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos apresentam-se em duas classes distintas: os derivados de ácido benzóico e os derivados de ácido cinâmico (Fig. 8). Os ácidos hidroxibenzoicos como taninos hidrolisáveis estão presentes em frutas e nozes, sendo os principais compostos os ácidos hidroxibenzoico gálico e ácido elágico. Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os ácidos hidroxibenzoicos e consistem em ácidos *p*-cumarico, caféico, ferúlico e sinápico que são sensíveis ao calor. Estes ácidos raramente se encontram em forma livre à exceção de alimentos processados que passam pela congelação, esterilização ou fermentação. As formas ligadas são derivadas de glicosilados ou ésteres de ácido quínico, ácido chiquimico e ácido tartárico. O ácido caféico e quínico combinam-se formando o ácido clorogénico que está amplamente distribuído em frutas e legumes, encontrando-se em altas concentrações nas sementes como feijões de café, grãos e sementes de girassol. Um simples copo de café contém cerca de 79-350 mg de ácido clorogénico. Este ácido está geralmente concentrado nas camadas externas da fruta (King *et al.* 1999, Manach *et al.* 2004).



Figura 8 – Ácido hidroxibenzoico e Ácido hidroxicinâmico. Fonte: Manach *et al.* (2004).

### 3.1.3. Taninos

Os taninos são compostos com alto peso molecular e reagem com as proteínas da boca dando a sensação de gosto conhecida por adstringência. Estes compostos dividem-se em dois grupos, os condensados e os hidrolisáveis. Os taninos condensados são polímeros de catequinas ou epicatequinas e estão presentes principalmente em frutas, grãos e legumes, e os taninos condensados encontram-se normalmente acumulados na camada externa das plantas. No caso dos taninos hidrolisáveis estes são polímeros de ácido elágico e gálico e encontram-se em frutas e nozes (King *et al.* 1999).

Os polifenóis são substâncias activas em muitas plantas medicinais e modelam a actividade de uma grande variedade de enzimas e receptores celulares. Estas moléculas são metabolitos secundários das plantas e encontram-se envolvidas na defesa contra as radiações ultravioleta e agressões pelos patogénicos (Manach *et al.* 2004).

## 3.2. Terpenos

Os terpenos formam classes estruturais e funcionais diferentes, são metabolitos secundários das plantas produzidas em parte para a defesa contra microrganismos e insectos. Estes são compostos pela combinação de várias unidades de bases de carbono-5 (C<sub>5</sub>) designados de isopreno sendo os principais os monoterpenos e os sesquiterpenos. Os monoterpenos (C<sub>10</sub>), formados por duas unidades isoprénicas, podem ter hidrocarbonetos acíclicos (mirceno, etc.) ou monocíclicos (limoneno, terpineno, etc), bicíclicos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, etc) e as respectivas moléculas funcionais (álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, peróxidos e fenóis). Os sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), compostos por três unidades podem ser não oxigenados como o *E*-bisaboleno, o *E*-cariofileno ou o longifoleno e oxigenados como álcoois (farnesol, santalol), cetonas (vetivenona), aldeídos (farnesal), etc. Ainda podem ser encontrados outros terpenóides como hemiterpenos (C<sub>5</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>). Aos terpenos que contém oxigénio é lhes dado o nome de terpenóides. Os monoterpenos representam 90% das moléculas presentes nos óleos essenciais (Cunha *et al.* 2006, Bakkali *et al.* 2008).

## 3.3. Composição química da *Mentha cervina*

Um estudo realizado por Gonçalves *et al.* (2007) demonstra que existe uma diferença quantitativa na composição química do óleo essencial de *Mentha cervina* entre populações na fase vegetativa e na fase de floração (Tabela 1). Os monoterpenos oxigenados são o principal grupo presente neste óleo essencial, encontrando-se em diferentes quantidades: a pulegona entre 13 a 79 %, e o isomentona no intervalo de 9 a 77 %. Dentro dos hidrocarbonetos dos monoterpenos, o limoneno é o constituinte que se encontra em maior quantidade.

**Tabela 1 – Constituintes de quatro óleos essenciais (%) de *M. cervina* em função da época de floração (Agosto: amostra 1) e da época vegetativa das plantas (Outubro: amostra 2; Dezembro: amostra 3 e Fevereiro: amostra 4). Adaptado de Gonçalves *et al.* (2007).**

IR (SPB-1)	IR (SuperW-10)	Compostos	1	2	3	4
930	1030	□-Pino	0,5	0,5	0,4	0,3
962		Octan-3-one	0,1	0,1	0,1	0,1
969	1127	Sabino	0,1	0,1	0,1	0,1
970	1118	β-Pino	0,4	0,5	0,4	0,3
981	1387	3-Octanol	1,2	1,6	1,5	1,3
981	1164	Mirceno	0,5	0,5	0,4	0,2
1020	1215	1.8-Cineol	0,2	0,2	0,1	0,1
1020	1207	Limoneno	4,3	3,2	1,2	0,8
1035	1253	E-β-Ocimeno	0,5	0,4	0,3	0,1
1130	1461	Mentona	1	0,8	1,7	4,4
1139	1491	Isomentona	8,7	9,5	33,3	77
1147	1580	cis-Isopulegona	0,7	1,3	0,8	0,4
1147	1570	trans-Isopulegona	0,5	0,6	0,2	0,1
1212	1640	Pulegona	75,1	79,6	58,3	12,9
1303	1906	Piperitenona	0,3	0,1	0,2	
1410	1594	E-Cariofileno	0,4	0,3	0,5	0,3

Nota: Lista de compostos por ordem de diluição na coluna SPB-1 (coluna de polidimetilsiloxano); IR - índices de retenção.

No estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2008) ao óleo essencial da *Mentha cervina* observou-se que não existe polimorfismo químico entre óleos essenciais obtidos a partir de populações de diferentes proveniências, colhidas na mesma fase de desenvolvimento e que crescem nas mesmas condições ecológicas e edafológicas. O mesmo padrão de composição química foi obtido para populações que cresceram em condições selvagens e em cultivo, indicando que também não existe grande variação entre populações com diferentes condições ecológicas. Tal como no estudo efectuado por Gonçalves *et al.* (2007) verificou-se que nas diferentes populações há um domínio da presença de monoterpenos oxigenados, no caso das de cultivo 78 a 88 % e nas selvagens 89 a 91 %. A pulegona encontra-se num intervalo de 62-78 % nas plantas cultivadas e 73-80 % nas populações selvagens, a isomentona numa fracção de 3-18 % e limoneno, hidrocarboneto de monoterpenos, encontra-se entre 3 a 7 %.

Quanto à composição química da infusão da *Mentha cervina*, esta possui como principais compostos os ácidos clorogénico e caféico, como os mais abundantes, seguidos do ácido cumárico e a rutina (Tabela 2).

**Tabela 2 –Análise LC-MS/MS da infusão de *M. cervina*; os valores em % indicam a quantidade relativa do cálculo dos sete compostos identificados pela integração da área sob os picos. Fonte de Politi *et al.* (2008).**

Nome do Composto	Tempo de Retenção (min.)	[M-1] <sup>-</sup>	Fragmentos	Quantidade Relativa
Ácido protocatecuico	9,65	153,0	109,0 (100)	3,1 %
Ácido cumárico	20,16	163,0	119,0 (100)	19,7 %
Ácido cafeico	18,3	179,0	135,0 (100)	29,1 %
Epicatequina	22,84	289,0	245,0 (100)	1,1 %
Ácido clorogénico	16,75	353,0	191,0 (100)	32,1 %
Orientina	20,5	447,0	357,0 (70)	3,3 %
			327,0 (100)	
			285,0 (20)	
Rutina	25,52	609,0	301,0 (40)	11,6 %

Tal como observado em estudos anteriores o perfil metabólico do aroma da *Mentha cervina*, estudado por Politi *et al.* (2008), em material seco e fresco da planta apresenta como principais constituintes voláteis a pulegona, a isomentona e o limoneno. O limoneno e a isomentona encontram-se em maior quantidade na planta seca comparativamente à planta fresca. Assim o processo de secagem faz com que a *Mentha cervina* apresente características metabólicas distintas.

## 4. Características biológicas

### 4.1 Actividade antioxidante

As plantas contêm compostos naturais tais como as vitaminas, carotenóides, terpenóides, alcalóides, flavonóides, fenóis simples e ácidos fenólicos que apresentam propriedades antioxidantes (Gulcin *et al.* 2008).

A importância do uso das plantas como fornecedores de antioxidantes naturais em alternativa aos antioxidantes sintéticos tem vindo a aumentar na indústria alimentar. De acordo com alguns toxicologistas e nutricionistas, os antioxidantes sintéticos têm demonstrado efeitos colaterais (cancerígenos) prejudiciais ao homem (Dung *et al.* 2008), pelo que para cada extracto deve ser comprovado ausência de toxicidade.

Os antioxidantes são compostos que apresentam características de preservação contra reacções oxidativas, que são responsáveis pela degradação de alimentos. Estes podem actuar por:

- Diminuição da concentração ou mesmo eliminação total de O<sub>2</sub>;
- Redução catalítica de iões metálicos;
- Remoção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como por exemplo o ião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);
- Remoção de radicais livres, tais como radicais hidroxilo (OH<sup>•</sup>), alcoóxilo (RO<sup>•</sup>) e superóxido (RO<sub>2</sub><sup>•-</sup>);
- Sequestradores de oxigénio singuleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>);
- Promoção de defesas endógenas antioxidantes, pela regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes;
- Reparação de danos oxidativos provocados pelos radicais livres;
- Reforço na eliminação e/ou reparação de moléculas danificadas, minimizando a incidência de mutações.

No entanto, em condições específicas, os antioxidantes podem comportar-se como radicais livres, levando à oxidação (efeito pró-oxidante). Este comportamento está relacionado com a concentração do antioxidante (Gião et al.2007; Macini et al. 1999).

As reacções oxidativas ou stress oxidativo também estão relacionados com patogénese de certas doenças e condições de saúde, entre as quais o envelhecimento, arteriosclerose, cancro, doenças respiratórias, neurodegenerativas e cardiovasculares. Estas reacções ocorrem quando quantidades excessivas de espécies reactivas de oxigénio, que actuam como oxidantes, ião superóxido e radical hidroxilo, entre outros, estão em excesso em relação às defesas antioxidantes do hospedeiro. Estes podem causar danos em todo tipo de macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Assim, as doenças provocadas por reacções oxidativas podem ser evitadas ou adiadas através da inclusão regular e equilibrada de antioxidantes (Gião *et al.* 2007; Langseth 1995).

Muitos estudos demonstram a actividade antioxidante de vários extractos de plantas como se pode verificar nos exemplos da Tabela 3, sendo estes extractos os mais usados neste tipo de estudo.

**Tabela 3 – Exemplos de plantas e respectivos extractos mais usados com actividade antioxidante**

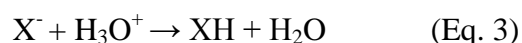
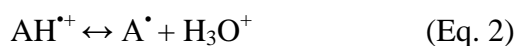
<b>Espécie</b>	<b>Extractos</b>	<b>Referências</b>
<i>Mentha piperita</i>	Infusão (extracto aquoso)	Almajano <i>et al.</i> 2007
<i>Achillea millefolium</i>	Extracto metanólico	Candan <i>et al.</i> 2003
<i>Cyclotrichium niveum</i>	Extracto etanólico	Gulcin <i>et al.</i> 2008

#### 4.1.1. Métodos de análise da actividade antioxidante

Alguns métodos analíticos têm sido desenvolvidos de forma a determinar a capacidade antioxidante total. Porém, a nível da comunidade científica não existe um consenso de acerca do melhor método, uma vez que a capacidade antioxidante é analisada numa mistura de diferentes antioxidantes, com diferentes mecanismos de acção, entre os quais poderá haver interacções sinérgicas. Assim, sugere-se que para uma melhor avaliação da planta deverão ser efectuados diferentes métodos *in vitro*. Paralelamente, o compromisso entre a celeridade e a precisão do método deverá ser tida em linha de conta.

Para o estudo da actividade antioxidante de plantas medicinais, os métodos mais frequentes são: (i) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power); (ii) ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico) diammonium radical catiónico) ou TEAC (capacidade antioxidante equivalente a TROLOX); (iii) DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) e (iv) ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

A base do método de FRAP consiste na avaliação da capacidade de reduzir metais presentes na amostra, no caso do ABTS, DPPH e ORAC a análise avalia a capacidade de eliminação de radicais livres da amostra. Os ensaios FRAP e ABTS são baseados na reacção de transferência de um único electrão,



enquanto no ORAC a reacção envolve a transferência de um átomo de hidrogénio (i. e. Eq.1), e o DPPH combina ambas as reacções.

O método de ABTS<sup>•+</sup> permite quantificar os antioxidantes solúveis em água e em lípidos, tal como o DPPH. Os métodos de FRAP e ORAC, são usados para analisar a capacidade

antioxidante de compostos hidrofílicos, tendo surgido algumas modificações na metodologia de ORAC de forma a ser possível avaliar os compostos lipofílicos.

Cada método fornece valores repetitivos, no entanto, diferem substancialmente entre eles. Todos estes métodos são adequados à avaliação da capacidade antioxidante, mas cada um tem as suas desvantagens, as quais podem ser analisadas na Tabela 4.

**Tabela 4 – Principais desvantagens dos métodos de avaliação da capacidade antioxidante. Fonte: Pérez-Jiménez *et al.* (2008)**

Métodos	Desvantagem
FRAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Outros compostos que não antioxidantes podem absorver a 595nm</li> <li>▪ Qualquer composto com potencial redox inferior a 0,77V, embora não se comporte <i>in vivo</i> como um antioxidante, pode reduzir ferro.</li> <li>▪ É realizado a um pH não fisiológico</li> </ul>
ABTS	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Os antioxidantes além de reagirem com o radical, produzindo a molécula original, geram também outros compostos.</li> <li>▪ A reacção normalmente não termina nos 6 min.</li> <li>▪ O radical livre usado não está presente <i>in vivo</i>.</li> </ul>
DPPH	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Outros compostos além dos antioxidantes podem absorver a 515 nm.</li> <li>▪ As moléculas com maior peso molecular podem ter maior dificuldade.</li> <li>▪ O radical livre utilizado não está presente <i>in vivo</i> e é bastante estável, ao contrário dos radicais presentes nos organismos vivos.</li> </ul>
ORAC	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ A cinética da reacção pode variar dependendo da concentração do antioxidante, o que permite que este método seja utilizado para estudos de cinética.</li> <li>▪ Mede a capacidade dos antioxidantes de realizarem o varrimento dos radicais peroxil, presente <i>in vivo</i>, no entanto o procedimento para gerar estes radicais peroxil não é fisiológico.</li> <li>▪ As proteínas podem ter um efeito de interferência.</li> </ul>

O método de Folin-Ciocalteu é o mais utilizado para a determinação dos compostos fenólicos totais efectuada através da oxidação de polifenóis via reagente Folin-Ciocalteu (Gião *et al.* 2007a; Pérez-Jiménez *et al.* 2008; Tabart *et al.* 2009). Em geral, os compostos fenólicos são identificados através da análise directa em extractos aquosos por LC-MS/MS. Esta análise tem como objectivo identificar o número máximo de fenóis contidos no extracto. A presença desta classe de compostos está fortemente relacionada com actividade antioxidante medida pelo método de ABTS<sup>•+</sup> (Politi *et al.* 2008b).

Os métodos acima descritos são métodos químicos de determinação da capacidade antioxidantes de selecção primária. Estes deverão ser posteriormente complementados com testes que avaliem o potencial antioxidante biológico, tais como a protecção da degradação do ADN (método bioquímico) e o sistema biológico bacteriófago P22/ bactéria *Salmonella typhimurium* (método biológico), métodos utilizados neste trabalho. Os métodos actuais que têm como base a atenuação dos efeitos oxidativos do ADN tiram partido da conservação desta

molécula quando exposta a radicais livres que originam a oxidação, sendo esta avaliada através de electroforese (Gião *et al.* 2009).

#### 4.1.2. Actividade antioxidante da *Mentha cervina*

Recentemente, Politi *et al.* (2008) analisaram a infusão de *Mentha cervina* preparada através do seu pó, realizando o método de ABTS<sup>+</sup> para determinar a capacidade antioxidante e o método de Folin-Ciocalteu para saber a quantidade total de fenóis. Os autores compararam os seus dados com 48 infusões preparadas com pó de plantas medicinais comercializadas em Portugal tendo sido analisadas pelos mesmo métodos e com o mesmo processo de extracção. Assim este designaram que a *M. cervina* demonstrou uma capacidade antioxidante média com valores de  $0,16 \pm 0,013 \text{ g L}^{-1}$  equivalentes a ácido ascórbico e uma quantidade total de fenóis de  $0,15 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$  equivalentes a ácido gálico.

#### 4.2. Actividade Antimicrobiana

As plantas, ervas e especiarias, tal como os seus derivados de óleos essenciais e constituintes isolados contêm um grande número de substâncias conhecidas pela sua capacidade de inibir diversas actividades metabólicas de bactérias, leveduras e bolores. Muitos estudos demonstram a actividade antimicrobiana de vários extractos de plantas conforme o exemplificado na Tabela 5

**Tabela 5 – Exemplos de actividade antimicrobiana em diferentes espécies de plantas**

Espécie	Propriedades	Extractos	Referências
<i>Mentha cervina</i>	Antifúngica ( <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> e dermatófitos)	Óleos essenciais	Gonçalves <i>et al.</i> 2007
<i>Capparis spinosa</i>	Antibacteriana ( <i>Listeria monocytogenes</i> )		
<i>Geranium purpureum</i>	Antibacteriana ( <i>Escherichia coli</i> 0157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas putida</i> )	Extracto metanólico	Proestos <i>et al.</i> 2006
<i>Urtica dioica</i>	Antibacteriana ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> )		
<i>Dendrophthoe falcata</i> (L.f) Ettingsh	Antimicrobiana ( <i>Serratia marscescens</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i> , <i>Salmonella typhi</i> )	Extracto etanólico	Pattanayak <i>et al.</i> 2008

Os compostos antimicrobianos existentes nas plantas encontram-se no óleo essencial das folhas, flores, bolbos, rizomas, frutos e outras partes da planta, podendo ser letais para os microrganismos ou simplesmente inibidores da produção de metabolitos como por exemplo micotoxinas.

Os principais constituintes presentes nas plantas, ervas e especiarias com actividade antimicrobiana são compostos fenólicos, terpenos, álcoois alifáticos, aldeídos, cetonas, ácidos e isoflavonóides. Alguns óleos essenciais, extractos de plantas e óleo-resinas actuam nas funções bioquímicas e/ou metabólicas como na respiração ou na produção de toxinas e ácidos, o que indica que os compostos activos têm especificidades diferentes em relação ao alvo da célula microbiana.

É sugerido que a acção dos compostos fenólicos depende da sua concentração, ou seja, a concentrações baixas destes afectam a actividade enzimática, principalmente as enzimas associadas à produção de energia, e a concentrações elevadas leva à desnaturação de proteínas. O efeito antioxidante dos compostos fenólicos no crescimento microbiano e na sua produção de toxinas, pode resultar da capacidade destes compostos de alterarem a permeabilidade da célula, permitindo a perda de macromoléculas e a sua interacção com proteínas da membrana, alterando a sua estrutura e função.

A actividade antimicrobiana dos óleos essenciais/extractos deve-se à estrutura química dos seus componentes e sua concentração. Na mesma especiaria ou planta, os níveis de componentes e os grupos antimicrobianos activos podem variar substancialmente. A zona geográfica de cultivo, a origem, o tratamento, o processamento da especiaria, erva ou planta são factores que influenciam a capacidade antimicrobiana dentro da mesma espécie (Davidson *et al.* 2005).

Uma característica importante dos óleos essenciais e dos seus componentes é a sua hidrofobicidade que permite quebrar os lípidos da membrana celular bacteriana, alterando as estruturas e tornando-as mais permeáveis. A perda de iões e outros conteúdos pode ocorrer, no entanto, as bactérias podem tolerar esta perda, mas se a eliminação do teor celular e de iões for extensa irá conduzir à morte.

Normalmente os óleos essenciais que apresentam uma grande actividade antibacteriana contra patogénicos alimentares, possuem uma elevada percentagem de terpenos como o carvacrol, o eugenol e o timol. Componentes do óleo essencial também podem agir sobre as proteínas celulares da membrana citoplasmática, tal como as enzimas ATPases que se encontram rodeadas de moléculas lipídicas. Existem duas hipóteses de mecanismo de acção: (i) as moléculas hidrocarbonetos lipofílicas podem acumular-se na bicamada lipídica

alterando a interacção proteínas-lípidos, ou (ii) a interacção directa dos compostos lipofílicos com as partes hidrofóbicas das proteínas. Alguns estudos também demonstraram que o óleo essencial pode actuar sobre enzimas envolvidas na regulação de energia ou na síntese de componentes estruturais (Burt *et al.* 2004).

#### 4.2.1 Actividade antimicrobiana da *Mentha cervina*

Existe apenas um estudo, realizado por Gonçalves *et al.* (2007), relativo à actividade antimicrobiana do óleo essencial da *Mentha cervina*. Este estudo revelou uma actividade antifúngica do óleo essencial com elevada actividade para os dermatófitos, principalmente *Epidermophyton floccosum*, com valores de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML) de 0,64  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (Tabela 6).

**Tabela 6 – Actividade antifúngica (CMI e CML) do óleo essencial de *M. cervina*; amostra 1 (75,1% de pulegona e 8,7% de isomentona) e amostra 4 (12,9% de pulegona e 77,0% de isomentona). Fonte de Gonçalves *et al.* (2007).**

Estirpes	1		4		Fluconazole		Amphotericin B	
	CMI <sup>a</sup>	CML <sup>a</sup>	CMI <sup>a</sup>	CML <sup>a</sup>	CMI <sup>b</sup>	CML <sup>b</sup>	CMI <sup>b</sup>	CML <sup>b</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	1,25-2,50	2,50	2,50	1	>128	N.T <sup>(c)</sup>	N.T
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	1,25-2,50	2,50	2,50	4	>128	N.T	N.T
<i>C. krusei</i> H9	1,25	1,25-2,50	2,50	2,50	64	64-128	N.T	N.T
<i>C. guilliermondii</i> MAT23	1,25	1,25-2,50	2,50	2,50	8	8	N.T	N.T
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25-2,50	2,50	2,50	5,00	<1	<1	N.T	N.T
<i>C. neoformans</i> CECT 1078	1,25	1,25	1,25	1,25	16	128	N.T	N.T
<i>E. floccosum</i> FF9	1,25	1,25	0,64	0,64	16	16	N.T	N.T
<i>T. rubrum</i> CECT 2794	1,25	1,25	1,25	1,25	16	64	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> FF7	1,25-2,50	1,25-2,50	2,50	2,50	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>M. canis</i> FF1	1,25	1,25	1,25	1,25	128	128	N.T	N.T
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	2,50	2,50	1,25	1,25	128	>128	N.T	N.T
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1,25	5,00	2,50	>20	N.T	N.T	1-2	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	1,25	2,50	2,50	5,00	N.T	N.T	2	4
<i>A. flavus</i> F44	2,50	2,50	5,00	5,00	N.T	N.T	2	8

Nota: <sup>a</sup>CMI e CML foi determinada pelo método de microdiluição e expresso em  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (V/V).

<sup>b</sup>CMI e CML foi determinada pelo método de macrodiluição e expresso em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (W/V).

<sup>c</sup>Não foi testado.

## 5. Aplicação de *Mentha* spp.

O óleo essencial da hortelã-pimenta (*M. piperita*) é um aromatizante com propriedades anti-sépticas, fazendo parte de mais de metade da produção de dentífricos, 25 % de rebuçados e

pastilhas elásticas e a restante na indústria farmacêutica, na de tabaco e na de perfumaria. É também usada em infusões, como condimento e aroma de bebidas.

As folhas da *Mentha spicata* são usadas como condimentos e aromatizantes em diversos alimentos de culinária portuguesa como sopa, açordas, bebidas e “coktails”. Esta planta também é usada em infusões devido ao seu agradável sabor. Na indústria, o óleo essencial é utilizado para obter a carvona (Cunha *et al.* 2007a).

A planta fresca de *Mentha cervina* é usada como condimento de pratos de peixe. A planta em material seco é utilizada em infusões pelas suas propriedades digestivas. (Politi *et al.* 2008a)

As seguintes mentas, *M. arvensis*, *M. piperita*, *M. cirata* e *M. spicata* são usadas como fontes naturais de compostos como metanol, carvona, linalol e acetato de linalil, utilizados em alimentos e preparações cosméticas e farmacêuticas (Chand *et al.* 2004)

## 6. Objectivo

Os estudos científicos existentes sobre a *Mentha cervina*, acima descritos, são limitados e têm sido focados principalmente na composição química do óleo essencial. A actividade biológica de diferentes extractos tem sido pouco explorada. Até a data não foram realizados nenhuns testes a extractos obtidos com outros solventes para além da água, nem testado se existe alguma diferença representativa na actividade biológica e químicas dos extractos.

Assim, este trabalho teve como objectivo geral efectuar uma análise integrada da capacidade antioxidante e antimicrobiana de vários tipos de extractos de *Mentha cervina*. Os objectivos específicos incluíram a obtenção de diferentes extractos: aquosos (infusão da planta moída e inteira) e hidroetanólicos (maceração de caule, folha e mistura em diferentes percentagens de etanol) bem como óleo essencial obtido a partir de hidrodestilação da *M. cervina* e a caracterização da composição em compostos fenólicos dos extractos aquosos e hidroetanólicos por análise de extractos por LC-MS/MS. No seguimento do estudo foi realizado a determinação do teor de compostos fenólicos totais através da análise de Folin-Ciocalteu, da capacidade total antioxidante pelos métodos de ABTS<sup>+</sup> e TEAC (óleo essencial) e da capacidade antioxidante biológica pela análise de protecção da degradação do ADN. Para a finalização do estudo avaliou-se a capacidade antimicrobiana dos diferentes extractos, tendo sido avaliados um total de oito microrganismos (quatro Gram positivas, duas Gram negativas e duas leveduras).

## II. Material e Métodos

### 1. Material Vegetal

A *Mentha cervina* foi fornecida pela ERVITAL (Castro Daire, Portugal), produzida através de agricultura biológica e colhida aleatoriamente. A planta foi fornecida em forma de material seco, após a sua colheita na fase de desenvolvimento conhecida por maximizar a sua actividade terapêutica putativa, sendo esta a forma actual fornecida ao consumidor.

### 2. Extractos da *Mentha cervina*

Para efectuar a análise antioxidante e antimicrobiana da *Mentha cervina* foram utilizados três tipos de extractos: infusões (i.e. extractos aquosos), tinturas (i.e. extractos hidroetanólicos) e óleo essencial.

As infusões foram obtidas de acordo com Gião *et al.* (2007a), a partir da planta seca inteira ou moída. O extracto aquoso foi obtido por infusão durante 5 min. de 1 g de planta em 110 mL de água desionizada. Após a infusão, os extractos foram filtrados por papel de filtro e seguidamente por filtros de 0,45 µm. Este tipo de extracto foi analisado directamente pelos métodos de ABTS<sup>+</sup>, teor de fenólicos totais e actividade antimicrobiana. Após liofilização este extracto foi utilizado no teste da determinação da degradação do ADN por oxidação e na actividade antimicrobiana, sendo que até a sua utilização foram conservados a -20 °C.

As tinturas foram preparadas de acordo com Politi *et al.* (2008a) utilizando-se em cada extracção 5 g de planta seca: inteira (caule, folhas e flores), caules ou folhas. Os extractos resultaram da maceração de 5 g de material de planta em 50 mL de diferentes misturas hidroetanólicas durante três dias, ao abrigo da luz e sob agitação de 100 rpm e à temperatura ambiente. Neste estudo a percentagem de etanol utilizada (volume/volume) foi: 100 %, 65 % (para simular uma tintura farmacêutica clássica), 40 %, 20 % e finalmente 0 % (i.e. água, controlo). Após a maceração, os extractos foram filtrados sob vácuo, por um filtro de 0,45 µm. As tinturas foram testadas tal como o acima referido para as infusões, directamente ou em concentrados através da secagem por Speed Vacuum (CHRIST, Germany), uma vez que a percentagem elevada de etanol não permite a liofilização, e conservados a -20 °C até a sua utilização.

Por último o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, usando um aparelho tipo Clevenger (Fig.5). Em cada hidrodestilação foram utilizados 30 g de planta seca (previamente congelada a -20 °C) em 500 mL de água desionizada. Este preparado foi aquecido a 100 °C

durante 3 horas. O óleo essencial extraído foi conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização. A biomassa da planta (material da planta após fervura) foi seca a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h numa estufa. O rendimento do óleo essencial é expresso como o rácio entre o peso do óleo e o peso seco da planta.

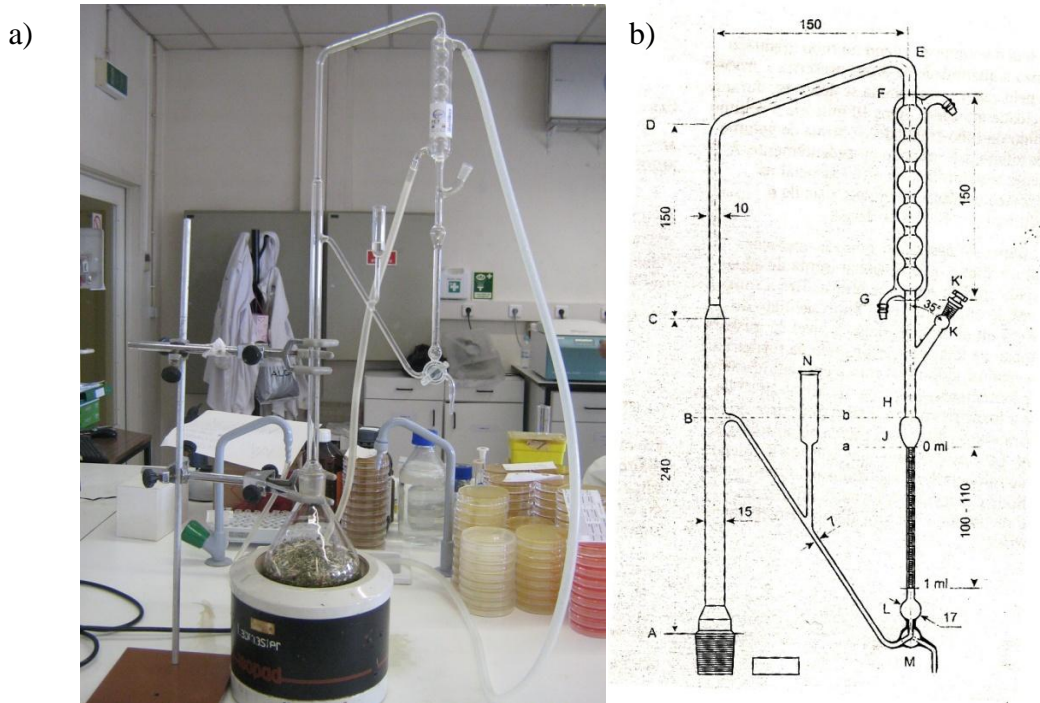


Figura 5 – a) Hidrodestilação com aparelho de Clevenger. b) Esquema do aparelho de condensação que se adapta a um balão(A), JL-tubo graduado, J-dilatação de 3 mL, L-dilatação em forma de esfera de 2 mL, M-torneira de 3 vias, N- tubo de enchimento (introdução de água até ao afloramento B e H), G- entrada e saída de água F para a refrigeração. Fonte: Farmacopeia Europeia, 2004

### 3. Capacidade antioxidante total

#### 3.1. ABTS<sup>·+</sup>

Para o estudo das amostras aquosas e hidroetanólicas foi utilizado o método do radical catiónico ABTS<sup>·+</sup> de acordo com Gião *et al.* (2007a). Esta técnica utiliza o catião ABTS<sup>·+</sup>, que é originado pela reacção de ABTS e o persulfato de potássio que produz uma cor azul/verde. De forma a obter uma solução estável de ABTS<sup>·+</sup> dissolve-se o catião em água ultra-pura, esta solução é preparada a partir da mistura na proporção 1:1 (v/v) de uma solução de ABTS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a  $7\text{ mmol L}^{-1}$  com uma solução de persulfato de potássio (Merck, Damstadt, Germany) a  $2,45\text{ mmol L}^{-1}$ . A mistura obtida é mantida à temperatura ambiente durante 16 h ao abrigo da luz. A solução ABTS<sup>·+</sup> é posteriormente diluída em água ultra-pura de forma obter uma absorvância de  $0,700 \pm 0,020$  a um comprimento de onda de 734 nm. Na análise efectuada o volume de amostra utilizado foi de

10  $\mu\text{L}$  em 1 mL de solução  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  de modo a obter-se uma percentagem de inibição (PI) entre 20 a 80 % após 6 min de reacção. A PI é calculada através da seguinte equação,

$$\text{PI} = ((\text{Abs.}_{\text{ABTS}^{\cdot+}} - \text{Abs.}_{\text{amostra}}) / \text{Abs.}_{\text{ABTS}^{\cdot+}}) \times 100, \quad (\text{Eq. 5})$$

onde  $\text{Abs.}_{\text{ABTS}^{\cdot+}}$  representa absorvância inicial da solução de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  e  $\text{Abs.}_{\text{amostra}}$  representa absorvância da amostra após uma reacção de 6 min.. Através da curva de calibração (Anexo1), preparada com soluções padrão de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a várias concentrações, o resultado final é expresso como concentração equivalente de ácido ascórbico em  $\text{g L}^{-1}$ .

### 3.2. TEAC

Para a análise da capacidade antioxidante total do óleo essencial utilizou-se o método TEAC (TROLOX equivalent antioxidant capacity) descrito por Santos *et al.* (2009). Esta técnica é realizada para substâncias que não se dissolvem em água. Trata-se de um o método semelhante ao anteriormente descrito com pequenas diferenças, nomeadamente a necessidade de preparação da amostra, o solvente para a diluição da solução concentrada  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  é diferente tal como o volume de amostra usado para a reacção 6 min. e o TROLOX (Sigma-Aldrich, Germany) é o padrão usado. O óleo essencial analisado foi dissolvido numa mistura de 50:50 etanol e tolueno, utilizando-se 0,25 g de amostra em 2,5 mL da mistura. Nesta análise o volume de amostra (óleo essencial mais etanol e tolueno) utilizado foi de 50  $\mu\text{L}$  para 1 mL de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , o antioxidante presente na amostra vai reagir durante 6 min., nos quais o  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  muda de cor verde marinho intenso para um verde mais claro ou até transparente. Os resultados quantitativos são expressos em concentração equivalente de TROLOX ( $\text{g L}^{-1}$ ), composto padrão correspondente a um equivalente hidrossolúvel da vitamina E. O  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  não é estável em tolueno mas só em etanol puro sendo necessário eliminar o efeito do tolueno de forma a obter-se uma percentagem de inibição (PI) entre 20 a 80 %. A PI é obtida através da seguinte equação,

$$\text{PI} = ((\text{Abs.}_{\text{solvente}} - \text{Abs.}_{\text{amostra}}) / \text{Abs.}_{\text{ABTS}^{\cdot+}}) \times 100, \quad (\text{Eq. 6})$$

onde  $\text{Abs.}_{\text{ABTS}^{\cdot+}}$  representa absorvância inicial do  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ,  $\text{Abs.}_{\text{amostra}}$  representa absorvância da amostra após uma reacção de 6min. e  $\text{Abs.}_{\text{solvente}}$  caracteriza absorvância  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  mais a mistura etanol e tolueno (50:50). Através da curva de calibração (Anexo 2) preparada com o padrão para um intervalo de concentração de 0,03 mM a 0.40 mM, expressa-se o resultado final como concentração equivalente de TROLOX em  $\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3. Teor de fenólicos totais

A concentração dos compostos fenólicos foi determinada como é descrito por Gião *et al.* (2007). Esta técnica é baseada na reacção de oxidação de polifenóis com o reagente Folin-Ciocalteu num meio básico, originando uma solução azul. A solução é analisada no comprimento de onda de 750 nm sendo a intensidade da cor directamente proporcional à quantidade total de polifenóis do meio. A 0,05 mL de amostra foi adicionado 0,05 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany), 1 mL de carbonato de sódio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a 75 g L<sup>-1</sup> e água destilada de forma obter um volume final de 2,5 mL. A absorvância da solução então obtida foi medida a 750 nm após 1 h de reacção, à temperatura ambiente e na ausência de luz. O ácido gálico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) foi utilizado como padrão, sendo o teor de fenóis totais apresentado como a concentração equivalente ao ácido gálico em g L<sup>-1</sup> usando a equação 7

$$C = (\text{Abs.}_{\text{amostra}} - 0,0827) / 1,6289 \quad (\text{Eq. 7})$$

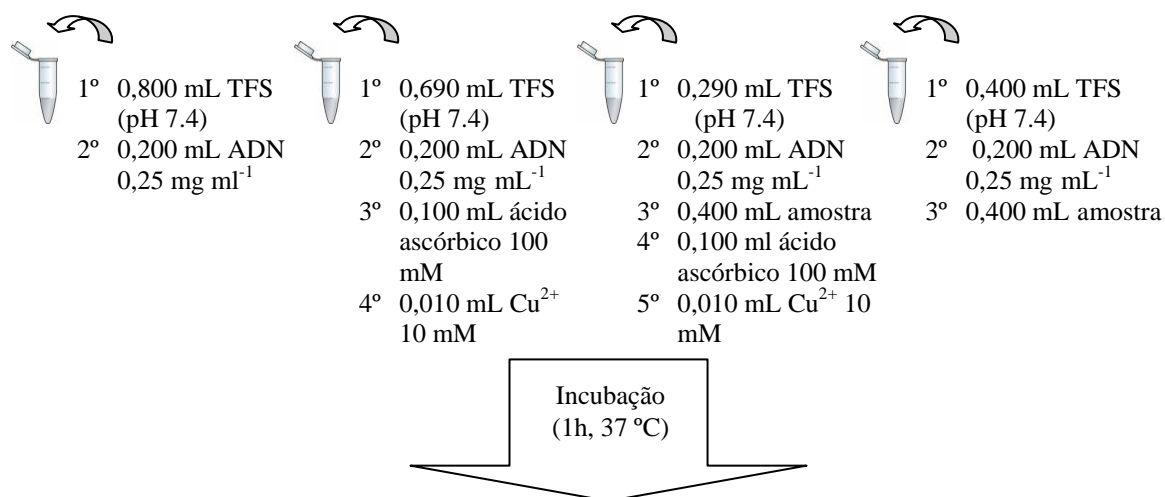
onde Abs.<sub>amostra</sub> é absorvância da amostra após 1 h de reacção (Anexo 3).

### 3.4. Determinação da degradação do ADN por oxidação.

Na qualificação da degradação do ADN por oxidação utilizou-se o método descrito por Gião *et al.* (2007b). O método avalia a capacidade antioxidante e pró-oxidante das amostras. De acordo com a Figura 6 para cada amostra são preparadas as seguintes soluções com DNA: (i) 800 µL de tampão fosfato de sódio (Panreac, Barcelona, Spain (pH 7.4; 100 mmol L<sup>-1</sup>)) e 200 µL de ADN de timo de bezerro a 0,25 mg mL<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) para o controlo positivo que evidencia o DNA intacto sem oxidação, (ii) 690 µL tampão fosfato de sódio, 200 µL de ADN, 100 µL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a 100 mmol L<sup>-1</sup> e 10 µL de sulfato de cobre II a 10 mmol L<sup>-1</sup> (Panreac, Barcelona, Spain) para o controlo negativo que evidencia o DNA fragmentado por oxidação, (iii) 290 µL de tampão fosfato de sódio, 200 µL de ADN, 400 µL de amostra, 100 µL de ácido ascórbico e 10 µL de sulfato de cobre II para estudo do actividade antioxidante sobre o DNA, (iv) 400 µL tampão fosfato de sódio, 200 µL de ADN e 400 µL de amostra para estudo do actividade pró-oxidante sobre o DNA

As diferentes soluções obtidas foram posteriormente incubadas durante 1 h a 37°C. De seguida 9 µL de cada solução foram misturados com 1 µL de corante (20 % (w/v) de glicerol com 0,1 % (w/v) de azul de bromofenol). Esta mistura foi colocada nos poços de gel de

agarose a 1 % (agarose tipo I A). Este gel foi preparado com tampão Tris Acetato EDTA e com 7,5  $\mu\text{L}$  brometo de etídio. A electroforese foi corrida usando o modelo 100/500 de fonte de energia da Bio-Rad a 150 V durante 30 min.. As bandas de ADN foram digitalizadas usando o Gel Doc (Bio-Rad). Nesta análise as amostras foram testadas nas seguintes concentrações: 40, 60 e 80  $\text{mg mL}^{-1}$ , sendo que o óleo essencial teve que ser dissolvido numa solução de 10 % de DMSO (dimethylsulfoxide).



**Figura 6 – Esquema de preparação de amostras e controles para aplicação em gel de agarose: (i) controlo positivo, (ii) controlo negativo, (iii) efeito antioxidante, (iv) efeito pró-oxidante.**

### 3.5. LC-MS/MS

A análise de LC-MS/MS dos extractos aquosos e hidroetanólicos da *M. cervina* foi efectuada de acordo com Dimeray *et al.* (2009) e Politi *et al.* (2008a). O sistema de cromatografia utilizado é constituído por uma bomba Prostar LC 210 (Varian, CA, E.U.A) que está acoplada a um espectrómetro de massa triplo/quadruplo 1200 Varian (Varian, CA, E.U.A) com modo positivo e negativo de ionização de electrospray. Uma coluna de 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  100 mm, Merck) foi utilizada para a separação com uma taxa de fluxo de 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ . A separação da cromatografia líquida foi realizada em 30 min., utilizando um gradiente de eluição (eluente A, água com 0,1% de ácido fórmico; eluente B, 100% metanol). A detecção do ESI-MS/MS foi obtida usando uma tensão capilar de 55V. Para a fragmentação do MS/MS foram utilizados os átomos de árgon (pressão de 1,20 mtorr; energia de colisão de 15 V). Os dados foram adquiridos com o LC-MS Varian Workstation 1200 L, sendo criada uma biblioteca através da injeção de padrões fenólicos puros usando as condições de LC-MS/MS já referidas. A identificação dos extractos de *M. cervina* foi alcançada através da injeção

directa do extracto bruto e comparação dos compostos separados com a biblioteca de compostos existentes.

## **4. Actividade Antimicrobiana**

### **4.1. Estirpes microbianas**

O óleo essencial e os extractos aquosos e hidroetanólicos foram testados individualmente contra seis bactérias: *Escherichia coli* (NCTC 9001), *Salmonella* spp. (ATCC 3076), *Staphylococcus aureus* (NCTC 8532), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Listeria innocua* (NCTC 11286) (utilizada como modelo de *Listeria monocytogenes*) e duas leveduras: *Candida albicans* (isolado clínico) e *Yarrowia lipolytica* (isolado alimentar). As bactérias foram cultivadas em Nutrient Agar (NA; Biokar, France) a 37 °C por 24 h e as leveduras em Yeast Malt Agar (YMA; Difco, UK) a 30 °C por 24 e 48 h, respectivamente.

### **4.2. Método de difusão em agar por poços**

Para a determinação do efeito de inibição dos extractos aquosos e hidroetanólicos nos microrganismos utilizou-se o método de difusão em agar por poços. As culturas bacterianas foram inoculadas durante noite a 37 °C em NA e as leveduras a 30 °C em YMA. Colónias isoladas das culturas de microrganismos foram suspensas numa solução estéril de 0,9 % NaCl de modo atingir uma densidade óptica correspondente à turbacão padrão de 0,5 na escala Mcfarland (cerca de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Com uma zaragatoa estéril espalhou-se o inóculo por toda a superfície de Muller-Hinton Agar -MHA (Biokar, Allonne, Beauvais) no caso das bactérias e em YMA no caso das leveduras. Após 30 min., com ajuda de uma pipeta de Pasteur estéril, realizaram-se orifícios nas placas (5 por placa) para os extractos e controlos negativos e positivos. Cada orifício foi preenchido com 50 µL de cada amostra/controlo previamente esterilizados por filtração com filtro estéril de 0,22 µm. Como controlo negativo usou-se água estéril. Como controlo positivo utilizou-se: ampicilina a 100 µg mL<sup>-1</sup> (Sigma, Germany) para a *L. innocua*, clorofenicol a 100 µg mL<sup>-1</sup> (Sigma, Germany) para as restantes bactérias e uma solução de 50 % de ácido acético para as leveduras. A análise foi realizada em duplicado e em duas experiências, as amostras foram analisadas directamente e concentradas num intervalo de 40 mg mL<sup>-1</sup> a 80 mg mL<sup>-1</sup>; os solventes das amostras também foram testados para confirmar a ausência de efeito. As placas de Petri foram incubadas a 37

°C durante 24 h no caso das bactérias e as restantes a 30 °C, sendo *Y. lipolytica* incubada por 48 h. Após a incubação foi medido o diâmetro do halo de inibição.

### **4.3. Método de difusão em disco**

O método de difusão em disco foi realizado para determinar actividade antimicrobiana do óleo essencial. Esta técnica é idêntica á anterior, excepto que neste método utilizou-se discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) que foram impregnados com 10 µL de amostra ou controlos e as concentrações destes últimos foram diferentes (ampicilia 250 µg mL<sup>-1</sup> e o clorofenicol a 750 µg mL<sup>-1</sup>).

### **4.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória**

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) das amostras utilizou-se análise de susceptibilidade por microdiluição em meio líquido. O extracto que exibiu efeito antimicrobiano (óleo essencial) foi utilizado de forma a confirmar a inibição observada pelos métodos anteriores. A solução stock do óleo essencial foi preparada em meio líquido de modo a obter uma série de diluições num intervalo de 0,625 µL mL<sup>-1</sup> a 160 µL mL<sup>-1</sup>. As placas de 96 poços foram preparadas para a distribuição de 0,300 mL das seguintes soluções:

- (1) Controlo positivo, 0,980 mL de Muller-Hinton Broth (Biokar, France) para as bactérias ou Yeast Malt Broth (Difco, UK) para as leveduras mais 20 µL de inóculo de microrganismos à concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL;
- (2) Controlo negativo, 1,0 mL de MHB ou YMB
- (3) Efeito da amostra, 0,980 mL de MHB ou YMB e amostra mais 20 µL de inóculo de microrganismos à concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL;

As microplacas foram incubadas a 37 °C (bactérias) ou a 30 °C (leveduras) durante 24 h, à excepção da *Y. lipolytica* em que o tempo de incubação foi 48 h. A incubação foi efectuada no leitor de Microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH) que realizou leituras de 30 em 30 min., permitindo obter as curvas de inibição para além da determinação da CMI. A CMI é dada pela diluição mais elevada (a concentração mais baixa) que apresenta crescimento visível. A experiência foi efectuada em triplicado.

## **5. Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos, nomeadamente da parte da planta e tipo de solvente ('dois factores' ANOVA), e da temperatura usada no método de extracção ('um factor' ANOVA) na concentração de antioxidante total e no teor de fenólicos totais. Caso o efeito fosse significativo, foi levada a cabo a separação das médias pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). As análises foram efectuadas usando SPSS 19.0.0 software (SPSS, Chicago IL, USA).

### III. Resultados e Discussão

#### 1. Extractos de *Mentha cervina*

Para a produção de extractos aquosos (infusão) utilizou-se 1 g de *Mentha cervina* em pó ou inteira em 110 mL de água enquanto que para a produção de extractos hidroetanólicos (tinturas) foram utilizados 5 g de planta (caule, folhas ou mistura) em 50 mL de mistura etanol/água. Através da liofilização dos extractos aquosos obteve-se em média  $0,129 \pm 0,013$  g de peso seco da infusão da planta em pó e  $0,130 \pm 0,012$  g da infusão da planta inteira, revelando que não existe influência do tipo de amostra na quantidade obtida de extracto seco. No caso dos extractos hidroetanólicos recorreu-se ao Speed Vacuum para eliminar o etanol, tendo-se obtido valores de peso seco num intervalo de  $0,005 \pm 0,001$  g no extracto resultante da tintura do caule em 100 % de etanol a  $0,050 \pm 0,003$  g no extracto da mistura da planta obtido com 20 % de etanol (Tabela 7). De um modo geral, independentemente da parte da planta os extractos com 20, 40 e 65 % de etanol apresentam uma maior quantidade de extracto seco, comparativamente aos extractos com 0 e 100 % etanol – sendo que os últimos possuem uma menor capacidade de extracção. Uma vez que em 100 g de planta seca, designada como mistura, 50,4 % é composta por caules, 47,3 % por folhas e os restantes 2,3 % flores, os resultados obtidos indicam que as flores presentes na mistura são provavelmente as responsáveis pelo aumento do peso seco dos extractos.

**Tabela 7 – Peso seco dos diferentes extractos hidroetanólicos estudados (média  $\pm$  desvio padrão)**

Parte da Planta	Concentração de etanol (%)	Peso seco (g/g)
Caule	0	$0,018 \pm 0,004$ cd
	20	$0,029 \pm 0,004$ e
	40	$0,026 \pm 0,002$ e
	65	$0,025 \pm 0,003$ de
	100	$0,005 \pm 0,001$ a
Folhas	0	$0,028 \pm 0,003$ e
	20	$0,039 \pm 0,002$ f
	40	$0,040 \pm 0,001$ f
	65	$0,038 \pm 0,003$ f
	100	$0,010 \pm 0,001$ ab
Mistura	0	$0,038 \pm 0,013$ f
	20	$0,050 \pm 0,003$ h
	40	$0,049 \pm 0,002$ gh
	65	$0,043 \pm 0,001$ fg
	100	$0,013 \pm 0,001$ bc

O método de extracção (maceração a frio ou infusão) utilizando a mistura da planta demonstrou influenciar a quantidade de extracto seco obtida uma vez que a infusão apresenta uma quantidade de extracto seco superior ( $0,130 \pm 0,012g$ ) ao extracto obtido por maceração a 0 % de etanol.

A quantidade de óleo essencial isolado da *Mentha cervina* correspondeu a 1,3 % do peso seco da planta. Este valor é inferior ao reportado por Rodrigues *et al.* (2008), que obtiveram um rendimento de óleo de 2,4-4,0 %, mas está de acordo com o rendimento referenciado por Vidaurreta *et al.* (1999) de 1,5 % de óleo essencial da *M. cervina*. Tendo por base um estudo levado a cabo por Araújo *et al.* (2002), que analisou o rendimento do óleo essencial de quatro espécies da família das *Lamiaceae*, o rendimento da *Mentha cervina* neste estudo foi largamente superior ao da *Melissa officinalis* (0,14 %) e ao da *Salvia officinalis* no caso do óleo extraído da parte aérea da planta (1,01 %). No entanto, o rendimento foi inferior ao obtido para a *Mentha piperita* (1,71 %), óleo da parte aérea, para a *S. officinalis* (2,10 %) e para a *Lavandula angustifolia* (4,66 %) no caso de óleos extraídos das flores. Como tal, concluiu-se que a quantidade de óleo essencial depende das espécies e das partes da planta a partir do qual este é extraído. Deste modo, o facto do óleo essencial da *Mentha cervina* apresentar um rendimento inferior a *S. officinalis* e *L. angustifolia* pode dever-se ao facto de este ter sido extraído de uma mistura de planta (caules, folhas e flores) e não apenas de flores.

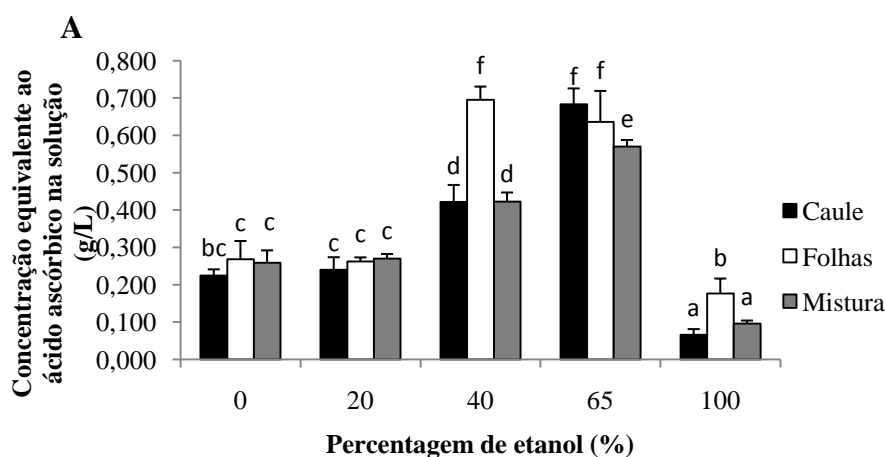
## 2. Actividade Antioxidante Total

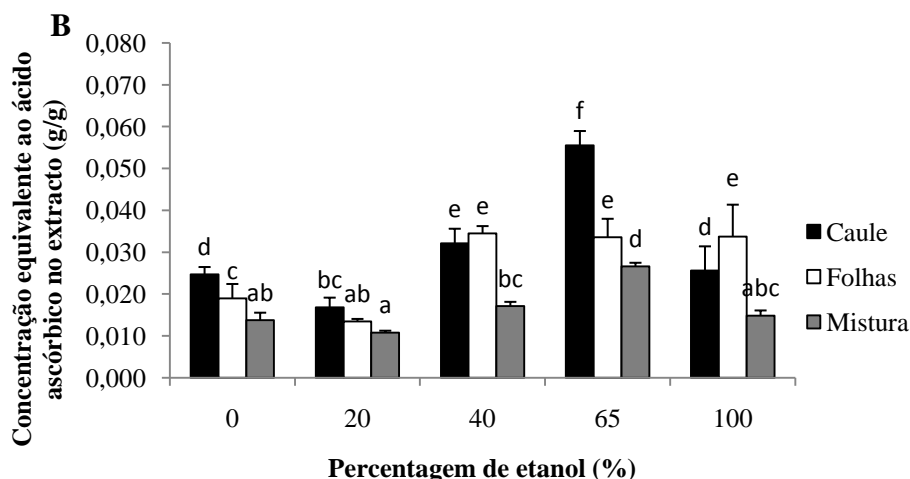
Na determinação da actividade antioxidante dos extractos utilizou-se os métodos de ABTS<sup>·+</sup> (extractos aquosos e hidroetanólicos) e TEAC (óleo essencial). A actividade antioxidante total foi complementada com o teor em fenólicos totais para os extractos aquosos e hidroetanólicos. Existem várias formas de expressar os resultados sobre a capacidade antioxidantes, o que dificulta a comparação entre estudos de amostras similares. A análise pelo método de ABTS<sup>·+</sup> é normalmente realizada por um valor fixo final interpolado numa curva de calibração de TROLOX expresso em equivalentes a TROLOX ou outro padrão como é o caso do ácido ascórbico. Outro método de expressar os resultados é por percentagem de inibição, no entanto esta vai depender da concentração do radical e da amostra, não sendo possível a comparação entre estudos (Péres-Jiménez *et al.* 2008) e por isso a menos utilizada.

## 2.1. Concentração antioxidante total (método ABTS<sup>•+</sup>)

No caso da actividade antioxidante das tinturas a concentração equivalente ao ácido ascórbico das soluções da *Mentha cervina* variaram entre  $0,066 \pm 0,015 \text{ g L}^{-1}$  do caule extraída a 100 % de etanol até  $0,695 \pm 0,036 \text{ g L}^{-1}$  da folha extraída a 40% etanol. Os restantes valores encontram-se no Anexo 4. De um modo geral a extracção com 65 % de etanol apresenta uma maior actividade antioxidante, para as diferentes partes da planta. No entanto na folha a capacidade antioxidante do extracto com 40 % e 65 % de etanol não é significativamente diferente (Fig. 7A) ( $P > 0,05$ ). A extracção com 100 % de etanol foi a que apresentou menor actividade antioxidante nos três tipos da parte das plantas. No caso da extracção com 0 e 20 % de etanol não existe diferença significativa entre as partes da planta utilizada na extracção e o solvente. Verifica-se que a concentração de antioxidante total na solução das tinturas analisada pelo método de ABTS<sup>•+</sup> foi significativamente ( $P < 0,001$ ) influenciada pela interacção entre a parte da planta e a percentagem de etanol usada na extracção.

Em estudos realizados com extractos aquosos e hidroetanólicos verifica-se que a capacidade antioxidante total usando o método de eliminação de radicais livres, o extracto aquoso tem uma maior capacidade antioxidante que o extracto etanólico (100 % de etanol). Turkmen *et al.* (2006) observou que na análise a chá preto e chá mate preto a extracção de antioxidantes com 100 % de água é mais eficiente que com 100 % de etanol. Estes autores também concluíram que os extractos obtidos com solventes de elevada polaridade são consideravelmente mais eficientes na eliminação de radicais livres que o solventes com baixa polaridade. No entanto, à semelhança do nosso estudo, os extractos hidroetanólicos (50 e 80% de etanol), apresentam uma actividade superior à do extracto aquoso. Esta observação indica-nos que existe uma interacção sinérgica entre água e o etanol.





**Figura 7 - Capacidade antioxidante total dos extractos hidroetanólicos analisada directamente na solução pelo método de ABTS<sup>+</sup> (A) e posteriormente calculada tendo por base o extracto seco (B). Barras que apresentam a mesma letra minúscula (a – f) não são significativamente diferentes (P>0,05). <sup>†</sup> - Representa o erro padrão.**

Uma vez que para o mesmo volume de tinturas e após a sua secagem obtiveram-se pesos secos diferentes realizou-se o cálculo da capacidade antioxidante total tendo como base 1 g L<sup>-1</sup> de extracto seco (Anexo 5; Fig. 7B). A concentração de antioxidantes total pelo método ABTS<sup>+</sup> foi uma vez mais significativamente (P<0,001) influenciada pela interacção entre a parte da planta e a percentagem de etanol do extracto (Fig.7B). Com base no extracto seco a tintura obtida a partir do caule com 65% de etanol têm a maior capacidade antioxidante em relação às restantes tinturas obtidas (Fig. 7B). A actividade antioxidante da extracção a 0, 65 e 100 % de etanol é diferente nos três tipos de parte da planta, sendo de um modo geral superior no caule, seguido das folhas e significativamente menor na mistura. Estes dados indicam-nos que embora com a mesma concentração a composição destes extractos é diferente em termos de compostos antioxidantes, dando ainda indicação que nas flores a capacidade antioxidante é inferior, explicando assim a menor actividade antioxidante da mistura tendo por base o extracto seco (Fig. 7B). Aliás, anteriormente foi evidenciado que as flores presentes na mistura poderiam ser as responsáveis pelo aumento do peso seco dos extractos de mistura, mostrando agora reduzir globalmente a sua actividade antioxidante.

Estudos anteriores demonstram que existe uma diferença na actividade antioxidante entre o caule e a folha. Por exemplo, Adedapo *et al.* (2009) observou que a actividade antioxidante, determinada pelo método de DPPH, de extractos metanólicos (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) de folha de *Celtis africana* obtidos por maceração é inferior ao caule. No mesmo estudo foi igualmente testado o método de ABTS<sup>+</sup> e para a mesma concentração observou-se que a actividade antioxidante

é semelhante no caule e na folha, no entanto as concentrações inferiores a  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  o caule apresenta maior actividade que a folha. De igual modo, num estudo realizado por Ganiyat *et al.* (2011) ao óleo essencial de *Dieffenbachia picta* obtido a partir de caule e folhas, verificou-se que a actividade antioxidante do caule analisada pelo método de DPPH era superior à da folha. Estes estudos estão de acordo com os nossos resultados já que o extracto hidroetanólico que apresenta uma maior quantidade de antioxidante equivalente ao ácido ascórbico foi resultante da extracção do caule.

No caso dos dois tipos de infusões a capacidade antioxidante total pelo método de ABTS<sup>·+</sup> foi significativamente influenciada pelo tratamento das amostras ( $P=0,000$ ), neste caso o material moído (pó) permitiu obter uma maior quantidade de antioxidantes,  $0,160 \pm 0,009 \text{ g L}^{-1}$  equivalentes a ácido ascórbico, (Fig. 8A). A eficácia do processo de extracção entre sólido e líquido é afectado por vários parâmetros do processamento da amostra, como a temperatura, o tamanho da partícula da amostra e o tempo de extracção. De acordo com Gião *et al.* (2009) quanto menor for o tamanho da partícula maior é a área de superfície disponível para o transporte molecular, contribuindo para elevada transferência de massa do soluto entre as fases. Tal como no nosso estudo Gião *et al.* (2007a) analisaram a capacidade antioxidante a infusões obtidas através da planta inteira e moída (pó) pelo método de ABTS<sup>·+</sup>. Nesse estudo utilizaram três espécies de Menta, a *M. spicata*, a *M. piperita* e *M. pulegium* e observaram que as infusões em pó destas apresentaram uma maior quantidade de antioxidantes que a planta inteira. Comparando os dados de Gião *et al.* (2007a) com *M. cervina* estudada no presente trabalho a infusão em pó desta tem uma maior capacidade antioxidante que a infusão obtida pela *M. spicata* ( $0,144 \pm 0,073 \text{ g L}^{-1}$ ), o mesmo não se dá em relação as restantes mentas. A *M. spicata* tem entre as suas aplicações comuns na medicina tradicional a função de digestivo que é também a utilização que se dá a *M. cervina*, pelo que se deverá optar pela infusão em pó desta última uma vez que tem uma maior capacidade antioxidante. A infusão da planta inteira da *M. cervina* tem uma capacidade antioxidante total inferior ( $0,044 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1}$ ) às três mentas analisadas por Gião *et al.* (2007a) em infusão com a planta inteira.

Realizou-se também a análise da capacidade antioxidante total das infusões calculada com base no extracto seco (Fig. 8B), mas ao contrário das tinturas estas mantiveram a mesma relação. Assim, e uma vez mais, se verificou que a infusão em pó demonstrou uma maior capacidade antioxidante total cerca de 4 vezes superiores à infusão com a planta inteira. Estes dados confirmam o que foi observado no caso das tinturas, as infusões não diferem significativamente no peso seco sendo por isso a composição química desta que influencia a sua actividade antioxidante.

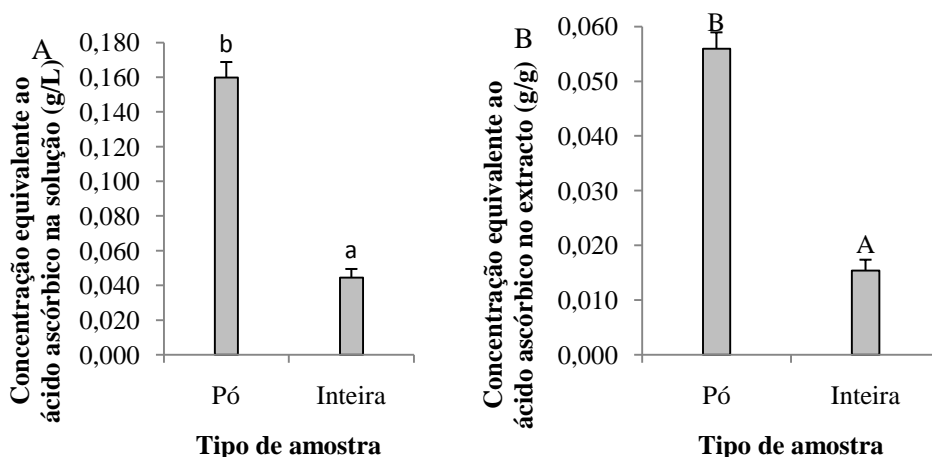


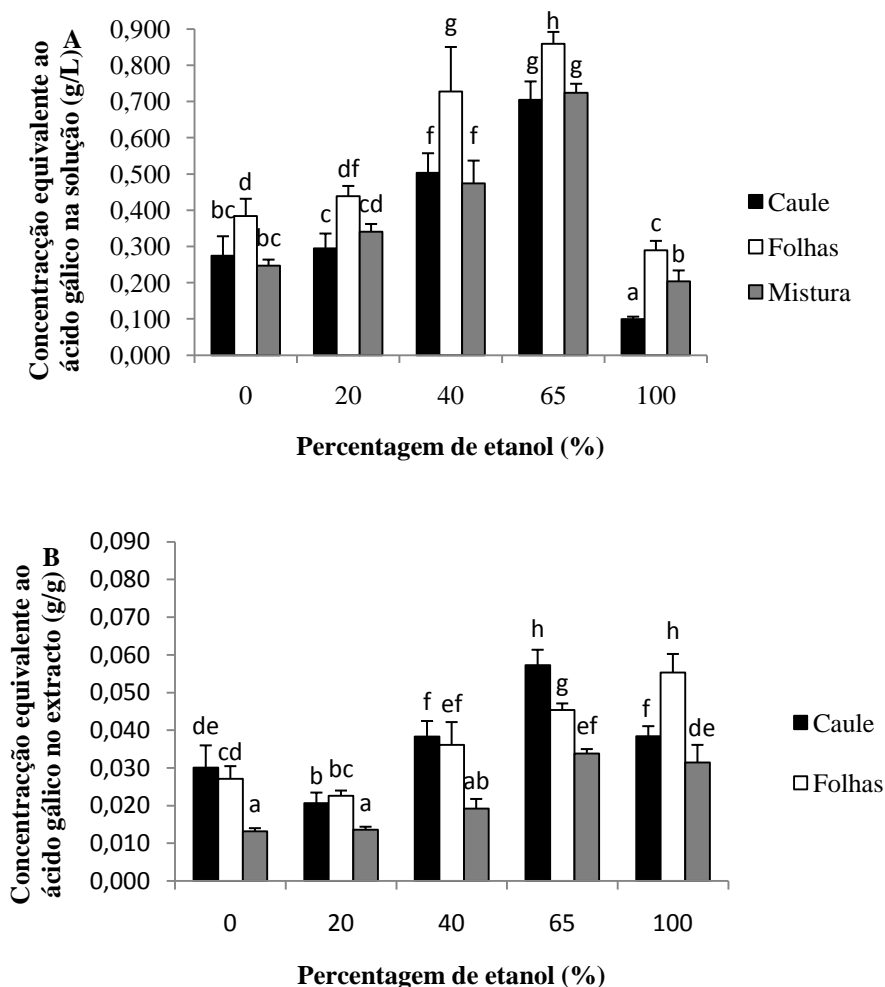
Figura 8 – Capacidade antioxidante total dos extractos aquosos analisada directamente na solução pelo método de ABTS<sup>+</sup> (A) e posteriormente calculada tendo por base o extracto seco (B). Barras que apresentam a mesma letra minúscula ou maiúsculo (a – b) não são significativamente diferentes (P>0,05). <sup>†</sup> - Representa o erro padrão.

## 2.2. Teor de fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu)

Na análise do teor de fenólicos totais a partir do método Folin-Ciocalteu observou-se que a concentração equivalente ao ácido gálico das soluções de tinturas varia entre  $0,099 \pm 0,007 \text{ g L}^{-1}$  do caule resultante da extracção a 100 % de etanol até  $0,859 \pm 0,032 \text{ g L}^{-1}$  da folha a 65 % etanol (Fig. 9A). Os valores do teor de fenólicos totais das soluções de todas as tinturas encontram-se no Anexo 4. As tinturas obtidas com 65 % etanol apresentaram o maior teor de fenólicos totais. Ao mesmo tempo, verificou-se que para todos os tipos de solventes, os extractos das folhas resultaram numa maior quantidade de fenóis em solução que o caule e a mistura, que não são significativamente diferentes entre si (P>0.05). Á semelhança dos resultados obtidos na capacidade antioxidante total, observou-se que a extracção com 100 % etanol foi a que originou um menor teor de fenólicos totais, seguida da extracção com 0 e 20 % etanol. Verifica-se que o teor de fenóis total na solução das tinturas analisadas pelo método de Folin-Ciocalteu não foi significativamente (P=0,084) influenciado pela interacção entre a parte da planta e a percentagem de etanol usada na extracção.

De acordo com Turkmen *et al.* (2006), o teor de fenóis totais assim como a capacidade antioxidante referida anteriormente é afectado pelo solvente utilizado na extracção. Assim a quantidade de compostos fenólicos num extracto varia com a concentração do solvente, o método utilizado e a planta. A distribuição dos metabolitos secundários pode ainda variar entre os diferentes órgãos da planta (Demiray *et al.* 2009). Os extractos resultantes da folha da

*M. cervina* apresentaram um teor de fenóis totais na solução mais elevado que o caule (Fig. 9A).

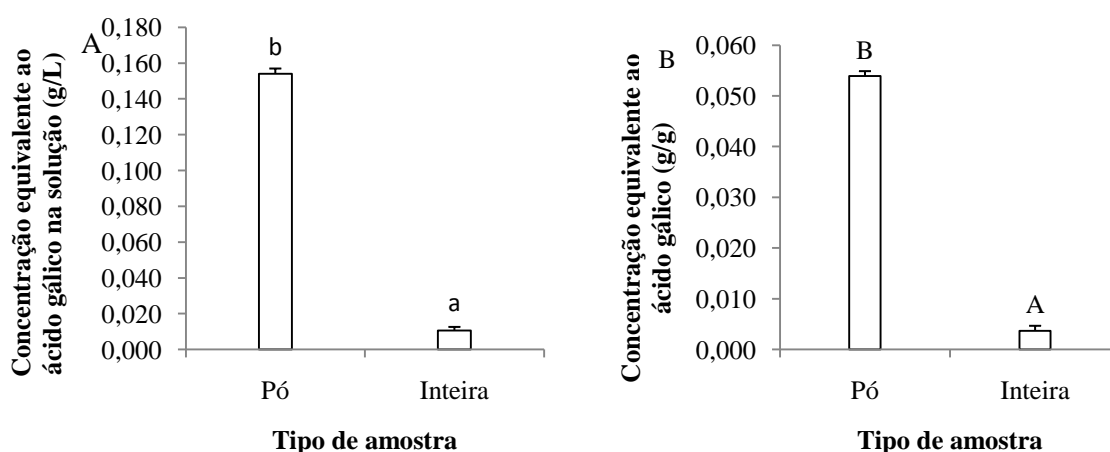


**Figura 9 – Teor de fenólicos totais dos extractos hidroetanólicos analisado directamente na solução pelo método Folin-Ciocalteu (A) e posteriormente calculada tendo por base o extracto seco (B). Barras que apresentam a mesma letra minúscula (a – f) não são significativamente diferentes ( $P>0,05$ ).  $\top$  - Representa o erro padrão.**

Foi calculado, tal como no caso da capacidade antioxidante total, o teor de fenóis totais com base no extracto seco (Anexo 5; Fig. 9B). A partir deste cálculo, as folhas deixaram de assumir uma posição de destaque relativamente ao caule e mistura, excepto a 100 % etanol, onde estas representam uma concentração em equivalentes de ácido gálico significativamente superior. O extracto hidroetanólico do caule a 65 % de etanol e o de folhas a 100 % de etanol têm quantidades semelhantes de compostos fenólicos, sendo os extractos com a maior quantidade de fenóis:  $0,057 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,055 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Estes dados mostram-nos que o teor de fenóis depende do solvente e da parte da planta utilizada ( $P<0,001$ , tal como já observado para a capacidade antioxidante).

Outros estudos demonstraram a presença de compostos fenólicos, antioxidantes naturais, em extractos etanólicos e aquosos de várias plantas usadas como condimentos em alimentos portugueses, incluindo duas mentas. O extracto etanólico da *M. piperita* e da *M. pulegium* mostraram uma maior quantidade de compostos fenólicos do que extracto aquoso (Mata *et al.* 2007). Estes resultados estão de acordo com o nosso estudo quando a análise é efectuada com base no extracto seco.

Simultaneamente, neste estudo demonstrou-se que a quantidade de fenólicos totais nas infusões depende da preparação das amostras (Fig. 10A), tal como aconteceu anteriormente no caso da capacidade antioxidante a infusão em pó apresenta uma maior quantidade de fenólicos totais ( $0,154 \pm 0,003 \text{ g L}^{-1}$  equivalentes a ácido gálico), sendo que a infusão da planta inteira apenas evidenciaram  $0,011 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$  equivalentes a ácido gálico. A mesma tendência foi observada quando se realizou o cálculo do teor de fenólicos totais com base no peso seco (Fig. 10B).



**Figura 10 - Teor de fenólicos totais dos extractos aquosos analisado directamente na solução pelo método Folin-Ciocalteu (A) e posteriormente calculada tendo por base o extracto seco (B). Barras que apresentam a mesma letra minúscula e maiúscula (a – b) não são significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ).  $\pm$  - Representa o erro padrão**

De entre os métodos avaliados, a infusão em pó, assim como o solvente 65 % etanol para o caule, são os extractos mais eficazes, dado possuírem um teor de fenólicos totais e a actividade antioxidante mais elevada. Porém, infusões em pó e planta inteira de *M. piperita*, *M. spicata* e *M. pulegium* apresentaram uma maior quantidade de fenólicos (Gião *et al.* 2007a) que a *M. cervina* analisada no presente trabalho. No estudo realizado por Gião *et al.* (2007a) a capacidade antioxidante detectada é directamente associada com a quantidade de fenóis. A *M. cervina* apresenta uma actividade antioxidante superior a *M. spicata* na infusão

em pó, mas o seu teor de fenóis é inferior, demonstrando que outros compostos além de fenóis estão presentes na menta estudada, contribuem para a actividade antioxidante total. Politi *et al.* (2008) demonstraram que o material seco da *M. cervina* contém uma elevada quantidade de limoneno e isomentona (terpenos), metabolitos secundários das plantas que podem ser responsáveis pela sua actividade antioxidante.

Tal como o efectuado na análise da capacidade antioxidante das infusões também se realizou o cálculo do teor de fenóis totais com base no peso seco de 1 g L<sup>-1</sup> (Fig. 8B), a infusão em pó apresentou o maior teor de fenóis totais equivalentes a ácido gálico 0,054 ± 0,001 g L<sup>-1</sup> do que infusão inteira 0,004 ± 0,001 g L<sup>-1</sup>. As infusões mantiveram a mesma tendência e como referido anteriormente os dados demonstram que a composição química de cada infusão é diferente.

De acordo com estudos disponíveis, a capacidade antioxidante e o teor em fenólicos totais dependem do método de extracção utilizado (Gião *et al.* 2007a e Pérez-Jiménez *et al.* 2008). Com base nos resultados obtidos neste estudo foi possível efectuar a comparação entre os métodos de extracção utilizados para obtenção de extractos aquosos por maceração a frio (25 °C; 72 h) e por infusão (100 °C; 5 min.) da planta inteira da *M. cervina* (Fig. 11). O método de infusão deu origem a um extracto mais diluído tendo-se aplicado a diluição 1:10 (amostra/solvente) nos dados obtidos pelo método de maceração. A actividade antioxidante analisada directamente na solução foi maior na infusão mas o teor de fenólicos foi inferior ao da maceração (Fig. 11A). Porém, como o extracto seco da infusão foi muito superior ao da maceração, verificou-se que a capacidade antioxidante com base no peso seco não foi influenciada pelo método (temperatura e tempo de extracção), mas no caso da quantidade de fenólicos a maceração a frio permitiu alcançar um maior teor do que com água a ferver (Fig. 11B). A obtenção de compostos fenólicos totais foi significativamente (P <0,05) influenciada pelo método de extracção utilizado. Gião *et al.* (2009) analisaram a extracção de antioxidantes pelo método de ABTS<sup>+</sup> tendo em conta o tempo de exposição do material seco da planta em infusões. De acordo com esse estudo 5 min. são o tempo suficiente para garantir a obtenção da quantidade máxima de antioxidantes dos extractos. O factor tempo poderá ser a causa pela qual a concentração de antioxidante equivalente ao ácido ascórbico nos extractos aquosos da *M. cervina* não ter sido significativamente diferente entre a maceração e a infusão, tendo por base o extracto seco.

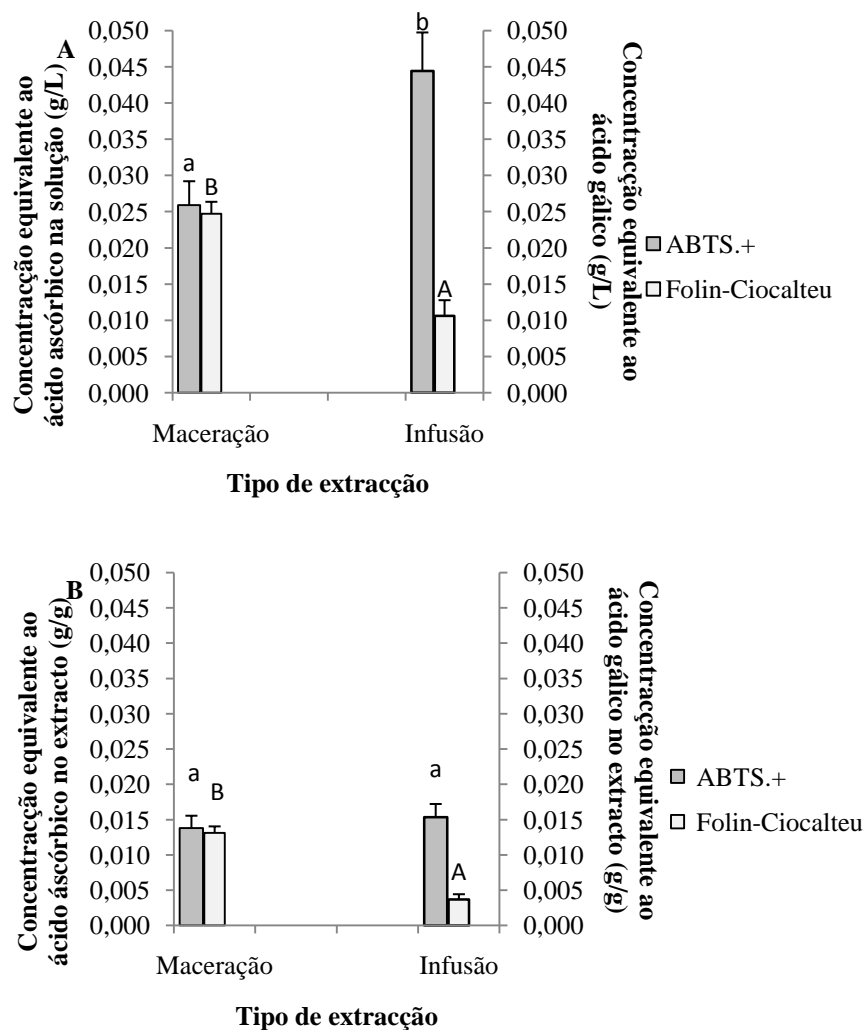


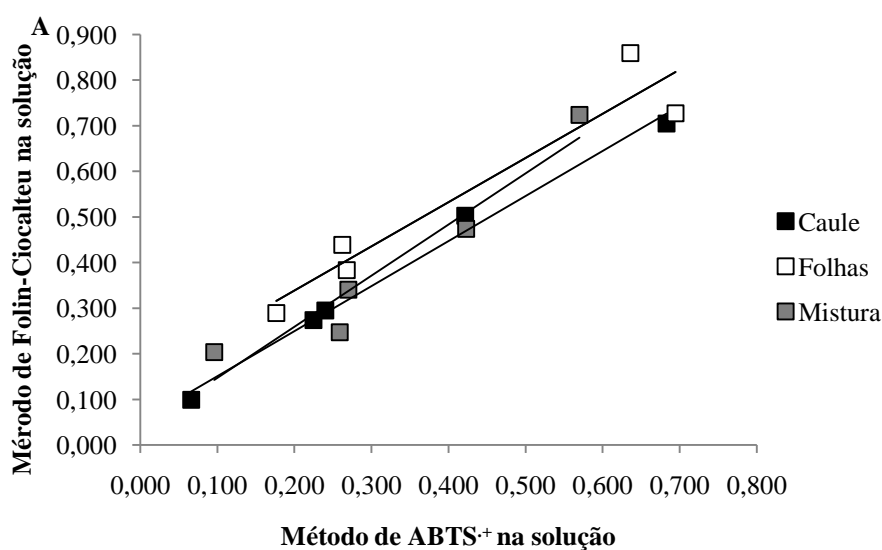
Figura 11 – Capacidade antioxidante total pelo método de ABTS<sup>+</sup> e o Teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu dos extractos aquosos analisados directamente na solução (A) e calculada tendo por base o extracto seco (B). Barras com a mesma letra (a – b ou A-B) não são significativamente diferentes (P>0,05). <sup>†</sup> - Representa o erro padrão

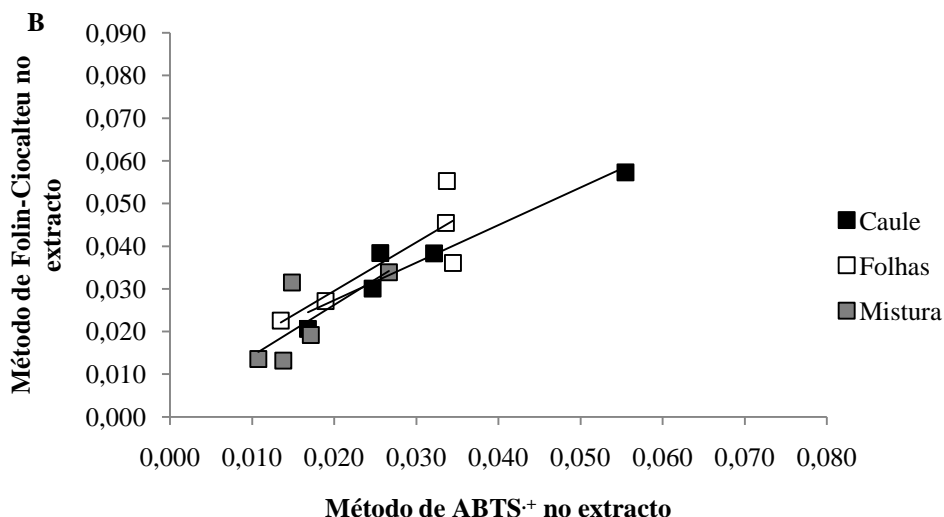
Os factores como a temperatura, o tempo e a razão solvente/amostra influenciam a quantidade de fenólicos extraídos. O estudo realizado por Rajaei *et al.* (2010) a extractos aquosos de *Pistachia vera*, que inclui o método de extracção por maceração, demonstrou que existem diferenças no teor em fenólicos totais nas razões líquido/sólido de 10:1, 15:1 e 20:1, sendo que a quantidade obtida foi aumentando até 20:1 mantendo-se igual a 25:1. A temperatura também influencia a extracção e o teor de fenólicos totais, aumentou ao longo do intervalo de temperatura de 25 a 65 °C, tendo-se mantido até ao máximo de temperatura estudada (85 °C). O tempo de extracção apresentou influência na amostra dando-se um aumento do teor de fenólicos totais obtidos nos primeiros 20 minutos, mas estabilizando no intervalo de 40 a 60 minutos, sendo que nesse estudo avaliou-se a teor de fenólicos totais até

aos 100 min. Na nossa análise aos extractos aquosos da *M. cervina*, factores como a temperatura (25 °C), o tempo (72 h) e a razão solvente/amostra (10:1) podem ter influenciado a extracção de maior teor de fenólicos totais no método de maceração a frio comparativamente à infusão (100 °C, 5min.).

### 2.3. Correlação entre o método Folin-Ciocalteu e o método ABTS<sup>+</sup>

Neste estudo nas análises efectuadas às soluções das tinturas verificou-se que a capacidade antioxidante total e o teor de fenóis totais estavam correlacionadas (Fig. 12A). No entanto, quando analisamos estas duas características nas tinturas, tendo como base o extracto seco, observou-se que as tinturas a partir dos caules têm uma actividade antioxidante e um conteúdo de fenóis correlacionados ( $R^2=0,92$ ). O mesmo já não acontece nas tinturas a partir das folhas e a mistura das diferentes partes da planta (Fig. 12B). Ambas as situações aqui apresentadas ocorreram em outros estudos que seguidamente vão ser descritos.





**Figura 12 – Correlação entre os dois métodos utilizados para análise da actividade antioxidante na A) solução (Caule:  $y = 0,987x + 0,0523$ ,  $R^2 = 0,9908$ ; Folhas:  $y = 0,9674x + 0,1456$ ,  $R^2 = 0,9119$ ; Mistura:  $y = 0,9674x + 0,1456$ ,  $R^2 = 0,9119$ ) e B) calculada com base no extracto seco (Caule:  $y = 0,88x + 0,0097$ ,  $R^2 = 0,9228$ ; Folhas:  $y = 1,1385x + 0,0067$ ,  $R^2 = 0,7146$ ; Mistura:  $y = 1,1939x + 0,0024$ ,  $R^2 = 0,5398$ ).**

A presença de compostos fenólicos encontra-se relacionada com actividade antioxidante medida pelo método de ABTS<sup>+</sup> quando analisado directamente em extractos aquosos como infusões (Politi *et al.* 2008b). A capacidade antioxidante detectada pelo método de ABTS<sup>+</sup>, no trabalho realizado por Gião *et al.* (2007a), em infusões está associada à quantidade de fenólicos analisada pelo método de Folin-Ciocalteu apresentando um coeficiente de correlação elevada (coeficiente de Pearson de 0,838).

Uma menor correlação entre o teor de compostos fenólicos dos extractos e actividade antioxidante nas folhas e mistura, poderá estar relacionado com a presença de outros compostos que não têm estruturas fenólicas mas, podem ser responsáveis pela actividade antioxidante. Por exemplo, a extracção de fracções polares de terpenoides presentes em óleos essenciais foi apontada como a possível causa da falta de correlação em extractos aquosos e etanólicos (Mata *et al.* 2007). O óleo essencial encontra-se nos tricomas glandulares, estas estruturas estão distribuídas pela superfície da planta, principalmente nas folhas da *Mentha cervina* (Rodrigues *et al.* 2008). Como tal, esta poderá ser a causa para a menor correlação entre os métodos de análise nos extractos hidroetanólicos. Demiray *et al.* (2009), analisaram extractos orgânicos que não apresentavam correlação entre o método de ABTS<sup>+</sup> e Folin-Ciocalteu, tendo concluído que esta diferença poderá resultar das diversas polaridades dos solventes e a capacidade de extracção de compostos antioxidantes.

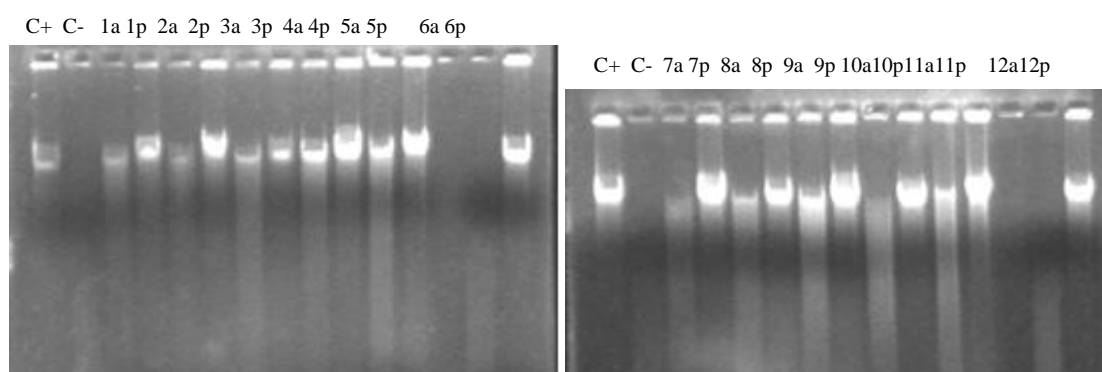
O óleo essencial obtido neste estudo apresentou uma capacidade antioxidante equivalente ao TROLOX de  $0,941 \pm 0,033 \text{ g L}^{-1}$ . No estudo histoquímico realizado por Rodrigues *et al.* (2008) verificou-se que a composição do material secretado pelos tricomas glandulares da *M. cervina* é semelhante na flor e folha, apresentando uma natureza complexa de componentes hidrofílicos e lipofílicos. A *M. piperita*, a *M. longifolia* e *M. aquatica* também apresentam actividade antioxidante significativa, sendo esta característica dada por cetonas de monoterpenos (mentona e isomentona) e 1,8-cineole (Mimica-Dukić *et al.* 2003; Gullace *et al.* 2007). Estes compostos também estão presentes na composição do óleo essencial da *M. cervina* (Gonçalves *et al.* 2007; Rodrigues *et al.* 2008) podendo ser responsáveis pela sua actividade antioxidante.

### **3. Protecção da degradação do ADN por oxidação**

Em relação ao efeito antioxidante e pró-oxidante dos diferentes tipos de extractos sobre o ADN utilizaram-se várias concentrações, no caso dos extractos hidroetanólicos foi a  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  nas infusões e óleo essencial testou-se nas seguintes concentrações: 40, 60 e  $80 \text{ mg mL}^{-1}$ . Uma vez que o solvente (etanol) interage com o DNA, este foi eliminado através do secagem por speed vacuum. Os resultados obtidos demonstraram que todos os extractos hidroetanólicos protegeram o ADN da oxidação a uma concentração de  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  (i.e. todos têm capacidade antioxidante), e uma vez que nenhum dos extractos degradou o ADN conclui-se que não são pró-oxidantes (Fig. 13; Anexo 6). De igual modo, as infusões também não apresentaram capacidade pró-oxidantes nas concentrações utilizadas. Também verificou-se que a infusão em pó foi mais eficaz na protecção da degradação do ADN por oxidação comparativamente à infusão da planta inteira, já que a primeira conferiu protecção do DNA a uma concentração de  $60 \text{ mg mL}^{-1}$  e a segunda apenas a uma concentração de  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  (Anexo 6). No caso dos extractos hidroetanólicos a capacidade de proteger o ADN poderá resultar de compostos que as diferentes tinturas têm em comum, uma vez que a capacidade antioxidante e teor fenólico destas é variável. No entanto, nos extractos aquosos a infusão em pó conseguiu proteger o ADN a uma concentração inferior à da infusão inteira, sendo que a infusão em pó tem uma maior capacidade antioxidante e maior teor de fenóis totais do que a outra infusão. Assim sendo a composição química destes extractos poderá conferir a capacidade de proteger o ADN. Num trabalho realizado por Gião *et al.* (2007b), apresentaram o método igual ao utilizado neste estudo para avaliação de infusões de várias plantas portuguesas, demonstraram

que as espécies *Mentha piperita*, *M. pulegium* e *M. spicata* têm a capacidade de protecção do ADN e não são pró-oxidantes. Nesse estudo, foi igualmente observado que o efeito antioxidante para com o ADN está associado ao tratamento da amostra (pó vs. planta inteira), pois as infusões obtidas com material em pó apresentaram uma protecção contra a oxidação do ADN superior à da planta inteira, uma vez que a área de superfície disponível para a extracção de antioxidante aumenta.

O ácido clorogénico é um dos compostos que aparece em grande quantidade na infusão em pó da *M. cervina* (Politi *et al.* 2008). De acordo Gião *et al.* (2007b), os compostos antioxidantes como ácido ferulico e clorogénico protegem o ADN mostrando-nos que este último poderá ser o principal responsável pela capacidade protectora da degradação do ADN no extracto aquoso da *M. cervina*. Outros compostos mencionados por Gião *et al.* (2007b) como catequina, epicatequina e ácido gálico também inibem a quebra do ADN. De entre todos os extractos estudados, o único que não ofereceu protecção antioxidante foi o óleo essencial, o qual juntamente com os valores de TEAC demonstra que os compostos presentes neste óleo actuam de forma diferente sobre moléculas biológicas.



**Figura 13** – Exemplo de electroforese do teste de ADN para avaliação do efeito antioxidante (a) e pró-oxidante (p) de diferentes extractos de *Mentha cervina* (detalhes acerca da preparação das amostras na Fig. 6). C+, controlo positivo (ADN+PBS); C-, controlo negativo (ADN +PBS+oxidante); (1) 100 % de etanol na mistura da planta; (2) 65 % de etanol na mistura da planta; (3) 40 % de etanol na mistura da planta; (4) 20 % de etanol na mistura da planta; (5) 0 % de etanol na mistura da planta; (6) óleo essencial; (7) 100 % de etanol no caule; (8) 65 % de etanol no caule; (9) 40 % de etanol no caule; (10) 20 % de etanol no caule; (11) 0 % de etanol no caule a 40 mg mL<sup>-1</sup>; (12) óleo essencial a 80 mg mL<sup>-1</sup>

## 4. Identificação dos compostos fenólicos

A análise por LC-MS/MS foi realizada directamente nos extractos hidroetanólicos e aquosos, de forma a identificar compostos fenólicos. Estes compostos estão normalmente relacionados com actividade antioxidante obtida pelo método de ABTS<sup>+</sup> (Politi *et al.* 2008b). No caso dos extractos hidroetanólicos foram identificados nove compostos (Tabela 8) e nos extractos aquosos cinco compostos (Tabela 9). Nos extractos hidroetanólicos podemos salientar uma maior quantidade relativa de ácido caféico, seguida de ácido clorogénico e rutina. O ácido clorogénico resulta da combinação do ácido caféico e do quínico, responsável pela regulação do fluxo biliar e do processo digestivo, é um composto antioxidante capaz de proteger moléculas biológicas da degradação por oxidação (Gião *et al.* 2007b, Politi *et al.* 2008). A rutina é um composto com elevada actividade antioxidante, sendo capaz de neutralizar radicais hidroxilos e superóxido. Este composto está associado ao aumento do colesterol-HDL e a diminuição de factores de risco para arterosclerose e doenças cardiovasculares (Rodrigues *et al.* 2003). A quercetina é um flavonol com actividade antioxidante que apresenta uma grande percentagem de inibição de oxidação (64 %) (Burda *et al.* 2001), tendo sido identificado em todos os extractos hidroetanólicos de caules, mas em pequenas quantidades. Como já mencionado, os extractos de caules apresentaram uma correlação mais acentuada entre actividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos (Fig. 12). Deste modo, nos extractos das folhas foi identificado um menor número de compostos fenólicos, o que poderá indicar que outros compostos estão presentes nestes extractos, como por exemplo os terpenos dos óleos essenciais que se encontram nas estruturas das folhas.

**Tabela 8 – Análise de LC-MS/MS das tinturas de *M. cervina*, a quantidade relativa dos compostos é calculado pela integração da área da base do picos .**

Compostos	[M-1] <sup>-</sup>	Fragm entos	Quantidade relativa (%)															
			Caulo					Folhas					Mistura					
			0	20	40	65	100	0	20	40	65	100	0	20	40	65	100	
Ácido protocatecuico	153	109	v	0,6	0,5	0,2				0,6								
Ácido ferrulico	193	134	v	1,6	0,4	0,7												
Ácido cumarico	163	119							23,3						4,0			
Ácido cafeico	179	135	v	91,0	58,4	70,1	83,1	100*	63,5	61,1	77,7	80,0	100*	100*	63,2	69,2	84,9	
Naringenina	271	151		0,4	0,4	0,1	1,5			1,0	0,8	7,5			1,7	0,6	4,8	
Quercetina	301	151	v	1,1	1,2	0,2	1,2					0,9				0,1	0,8	
Ácido clorogénico	353	191	v	4,0	29,5	22,0	0,9		13,2	35,6	20,7	8,6			28,7	29,4	7,7	
Epicatequina	289	245														0,3		
Rutina	609	301	v	1,3	9,5	6,7	13,4			1,7	0,8	3,1			1,1	0,4	1,8	

Nota: \* - único composto identificado devido ao “ruído” existente na amostra. v - vestigial

Politi *et al.* (2008b) identificaram sete compostos fenólicos na infusão em pó de *M. cervina*. Para além dos quatro compostos também identificados no nosso estudo (Tabela 9), estes autores demonstraram a presença de ácido cumárico, da epicatequina e de orientina. No caso da infusão inteira identificou-se ainda outro composto fenólico a naringenina. À infusão de *Mentha cervina* estão atribuídas propriedades digestivas comprovadas pela presença de ácido clorogénico, conhecido como derivado de colagona e cloloretico, ajudando na ingestão e fluxo da bilis, facilitando o processo digestivo (Cunha *et al.* 2006).

**Tabela 9 – Análise de LC-MS/MS das infusões de *M. cervina* da planta em pó e inteira. Quantidade relativa dos compostos (%) calculado, pela integração da área da base dos picos.**

Compostos	[M-1] <sup>-</sup>	Fragmentos	Infusão	
			Pó	Inteira
Ácido protocatecuico	153	109	0,2	
Ácido cafeico	179	135	48,4	16,8
Naringenina	271	151		0,3
Ácido clorogénico	353	191	33,8	67,2
Rutina	609	301	17,6	15,7

## 5. Actividade antimicrobiana

### 5.1. Difusão em agar por poços e discos

Os extractos hidroetanólicos e aquosos não inibiram nenhum dos microrganismos testados nas concentrações estipuladas (e.g. Fig. 13a). Contudo, o óleo essencial da *Mentha cervina* conseguiu inibir todos os microrganismos testados pelo método de difusão em agar aplicado em discos de papel (e.g. Fig.13b), apresentando no mínimo um halo de 10 mm (Tabela 10).

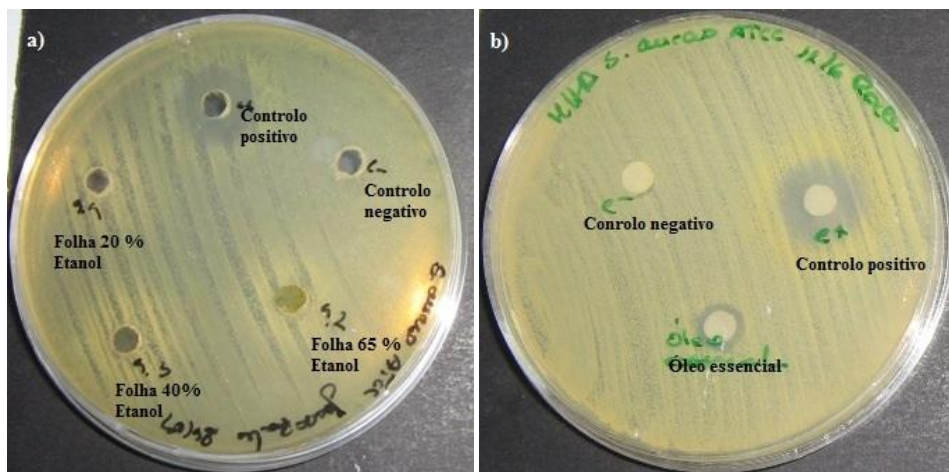


Figura 13- a) Teste de difusão em agar por poços dos extractos hidroetanólicos da folha em *S. aureus* ATCC; b) Teste de difusão em agar por discos do óleo essencial em *S. aureus* ATCC.

De entre todos os microrganismos testados, o óleo essencial de *M. cervina* demonstrou uma actividade antimicrobiana mais elevada para a *Yarrowia lipolytica* ( $P < 0,001$ ), resultando num halo de inibição de 19,0 mm, seguida da *Candida albicans* (halo de 13,5 mm) e da *E. coli* (halo de 12,0 mm) (Tabela 10). Para os restantes cinco microrganismos foi observada uma actividade antimicrobiana mais reduzida, tendo sido registado um menor halo (10,0 mm) para a *Listeria innocua*. A pesquisa da actividade antibacteriana do óleo essencial da *M. cervina*, ainda não tinha sido reportada até ao momento. O único estudo existente sobre actividade antimicrobiana foi realizado por Gonçalves et al. (2007) que estudaram o efeito da *M. cervina* na *Candida*, *Aspergillus* e estirpes dermatófitas, tendo sido demonstrada uma actividade antifúngica contra todos estes microrganismos.

**Tabela 10 - Média do diâmetro ( $\pm$  desvio padrão) do halo obtido no teste de difusão em agar com aplicação do óleo essencial (10  $\mu$ L) em disco de papel. A média dos halos é resultante de duas experiências e duas replicas**

Estirpes	Média do Diâmetro do Halo (mm)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	10,3 $\pm$ 0,4
<i>Listeria innocua</i> NCTC 11286	10,0 $\pm$ 0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8532	10,8 $\pm$ 0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	10,4 $\pm$ 0,4
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	12,0 $\pm$ 1,4
<i>Salmonella</i> spp. ATCC 3076	10,3 $\pm$ 0,4
<i>Candida albicans</i> (isolado clínico)	13,5 $\pm$ 2,1
<i>Yarrowia lipolytica</i> (isolado alimentar)	19,0 $\pm$ 1,4

A *M. piperita*, é uma espécie de menta muito utilizada na indústria alimentar e farmacêutica. O seu óleo essencial apresentou uma actividade antimicrobiana elevada para a *Y. lipolytica* no teste de difusão em agar por disco (halo entre 10 a 15 mm) (Araújo *et al.*, 2003). Este facto poderá indicar que os compostos em comum a estas duas mentas (e.g. pulegona e o limoneno) são responsáveis pela actividade antimicrobiana nesta levedura. Neste estudo a *M. cervina* apresentou um halo maior que a *M. piperita*, revelando assim que o seu óleo essencial poderá ter uma elevada aplicação na Indústria alimentar ou farmacêuticas, com vista a inibir esta levedura. Uma maior actividade da *M. cervina* comparativamente à *M. piperita* poderá resultar de um maior teor dos compostos comuns as ambas espécies, mas também de outros compostos que embora em menor quantidade poderão exercer esse efeito antimicrobiano. Paralelamente, poderá ainda haver um sinergismo entre os componentes do óleo, pelo que o efeito da soma de todos os compostos é superior ao efeito individual dos mesmos (Burt 2004).

A *Yarrowia lipolytica* é uma levedura não patogénica, que pode ser isolada de substratos ricos em lípidos e proteínas, como os produtos lácteos, o queijo ou salsichas. Esta levedura pode-se encontrar em concentrações superiores a  $10^6$ - $10^7$  ufc.g<sup>-1</sup> no Camembert e queijos de veios azuis, frequentemente, isto deve-se à actividade extracelular lipolítica e proteolítica, tendo também a capacidade de crescer a 5-10 °C (Fickers *et al.* 2004). As características da levedura aqui referidas são responsáveis pela sua capacidade de deterioração dos alimentos, sendo um problema na Indústria Alimentar, podendo a utilização do óleo essencial da *M. cervina* ser considerada uma possível solução para a sua inibição, desde que a concentração usada não afecte negativamente as características organolépticas do produto.

## 5.2. Concentração mínima inibitória

Os resultados da CMI demonstraram que o óleo essencial tem uma maior eficácia para a *Y. lipolytica*, *C. albicans* e *E.coli*, uma vez que demonstraram ser inibidos completamente com quantidades inferiores de óleo essencial (Tabela 11). Os dados estão correlacionados com o teste de difusão em agar por disco, em relação às bactérias Gram negativas e às leveduras. No caso das Gram positivas observa-se uma baixa actividade antimicrobiana contra a *L. innocua* e o *S. aureus*. Ao mesmo tempo, verificou-se que nas bactérias Gram positivas os métodos usados para avaliar a actividade antimicrobiana do óleo essencial da *M. cervina* não estão correlacionados pois nas bactérias Gram positivas verifica-se que o *B. cereus* tem um halo de inibição menor que o *S. aureus* NCTC 8532 mas a CMI deste é menor que do *S. aureus*, que necessita de uma concentração de óleo superior para a inibir. Rusenova *et al.* (2009) também observaram que o óleo essencial da *M. piperita* resulta num halo < 12 mm para a *Klebsiella pneumoniae*, mas o valor da sua CMI é idêntico ao de três bactérias Gram negativas que apresentaram halos de inibição de 21 a 29 mm. No entanto, no caso da *M. cervina* a correlação entre os métodos de inibição não se dá nas bactérias Gram positivas.

**Tabela 11- Concentração mínima inibitória ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) do óleo essencial da *M. cervina***

Estirpes	CMI ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	10,00
<i>Listeria innocua</i> NCTC 11286	80,00
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8532	40,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	40,00
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	5,00
<i>Salmonella</i> spp. ATCC 3076	10,00
<i>Candida albicans</i> (isolado clínico)	5,00
<i>Yarrowia lipolytica</i> (isolado alimentar)	0,63

Ao contrário da maioria dos óleos essenciais que têm uma elevada actividade antimicrobiana para com as bactérias Gram positivas, os resultados obtidos sugerem que o óleo essencial da *M. cervina* é mais eficiente na inibição das bactérias Gram negativas. O óleo essencial poderá então actuar na membrana externa da parede celular das bactérias Gram negativas, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através da sua camada lipopolissacarídea (Burt 2004). O efeito de compostos como o limoneno, mentona,  $\alpha$ - pineno,  $\beta$ -pineno, sabinena e terpeno-4-ol entre outros foram analisados em bactérias Gram positivas e negativas por Dorman *et al.* (2000). Nesse estudo, o limoneno que é um dos principais

compostos presentes no óleo essencial da *M. cervina* demonstrou ter actividade antimicrobiana para a *E. coli*, mas nenhuma para o *S. aureus*. Na análise à *M. cervina* observou-se que a CMI do óleo essencial para o *S. aureus* foi oito vezes superior ( $40 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) à da *E. coli* ( $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ). Assim o limoneno poderá ter influência na maior actividade antimicrobiana do óleo essencial da *M. cervina* nas bactérias Gram negativas.

Como acima referido uma grande parte dos óleos essenciais, entre os quais os obtidos de outras Mentas, tem maior actividade perante as bactérias Gram positivas. Por exemplo, um estudo realizado por Mahboubi *et al.* (2008) revelou que as bactérias Gram negativas foram mais resistentes que os restantes microrganismos à *M. pulegium*, verificando-se que no caso da *E. coli* a CMI foi de  $4 \mu\text{L mL}^{-1}$  e do *S. aureus* de  $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Embora a eficácia da *M. pulegium* seja superior à do óleo essencial da *M. cervina*, é importante salientar que o óleo usado no estudo mencionado foi extraído a partir de material fresco, ao contrário do da *M. cervina* utilizada no nosso estudo. Moreira *et al.* (2005) estudaram óleos essenciais que estão á venda como suplementos alimentares, incluindo um óleo obtido da *Mentha piperita* que apresentou um halo de inibição de 17 mm para a *E. coli* (ATCC 25158) e uma CMI de  $20 \mu\text{L mL}^{-1}$ , demonstrando a necessidade de utilizar uma quantidade superior para inibir uma estirpe de *E. coli* do que a *M. cervina*. Schelz *et al.* (2006) estudaram a actividade antimicrobiana do óleo essencial da *M. piperita* para bactérias e leveduras, observando-se uma maior eficácia para a inibição das leveduras como a *S. cerevisiae* com CMI de  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ . Iscan *et al.* (2002) também avaliaram actividade a antimicrobiana do óleo essencial da *M. piperita* e dos seus principais compostos, neste caso mentol (28-42 %) e mentona (18-28 %). Verifica-se que foi necessária uma maior quantidade de mentona para inibir a *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans* do que óleo essencial e o mentol. No caso do *Bacillus cereus* tanto os óleos como os compostos apresentaram a mesma CMI ( $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A mistura dos compostos químicos do óleo essencial é mais eficiente que o composto isolado. No caso da *M. cervina* estes compostos são apenas vestígias, o que pode sugerir a existência de sinergismos entre os diferentes compostos presentes e a sua capacidade de inibir ou não determinado microrganismo.

### 5.3. Curvas de inibição

A partir do estudo da CMI obtiveram-se as curvas de inibição dos microrganismos com a respectiva concentração de óleo essencial (Fig. 14).

As bactérias Gram positivas confirmaram a sua maior resistência ao óleo essencial da *M. cervina*. Na análise ao *B. cereus*, microrganismo patogénico oportunista, responsável por causar intoxicações alimentares e graves infecções oculares, estando amplamente distribuído na natureza nomeadamente no solo e plantas ( Ferreira *et al.* 2000), observou-se que a CMI do óleo essencial apenas retarda o crescimento do microrganismo (Fig. 14A). No crescimento normal do *B. cereus* a fase exponencial dá-se após 2 h de incubação e com o óleo essencial a 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$  esta ocorre às 8 h. Este microrganismo em forma de bastonete apresenta esporos, facto que pode justificar a sua resistência quando incubado com o óleo essencial da *M. cervina*.

A *L. innocua* é o homólogo da *L. monocytogenes*, sendo uma espécie não patogénica. No entanto a *L. monocytogenes* é uma bactéria patogénica causadora de graves doenças ao homem e particularmente problemática na indústria alimentar devido à sua capacidade de sobreviver nas condições utilizadas para a conservação de alimentos (Desvaux *et al.* 2006; Li *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2000). Devido a estas características analisou-se a sua resistência ao óleo essencial da *M. cervina*, mas este microrganismo foi o que apresentou maior resistência, verificando-se que o óleo essencial a 80  $\mu\text{L mL}^{-1}$  apenas permitiu reduzir o seu crescimento, quando comparada com o crescimento na sua ausência (Fig. 14B), mas sem inibir completamente o seu crescimento.

Outro microrganismos estudado devido à sua importância foi *S. aureus*, (patogénico para o Homem, podendo ser adquirido tanto na comunidade como no hospital). A infecção pode ser endógena ou por transmissão homem a homem. Esta espécie encontra-se em número muito elevado na flora indígena humana, principalmente na mucosa nasal e na pele. A virulência do *S. aureus* deve-se à diversidade de toxinas e às enzimas produzidas por este microrganismo, a cápsula e a parede celular. Os estafilococos adquirem resistências aos antimicrobianos e transmitem esta informação entre si (Ferreira *et al.* 2000). Estes factos fazem com exista uma constante procura de alternativas de inibir ou eliminar este microrganismo. O óleo essencial da *M. cervina* a 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  demonstrou a capacidade de inibir o *S. aureus* NCTC (Fig. 14D), no entanto verifica-se que a estirpe ATCC apresenta às 24 h uma ligeira recuperação de crescimento (Fig. 14C), mas pouco relevante.

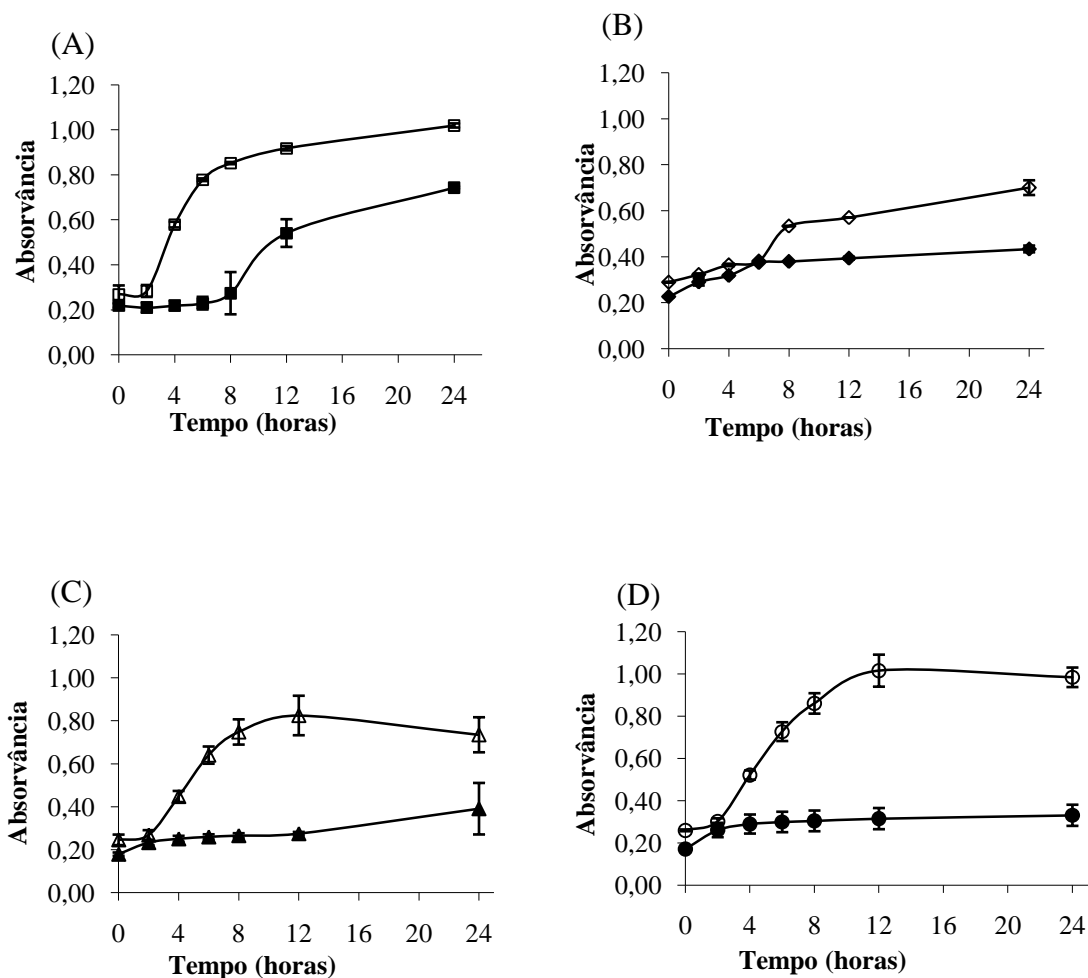


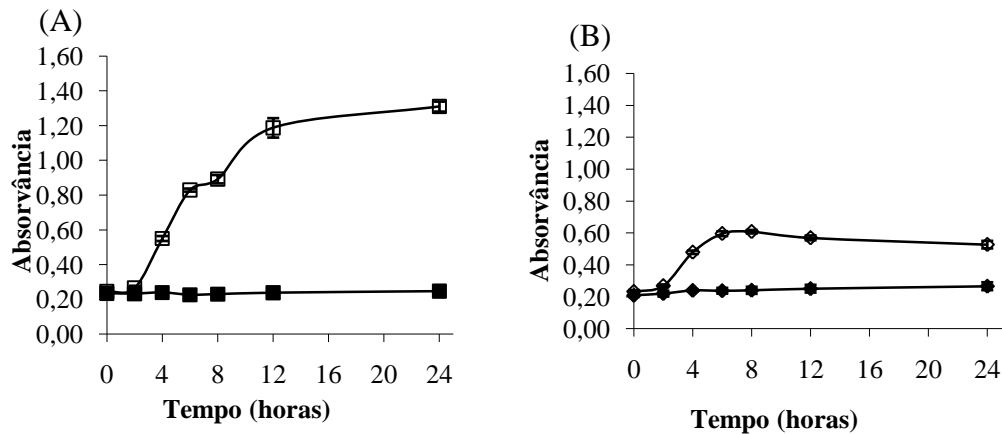
Figura 14 – Curvas de crescimento das bactérias Gram Positivas com diferentes concentrações de óleo essencial; (A) *Bacillus cereus*; (B) *Listeria innocua*; (C) *Staphylococcus aureus* ATCC (29213); (D) *Staphylococcus aureus* NCTC (8532), com símbolos abertos representado a curva do microrganismo na ausência de óleo essencial e símbolo fechado representado o microrganismo na presença da respectiva CMI ( $\square$ /mL) de óleo essencial.

O óleo essencial da *M. cervina* foi mais eficaz contra as bactérias Gram negativas.

A *E. coli* tem uma grande importância clínica, provocando infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicemias, abscessos, etc. Esta pode apresentar factores de virulência como a produção de toxinas, a ligação por pili e aderência à membrana citoplasmática do enterócito (Ferreira *et al.* 2000; Forbes *et al.* 2007). O óleo essencial da *M. cervina* demonstrou uma grande eficácia na inibição do crescimento desta bactéria durante 24 h a uma CMI muito baixa (Fig. 15A).

A *Salmonella* spp. está associada a uma ingestão de alimentos e de água contaminados ou por contacto fecal-oral (Ferreira *et al.* 2000). Os diferentes factores de virulência da *Salmonella* spp. incluem plasmídeos, toxinas, fímbrias e flagelos que servem para proteger o

microrganismo de ácidos do estômago e permitir a sua sobrevivência e destruição dos fagócitos e facilitar a disseminação para outros tecidos (Asten *et al.* 2005; Forbes *et al.* 2007). O óleo essencial a uma CMI de  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$  inibiu completamente o crescimento da *Salmonella* spp. nas primeiras 24 h de contacto (Fig. 15B)



**Figura 15 - Curvas de crescimento das bactérias Gram negativas com diferentes concentrações de óleo essencial: (A) *E. coli*; (B) *Salmonella* spp. (3076) com símbolos abertos representado a curva do microrganismo na ausência de óleo essencial e símbolo fechado representado o microrganismo na presença da respectiva CMI ( $10 \mu\text{L/mL}$ ) de óleo essencial.**

A *Candida albicans* é uma espécie endógena ao tracto oral, gastrointestinal e urogenital do homem e de animais de sangue quente. Os efeitos clínicos deste microrganismo são diversos, incluindo vulvovaginite, dermatite, cistite, febre, miosite, disfunção hepática e perturbação mental. A virulência varia entre as diferentes estirpes de *C. albicans*, mas como todas as infecções fúngicas esta depende do estado fisiológico do hospedeiro. Os factores de virulência deste microrganismo incluem a germinação, a adesão às células hospedeiras e a secreção de proteinases e fosfolipases (Kurtzman *et al.* 1998; Ferreira *et al.* 2000). O óleo essencial inibiu o crescimento da *C. albicans* durante 24 h podendo ter interferido na capacidade germinação do microrganismo (Fig. 16A).

A *Yarrowia lipolytica* como já dito é um contaminante de alimentos estando presente no meio ambiente (Fickers *et al.* 2004). Este microrganismo foi inibido pelo óleo essencial com a CMI mais baixa utilizada no espectro dos microrganismos estudados, inibindo completamente o crescimento da levedura durante 48 h (Fig. 16B).

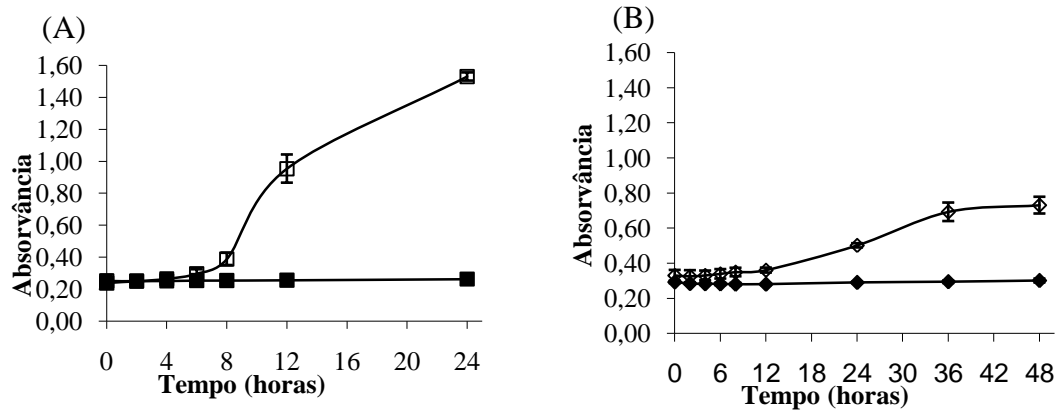


Figura 16 - Curvas de crescimento das leveduras com diferentes concentrações de óleo essencial: (A) *C. albicans*; (B) *Y. lipolytica* com símbolos abertos representado a curva do microrganismo na ausência de óleo essencial e símbolo fechado representado o microrganismo na presença da respectiva CMI (□/mL) de óleo essencial.

## IV. Conclusões gerais

Os resultados deste estudo demonstram que o método de extracção (maceração ou infusão), o tipo de amostra (caule, folha e mistura) e o solvente usado (etanol ou água) influenciam actividade antioxidante e o teor de fenólicos totais dos extractos. O extracto hidroetanólico a 65% do caule com base no extracto seco foi o mais eficaz na extracção de compostos antioxidantes, que incluem principalmente compostos fenólicos. Os extractos hidroetanólicos protegeram o ADN da degradação por oxidação a uma concentração inferior ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) que as infusões. O óleo essencial da *M. cervina* revelou ter uma elevada capacidade antioxidante, no entanto foi o único extracto que não protegeu o ADN da degradação por oxidação.

A actividade antioxidante, o teor de fenóis totais e a protecção do ADN pelas infusões depende do tratamento da amostra. A infusão em pó demonstrou uma maior capacidade antioxidante e maior teor de compostos fenólicos do que a infusão da planta inteira, tendo sido necessário uma concentração inferior de infusão em pó ( $60 \text{ mg mL}^{-1}$ ) do que a infusão da planta inteira ( $80 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para proteger o ADN.

Os extractos hidroetanólicos dos caules apresentaram uma correlação elevada entre a actividade antioxidante e o teor de fenólicos totais ( $R^2=0,92$ ), entretanto o mesmo já não se observou nos extractos obtidos da mistura e das folhas com base no extracto seco. Como demonstrado na análise de LC-MS/MS os extractos hidroetanólicos e aquosos estudados são compostos principalmente por ácido cafeico e clorogénico. O extracto de caule resultante da extracção com 65 % de etanol que evidenciaram uma maior capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais apresentaram também um maior número de compostos fenólicos identificados por LC-MS/MS, do que o os extractos das folhas e da mistura. A capacidade antioxidante nem sempre está relacionada com os compostos fenólicos, uma vez que alguns extractos hidroetanólicos obtidos das folhas da *M. cervina*, com elevada actividade antioxidante apresentaram menor teor de fenólicos totais, o que ficou provado na análise dos compostos químicos por LC-MS/MS.

A *Mentha cervina* é utilizada tradicionalmente como infusão, devido às suas designadas propriedades digestivas. A infusão obtida da planta em pó como já referido tem uma capacidade antioxidante muito superior à obtida da planta inteira, sendo ainda relevante comparativamente a outras mentas já estudadas. O seu conteúdo em fenólicos totais (principalmente ácido clorogénico) está associado às propriedades que lhe são atribuídas.

O tempo e a temperatura influenciam a extracção de compostos fenólicos em extractos aquosos da *M. cervina*, já que com o aumento de tempo (72 h) e com temperatura a 25 °C, o extracto obtido por maceração contínua com base no peso seco uma concentração equivalente a ácido gálico muito superior à infusão (5min., 100 °C).

O óleo da *M. cervina* é caracterizado por ter uma elevada capacidade antioxidante, sendo os seus compostos químicos potenciais antioxidantes naturais. Os extractos hidroetanolicos têm flavonoides e ácidos fenólicos e protegem moléculas biológicas como ADN, podendo ser utilizados como antioxidantes naturais. Além do uso das PAM para a obtenção de antioxidantes naturais, estas também podem ter aplicações relevantes na indústria alimentar, nomeadamente na prevenção de contaminações por microrganismos patogénicos da matéria-prima ou do produto final. O óleo essencial da *M. cervina* inibiu o crescimento de uma grande variedade de microrganismos principalmente bactérias Gram negativas e leveduras. Como tal, este óleo essencial demonstra um elevado potencial de prevenção de contaminações, podendo ser aplicado directamente em alimentos, ou indirectamente por incorporação em revestimentos comestíveis, ou mesmo em formulações cosméticas.

## V. Trabalho Futuro

A *M. cervina* tem um perfil químico diferenciado entre o seu material fresco e o seco (Politi *et al.* 2008b), por isso em estudos futuros novos extractos deverão ser analisados a partir das diferentes partes da planta em fresco, de forma a verificar a sua composição e acção biológica. Uma vez que se verificou que a redução do tamanho das partículas (pó vs. planta inteira para a preparação das infusões) aumenta a capacidade antioxidante *in vitro*, seria interessante avaliar os extractos hidroetanólicos preparados com as diferentes partes da planta reduzidas a pó, de forma a verificar se existe um aumento de extracção de compostos com acção biológica.

A avaliação da capacidade antioxidante deverá ser complementada com outros métodos *in vitro* face à existência de uma grande variedade de antioxidantes com mecanismos de acção diferentes, os quais poderão estar envolvidos em interacções sinérgicas. Assim à análise já efectuada pelo método de ABTS<sup>+</sup> dever-se-á estudar a capacidade antioxidante pelo método de DPPH , FRAP e ORAC. Contrariamente ao óleo essencial, os extractos hidroetanólicos demonstraram ter a capacidade de proteger uma molécula biológica através do método de avaliação da degradação de ADN. Porém, a confirmação do seu potencial biológico, deveria ser validada por outros métodos, nomeadamente pelo método de bacteriófagos ou usando o sistema de eritrócitos.

O estudo da actividade antimicrobiana de extractos de *Mentha cervina* foi inicialmente realizado recorrendo ao método de difusão em agar por disco, no caso do óleo essencial, seguindo-se a determinação da concentração mínima inibitória. A partir dos dados obtidos será relevante complementar o estudo da acção antimicrobiana com a determinação da concentração mínima bactericida, uma vez que esta menta, ao contrário da *M. piperita* utilizada na indústria, não tem variações na composição química entre as suas populações. A extracção de compostos voláteis isolados poderá ser útil, sendo necessária uma avaliação da actividade antimicrobiana dos principais compostos do óleo essencial. Dado que o óleo essencial da *M. cervina* foi eficaz na inibição de bactérias Gram negativas, haveria interesse em aumentar o grupo de microrganismos Gram negativos para completar o espectro de acção deste óleo. Além disso, conhecendo o espectro de acção, é importante estudar os mecanismos de acção associados à inibição de cada grupo de microrganismos, que poderá ser realizado por citometria de fluxo e complementado com técnicas microscópicas.

No nosso estudo observa-se a existência de outros compostos que não fenólicos os quais conferem uma capacidade antioxidante aos extractos, pelo que seria interessante efectuar uma

análise mais detalhada da composição química dos extractos, em particular de compostos hidrofóbicos como os terpenos e terpenoides, por GC-MS.

## VI. Bibliografia

- Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Afolayan, A. J. e Masika, P. J. 2009. Antioxidant properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis africana*. *Records of Natural Products* **3**(1):23-31.
- Araújo, C., Sousa, M. J., Ferreira, M. F. e Leão, C. 2003. Activity of Essential Oils from Mediterranean *Lamiaceae* Species against Food Spoilage Yeast. *Journal of Food Protection* **4**: 625-632
- Asten, A. J. e Dijk, J. E. 2005. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *Immunology and Medical Microbiology* **44**: 251-259.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. e Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 446-475.
- Burda, S. e Oleszek, W. 2001. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **49**: 2774-2779.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in food – a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 223-253.
- Chand, S., Patra, N., Anwar, M. A. e Patra, D. 2004. Agronomy and Uses of Menthol Mint (*Mentha arvensis*) – Indian Perspective. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **3**: 269-297.
- Cunha, A. 2005. Farmacognosia e Fitoquímica. 1ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A. e Roque, O. 2006. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 31-52.
- Cunha, A., Ribeiro, J. e Roque, O. 2007a. Plantas Aromáticas em Portugal Caracterização e Utilizações, 1ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 33-34
- Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A. e Roque, O. 2007b. Plantas na Terapêutica Farmacológica e Ensaio Clínicos, 1ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp. 1-709
- Davidson, P. M., Sofos, J. N. and Branen, A. L. 2005. Antimicrobials in Food, 30<sup>th</sup> edition. Taylor & Francis Group, LLC, US, pp.429-436, 440-441.
- Demiray, S., Pintado, M. e Castro, P. 2009. Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **54**: 312-317.

- Desvaux, M. e Hébraud, M. 2006. The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence. *FEMS Microbial Rev* **30**: 774-805.
- Dung, N., Kim, J. e Kang, S. 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3632–3639.
- *European Pharmacopoeia*, 5ª edição., Council of Europe: Strasbourg Cedex, France 2.8.12, 2178, 2004
- Ferreira, W. F. e Sousa, J.S. 2000. Microbiologia – Vol. 2, Lidel – edições técnicas, lda, Lisboa, pp.65-66, 71-73, 99-102, 105-107, 314-318.
- Fickers, P., Benetti, P. H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. e Nicaud, J. M. 2004. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. Elsevier, *Yeast Research* **5**: 527-543.
- Forbes, B. A., Sham, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 12<sup>th</sup> edition. MOSBY Elsevier, St. Louis, Missouri, pp.323-331.
- Gião, M., Borges, A., Guedes, C., Hogg, T., Pintado, P. e Malcata, X. 2009. Determination of Antioxidant Capacity Using the Biological System Bacteriophage P22/Bacterium *Salmonella typhimurium*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 22-25.
- Ganiyat, K. O., Patricia, A. O. e Sunday, F. A. 2011. Chemical Composition, Toxicity, antimicrobial an Antioxidant Activities of Leaf and Stem Essential Oils of *Dieffenbachia picta* (Araceae). *European Journal of Scientific Research* **49**(4): 567-580.
- Gião, M., González-Sanjosé, M., Rivero-Pérez, M., Pereira, C., Pintado, M. e Malcata, X 2007a. Infusions of Portuguese Medicinal Plants: Dependence of Final Antioxidant Capacity and Phenol Content on Extraction Features. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**:2638–2647.
- Gião, M., González-Sanjosé, M., Muñiz, P., Rivero-Pérez, M., Kosinka, M., Pintado, M. e Malcata, X. 2007b. Protection of Deoxyribose and DNA from Degradation by using Aqueous Extracts of Several Wild Plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**(4):633-640.
- Gião, M. S., Pereira, C. I, Fonseca, S. C., Pintado, M. E e Malcata, F. X. 2009. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants

*Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry* **117** (3):412-416.

- Gonçalves, M., Vicente, A., Cavaleiro, C. e Salgueiro, L. 2007. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal. *Natural Product Research* **21**(10): 867–871.
- Gulcin, I., Tel, A. e Kirecci, E. 2008. Antioxidant, Antimicrobial, Antifungal, And Antiradical Activities of *Cyclotrichium niveum* (Boiss) Manden and Scheng. *International Journal of Food Properties* **11**: 450–471.
- Gullace, M., Sahin, F., Sokmen, M, Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. e Ozkan, H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp, *longifolia*. *Food Chemistry* **103**: 1449-1456.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuglu, M., Baser, K. H. C. e Demirci, F. 2002. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal Agriculture Chemistry* **50**: 3943-3946.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T. e Yankova, T. 2005. Polyphenols and Antioxidant Capacity of Bulgarian Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology* **96**: 145–150.
- Kähkönen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T. e Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal Agriculture Food Chemical* **47**: 3954-3962.
- King, A. e Young, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of The American Dietetic Association* **99**: 213-218.
- Kurtzman, C. P. e Fell, J. W. 1998. *The Yeast*, a taxonomic study. 4<sup>th</sup> edition. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp.9.
- Langseth, L. 1995. *Oxidants, Antioxidants And Disease Prevention*. ILSI Europe Consise Monograph Series.
- Li, Q., Sherwood, J. S. e Longue, C. M. 2006. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. Recovered from processed bison. *Letters in Applied Microbiology* **44**: 86-91.
- Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R. e Cañigueral, S. 2002. Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **45**(4): 519-524.

- Mahboubi, M. e Haghi, G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essencial oil. *Journal of Ethnopharmacology* **119**: 325-327.
- Malingré, T. e Maarse, H. 1974. Composition Of The Essential Oil Of *Mentha Aquatica*. *Phytochemistry* **13**(8): 1531-1535.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., e Jiménez, J. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727-747.
- Mancini, D. e Mancini J. 1999. Prevenção de Reações Oxidativas: Antioxidantes nos Vegetais de Consumo Humano. In Angelis (ed) Importância de Alimentos Vegetais na Protecção da Saúde. Atheneu 36, pp 203-207.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. e Araújo, M. E. M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* **103**: 778-786.
- Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B. e Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Medicine* **69** (5): 413-419
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Valle, C. E. e Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT* **38**: 565-570.
- Nickavar, B., Alinaghi, A. e Kamalinejad, M. 2008. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Journal of Pharmaceutical Research* **7**: 203-209.
- Pattanayak, S. e Sunita, P. 2008. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. *Journal of Ethnopharmacology* **120** (2): 241-247.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M., Serrano, J., Goñi, I. e Saura-Calixto, F. 2008. Updated Methodology to Determine Antioxidant Capacity in Plant Food, Oils and Beverages: Extraction, Measurement and Expression of Results. *Food Research International* **41**: 274-285.
- Politi, M., Peschel, W., Wilson, N., Zloh, M., Prieto, J. e Heinrich, M. 2008a. Direct NMR Analysis of Cannabis Water Extracts and Tinctures and Semi-quantitative Data on  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-acid. *Phytochemistry* **69**: 562-570.
- Politi, M., Rodrigues, C., Gião, M. e Pintado, M; Castro, P. 2008b. Antioxidant Principles and Volatile Constituents from the North-western Iberian mint “erva-peixeira”, *Mentha cervina*. *Natural Product Communications* **3**: 2065-2068.

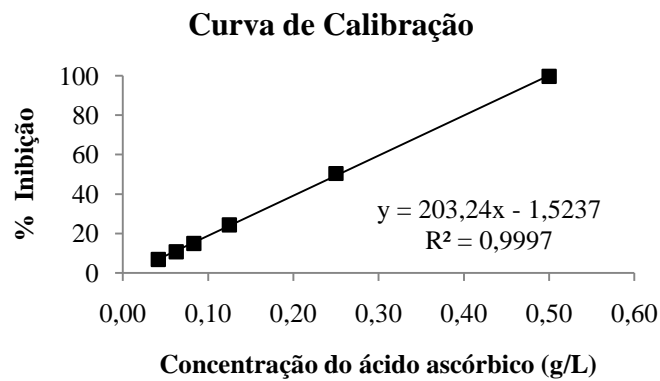
- Proestos, C., Boziaris, I., Nychas, G. e Komaitis, M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* **95**: 664–671.
- Rajaei, A., Barzegar, M., Hamidi, Z. e Sahari, M. A. 2010. Optimization of Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistachia vera*) Green Hull through Response Surface method. *Journal Agriculture Science Technology* **12**: 605-615.
- Ramassamy, C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology* **545**: 51-64.
- Rodrigues, H., Diniz, Y., Faine, L., Almeida, J., Fernandes, A. e Novelli, E. 2003. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. *Revista de Nutrição* **16**(3): 315-320.
- Rodrigues, L., Monteiro, P., Póvoa, P., Teixeira, G., Moldão, M., Figueiredo, A. e Monteiro, A. 2008. Morphology of secretory structures and essential oil composition in *Mentha cervina* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal* **23**: 340–347.
- Rusenova, N. e Parvanov P. 2009. Antimicrobial Activities Of Twelve Essential oils Against Microorganisms Of veterinary Importance. *Trakia Journal Of Sciences* **7** (1): 37-43.
- Santos, A., Ferraro, V., Cruz, I., Ferreira Jorge, R., Carvalho, A., Castro, P. e Pintado, M. 2009. Potential valorisation of vinification by products. Proceeding of 2<sup>nd</sup> SAFE Consortium International Congress, Girona , Catalunya, Spain, 27-29 April
- Schelz, Z., Molnar, J. e Hohmann, J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* **77**: 279-285.
- Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Rawat, A. e Mehrotra, S. 2006. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology* **107**:67–72.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. e Dommes, J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* **113**: 1226–1233.
- Turkmen, N., Sari, F. e Velioglu, Y. S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols

determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry* **99**: 835.-841.

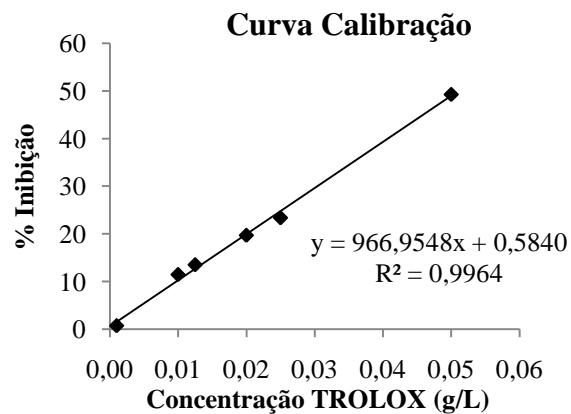
- Vidaurreta, A., Pérez-Alonso, M. e Negueruela, A. 1999. Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas mentas com pulegona: *Mentha pulegium* L. y *Mentha cervina* (L.) Fresen. *Botanica Complutensis* **17**: 79-85

## VII. Anexo

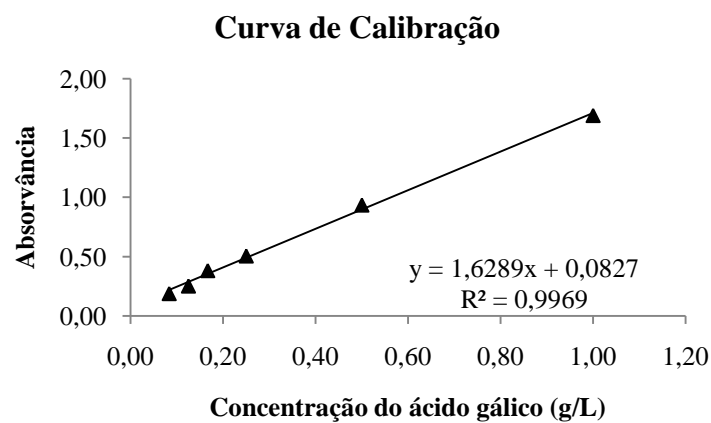
### Anexo 1. Curva de calibração do ácido ascórbico



### Anexo 2. Curva de calibração de TROLOX



### Anexo 3. Curva de calibração de ácido gálico



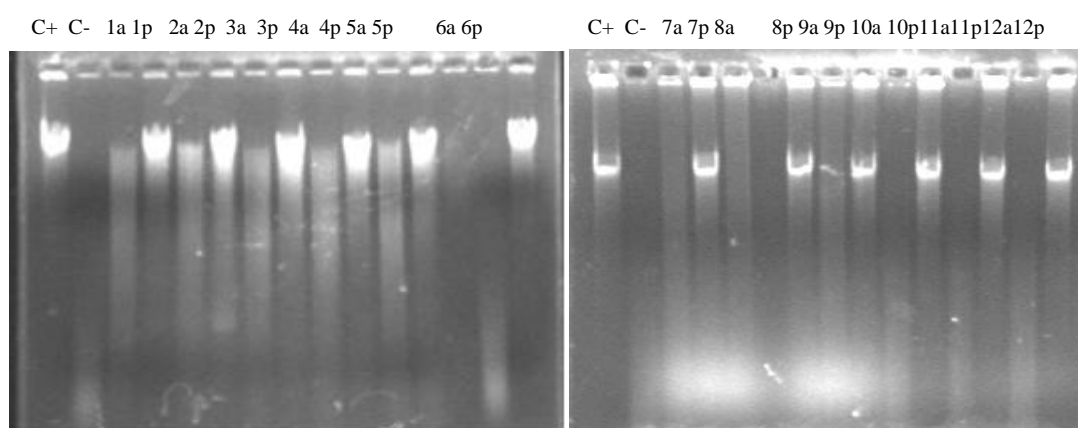
**Anexo 4.** Tabela com os valores da actividade antioxidante total pelo método de ABTS<sup>·+</sup> e o teor de fenólicos totais a partir do método de Folin-Ciocalteu dos extractos hidroetanólicos analisados directamente na solução.

Parte da Planta	Concentração de etanol (%)	ABTS <sup>·+</sup> (g L <sup>-1</sup> equivalente a ácido ascórbico)	Folin-Ciocalteu (g L <sup>-1</sup> equivalente a ácido gálico)
Caule	0	0,225 ± 0,016 bc	0,274 ± 0,054 bc
	20	0,240 ± 0,033 c	0,295 ± 0,041 c
	40	0,422 ± 0,045 d	0,503 ± 0,054 f
	65	0,683 ± 0,043 f	0,705 ± 0,050 g
	100	0,066 ± 0,015 a	0,099 ± 0,007 a
Folhas	0	0,268 ± 0,049 c	0,384 ± 0,048 d
	20	0,262 ± 0,011 c	0,439 ± 0,028 df
	40	0,695 ± 0,036 f	0,798 ± 0,005 g
	65	0,636 ± 0,083 f	0,859 ± 0,032 h
	100	0,176 ± 0,040 b	0,280 ± 0,026 c
Mistura	0	0,259 ± 0,033 c	0,247 ± 0,017 bc
	20	0,270 ± 0,012 c	0,341 ± 0,021 cd
	40	0,423 ± 0,023 d	0,474 ± 0,063 f
	65	0,571 ± 0,017 e	0,724 ± 0,025 g
	100	0,096 ± 0,008 a	0,204 ± 0,030 b

**Anexo 5.** Tabela com os valores da actividade antioxidante total pelo método de ABTS<sup>•+</sup> e o teor de fenólicos totais a partir do método de Folin-Ciocalteu dos extractos hidroetanólicos calculado tendo por base o extracto seco.

Parte da Planta	Concentração de etanol (%)	ABTS <sup>•+</sup> (g/g equivalente a ácido ascórbico)	Folin-Ciocalteu (g/g equivalente a ácido gálico)
Caules	0	0,025 ± 0,002 d	0,030 ± 0,006 de
	20	0,017 ± 0,002 bc	0,021 ± 0,003 b
	40	0,032 ± 0,003 e	0,038 ± 0,004 f
	65	0,055 ± 0,003 f	0,057 ± 0,004 h
	100	0,026 ± 0,006 d	0,038 ± 0,003 f
Folhas	0	0,019 ± 0,003 c	0,027 ± 0,003 cd
	20	0,013 ± 0,001 ab	0,023 ± 0,001 bc
	40	0,034 ± 0,002 e	0,036 ± 0,006 ef
	65	0,034 ± 0,004 e	0,045 ± 0,002 g
	100	0,034 ± 0,008 e	0,055 ± 0,005 h
Mistura	0	0,014 ± 0,002 abc	0,013 ± 0,001 a
	20	0,011 ± 0,000 a	0,014 ± 0,001 a
	40	0,017 ± 0,001 bc	0,019 ± 0,003 ab
	65	0,027 ± 0,001 d	0,034 ± 0,001 ef
	100	0,015 ± 0,001 abc	0,031 ± 0,005 de

**Anexo 6.** Imagens das electroforeses obtidas no teste de ADN para avaliação do efeito antioxidante (a) e pró-oxidante (p) nos diferentes extractos da *M. cervina*.



**Figura 17 -** Electroforese do teste de ADN para avaliação do efeito antioxidante (a) e pró-oxidante (p) de diferentes extractos de *Mentha cervina* (extractos hidroetanólicos a 40 mg mL<sup>-1</sup>, extractos aquosos a 60 mg mL<sup>-1</sup> e óleo essencial a 60 mg mL<sup>-1</sup>). C+, controlo positivo (DNA+PBS); C-, controlo negativo (DNA+PBS+oxidante); (1) 100 % de etanol na folha da planta; (2) 65 % de etanol na folha da planta; (3) 40 % de etanol na folha da planta; (4) 20 % de etanol na folha da planta; (5) 0 % de etanol na folha da planta; (6) óleo essencial; (7), (8) e (9) infusão em pó; (10), (11) e (12) infusão de planta inteira.