



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Caracterização química e actividade biológica dos óleos essenciais e extractos aquosos de algumas *Lavandula* spp. do Sul de Portugal

Sílvia Alexandra Macedo Arantes

Orientador:

Professora Doutora Maria do Rosário Caeiro Martins

2012

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Caracterização química e actividade biológica dos óleos essenciais e extractos aquosos de algumas *Lavandula* spp. do Sul de Portugal

Sílvia Alexandra Macedo Arantes

Orientador:

Professora Doutora Maria do Rosário Caeiro Martins

Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Maria do Rosário Martins pela sua orientação, disponibilidade, motivação, compreensão, amizade e auxílio nas dificuldades ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais pela sua disponibilidade, amizade e auxílio ao longo de todo o trabalho.

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

À Dr.^a Fátima Candeias pelo auxílio e disponibilidade nos estudos farmacológicos com animais.

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

Ao ICAAM e ao Departamento de Química da Universidade de Évora, pela disponibilização dos reagentes e equipamentos necessários à realização do presente trabalho

Ao Hospital Veterinário e à Prof.^a Doutora Cristina Queiroga, pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário para realização dos ensaios com microrganismos patogénicos.

Ao Laboratório Flaviano Gusmão, Lda. (Évora) pela cedência das estirpes bacterianas patogénicas utilizadas neste estudo.

À Dr.^a Cátia Salvador e à Dr.^a Diana Alcobia pela companhia, auxílio e amizade.

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

À minha família, principalmente, aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio e carinho em todos os momentos e a todos os meus amigos, em especial à Carla Boal e ao Victorino Bandeira, pela amizade, confiança e suporte nos momentos mais importantes da minha vida, encorajando-me a ultrapassar todos os difíceis obstáculos e desafios.

OBRIGADA! Sílvia.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ABREVIATURAS	XI
UNIDADES.....	XII
RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas Aromáticas	1
1.1.1 Alcaloides.....	4
1.1.2 Compostos fenólicos	4
1.1.3 Terpenos.....	5
1.1.4 Óleos essenciais.....	5
1.2 <i>Lavandula</i> spp.....	7
1.2.1 <i>L. luisieri</i> ou <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	8
1.2.2 <i>L. pedunculata</i>	9
1.2.3 <i>L. viridis</i>	10
1.2.4 Usos etnofarmacológicos	10
1.3 Atividades biológicas dos produtos naturais.....	13
1.3.1 Atividade antioxidante	14
1.3.2 Atividade antimicrobiana	17
1.3.3 Atividade analgésica e anti-inflamatória.....	26
2 ENQUADRAMENTO DA PROBLEMÁTICA E OBJETIVOS	29
2.1 Problemática.....	29
2.2 Objetivos.....	31
2.2.1 Objetivo geral	31
2.2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Colheita e preparação da planta	33
3.2 Obtenção dos óleos essenciais e hidrolatos.....	33

3.3	Caracterização dos óleos essenciais.....	34
3.3.1	Determinação do índice de refração dos óleos essenciais	34
3.3.2	Análise da composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa (GC).....	34
3.4	Caracterização dos extratos	35
3.4.1	Análise qualitativa por pesquisa fitoquímica	35
3.4.1.1	Fenóis e taninos.....	35
3.4.1.2	Antocianinas, antocianidinas e flavonoides.....	35
3.4.1.3	Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.....	36
3.4.1.4	Flavonois, flavonas, flavanonois e xantonas.....	36
3.4.1.5	Catequinas.....	37
3.4.1.6	Flavonoides.....	37
3.4.1.7	Esteroides e triterpenoides.....	37
3.4.1.8	Cumarinas.....	37
3.4.1.9	Saponinas	38
3.4.1.10	Alcaloides	38
3.4.1.11	Oses e polioses	38
3.4.2	Análise quantitativa.....	39
3.4.2.1	Avaliação dos fenóis totais.....	39
3.4.2.2	Avaliação dos flavonoides totais.....	40
3.5	Estudo da atividade antioxidante.....	40
3.5.1	Método da redução do DPPH.....	41
3.5.2	Método do β -Caroteno/ Ácido Linoleico.....	42
3.6	Avaliação atividade antimicrobiana	43
3.6.1	Preparação das suspensões de microrganismos.....	44
3.6.2	Método de difusão em meio sólido	44
3.6.3	Concentração mínima inibitória	45
3.7	Avaliação da atividade toxicológica e farmacológica.....	46
3.7.1	Avaliação da citotoxicidade em <i>Artemia salina</i>	46
3.7.2	Avaliação do perfil hipocrático e determinação da dose letal 50 (DL50)	47
3.7.3	Análise histológica e histomorfométrica.....	48
3.7.4	Avaliação da atividade analgésica	49

3.7.5	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	50
3.8	Análise estatística dos resultados.....	51
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	52
4.1	Caraterização química dos óleos essenciais.....	52
4.2	Caracterização dos extratos de <i>Lavandula spp.</i>	55
4.3	Avaliação das propriedades antioxidantes dos óleos e extratos	59
4.4	Avaliação da citotoxicidade em <i>Artemia salina</i>	68
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana	69
4.6	Avaliação da toxicidade aguda e <i>screening</i> farmacológico	74
4.7	Avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória.....	86
5	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	89
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXOS.....	100

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo do metabolismo nas células vegetais.	2
Figura 2 – Alguns compostos presentes nos óleos essenciais.	6
Figura 3- Fotografia de <i>L. luisieri</i>	8
Figura 4- Fotografia de <i>L. pedunculata</i>	9
Figura 5- Fotografia de <i>L. viridis</i>	10
Figura 6 - Regime simplificado não estequiométrico dos sistemas oxidante e antioxidante nas células	15
Figura 7- Classificação dos antioxidantes.	16
Figura 8 - Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antimicrobianos.....	22
Figura 9 – Mecanismos e locais de ação dos metabolitos secundários na célula bacteriana.....	24
Figura 10 – Esquema da formação de COX pela via do ácido araquidónico.....	27
Figura 11 – Esquema da inibição da COX-2.	28
Figura 12- Sistema de hidrodestilação de óleos essenciais.....	34
Figura 13- Reação do ácido gálico com o molibdénio, presente no reagente de Folin- Ciocalteu	39
Figura 14- Formação do complexo flavonoide-alumínio	40
Figura 15- Esquema representativo da redução do DPPH	41
Figura 16- Descrição esquemática da auto-oxidação do ácido linoleico	42
Figura 17 – Concentração de fenóis totais expressos em concentração de ácido pirogálico ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	57
Figura 18 – Concentração de flavonoides totais expressos em concentração de quercetina (mg/mL).....	58
Figura 19 – Atividade antioxidante pelo método de radical DPPH	60
Figura 20 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do radical DPPH \cdot , expressa em [ácido ascórbico].	61
Figura 21 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do radical DPPH \cdot , expressa em [quercetina]......	61
Figura 22 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	63
Figura 23 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, expressa em [ácido ascórbico].....	64
Figura 24 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, expressa em [quercetina].	64

Figura 25 – Cortes histológicos da região pericentral do fígado corados à Hematoxilina e Eosina (H&E).....	78
Figura 26 – Cortes histológicos da região pericentral do fígado.....	79
Figura 27 – Região cortical do rim, observando-se secções transversais dos túbulos proximais e de glomérulos	82
Figura 28 – Região medular do rim, onde se destacam os túbulos proximais seccionados transversalmente.....	83
Figura 29 – Região medular do rim. Observam-se secções transversais da porção espessa da alça de Henle, cuja parede é constituída por epitélio cúbico simples.....	84
Figura 30 – Atividade analgésica para o óleo essencial e hidrolato das folhas de <i>L. luisieri</i>	86
Figura 31 – Atividade anti-inflamatória para o óleo essencial e hidrolato das folhas de <i>L. luisieri</i>	88
Figura 32- Cromatogramas tipo dos óleos essenciais	100
Figura 33 - Curva de calibração obtida para o padrão ácido pirogálico, para quantificação de fenóis totais.	101
Figura 34 - Perfil da quantificação de fenóis totais nos hidrolatos método de <i>Folin-Ciocalteu</i>	101
Figura 35 - Curva de calibração obtida para o padrão quercetina, para a quantificação de flavonoides totais.	103
Figura 36 – Perfil da quantificação dos flavonoides totais para os hidrolatos	103
Figura 37 – Atividade antioxidante pelo método de radical DPPH, para os padrões	105
Figura 38 – Atividade antioxidante pelo método de radical β -caroteno/ácido linoleico, para os padrões	108
Figura 39 – Curvas dose-resposta para a determinação da CL ₅₀ com ensaio de citotoxicidade em <i>Artemia salina</i>	112

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estudo anteriores realizados com <i>Lavandula spp.</i>	11
Tabela 2 - Descrição das bactérias em estudo	18
Tabela 3 - Descrição das leveduras em estudo	20
Tabela 4 - Descrição dos fungos em estudo	21
Tabela 5 - Exemplos de antibióticos com os respetivos mecanismos de ação	23
Tabela 6 - Características dos óleos essenciais	52
Tabela 7 - Composição química dos óleos essenciais	53
Tabela 8 - Rendimento de extração dos hidrolatos	55
Tabela 9 - Composição fitoquímica dos hidrolatos	56
Tabela 10 - Valores de IC ₅₀ (mg/mL).....	66
Tabela 11 - Valores de concentração letal 50 (CL ₅₀)	68
Tabela 12 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	69
Tabela 13 - Valores da concentração mínima inibitória.....	71
Tabela 14 - Atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	72
Tabela 15 - Valores da concentração mínima inibitória para as estirpes fúngicas.....	73
Tabela 16 - Resumo do perfil hipocrático para o óleo essencial das folhas de <i>L. luisieri</i>	75
Tabela 17 - Resumo do perfil hipocrático para o hidrolato das folhas de <i>L. luisieri</i>	75
Tabela 18 - Valores da análise histomorfométrica do fígado para o óleo e hidrolato da folha de <i>L. luisieri</i>	80
Tabela 19 - Valores da análise histomorfométrica do rim para o óleo e hidrolato da folha de <i>L. luisieri</i>	85
Tabela 20 - Análise de variância ANOVA para o método de <i>Folin-Ciocalteu</i>	101
Tabela 21 - Teste de Tukey para o método de <i>Folin-Ciocalteu</i> - Comparações múltiplas	102
Tabela 22 - Análise de variância ANOVA para o método de quantificação de flavonoides	103
Tabela 23 - Teste de Tukey para o método de quantificação de flavonoides	104
Tabela 24 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do DPPH.....	105
Tabela 25 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do DPPH.....	106
Tabela 26 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos hidrolatos pelo método do DPPH.....	107

Tabela 27 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do DPPH.....	107
Tabela 28 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.....	109
Tabela 29 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do β -caroteno/ácido linoleico	109
Tabela 30 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos hidrolatos pelo método do β -caroteno/ácido linoleico	110
Tabela 31 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do β -caroteno/ácido linoleico	111
Tabela 32 - Atividade antimicrobiana dos antibióticos específicos	113
Tabela 33 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antimicrobiana face a bactérias patogénicas.....	114
Tabela 34 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antimicrobiana face a bactérias patogénicas.....	115
Tabela 35 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antimicrobiana face a leveduras patogénicas.....	117
Tabela 36 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antimicrobiana face a leveduras patogénicas.....	118
Tabela 37 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antimicrobiana face a fungos filamentosos	119
Tabela 38 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antimicrobiana face a fungos filamentosos	119
Tabela 39 - Perfil hipocrático para o óleo essencial das folhas de <i>L. luisieri</i>	122
Tabela 40 - Perfil hipocrático para o hidrolato das folhas de <i>L. luisieri</i>	123
Tabela 41 - Análise de variância ANOVA para a avaliação histomorfométrica	124
Tabela 42 - Teste de Duncan para a avaliação histomorfométrica	124
Tabela 43 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade analgésica.....	127
Tabela 44 - Teste de Duncan para a avaliação da atividade analgésica.....	127
Tabela 45 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade anti-inflamatória	128
Tabela 46 - Teste de Duncan para a avaliação da atividade anti-inflamatória	128

Abreviaturas

- A – Absorvência;
ATCC – Coleção americana de culturas tipo, do inglês “American Type Culture Collection”;
AAI-Atividade anti-inflamatória
Aan-Atividade analgésica
CCMI – Coleção de culturas de microrganismos industriais (LNEG e INRB, Portugal);
CL50-Concentração Letal 50
CMI – Concentração Mínima Inibitória, do inglês “Minimum Inhibitory Concentration”;
DL50-Dose Letal 50
DMSO-Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”;
EC50 – Concentração efetiva 50% (Concentração efetiva de um composto que provoca um efeito inibitório de 50% no crescimento de uma determinada população microbiana);
EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético, do inglês “Ethylenediamine Tetraacetic Acid”;
g – Aceleração gravítica;
HPLC – Cromatografia líquida de elevada eficiência, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”;
IUPAC – União internacional de química pura e aplicada, do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”;
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, do inglês “Liquid Chromatography Mass Spectrometry”;
NA – Meio agar nutriente, do inglês “Nutrient agar”
NB – Meio caldo nutriente, do inglês “Nutrient broth”
NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards
OCDE-Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
pH – Potencial de Hidrogénio;
RNA – Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”;
ROS-Espécies reativas de oxigénio
rpm – Rotações por minuto;
SDA – Meio de Sabouraud dextrose agar
SDB – Caldo de Sabouraud dextrose
SNC-Sistema Nervosa Central
UV – Ultravioleta;
UFC – Unidade formadora de colónias;
VIS – Visível;
 λ – Comprimento de onda;

Unidades

%-percentagem

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

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

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

L; mL; μL - Litro; mililitro; microlitro

M; mM; μM - Molar; milimolar; micromolar

N – Normal

$^{\circ}\text{C}$ -Graus Celsius

Resumo

Caracterização química e actividade biológica dos óleos essenciais e extractos aquosos de algumas *Lavandula* spp. do Sul de Portugal

No presente trabalho estudaram-se três espécies do género *Lavandula*, do sul de Portugal: *L. luisieri* e *L. pedunculata* (Alentejo) e *L. viridis* (Algarve), com vista caracterizar a composição química dos óleos essenciais das diferentes espécies, parte vegetativa (folha) e espiga floral, e dos respetivos extratos de hidrodestilação, e avaliar as propriedades antioxidante, antimicrobiana, toxicológica, analgésica e anti-inflamatória de alguns dos seus óleos essenciais e extratos aquosos, mais promissores.

Os resultados mostraram importantes diferenças na composição química dos óleos essenciais, quanto à diversidade e à proporção dos seus constituintes. Os óleos essenciais e hidrolatos, em estudo, apresentaram importantes propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os estudos toxicológicos e farmacológicos mostraram que os óleos apresentaram citotoxicidade em *Artemia salina*, apresentaram valores de DL₅₀ muito superiores a 2000 mg/kg em ratinhos *Swiss*, e que possuem importantes propriedades analgésicas e anti-inflamatória.

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

Palavras-chave: *L. stoechas* subsp. *luisieri*; *L. pedunculata*; *L. viridis*; óleos essenciais; extratos aquosos; composição química; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; toxicidade aguda; atividade analgésica; atividade anti-inflamatória

Abstract

Chemical characterization and biological activity of essential oils and aqueous extracts of some *Lavandula* spp. South of Portugal

The aim of present work was to develop a set of studies of three species of the genera *Lavandula*, at the South of Portugal: *L. luisieri* e *L. pedunculata* (Alentejo) e *L. viridis* (Algarve), in order to characterize the chemical composition of the essential oils (leaves and flowers) and to evaluate the antioxidant, antimicrobial, toxicological and pharmacological properties of selected essential oils and aqueous extracts.

Results show important differences in chemical composition of essential oils, both in diversity as the proportion of their constituents. Essential oils and aqueous extracts of different *Lavandula* spp. showed important antimicrobial and antioxidant properties. Pharmacological studies have shown that essential oils showed cytotoxicity against *Artemia salina*, low acute toxicity, with LD50 >> 2000 mg/kg for mice, and important analgesic and anti-inflammatory properties.

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

Keywords: *L. stoechas* subsp. *luisieri*; *L. pedunculata*; *L. viridis*; essential oils; aqueous extracts ; chemical composition; antioxidant activity; antimicrobial activity; analgesic activity; anti-inflammatory activity

1 Introdução

1.1 Plantas Aromáticas

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, nomeadamente, alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenóides, muitos dos quais se constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. Até meados do século XIX, os principais agentes terapêuticos eram constituídos por produtos à base de plantas. Atualmente, os compostos obtidos a partir de plantas desempenham um papel relevante na medicina e nossa dieta (Camejo-Rodrigues *et al.* 2003), sendo cada vez mais usadas a par dos medicamentos convencionais, ou até mesmo como seus substitutos, com fins curativos ou preventivos (Mendes *et al.* 2010; Roura *et al.* 2010), devido à grande variedade de efeitos que produzem. Destas, as plantas aromáticas são cada vez mais usadas como agentes terapêuticos, cosméticos e aditivos alimentares, a par de produtos de síntese industrial, com aplicação na Fitoterapia. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 80% da população mundial recorre a produtos à base de extratos de plantas e/ou dos seus componentes ativos para diversos fins, inclusive os cuidados de saúde (Ssegawa *et al.* 2007; Krishnaiah *et al.* 2010).

As plantas aromáticas caracterizam-se por possuírem, em estruturas especializadas, óleos essenciais. Estes são compostos voláteis pertencentes a vários grupos químicos e resultam dos seus processos metabólicos, nomeadamente o metabolismo secundário. Os óleos essenciais, apesar de serem praticamente insolúveis na água, podem ser arrastados pelo vapor de água (Dixon 2005; Cunha *et al.* 2007). Os óleos essenciais e extratos aquosos obtidos a partir de várias plantas ganharam, recentemente, popularidade e interesse científico. Muitas plantas têm sido utilizadas para diferentes fins, tais como, aditivos alimentares, medicamentos e perfumes (Tepe *et al.* 2005).

O crescente interesse pelo uso destes produtos justifica o aprofundamento do conhecimento científico a seu respeito, a par do saber e práticas tradicionais, de modo a permitir uma utilização adequada, eficaz e segura dos mesmos.

O metabolismo, conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células e permite transformar e converter compostos orgânicos em energia sob a forma de ATP, é uma das características dos seres vivos e encontra-se, geralmente, dividido em metabolismo primário e metabolismo secundário. Nas plantas, os metabolitos primários englobam os sistemas bioquímicos de manutenção, fundamentais para o desenvolvimento das plantas. Os metabolitos secundários são mais específicos de plantas correlacionadas, de uma mesma espécie ou de um género, e são responsáveis por um conjunto de reações químicas que desempenham funções de sobrevivência, proteção, reprodução e competição ambiental (Taiz *et al.* 2002; Dixon 2005; Aharoni *et al.* 2011).

Alguns estudos referem que os metabolitos exercem funções ecológicas importantes nas plantas: protegem as plantas contra herbívoros e microrganismos patogénicos e funcionam como atrativos para agentes polinizadores (Taiz *et al.* 2002; Hartmann 2007). Na Figura 1 encontra-se representado os produtos resultantes do metabolismo vegetal.

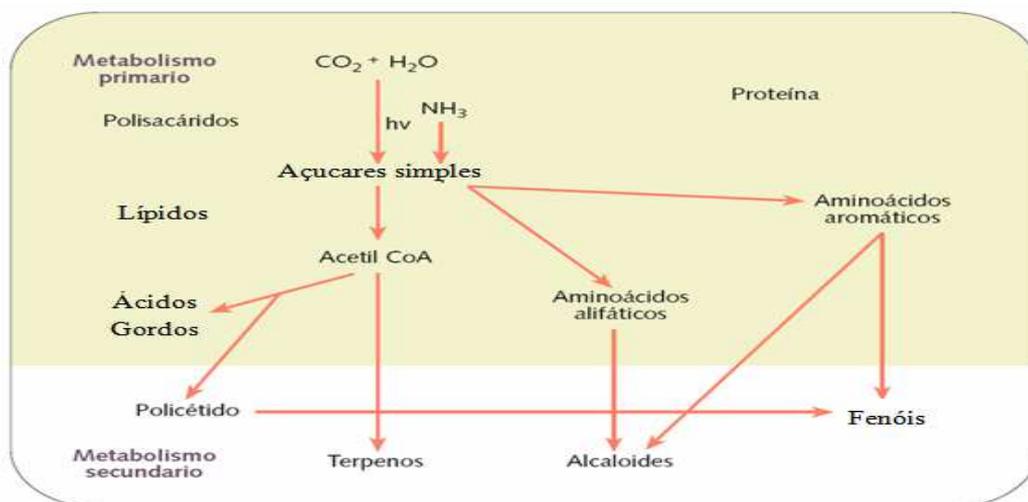


Figura 1 – Esquema representativo do metabolismo nas células vegetais.
Adaptado de Prats, 2007

Todo o metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos, donde resultam as substâncias do metabolismo primário das quais derivam os metabolitos secundários. A glicólise é a via metabólica pelo qual se formam quase todos os metabolitos primários e secundários. As substâncias do metabolismo

primário, glúcidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos e fontes de energia (ATP e NADPH), fazem parte da atividade celular de praticamente todos os seres vivos, desde os organismos unicelulares até o homem. A glicose, ao ser convertida em ácido pirúvico pode entrar na via do ácido chiquímico para formar todos os metabolitos secundários aromáticos (por ex.: alcaloides indólicos, quinolínicos, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Se o ácido pirúvico não seguir esta via, è oxidado a aceti-coenzima A (acetil-CoA). A acetil-coA pode seguir três vias distintas: a via do ácido cítrico formando alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos; a via do ácido mevalónico originando terpenoides e esteróis; e a via da condensação do acetato formando os metabolitos secundários derivados do acetato, nomeadamente as acetogeninas. As antraquinonas, flavonóides e os taninos condensados resultam da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes (Hartmann 2007; Aharoni *et al.* 2011).

Os metabolitos secundários, compostos derivados biologicamente dos metabolitos primários, além de desempenharem um importante papel na adaptação das plantas ao seu ambiente, representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (Bourgaud *et al.* 2001). A sua produção é frequentemente baixa (menos de 1% do peso seco) e depende muito do estágio fisiológico e de desenvolvimento da planta. Muitos metabolitos secundários apresentam uma estrutura única e complexa e a sua produção é frequentemente reforçada pelas condições de *stress* biótico e abiótico (Oksman-Caldentey *et al.* 2004; Kirsi-Marja Oksman-Caldentey 20004) .

Os metabolitos secundários apresentam estruturas diversas, farmacologicamente ativos e com potencial terapêutico e fitoterapêutico (Venkataramanan *et al.* 2006). Os metabolitos secundários podem ser agrupados em três classes principais: alcaloides, compostos fenólicos e terpenos (terpenoides) (Rattan 2010).

1.1.1 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de azoto no seu anel. Os alcaloides são sintetizados no retículo endoplasmático e derivam de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina - derivados do ácido chiquímico) e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). A maioria possui carácter básico, podendo ser encontrados em grandes quantidades em muitos membros das famílias *Berberidaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, e *Ranunculaceae* (Rattan 2010). Estes compostos apresentam propriedades bactericidas e inseticidas em baixas concentrações e também tóxicos para os vertebrados. Muitos alcaloides são venenos poderosos e alguns são empregues na medicina pela ação específica que exercem. O seu modo de ação varia consoante o grupo a que pertence, no entanto a sua atividade biológica principal é inibir o enzima acetilcolinesterase, afetando os recetores de acetilcolina no sistema nervosa central. Uma das principais características dos alcaloides é a sua capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, podendo afetar, também, os canais de sódio da membrana dos neurónios (Rattan 2010).

1.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de um grupo hidroxilo ligado a um anel de benzeno ou a outras estruturas complexas do anel aromático por exemplo, catecol, resorcinol, hidroquinona. Derivam de diferentes vias metabólicas, constituindo um grupo bastante heterogéneo do ponto de vista metabólico. No entanto, existem duas vias metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalónico. Estes compostos variam de fenóis simples (encontrados no óleo essencial de *Pinus sylvestris*) para polifenóis, como antocianinas e taninos (Rattan 2010), sendo subdivididos em dois grupos principais: os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os ácidos fenólicos são, estruturalmente fenóis simples que incluem dois grupos: os ácidos hidrocínâmicos e os ácidos hidroxibenzoicos. Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados de origem natural, sendo-lhes atribuídas varias propriedades biológicas, entre as quais a capacidade antioxidante (Ghasemzadeh *et al.* 2011).

1.1.3 Terpenos

Os terpenos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e perfumaria, bem como em uma ampla gama de aplicações farmacológicas. Incluem o maior grupo de produtos naturais a partir de plantas que compreende os óleos essenciais, aromas, fragrâncias e pigmentos vegetais lipossolúveis. Estes compostos são hidrofóbicos, normalmente armazenado em instalações em ductos de resina, óleo ou células tricomas glandulares. São derivados de unidades de isopreno de 5 carbonos, tais como hemiterpenos C5, monoterpenos C10, sesquiterpenos C15, diterpenos, C20, sesquiterpenos, C25, triterpenos, C30, tetraterpenos C40 e politerpenos C50 ou mais.

As misturas de terpenos contendo compostos com diferentes propriedades físicas podem ser mais tóxicos com maior persistência de defesas (Rattan 2010).

1.1.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, metabolitos secundários das plantas aromáticas contribuem para uma importante fonte de compostos bioativos com aplicação em Fitoterapia. São compostos complexos voláteis caracterizados por um odor forte e são ricos em compostos terpénicos, nomeadamente monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), apesar de diterpenos (C20) também poderem estar presentes, bem como uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e, excepcionalmente, compostos contendo azoto (N) e enxofre (S), cumarinas e homólogos de fenilpropanóides (Benchaar *et al.* 2008). Geralmente, os principais constituintes dos óleos essenciais são os principais monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos monoterpénicos, hidrocarbonetos sesquiterpénicos e sesquiterpenos oxigenados, no entanto também se pode encontrar em pequenas percentagens compostos derivados do benzeno e alguns ésteres nos óleos essenciais (Chiang *et al.* 2010).

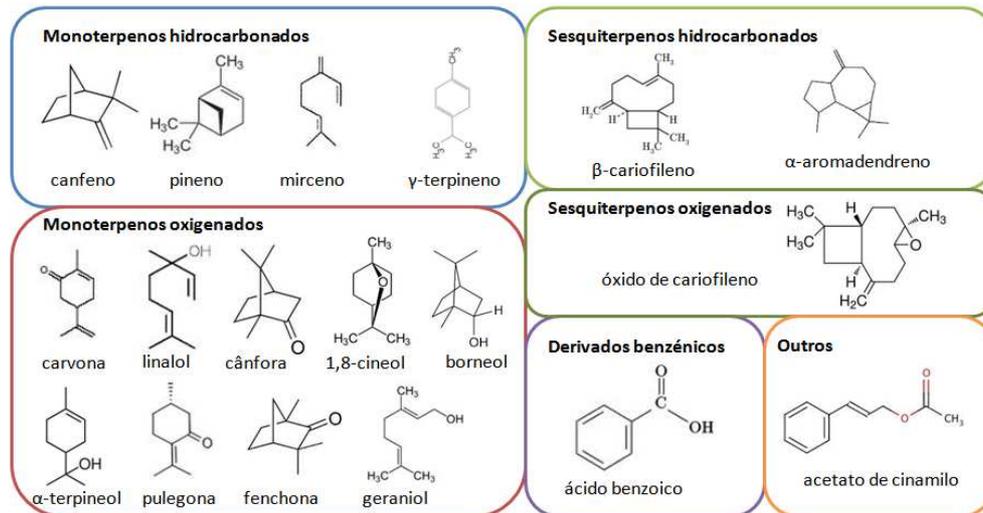


Figura 2 – Alguns compostos presentes nos óleos essenciais.
Adaptado de Nagegowda, 2010

Os óleos essenciais são extraídos de várias plantas aromáticas geralmente localizadas em países de clima temperado para quente como os Mediterrânicos e os países tropicais, onde representam uma parte importante de uma farmacopeia tradicional.

Os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o seu apetite para essas plantas. Estes compostos também podem atrair alguns insetos que favoreçam a dispersão do pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis.

Alguns óleos essenciais, dependendo da sua composição, parecem apresentar propriedades medicinais particulares que têm sido reivindicadas para a cura de uma ou outra disfunção de órgão ou desordem sistémica, nomeadamente atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, efeito sedativo, antiespasmódico e/ou anti-inflamatórios. Além disso, algumas composições de óleos essenciais podem inibir as funções metabólicas de microrganismos, ou seja, crescimento e reprodução (Bernardo-Gil *et al.* 2002; Bakkali *et al.* 2008; Benchaar *et al.* 2008). Alguns estudos referem que os óleos essenciais e seus componentes voláteis são usados para prevenir e tratar doenças humanas como cancro e doenças cardiovasculares (aterosclerose e trombose) (Chiu *et al.* 2009; Chiang *et al.* 2010).

O Alentejo é uma zona muito rica em plantas aromáticas, muitas das quais nativas da região e outras cultivadas, muito utilizadas pelas populações. Os estudos etnobotânicos estão normalmente associados a estudos etnofarmacológicos com vista a conhecer as aplicações e uso dos fármacos de origem natural associados aos sistemas tradicionais da Medicina.

1.2 *Lavandula* spp.

As plantas do género *Lavandula* L. pertencem à família *Labiatae* e compreendem cerca de trinta e duas espécies, além das espécies híbridas. Algumas *Lavandula* spp., conhecidas vulgarmente por rosmaninho, apresentam difícil classificação taxonómica devido à sua capacidade de hibridização e diversidade morfológica e são das

plantas aromáticas e medicinais mais populares e de grande importância económica. Estas plantas têm sido usadas tradicionalmente, tanto secas ou como óleo essencial, num grande número de aplicações, sendo o óleo frequentemente usado na aromaterapia, indústria farmacêutica e incorporado em produtos com agradável fragrância ou agente antimicrobiano (Cavanagh *et al.* 2002; Upson *et al.* 2002; Hajhashemi *et al.* 2003). O seu óleo essencial é produzido, geralmente, por destilação, quer da espiga floral como das folhas. No entanto, estes óleos apresentam composição muito variável, consoante a espécie e o órgão da planta, sendo o óleo derivado das flores, geralmente, mais aromático (Cavanagh *et al.* 2002).

As espécies do género *Lavandula*, apesar de diferirem na composição dos óleos essenciais, têm propriedades etnobotânicas semelhantes, sendo as espécies *L. angustifolia* Mill., *L. latifolia* Medik., *L. stoechas* L. as mais comumente usadas. A região sul de Portugal é rica em plantas aromáticas, entre as quais as nativas

Taxonomia

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Subdivisão: *Magnoliophytina (Angiospermae)*

Classe: *Magnoliopsida*

Sub-classe: *Asteridae*

Ordem: *Lamiales*

Família: *Labiatae (Lamiaceae)*

Género: *Lavandula*

Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas Martínez, *L. pedunculata* (Mill.) Cav., e do Algarve, *L. viridis* L'Hér. Estes espécimes são frequentes nos sub-bosques de azinhais, sobreirais e pinhais de pinheiro bravo, matagais, estevais e sargaçais, em solos arenosos, quartzíticos, graníticos e xistosos.

1.2.1 *L. luisieri* ou *L. stoechas* subsp. *luisieri*

A *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas Martínez é uma espécie afim das alfazemas (*L. angustifolia*) com utilização em fitoterapia e aromaterapia, sendo vulgarmente conhecida por rosmaninho, (Miguel *et al.* 2009). Morfologicamente, é um caméfito lenhoso e tomentoso, com folhas oblongas a lanceoladas acinzentado-tomentosas. As inflorescências são espigas cilíndricas pálido-púrpúreas ou púrpura-anegradas, curtamente pedunculadas ou sésseis. É endémica da Península Ibérica, muito comum no Sudoeste de Espanha e no Centro e Sul de Portugal. É uma planta termófila, típica dos sargaçais de solos xistosos ou calcários, bastante secos (Cunha *et al.* 2007). Do ponto de vista biogeográfico, trata-se de uma espécie de ampla distribuição na Bacia Mediterrânica e que alcança grande variabilidade genética e, conseqüentemente, morfológica na Península Ibérica (Castroviejo 2010).



Figura 3- Fotografia de *L. luisieri* (Primavera (Herdade da Mitra, Universidade de Évora)

Recentemente, de acordo com a flora Ibérica, a *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas Martínez foi classificada como *L. stoechas* L. subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira, tendo sido incluída, devido à semelhança morfológica, no género *stoechas*, o qual passou a compreender duas subespécies: *L. stoechas* L. subsp. *stoechas* e *L. stoechas* L. subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira (Castroviejo *et al.*, 2010). No entanto, a composição química do óleo essencial das *L. stoechas* subsp. *stoechas* e *L. stoechas* subsp. *luisieri* é distinta (Baldovini *et al.* 2005) (Lavoine-Hanneguelle *et al.* 2004), pelo que esta classificação tem sido controversa. Alguns estudos referem que o óleo de *L. luisieri* tem uma composição única no reino *Plantae*, contendo componentes derivados do necrodano e que o óleo essencial da espiga contém, maioritariamente, acetato de α -

necrodilo, 1,8-cineol, acetato de lavandulilo, α -pineno, α -necrodol, linalol, cânfora e fenchona, enquanto o óleo essencial da folha contém maioritariamente acetato de α -necrodilo, 1,8-cineol, acetato de lavandulilo, α -pineno, α -necrodol e linalol (Lavoine-Hanneguelle *et al.* 2004; Delgado 2010; Zuzarte *et al.* 2012).

1.2.2 *L. pedunculata*

A *L. pedunculata* (Mill.) Cav. é uma espécie afim da *L. luisieri*, conhecida vulgarmente por rosmaninho-maior. Esta distingue-se da *L. luisieri* sobretudo pelas formas das brácteas e pelos comprimentos dos pedúnculos das espigas e pela composição dos seus óleos essenciais (Franco 1984; Miguel *et al.* 2009; Zuzarte *et al.* 2010). A *L. pedunculata* apresenta hastes florais muito longas (5-24cm) e brácteas férteis com 4-7 x 4-6mm mais ou menos obtriangulares, enquanto na *L. luisieri* o pedúnculo pode variar de 0-30mm e as brácteas férteis são cordado-reniformes.

Morfologicamente, é um caméfito lenhoso ou nanofanerófito tomentoso com folhas acizentado-tomentosas ou verde-acizentado-tomentosas inteiras, lineares a oblongo-oblanceoladas e floresce de Março a Julho (Franco 1984). É endémica de Península Ibérica e norte de África, crescendo em carrasçais, tomilhais, sargaçais, piornais, estevais, zimbrais, arrelvados pobres e etapas de substituição de azinhais (*Quercus rotundifolia* Lam.), carvalhais de carvalho português (*Quercus faginea* Lam. subsp. *broteroi* (Cout.) A. Camus) e sobreirais (*Quercus suber* L.). Aparece também em terrenos baldio, dunas litorais, em solos siliciosos e xistosos, 0 a 1700 m de altitude.

Um estudo realizado com *L. pedunculata* do centro de Portugal (Zuzarte *et al.* 2009) refere que o seu óleo essencial é constituído maioritariamente por monoterpenos oxigenados (69-89%) e monoterpenos hidrocarbonados (4.25-22.5%), apresentando como constituintes maioritários a fenchona (1.3 – 59.7%), o 1,8-cineol (2.4 – 55.5%) e a cânfora (3.6 – 48.0%).



Figura 4- Fotografia de *L. pedunculata* Primavera (Évora)

1.2.3 *L. viridis*

A *L. viridis* L'Hér é uma espécie afim da *L. luisieri* conhecida por rosmaninho-verde ou rosmaninho-branco. Morfologicamente, é um caméfito lenhoso e viloso-pubescente, com folhas verdes viloso-pubescentes inteiras oblongas a lineares e brácteas esverdeadas a amareladas, florescendo de Março a Maio (Junho) (Franco 1984). É endémica da Península Ibérica, Madeira e Açores, podendo ser encontrada em matagais silicícolas, estevais, urzais, sobreirais, carrascais, azinhais, medronhais e pinhais, em solos pedregosos, arenosos, argilosos e raramente calcários, 70 a 850 m de altitude, sendo comum na charneca alentejana e algarvia (Nogueira *et al.* 2002; Cunha *et al.* 2007).



Figura 5- Fotografia de *L. viridis* Primavera (Serra de Monchique, Algarve)

Estudos efetuados com *L. viridis*, citam que o óleo essencial da parte aérea desta espécie revelam propriedades antioxidantes e são constituídos por monoterpenos oxigenados (> 50%) e hidrocarbonados (> 20%) e sesquiterpenos (<5%), apresentando como compostos maioritários: 1,8-cineol, cânfora, α -pineno e linalol, sendo as suas folhas usadas, secas, em aplicações médicas na Madeira, Portugal (Nogueira *et al.* 2002; Gonçalves *et al.* 2008; Zuzarte *et al.* 2011; Costa *et al.* 2012).

1.2.4 Usos etnofarmacológicos

Algumas plantas, incluindo *L. angustifolia*, estão aprovadas pela Comissão Europeia (EMEA- *European Medicines Agency*) para utilização em fitoterapia enquanto outras espécies do género *Lavandula* estão a ser estudadas atualmente, havendo poucos estudos referenciados na literatura (EMEA 1995; Directiva2004/24/EC 2004; EMEA/HMPC/611604/2009 2009).

Algumas espécies *Lavandula* spp. têm sido estudadas a nível mundial para avaliarem as suas propriedades terapêuticas (Tabela 1). A *L. angustifolia* é a espécie mais estudada devido à sua à sua grande importância na indústria de fragrâncias, e alguns estudos já comprovaram diminuição de ansiedade a partir do uso do seu óleo

essencial (Bradley *et al.* 2007), bem como propriedades sedativas e antibacterianas e analgésicas e anti-inflamatórias (Cavanagh *et al.* 2002; Hajhashemi *et al.* 2003; Porto *et al.* 2009). Em Portugal, têm sido efetuados alguns estudos para avaliar a composição química e algumas atividades antioxidantes e atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis* (Nogueira *et al.* 2002; Lavoine-Hanneguelle *et al.* 2004; Baldovini *et al.* 2005; Miguel *et al.* 2009; Zuzarte *et al.* 2009)

Tabela 1 - Estudo anteriores realizados com *Lavandula* spp.

Ano	Autor (es)	Periódico	Estudo
2012	Costa <i>et al.</i>	Food Chemistry	Extração com fluido supercrítico e hidrodestilação para a recuperação de compostos bioativos a partir de <i>Lavandula viridis</i> L'Hér
2011	Zuzarte <i>et al.</i>	Journal of Medical Microbiology	Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>Lavandula viridis</i> L'Hér
2012	Delgado, F.	Instituto Superior de Agronomia	Conservação e valorização de <i>Asphodelus bento-rainhae</i> P.Silva e <i>Lavandula luisieri</i> (Rozeira) Rivas -Martínez da Beira Interior
2010	Murthy <i>et al.</i>	Food Chemistry	Óleos essenciais de <i>Lavandula bipinnata</i> e sua atividade antimicrobiana
2010	Zuzarte <i>et al.</i>	Industrial Crops and Products	Tricomas, óleos essenciais e propagação <i>in vitro</i> de <i>Lavandula pedunculata</i> (Lamiaceae)
2009	Miguel <i>et al.</i>	Journal of Essential Oil Research	Capacidade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Lavandula</i> spp cultivadas no Algarve (Portugal)
2009	Rossi <i>et al.</i>	Journal of Stored Products Research	Bioatividade e análise qualitativa de alguns óleos essenciais de plantas da região mediterrânea
2009	Porto <i>et al.</i>	Food Chemistry	Compostos aromáticos de <i>Lavandula angustifolia</i> L. para utilização no fabrico de alimentos
2009	Georgiev <i>et al.</i>	Appl Biochem Biotechnol	Ácido rosmarínico e atividades antioxidantes das enzimas em cultura de suspensão celular de <i>Lavandula vera</i> MM
2009	Imelouane <i>et al.</i>	International Journal of Agriculture & Biology	Composição físico-química e atividade antimicrobiana do óleo essencial oriental marroquino da <i>Lavandula dentata</i> L.
2009	Zuzarte <i>et al.</i>	Chemistry & Biodiversity	Composição química e atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.
2008	Bakkali <i>et al.</i>	Food and Chemical Toxicology	Efeitos biológicos dos óleos essenciais

2008	Romano <i>et al.</i>	Biologia Plantarum	Headspace-SPME <i>in vitro</i> de shoot-cultures e plantas micropropagadas de <i>Lavandula viridis</i> L'Hér
2007	Hsu <i>et al.</i>	Food Chemistry	Efeitos inibitórios dos extratos aquosos de <i>Lavandula</i> spp. sobre a atividade da tirosinase de cogumelo
2007	Karadjova <i>et al.</i>	Microchemical Journal	Determinação de elementos vestigiais na inflorescência de Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.) - Sistema de óleo de lavanda
2007	Bradley <i>et al.</i>	Journal of Ethnopharmacology	Efeito ansiolítico do odor de <i>Lavandula angustifolia</i> L.
2007	Schwab <i>et al.</i>	Archives of Biochemistry and Biophysics	Clonagem e caracterização funcional de três terpeno sintases de lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i> L.)
2007	Segura <i>et al.</i>	Biochemical Systematics and Ecology	Variação do óleo essencial dentro e entre populações naturais de <i>Lavandula latifolia</i> Medik. e sua relação com as suas áreas ecológicas
2006	Ferreira <i>et al.</i>	Journal of Ethnopharmacology	Triagem <i>in vitro</i> de inibição da acetilcolinesterase e atividade antioxidante a partir de plantas medicinais de Portugal
2005	Baldovini <i>et al.</i>	Phytochemistry	Monoterpenóides necrodane de <i>Lavandula luisieri</i>
2005	Loggia <i>et al.</i>	Phytomedicine	Extratos e componentes de <i>Lavandula multifida</i> L. atividade anti-inflamatória tópica com atualidade
2005	Evandri <i>et al.</i>	Food and Chemical Toxicology	A atividade anti-mutagénica de óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i> L. (Lavanda) no ensaio de mutação bacteriana reversa
2005	Fakhari <i>et al.</i>	Journal of Chromatography A	Hidrodestilação headspace-microextração em solvente, um novo método para análise dos componentes do óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.
2004	Lavoine-Hanneguelle <i>et al.</i>	Journal of Essential Oil Research	Novos compostos do óleo essencial e absoluto de <i>Lavandula luisieri</i> L.
2004	Sanz <i>et al.</i>	Journal of Chromatography	Análise dos componentes voláteis de <i>Lavandula luisieri</i> L. por dessorção térmica directa-cromatografia gasosa-espectrometria de massa
2004	Barocelli <i>et al.</i>	Life Sciences	Efeitos anti-nociceptivo e gastroprotetor do óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> Reverchon "Grosso" administrado por inalação e por via oral
2004	Gülçin <i>et al.</i>	Food Chemistry	Comparação da atividade antioxidante de cravo (<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb) e botões de lavanda (<i>Lavandula stoechas</i> L.)

2004	Palá-Paúl <i>et al.</i>	Biochemical Systematics and Ecology	A análise dos componentes voláteis de <i>Lavandula canariensis</i> (L.) Mill., uma das espécies endémicas das Ilhas Canárias, crescendo na Austrália
2004	Barocelli <i>et al.</i>	Phytomedicine	Novas atividades antiplaquetários e antitrombóticos de óleo essencial de <i>Lavandula hybrida</i> Reverchon "grosso"
2003	Hajhashemi <i>et al.</i>	Journal of Ethnopharmacology	Propriedades anti-inflamatórias e analgésicas do extrato de folhas e óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.
2003	Büyükkuroglu <i>et al.</i>	Journal of Ethnopharmacology	Efeitos do extrato aquoso de flores de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. em neurotoxicidade induzida
2002	Cavanagh <i>et al.</i>	Phytotherapy Research	Atividades biológicas do óleo essencial de <i>Lavandula</i> spp.
2002	Lee <i>et al.</i>	Journal of Agricultural And Food Chemistry	Determinação do potencial antioxidante de extratos voláteis Isoladas de diversas ervas e especiarias
2002	Nogueira <i>et al.</i>	Phytochemical Analysis	Óleos essenciais de plantas micropropagadas de <i>Lavandula viridis</i> L'Hér
2001	Inoue <i>et al.</i>	Scientia Horticulturae	Variação nos componentes do óleo essencial em plantas (<i>Lavandula vera</i> DC) regeneradas
2000	Gilani <i>et al.</i>	Journal of Ethnopharmacology	Avaliação etnofarmacológica das atividades anticonvulsivante, sedativa e antiespasmódica de <i>Lavandula stoechas</i> L
1996	Skoula <i>et al.</i>	Biochemical Systematics and Ecology	Variação do óleo essencial de <i>Lavandula stoechas</i> L. ssp. <i>stoechas</i> selvagem em Creta (Grécia)

Grande parte dos estudos efetuados com as espécies *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis* são relativos à composição química dos seus óleos essenciais, havendo poucos estudos sobre as propriedades farmacológicas e toxicológicas dos seus óleos e extratos.

1.3 Atividades biológicas dos produtos naturais

As plantas e seus extratos têm sido utilizados pela humanidade desde o início história e os seus metabolitos secundários têm, tradicionalmente, realizado um importante papel na saúde e bem-estar humanos (Benchaar *et al.* 2008), cada vez mais

importância na terapêutica, pela eficácia e, principalmente, pelo menor número de efeitos adversos, quando comparados aos medicamentos sintéticos.

Dependendo dos componentes, os extratos vegetais podem apresentar atividade antioxidante, anti-tumoral, antibacteriana, antiviral, antifúngica, efeito sedativo, antiespasmódico, analgésico e/ou anti-inflamatórios, entre outras (Chiu *et al.* 2009; Chiang *et al.* 2010).

1.3.1 Atividade antioxidante

Os efeitos adversos do *stress* oxidativo na saúde humana tornaram-se uma questão séria. Este resulta do desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, podendo induzir danos celulares pelos radicais livres e promover o desenvolvimento das condições de muitas doenças atuais, incluindo inflamação, doenças autoimunes, catarata, cancro, doença de Parkinson, arteriosclerose e envelhecimento (Krishnaiah *et al.* 2010; Ghasemzadeh *et al.* 2011)

Os radicais livres, por conterem um ou mais eletrões desemparelhados, são altamente reativos e capazes de atacar biomoléculas. As espécies reativas de oxigénio (ROS) são constantemente geradas e eliminadas no sistema biológico, e desempenham papéis importantes numa variedade de funções bioquímicas normais e processos patológicos anormais. Durante a fosforilação oxidativa nos mitocôndrios, gera-se um gradiente de protões para a síntese de ATP, podendo ocorrer reações entre os eletrões dos complexos I e III da cadeia transportadora de eletrões e produzir o radical livre superóxido ($O_2\cdot$). Além disso, as ROS podem ser produzidas por uma família de enzimas ligada à membrana, como NAD(P)H oxidases, que parecem afetar a proliferação celular e apoptose. Os mitocôndrios são considerados a principal fonte de celular ROS (Huanga *et al.* 2004).

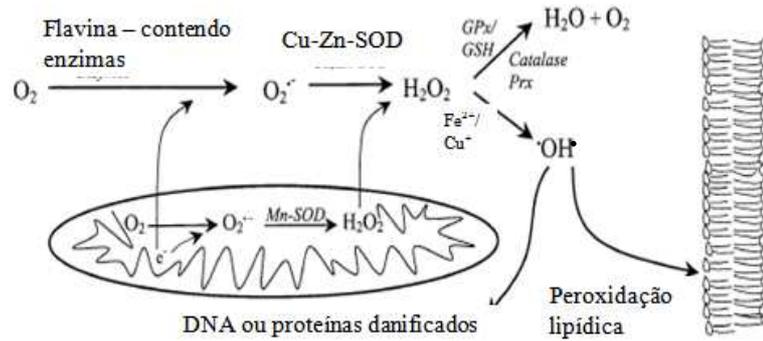


Figura 6 - Regime simplificado não estequiométrico dos sistemas oxidante e antioxidante nas células
Adaptado de Nordberg et al., 2001

Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada com a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”. Os antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (Descalzo *et al.* 2008) e podem ser classificados em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Alguns destes antioxidantes são produzidos endogenamente e incluem enzimas, moléculas de baixo peso molecular e co-fatores enzimáticos (Figura 7) (Ratnam *et al.* 2006). Os óleos essenciais como antioxidantes inserem-se no grupo dos ácidos hidroxibenzóicos. Estes, utilizados como complemento da dieta, evitam o desenvolvimento de doenças degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, cancro, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias (Krishnaiah *et al.* 2010).

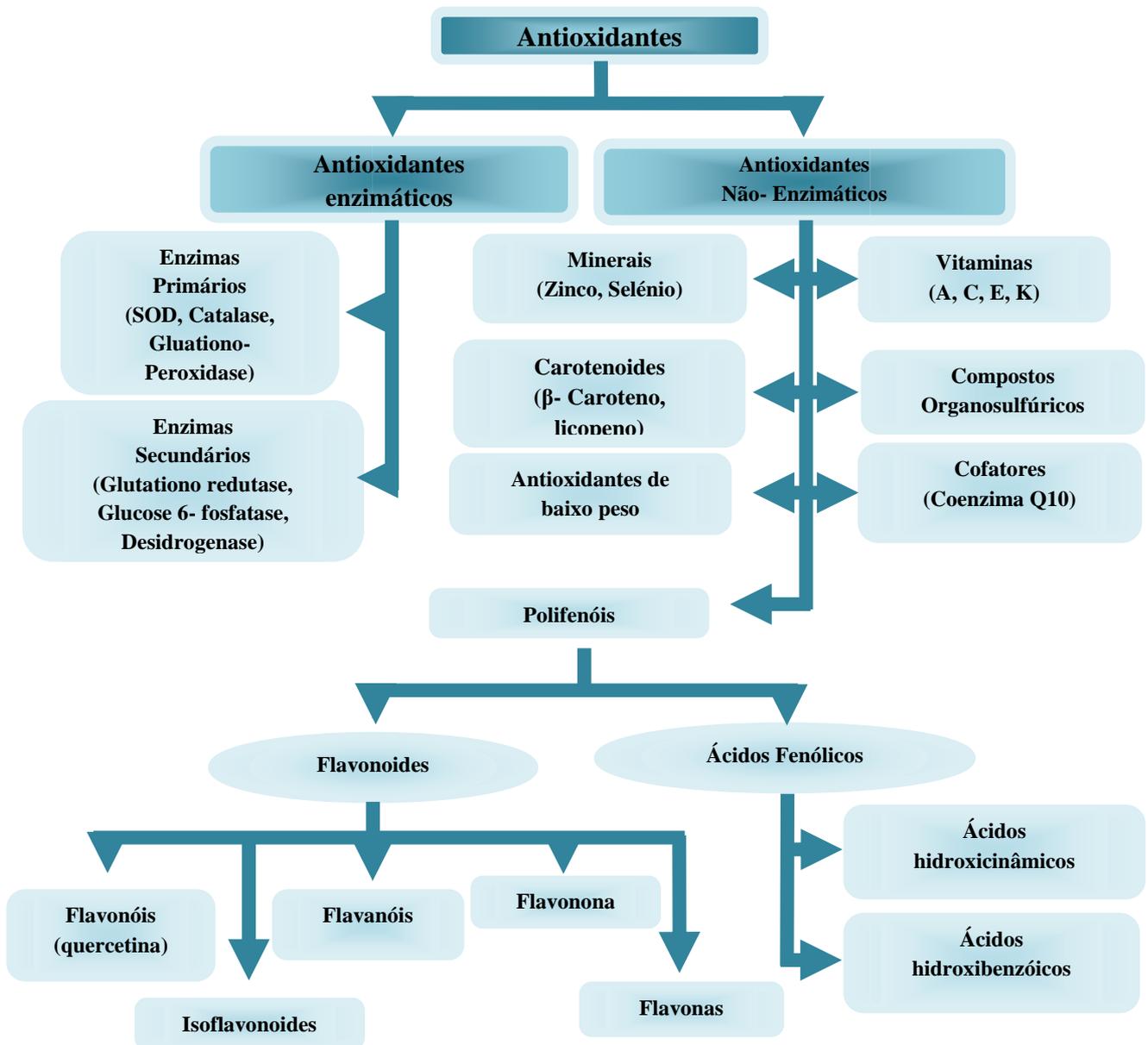


Figura 7- Classificação dos antioxidantes.
Adaptado de Ratnam *et al.*, 2006

Atualmente existe um crescente, tanto na indústria e na pesquisa científica de especiarias e ervas aromáticas, por devido às suas fortes propriedades antioxidantes e antimicrobianas, que excedem muitos dos antioxidantes naturais e sintéticos atualmente utilizados. Essas propriedades devem-se a muitas substâncias, incluindo algumas vitaminas, flavonoides, terpenos, carotenoides, fitoestrogénios, minerais, e especiarias e a algumas ervas ou seus componentes antioxidantes (Suhaj 2006).

1.3.2 Atividade antimicrobiana

Utilizados desde a antiguidade, os extratos e óleos vegetais ganharam, recentemente, popularidade e interesse científico, nomeadamente no tratamento de doenças infecciosas, patologias do sistema respiratório, aparelho urinário e gastrointestinal e biliar, bem como sobre a pele (Ríos *et al.* 2005). A sua atividade antimicrobiana constituiu a base de muitas aplicações, nomeadamente nas indústrias farmacêutica e alimentar (Hashem *et al.* 2010).

Os microrganismos são frequentemente divididos em bactérias, leveduras e fungos filamentosos devido às suas características.

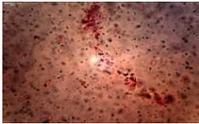
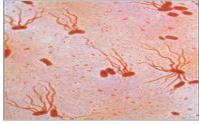
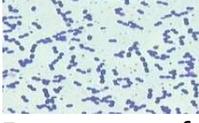
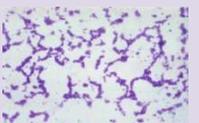
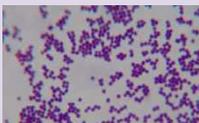
As Bactérias são organismos unicelulares, procariontes, que podem ser encontrados na forma isolada. Encontram-se em todos os *habitats*, sendo mais abundantes onde a matéria orgânica, a humidade e a temperatura são favoráveis ao seu crescimento e multiplicação (Pelczar *et al.* 1993).

Muitas são patogénicas, podendo causar infeções multirresistentes, como, por exemplo, Leptospirose, Febre tifoide, Cólera, Tétano, Difteria, Tuberculose, Meningite. Estas doenças afetam o Homem, podendo, em casos extremos, levar à morte.

As principais estirpes bacterianas patogénicas para o Homem incluem bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Salmonella spp.*, *Shigela spp.*) e *Pseudomonaceae* (*P. aeruginosa*), e bactérias Gram-positivas dos géneros *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*) e *Streptococcus* (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*). Na Tabela 2 apresentam-se as características principais das estirpes bacterianas utilizadas no presente Projeto.

Tabela 2 - Descrição das bactérias em estudo

Adaptado de Madigan *et al.* 2010 e Murray *et al.* 2010

Bactérias	Descrição
 <i>Escherichia coli</i>	<p>Bacilos cilíndricos <i>Gram</i>-negativos, podendo ocorrer isolados ou em pares. Pertencem à família das <i>Enterobacteriaceae</i> e são aeróbios e anaeróbios facultativos.</p> <p>Habitam o intestino humano; provocam pneumonia, meningite e gastroenterite</p>
 <i>Morganella morganii</i>	<p>Bacilos <i>Gram</i>-negativos que se movem através de flagelos. Pertencem à família das <i>Enterobacteriaceae</i> e são anaeróbios facultativos. São facilmente identificáveis nas fezes; provocam infeções do trato urinário e pneumonia.</p>
 <i>Proteus mirabilis</i>	<p>Bacilos <i>Gram</i>-negativos e movem-se por flagelos. Pertencem à família das <i>Enterobacteriaceae</i> e são anaeróbios facultativos. Provocam infeções urinárias e pneumonia.</p>
 <i>Salmonella enteritidis</i>	<p>Bacilos <i>Gram</i>-negativos; na sua maioria, móveis. Pertencem à família das <i>Enterobacteriaceae</i>. Podem causar patologias como gastroenterite, infeções sistêmicas e febre entérica. A <i>Salmonella typhimurium</i> é responsável pela febre tifoide.</p>
 <i>Salmonella typhimurium</i>	
 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<p>São bacilos <i>Gram</i>-negativos e movem-se por flagelos. Pertencem à família das <i>Pseudomonadaceae</i> e são aeróbios estritos. Provocam infeções do sistema respiratório, infeções nos ossos e cartilagens.</p>
 <i>Enterococcus faecalis</i>	<p>São cocos <i>Gram</i>- positivos e ocorrem isolados, em pares ou em pequenas cadeias. Pertencem à família das <i>Enterococcaceae</i> e são anaeróbios facultativos. São parasitas do intestino do homem; causam infeções intestinais e urinárias.</p>
 <i>Staphylococcus aureus</i>	<p>São cocos <i>Gram</i>-positivos e ocorrem isolados, em pares, em pequenas cadeias ou em cacho. São imóveis e capsulados. Pertencem à família das <i>Staphylococcaceae</i> e são anaeróbios facultativos. Causam infeções por pequenos cortes na pele, foliculite, endocardite e pneumonia, entre outras.</p>
 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Os fungos são células eucariotas, desprovidos de clorofila e que se reproduzem por esporos, podendo reproduzirem-se de forma assexuada e sexuada.

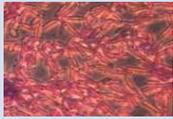
A reprodução assexuada é um mecanismo reprodutivo, sem fusão de núcleos, muito comum nos fungos. A reprodução ocorre, somente por mitoses sucessivas, pela fragmentação do micélio, onde cada micélio origina um novo organismo, ou pela produção de esporos assexuais. A reprodução sexuada ocorre entre dois esporos, havendo fusão dos protoplasmas, resultante da anastomose de duas células; fusão de dois núcleos haplóides (N) e compatíveis, formando um núcleo diplóide (2N), ocorre meiose, onde o núcleo diplóide (2N) sofre uma divisão reducional para formar dois núcleos haplóides (N); seguindo-se a mitose; e por fim o núcleo haplóide forma então uma parede que o protege, recebendo o nome de esporo.

No grupo dos fungos estão incluídos organismos de formas e dimensões muito variadas, conhecidos correntemente como leveduras, bolores, mofo e cogumelos (Ferreira *et al.* 1998). Estes são separados, frequentemente, em fungos unicelulares ou leveduras e fungos pluricelulares ou fungos filamentosos.

As leveduras são unicelulares e reproduzem-se assexuadamente por gemulação. Reproduzem-se mais rapidamente que os fungos e são, normalmente, mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa da sua maior relação área/volume. As leveduras também diferem das algas, pois não efetuam a fotossíntese, e não são protozoários porque possuem uma parede celular rígida. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas maiores dimensões e propriedades morfológicas. As leveduras mais comuns nas superfícies mucosas são do género *Candida*, que compreende cerca de 200 espécies distribuídas na natureza, todas assexuadas e dimórficas, das quais algumas espécies podem viver como saprófitas comensais ou parasitas patogénicos nos seres humanos. Entre elas podemos destacar *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Na Tabela 3 estão descritas as principais características das leveduras em estudo.

Tabela 3 - Descrição das leveduras em estudo

 Adaptado de Murray *et al.* 2010

Leveduras	Descrição
 <p><i>Candida albicans</i></p>	Fungo patogénico pertencente à divisão <i>Ascomycota</i> . É isolada tanto em doenças superficiais como sistémicas. <i>C. albicans</i> é a espécie mais comum, constituindo 60 a 90% das espécies. São responsáveis pela candidíase, uma doença que ocorre preferencialmente na pele ou em mucosas. Esta espécie é das mais importantes em termos epidemiológicos devido à sua alta incidência.
 <p><i>Candida krusei</i></p>	Fungos patogénicos pertencentes à divisão <i>Ascomycota</i> . Estes multiplicam-se rapidamente, e são responsáveis por infeções do sistema circulatório e infeções hematológicas.
 <p><i>Candida parapsilosis</i></p>	Fungo patogénico, pertencente à divisão <i>Ascomycota</i> Multiplicam-se rapidamente, e provocam infeções no sistema circulatório.
 <p><i>Geotrichum klebahnii</i></p>	Fungo patogénico para as plantas, pertencente à divisão <i>Ascomycota</i> . Está presente na flora intestinal humana e pode causar infeções, conhecidas por geotricose (por ingestão ou inalação). Também podem provocar infeções pulmonares e bronquite.

Os fungos filamentosos são os principais microrganismos, responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes da biosfera. São capazes de deteriorarem produtos e bens de consumo do Homem, tais como alimentos, tecidos, cabedais, metais e madeiras (Ferreira *et al.* 1998).

O seu poder patogénico é particularmente importante nos vegetais, sendo responsáveis por grandes prejuízos económicos. Para o Homem e animais estão descritas cerca de 150 espécies de fungos, reconhecidos como patogénicas específicas ou primárias. Os fungos filamentosos, patogénicos ou contaminantes ambientais, potencialmente oportunistas, formam um grupo muito extenso, sendo os mais comuns os *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., e *Rhizopus* spp. Na Tabela 4 estão descritas as principais características dos fungos em estudo.

Tabela 4 - Descrição dos fungos em estudo

 Adaptado de Murray *et al.* 2010

Fungos	Descrição
 <i>Aspergillus japonicus</i>	<p>Pertencem à divisão <i>Deuteromycota</i>. Pode provocar otites e problemas respiratórios, bem como alergias.</p>
 <i>Aspergillus niger</i>	<p>Pertencem à divisão <i>Deuteromycota</i>. As colónias apresentam-se como um feltro básico branco ou amarelo compacto, coberto por uma camada densa castanha escura que enegrece os conídios. Os conídios são grandes, globulosos e escuros. Os fungos desta espécie podem ser fitopatogénicos humanos causando a aspergilose pulmonar.</p>
 <i>Aspergillus oryzae</i>	<p>Pertencem à divisão <i>Deuteromycota</i>. É utilizado na indústria alimentar (fermentações), e para a produção de enzimas. Apresenta um crescimento rápido. O micélio é branco e os conídios são cinza.</p>
 <i>Fusarium oxysporum</i>	<p>Pertencem à divisão <i>Ascomycota</i>. As colónias crescem rapidamente e apresentam-se pálidas ou coloridas brilhantes e podem ou não ter micélio aéreo. Os fungos do Género <i>Fusarium</i> são fitopatogénicos e podem ser patogénicos para o Homem e animais, causando queratites micóticas, hialohifomicoses micóticas, especialmente em vítimas de queimaduras e em pacientes transplantados.</p>
 <i>Penicillium spp.</i>	<p>Os fungos do género <i>Penicillium</i> pertencem à divisão <i>Deuteromycota</i>. O micélio, de crescimento rápido, apresenta-se, frequentemente, com coloração branca, plano e com aspeto flocoso; os conídios são verdes e o verso das colónias é verde com uma bordadura branca. Estes podem ser encontrados, frequentemente, em solos e alimentos. Alguns são patogénicos para o Homem, provocando infeções pulmonares, queratites micóticas, otomicose e endocardite.</p>
 <i>Rhizopus oryzae</i>	<p>Pertencem à divisão <i>Zygomycota</i>. É usado na produção de bebidas alcoólicas em partes da Ásia e África. Algumas espécies de <i>Rhizopus</i> são agentes infecciosos oportunistas da zigomicose humana, podendo causar infeções sérias, e por vezes fatais, em humanos e animais. As infeções por <i>Rhizopus</i> são uma complicação associada à cetoacidose diabética.</p>
 <i>Rhizopus stolonifer</i>	<p>Pertencem à divisão <i>Zygomycota</i>. É um fungo filamentososo com ampla distribuição, sendo conhecido vulgarmente como o bolor-preto-do-pão. Encontra-se crescendo em pão e frutos moles, como bananas e uvas. Os seus esporos são comuns no ar. Pode causar infeções oportunistas em humanos.</p>

Na prática clínica, os microrganismos patogênicos são controlados através do uso de antimicrobianos de síntese. Contudo, por vezes, esta prática desencadeia problemas como resistência por parte dos microrganismos e, também, danos ambientais resultantes da eliminação dos resíduos medicamentosos. Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos comerciais no tratamento de doenças infecciosas, tem-se observado alterações nos mecanismos de defesa, levando à resistência a múltiplos fármacos por parte de muitos microrganismos patogênicos. Consequentemente, procuram-se constantemente novos produtos antimicrobianos (Gulluce *et al.* 2007). Na Figura 8 estão representados exemplos dos principais mecanismos afetados por antimicrobianos.

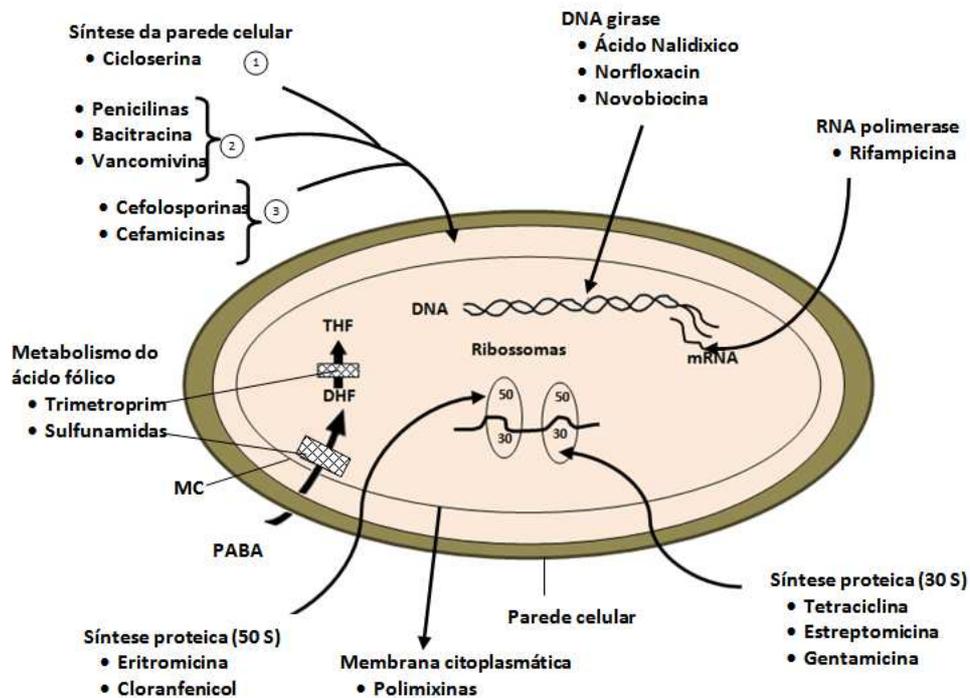


Figura 8 - Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antimicrobianos. Adaptado de Madigan *et al.*, 2010

Os antibióticos atuam a diversos níveis para inibir o crescimento bacteriano, principalmente ao nível da síntese da parede celular (Penicilinas e as Cefalosporinas), ao nível do metabolismo do ácido fólico (Trimetoprim e Sulfametoxazol), ao nível da membrana citoplasmática (Polimixinas), ao nível da síntese proteica (30S-Tetraciclina; 50S-Eritromicina e Cloranfenicol; e tRNA-Puromicina) e ao nível dos ácidos nucleicos

(RNApolimerase – Rifampicina; DNAgirase – Ácido nalidixico, Norfloxacina e Novobiocina).

Na Tabela 5 encontram-se alguns exemplos de antibióticos com os respetivos mecanismos de ação.

Tabela 5 - Exemplos de antibióticos com os respetivos mecanismos de ação

Antibiótico	Família	Mecanismo de Ação
Amoxicilina+Ácido Clavulâmico	β -lactâmicos (Penicilinas)	Ligação à membrana citoplasmática/ Inibidor da síntese da parede celular
Ampicilina	β -lactâmicos (Penicilinas)	Inibidor da síntese da parede celular
Amicacina	Aminoglicosídeos	Inibidor da síntese proteica (30S)
Ceftazidima	β -lactâmicos (Cefalosporinas)	Inibidor da síntese da parede celular
Gentamicina	Aminoglicosídeos	Inibidor da síntese proteica (30S)
Minociclina	Tetraciclina	Inibidor da síntese proteica (30S)
Penicilina G	β -lactâmicos (Penicilinas)	Inibidor da síntese da parede celular
Polimixina B	Aminoglicosídeos	Ligação à membrana citoplasmática
Sulfametoxazol	Sulfonamidas	Metabolismo do ácido fólico
Tetraciclina	Tetraciclina	Inibidor da síntese proteica (30S)
Cefalotina	β -lactâmicos (Cefalosporinas)	Inibidor da síntese da parede celular

No metabolismo da inibição da síntese da parede celular, os agentes antimicrobianos possuem um anel β -lactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin Binding Protein*), inibindo o enzima envolvido na transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídicas do peptidoglicano, impedindo a formação das ligações entre os tetrapéptidos das cadeias adjacentes de peptidoglicano, provocando uma perda na rigidez da parede celular. Os antibióticos da família dos aminoglicosídeos inibem o crescimento bacteriano ligando-se à membrana citoplasmática, entre os fosfolípidos, alterando a sua permeabilidade.

Os antibióticos pertencentes à família das tetraciclina ligam-se a subunidade ribossomal 30S, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA (Madigan *et al.* 2010).

No entanto, tem-se verificado problemas como resistência por parte dos microrganismos e, também, danos ambientais resultantes da eliminação dos resíduos medicamentosos. Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos comerciais no tratamento de doenças infecciosas, tem-se observado alterações nos mecanismos de defesa, levando à resistência a múltiplos fármacos por parte de muitos microrganismos patogénicos. Consequentemente, procuram-se constantemente novos produtos antimicrobianos (Gulluce *et al.* 2007).

Alguns óleos essenciais caracterizam-se por apresentarem importantes propriedades antimicrobianas, em estudos *in vitro*, face a microrganismos patogénicos multirresistentes, podendo virem a constituir uma alternativa aos fármacos de síntese.

A atividade dos óleos essenciais está relacionada com a sua composição química e com as proporções e as interações dos seus constituintes. Alguns estudos concluíram que os óleos essenciais possuem maior atividade do que a mistura dos seus componentes maioritários, sugerindo que o menor dos componentes é fundamental para a atividade, podendo apresentar um efeito sinérgico ou potenciar a sua influência (Burt 2004).

Na maioria dos estudos, a atividade antimicrobiana é atribuída à presença de vários compostos terpénicos e fenólicos, que, na sua forma pura, têm mostrado para atividade antimicrobiana, associadas ao seu carácter lipofílico (Zhao *et al.* 2010).

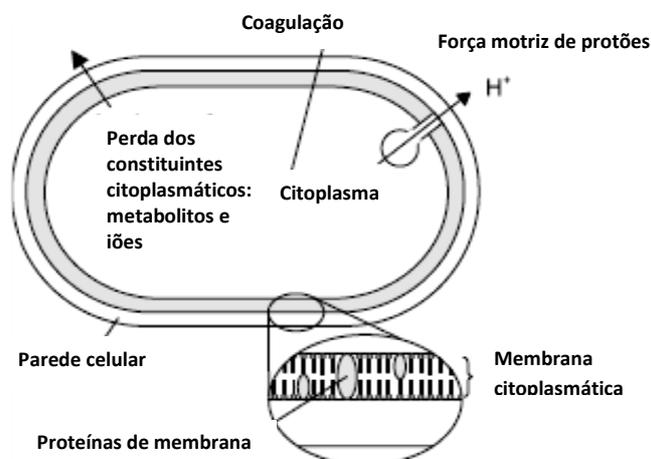


Figura 9 – Mecanismos e locais de ação dos metabolitos secundários na célula bacteriana. Adaptado de Burt, 2004

Geralmente os mecanismos de ação antibacteriana de compostos naturais estão associados à membrana celular, como o transporte de eletrões e o gradiente de iões, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzimo-dependentes. Os mecanismos que conferem aos óleos essenciais as suas propriedades antimicrobianas ainda não são bem compreendidos e, considerando o vasto número de compostos presentes nos óleos essenciais, é natural que a atividade antimicrobiana não seja mediada por um único mecanismo específico, podendo observar-se efeitos sinérgicos entre os modos de ação dos diversos compostos (Burt 2004).

Uma característica fundamental do local alvo de agentes antimicrobianos é o seu papel vital no crescimento microbiano e sobrevivência. A interferência com a sua função pode ser letal para as células ou inibidora do crescimento celular. Por exemplo, o peptidoglicano, componente da parede celular das bactérias, fornece um excelente exemplo de um alvo seletivo. É essencial para o crescimento e sobrevivência da maioria das bactérias e tem uma estrutura e composição química e diferente de qualquer macromolécula de mamífero. Por conseguinte, os enzimas envolvidos na sua síntese fornecem alvos excelentes para a inibição seletiva (Lambert 2005). São vários os possíveis alvos para os agentes antimicrobianos. O conhecimento dos mecanismos de ação destes agentes permite entender sua natureza e o grau de toxicidade seletiva de cada fármaco (Madigan *et al.* 2010).

A presença de componentes hidrofóbicos nos extratos vegetais, nomeadamente óleos essenciais, permitem a partição dos lípidos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeáveis (Calsamiglia *et al.* 2007). Alguns estudos referem que os componentes de óleos essenciais interagem, também com as proteínas da membrana citoplasmática (Knobloch *et al.* 1989) e que os hidrocarbonetos cíclicos podem agir sobre os enzimas ATPases, localizados na membrana citoplasmática (Sikkema *et al.* 1995), alterando a permeabilidade das membranas citoplasmática das bactérias mitocondrial das leveduras, interferindo em várias funções celulares, tais como a manutenção de energia no processo de transdução, transporte de solutos, regulação do metabolismo e controlo da pressão (Booth 1985; Cox *et al.* 2000).

Alguns óleos essenciais apresentam capacidade para estimular o crescimento de pseudomicélios, indicando que pode atuar sobre os enzimas envolvidos na síntese de componentes estruturais das bactérias (Conner *et al.* 1984).

1.3.3 Atividade analgésica e anti-inflamatória

A farmacologia da dor é um campo complexo e como a exploração de novos sistemas e abordagem, tem-se descoberto novos alvos de ação para os compostos que possuem propriedades analgésicas. A dor é uma modalidade sensorial que em muitos casos representa o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças. Têm sido usadas muitas terapias para o alívio da dor, entre elas, as plantas medicinais são destacadas devido à sua ampla utilização popular (Almeida *et al.* 2001; McCurdy *et al.* 2005).

Um dos grupos com ação analgésica são os opiáceos. Estes são os principais agentes com ação analgésica e atuam ao nível do sistema nervoso central (SNC), exercendo os seus efeitos nos recetores ópioides e são especialmente importantes no tratamento da dor crónica. No entanto, estes compostos apresentam propriedades viciantes e efeitos secundários que incluem depressão respiratória, sonolência, diminuição da motilidade gastrointestinal, náuseas e várias alterações do sistema endócrino e do sistema nervoso autónomo (Almeida *et al.* 2001).

Uma outra classe de agentes analgésicos são os anti-inflamatórios não esteroides. O uso de anti-inflamatórios não-esteroides é a principal abordagem terapêutica para as reações anti-inflamatória, estimulando a busca por novas moléculas potencialmente uteis no tratamento da inflamação (Ríos 2010; Jeon *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2011; Suresh *et al.* 2011).

A resposta inflamatória constitui um dos mais importantes mecanismos de defesa do organismo, encarregue de remover e neutralizar microrganismos invasores e/ou de reparar os tecidos, envolvendo, nos seus processos, células imunes do sistema hematopoiético, como os macrófagos. As ciclo-oxigenases (COX), responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas (PG) e outros icosanóides, desempenham um papel importante na mediação da resposta inflamatória do

organismo (Figura 10) (Li *et al.* 2011; Utar *et al.* 2011; Calvello *et al.* 2012). As citocinas libertadas nos processos de resposta anti-inflamatória, (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF ou fator de necrose tumoral) estão também associadas a outros processos de resposta do organismo, incluindo resposta imunológica e anti-tumoral, nomeadamente de apoptose (Ríos 2010; Jeon *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2011; Suresh *et al.* 2011).

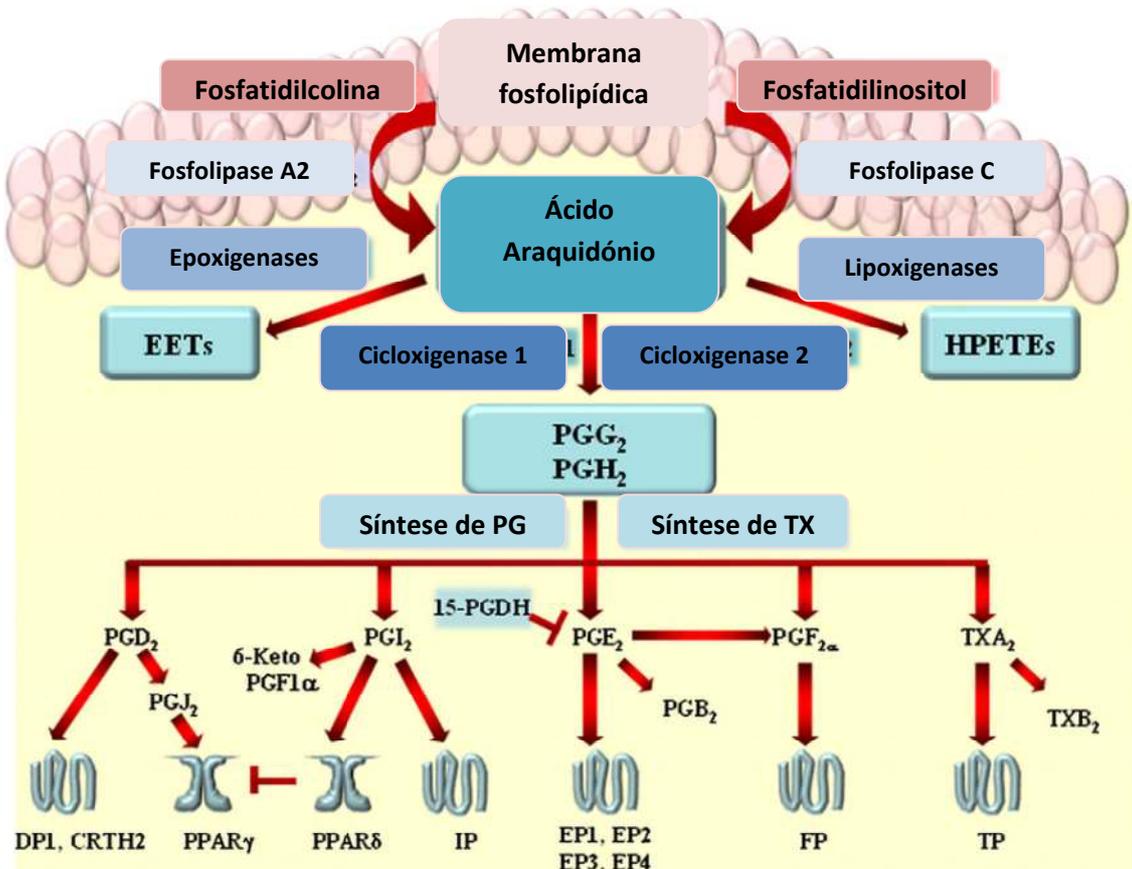


Figura 10 – Esquema da formação de COX pela via do ácido araquidónico..

Adaptado de Cathcart *et al.*, 2012

Alguns estudos demonstraram que os extratos vegetais de diversas plantas possuem atividade anti-inflamatória devido à presença de compostos bioativos como os terpenos e os flavonoides, descrevendo a ação deste compostos como intervenientes na captação de radicais livres gerados por neutrófilos e macrófagos e pela capacidade de inibirem a via das ciclo-oxigenases (Figura 11), sugerindo o seu

importante papel na regulação dos mediadores inflamatórios (Maimoona *et al.* 2011; Cathcart *et al.* 2012; Russo *et al.* 2012).

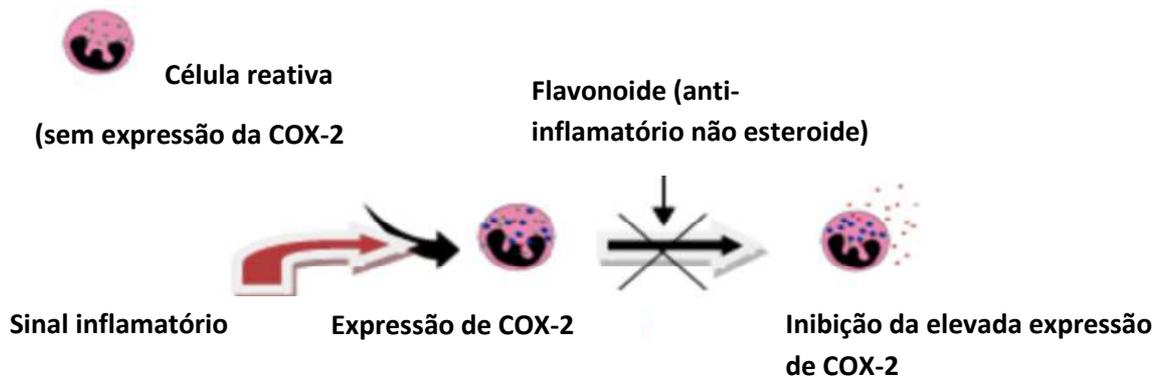


Figura 11 – Esquema da inibição da COX-2.

Adaptado de Maimoona *et al.*, 2011

As ciclo-oxigenases (COX), incluindo os seus isoenzimas, desempenham um papel importante na resposta inflamatória do organismo. São os enzimas centrais na conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas (PG) e outros icosanóides. A COX-1 é expressa constitutivamente e é responsável pela mediação de funções fisiológicas, controlando processos como a secreção da mucosa gástrica e a homeostasia vascular. COX-3 tem sido reportada, recentemente, como duas pequenas proteínas derivadas da COX-1, mas o seu papel ainda não foi descrito. Outra isoforma, COX-2, expressa de uma maneira constitutiva em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central, os rins e das gónadas, não é detetável na maioria dos tecidos normais e tem sido amplamente identificada como um enzima induzível quando estimulada por citocinas, fatores de crescimento, lesão súbita, inflamação, oncogenes e promotores tumorais, contribuindo para a síntese de PGs.

2 Enquadramento da problemática e objetivos

2.1 Problemática

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos (alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenoides, etc.), muitos dos quais constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. Destas destacam-se as plantas aromáticas, cada vez mais usadas como agentes terapêuticos, cosméticos e aditivos alimentares, a par de produtos de síntese industrial, com aplicação na Fitoterapia, sendo amplamente utilizadas nos países em desenvolvimento como tratamentos alternativos.

Os óleos essenciais e extratos obtidos a partir de várias plantas ganharam, recentemente, popularidade e interesse científico. Muitos extratos de plantas têm sido utilizados para diferentes fins, tais como, aditivos alimentares, produtos de cosmética e aromaterapia e medicamentos. Muitos extratos de plantas aromáticas apresentam importantes propriedades antimicrobianas, em estudos *in vitro* face a microrganismos patogénicos multirresistentes, podendo vir a constituir uma alternativa aos fármacos de síntese, além disso, são ricas em antioxidantes naturais, podendo ser usadas na medicina preventiva, nomeadamente, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares entre outras. Estudos recentes indicam que há uma relação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e a incidência de doenças humana (Tepe *et al.* 2005; Gulluce *et al.* 2007; Tepe *et al.* 2007; Roura *et al.* 2010). Alguns estudos tem descrito que os flavonoides, grupo de moléculas farmacologicamente ativas presente nas plantas, intervêm na captação de radicais livres gerados por neutrófilos e macrófagos e serem capazes de inibirem a via das ciclo-oxigenases, sugerindo o seu importante papel na regulação dos mediadores inflamatórios (Maimoona *et al.* 2011).

O crescente interesse pelo uso destes produtos justifica o aprofundamento do conhecimento científico a seu respeito, a par do saber e das práticas tradicionais, de modo a permitir uma utilização adequada, eficaz e segura dos mesmos. Por outro lado, são vários os fatores que influenciam as propriedades farmacológicas que algumas plantas podem apresentar, para além do género e da espécie, também a região e a

época de colheita podem influenciar a sua composição em metabolitos secundários e, consequentemente as suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e outras.

A região sul de Portugal é rica em plantas aromáticas, muitas das quais nativas da região e outras cultivadas, muito utilizadas pela população. Os estudos etnobotânicos estão normalmente associados a estudos etnofarmacológicos com vista a conhecer as aplicações e uso dos fármacos de origem natural associados aos sistemas tradicionais da Medicina.

Lavandula spp. pertence à família *Lamiaceae*, conhecidas vulgarmente por rosmaninho, são das plantas medicinais mais populares e de grande importância económica. Algumas espécies deste género, nomeadamente a *L. angustifolia* e a *L. stoechas*, têm sido utilizadas, quer secas ou como um óleo essencial durante séculos para uma variedade de tratamentos e cosméticos. Na Medicina tradicional, o óleo essencial tem sido usado tradicionalmente como antibacteriano, antifúngico, sedativo, antidepressivo e eficaz para queimaduras e picadas de insetos. No entanto, apesar da sua popularidade, e longa tradição de uso, só recentemente se tem realizado algumas investigações sobre a atividade biológica das diversas espécies de *Lavandula* (Cavanagh *et al.* 2002). Algumas espécies do género *Lavandula*, apesar de apresentarem propriedades etnobotânicas semelhantes, diferem na composição dos óleos essenciais, podendo estes constituir importantes marcadores de quimiotipo para caracterização destas espécies (Cavanagh *et al.* 2002; Hajhashemi *et al.* 2003).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo principal caracterizar quimicamente os diferentes óleos essenciais de 3 espécies do género *Lavandula*, naturais do Alentejo e Algarve, *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis*, extraídos da parte aérea vegetativa (folha) e da espiga floral e avaliar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas, a toxicidade e as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias dos óleos essenciais e correspondentes extratos aquosos de hidrodestilação, bem como dos óleos essenciais e extratos de hidrodestilação. Com o estudo da composição química dos óleos, pretende-se avaliar a variabilidade intra e inter-especie, como marcadores de quimiotipo, e com o estudo de algumas das propriedades biológicas dos óleos e extratos pretende-se avaliar o seu potencial fitoterapêutico e validar cientificamente os efeitos terapêuticos das plantas selecionadas e/ou respetivas frações mais ativas, com vista à sua futura aplicação como conservantes dos alimentos, nutracêuticos e/ou agentes fitoterapêuticos.

2.2.2 Objetivos específicos

- Proceder à extração dos óleos essenciais das folhas e das espigas florais das espécies selecionadas, utilizando o método de hidrodestilação num aparelho tipo *Clevenger* e calcular o rendimento de extração;
- Caracterizar física e quimicamente os óleos essenciais, com determinação da densidade e índice de refração e análise química por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID);
- Caracterizar quimicamente os extratos aquosos, obtidos por liofilização dos hidrolatos, por reações de identificação fitoquímica e quantificação de fenóis totais e flavonoides;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais face a estirpes patogénicas bacterianas, *Gram+* e *Gram-*, e leveduriformes e face a fungos

- filamentosos, contaminantes de alimentos e de culturas, através dos métodos de difusão em meio sólido e de macrodiluição, em meio líquido, para determinação da concentração mínima inibitória (CMI);
- Determinar a atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos aquosos pelo método do radical DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil) e pelo método do β -caroteno/ ácido linoleico, com vista à avaliação das suas propriedades antioxidantes por diferentes mecanismos de ação;
 - Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais e extratos aquosos em *Artemia salina*, com determinação do CL₅₀;
 - Determinar a toxicidade aguda dos óleos essenciais em ratinho *Swiss* (DL₅₀) e avaliar a sua toxicidade hepática e renal por estudos histológicos;
 - Avaliar a atividade comportamental e motora, por *screening* farmacológico, por administração oral de diferentes concentrações dos óleos essenciais selecionados.
 - Avaliar as propriedades analgésica e anti-inflamatória dos óleos essenciais selecionados, em rato *Wistar*.

3 Materiais e métodos

3.1 Colheita e preparação da planta

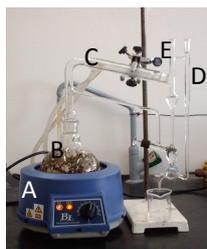
A recolha das plantas da espécie *L. luisieri* efetuou-se em Évora, numa mancha na Herdade da Mitra e as espécies de *L. pedunculata* foram colhidas de uma mancha em Guadalupe (Évora). As plantas da espécie *L. viridis* foram colhidas numa mancha da Serra de Monchique (Algarve). As plantas foram identificadas pela Prof^a Marizia Menezes, um membro do grupo, pertencente à Universidade de Évora e amostras das plantas colhidas foram armazenadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade de Évora.

Após a colheita, procedeu-se à seleção manual das folhas e flores, em separado, de modo a eliminar folhas/flores danificadas e ramos, garantindo, assim, que a pureza e a atividade do óleo não são alteradas (Prista *et al.* 1991). A planta foi, em seguida, triturada e dividida em frações de massa conhecida e conservada a 4°C, para extração dos óleos essenciais e obtenção do hidrolato, para posterior determinação dos rendimentos de extração.

3.2 Obtenção dos óleos essenciais e hidrolatos

A extração do óleo essencial foi feita por hidrodestilação. Colocou-se cerca de 100 g de material vegetal num balão de fundo redondo de 1000mL e adicionou-se cerca de 500mL de água destilada. Procedeu-se à montagem do aparelho tipo *Clevenger*, de acordo com o esquema representado na Figura 12 (abaixo). A destilação decorreu durante 3 horas (Infarmed 2005). Registou-se o volume de óleo essencial recolhido no tubo graduado do aparelho *Clevenger* e recolheu-se a essência para um frasco de vidro. O óleo essencial foi armazenado a -20°C (Infarmed 2005).

Após a extração dos óleos essenciais, a água resultante do processo de decocção, foi liofilizada para obtenção dos extratos de hidrodestilação. Determinou-se a massa obtida de cada extrato e calculou-se o rendimento de extração em função da massa da planta fresca.



- A- Manta de aquecimento;
- B- Balão de fundo redondo;
- C- Sistema de refrigeração;
- D- Tubo com água destilada,
- E- Tubo graduado;

Figura 12- Sistema de hidrodestilação de óleos essenciais

3.3 Caracterização dos óleos essenciais

3.3.1 Determinação do índice de refração dos óleos essenciais

O índice de refração dos óleos essenciais foi determinado com recurso a um refratómetro (Leica ABBE Mark II). Para o ensaio, procedeu-se à calibração do aparelho com água e, posteriormente, efetuaram-se as leituras para as amostras, de acordo com as instruções do aparelho.

O valor do índice de refração calcula-se de acordo com a fórmula:

$$\eta_d^{20} = \eta_d^t + 0.00045 (t - 20)$$

onde, $n_d^{20} = n_d^{20}$ = índice de refração a 20°C; n_d^t = índice de refração medido à temperatura (t) do laboratório e t = temperatura no momento da medida.

3.3.2 Análise da composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa (GC)

A caracterização química do óleo essencial foi efetuada por GC-FID no cromatógrafo GC-HP 5890 Series II. Utilizou-se como fase móvel hélio com um fluxo de 0,6 mL/min e como fase estacionária uma coluna polar SUPELCOWAX™ 10 (Supelco). O detetor utilizado foi o detetor de Ionização de Chama (FID). A análise da composição química do óleo essencial foi realizada em triplicado (Martins *et al.* 2012).

3.4 Caracterização dos extratos

O estudo preliminar da composição química possibilita o conhecimento prévio dos extratos e indica a natureza das substâncias presentes, facilitando a escolha de metodologias analíticas. Assim, realizaram-se testes fitoquímicos qualitativos para analisar a presença das principais classes de metabólitos secundários (Matos 1997; Anyasor *et al.* 2010). Efetuou-se, também, a quantificação dos fenóis e flavonoides totais presentes no extrato.

3.4.1 Análise qualitativa por pesquisa fitoquímica

A análise qualitativa foi efetuada de acordo com a marcha fitoquímica proposta por Matos (1997) para extratos aquosos, com algumas alterações. Para cada extrato (1 mg/mL), foram preparados 9 alíquotas de 1mL e 1 alíquota de 5mL em tubos de ensaio (Matos 1997; Anyasor *et al.* 2010).

3.4.1.1 Fenóis e taninos

Para a deteção de fenóis e taninos adicionou-se 3 gotas de solução alcoólica FeCl_3 1% e agitou-se bem. O teste foi comparando com um branco, usando apenas solvente e a solução cloreto férrico. Uma coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis quando o teste “branco” é negativo. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobafénicos (taninos condensados ou catéquicos).

3.4.1.2 Antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Para a deteção da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides nos hidrolatos, utilizaram-se 3 tubos de ensaio contendo cada um dos extratos. Num dos tubos adicionou-se HCl até pH3, noutro adicionou-se NaOH até pH 8.5 e no terceiro até pH 11. Na presença de antocianinas e antocianidinas observou-se coloração

vermelha a pH 3, coloração lilás a pH 8.5 e coloração azul-púrpura a pH 11. Na presença de flavonas, flavonóis e xantonas, observou-se o aparecimento de coloração amarela a pH 11. Na presença de chalconas e aurona (Matos 1997; Cunha 2006) observou-se o aparecimento da coloração vermelha a pH 3 e coloração vermelho-púrpura a pH 11. Na presença de flavanóis observou-se o aparecimento de coloração vermelho-laranja a pH 11.

3.4.1.3 Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Para avaliar a presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas foram necessários dois tubos para cada extrato. Num dos tubos adicionou-se HCl até pH 3 e no outro adicionou-se NaOH até pH 11. Com o auxílio de uma lâmpada de álcool, aqueceu-se a mistura, cuidadosamente, durante 2-3 min. Observou-se qualquer alteração na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. Na presença de leucoantocianidinas observa-se coloração vermelha em meio ácido. O surgimento de coloração pardo-amarelada em meio ácido indica a presença de catequinas (taninos catéquicos), enquanto a coloração vermelho-laranja em meio alcalino indica a presença de flavanonas.

3.4.1.4 Flavonóis, flavonas, flavanóis e xantonas

Para avaliar a presença de flavonóis, flavonas, flavanóis e xantonas, adicionou-se ao extrato, num tubo de ensaio, alguns centigramas de magnésio granulado ou em fita e 0.5mL de HCl concentrado. No final da reação (final da efervescência) observou-se, por comparação, a mudança na cor da mistura da reação nos tubos acidificados anteriormente. O aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença destes compostos, na forma livre ou os seus heterósidos.

3.4.1.5 Catequinas

Para confirmar a presença de catequinas humedeceu-se bem a madeira de um palito de fósforo no extrato. Evaporou-se o solvente e humedeceu-se uma face do palito com HCl concentrado e aqueceu-se o palito durante 2-3 min ao calor de uma chama de álcool, evitando que ficasse tostado. O aparecimento de coloração vermelha ou pardo-avermelhado no lado acidulado confirma a presença de catequinas.

3.4.1.6 Flavonoides

Para avaliar a presença de flavonoides adicionou-se, no tubo de ensaio, volume de NaOH 0.1M equivalente ao volume de extrato. O aparecimento de coloração amarela indica a presença de flavonoides (Anyasor *et al.* 2010).

3.4.1.7 Esteroides e triterpenoides

Para avaliar a presença de esteroides e triterpenoides, extraiu-se cerca de 10mg de extrato com 1 mL de clorofórmio (2-3 vezes), tendo o cuidado de agitar para que o solvente envolvesse todo o extrato. Filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota num pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com alguns decigrama de sulfato de sódio anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1mL de anidrido acético, agitou-se vigorosamente, e adicionou-se, cuidadosamente, 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se suavemente. O aparecimento de coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres enquanto o aparecimento de coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

3.4.1.8 Cumarinas

O teste para cumarinas foi efetuado colocando duas gotas de extrato separadas num papel de filtro não fluorescente. Sobre uma delas, colocou-se uma gota de KOH e

observou-se sob uma lâmpada de UV. Um resultado positivo é indicado pela observação de uma fluorescência azul-esverdeada na gota de extrato alcalinizada.

3.4.1.9 Saponinas

Para avaliar a presença de saponinas agitou-se vigorosamente o tubo de ensaio ($\Delta E = 1$ cm) com 5mL de extrato durante 15 segundos. A formação de uma coluna de espuma com altura mínima de 1 cm e persistente durante 15 minutos indica a presença de saponinas.

3.4.1.10 Alcaloides

A presença de alcaloides foi avaliada adicionando 5mL de HCl 1% a 0.5g de extrato e agite num banho a quente e filtrando enquanto quente. Adicionou-se água destilada ao resíduo. Adicionou-se, a 3 tubos de ensaio, 1 mL do filtrado e adicionou-se, a cada tubo, 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcaloides, respetivamente: Hager, Mayer e Dragendorff. A formação de precipitado é característica da presença de alcaloides (Matos 1997; Anyasor *et al.* 2010).

3.4.1.11 Oses e polioses

Para avaliar a presença de oses e polioses adicionou-se, num tubo de ensaio, um pouco de extrato aquoso e adicionou-se 2 gotas de reagente de Molish. Após agitação, adicionou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do tubo. O aparecimento de uma coloração púrpura indica a presença de oses e/ou polioses.

3.4.2 Análise quantitativa

3.4.2.1 Avaliação dos fenóis totais

A quantificação de fenóis totais, nos hidrolatos, foi avaliada usando o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*

modificado (Gajula *et al.* 2009). Este método baseia-se na redução, na presença de certos agentes redutores, dos ácidos fosfomolibdídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotungstíco ($H_3PW_{12}O_{40}$), presentes no reagente de *Folin-Ciocalteu*, na qual o molibdênio está no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$). Assim, na presença de compostos fenólicos (agentes redutores),

formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(PMoW_{11}O_4)^{4-}]$ (Figura 13), permitindo quantificação da absorvência da solução na região do visível (630 nm) (Oliveira *et al.* 2009).

Prepararam-se as soluções padrão de ácido pirogálico nas concentrações entre 10 e 250 $\mu g/mL$ em etanol. O ensaio foi efetuado em microplaca, em sextuplicado (Deng *et al.* 2012) com concentrações em hidrolatos entre 0.5 e 32 mg/mL . Efetuou-se um branco com água e como padrão usou-se o ácido pirogálico no intervalo de concentrações 10- 250 $\mu g/mL$. Incubou-se a placa durante 30 minutos a 40°C. Leu-se a absorvência a 630nm.

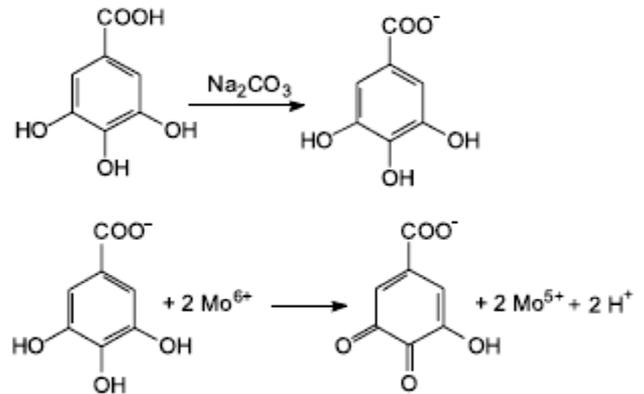


Figura 13- Reação do ácido gálico com o molibdênio, presente no reagente de Folin-Ciocalteu adaptado de Oliveira *et al.*, 2009

3.4.2.2 Avaliação dos flavonoides totais

O teor total de flavonoides dos hidrolatos foi determinado usando um método colorimétrico (Deng *et al.* 2012).

Neste método, o catião alumínio forma complexos estáveis com flavonoides (Figura 14), permitindo quantificar os flavonoides a comprimentos de onda maiores e evitar a interferência de outras classes de substâncias fenólicas,

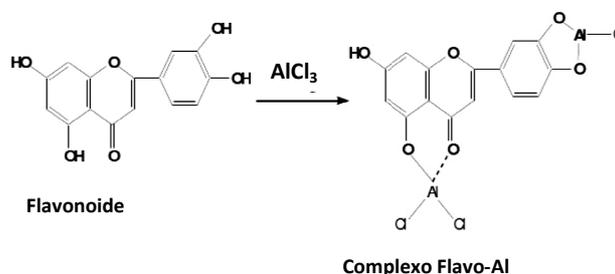


Figura 14- Formação do complexo flavonoide-alumínio adaptado de Rahayu *et al.*, 2009

principalmente dos ácidos fenólicos (Rahayu *et al.* 2009).

Prepararam-se soluções padrão de quercetina entre 6.3 e 1000 µg/mL dissolvidas em etanol. Em tubos de ensaio, alíquotas de 1mL de extratos (1 a 5 mg/mL) foram adicionados volumes iguais de uma solução de 2% AlCl₃.H₂O. A mistura foi agitada vigorosamente e leu-se a absorvência a 430nm após 10 min de incubação. O ensaio, realizado em triplicado, foi lido contra um branco contendo 1 mL de água destilada em vez da solução de 2% AlCl₃.H₂O, para cada concentração de extrato.

3.5 Estudo da atividade antioxidante

Por definição, a atividade antioxidante é a capacidade de um composto inibir a degradação oxidativa, por exemplo, peroxidação lipídica. Os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* foram criados para reproduzir as reações redox que ocorrem em sistemas biológicos vivos e são utilizados para avaliar o potencial antioxidante de diversas amostras químicas e biológicas (Ebrahimabadi *et al.* 2010). A capacidade antioxidante revela informações sobre a duração da ação antioxidante, no entanto a reatividade caracteriza o início da dinâmica das reações de anti-oxidação para uma determinada concentração de antioxidante ou mistura antioxidante (Moon *et al.* 2009). A atividade antioxidante total de compostos não pode ser avaliada por um único método, devido à natureza complexo dos fitoquímicos. Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir

uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes (Duarte-Almeida *et al.* 2006).

3.5.1 Método da redução do DPPH

O radical do DPPH é um radical livre estável, que reage com os compostos que podem doar um átomo de hidrogénio (Figura 15) (Krishnaiah *et al.* 2010). O princípio do método do radical do DPPH consiste em medir os radicais livres. Quando um átomo de hidrogénio ou um eletrão é transferido para o eletrão ímpar do radical do DPPH a absorvência diminuiu proporcionalmente ao aumento de forma não-radical de DPPH (Lee *et al.* 2007).

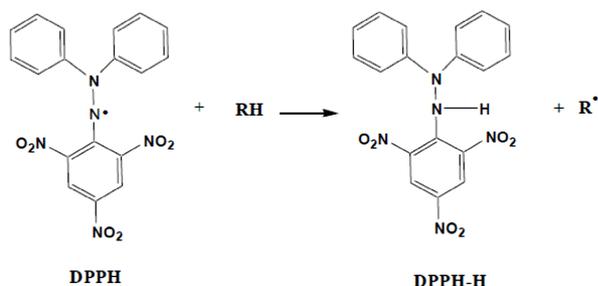


Figura 15- Esquema representativo da redução do DPPH adaptado de Rahayu *et al.*, 2009

As concentrações dos óleos e dos padrões foram preparadas por dissolução em etanol absoluto. As concentrações dos óleos foram preparadas a partir de uma solução de óleo previamente preparada, de concentração conhecida (ST), por diluição em tween 20 (20 μ L de tween 20 por mililitro de volume de solução final) e só depois se completou o volume com etanol absoluto. A solução ST preparou-se por diluição do óleo em igual volume de tween 20 e depois adicionou-se etanol absoluto até perfazer o volume final.

A atividade antioxidante foi avaliada para óleos essenciais (25-250 mg/mL) de *L. luisieri* (folhas e espigas) e do óleo essencial das folhas de *L. viridis*, e para os hidrolatos (0.05-4 mg/ml) das folhas e das espigas de *L. luisieri* e *L. viridis*. Para tal, adicionou-se, num tubo de ensaio, 1mL de solução de DPPH 0,1mM a 50 μ L de amostra/padrão bem dissolvidos em 50 μ L de tween 20, em triplicado. Como padrões usou-se o ácido ascórbico (3.91-1000 μ g/mL) e a quercetina (6.25-200 μ g/mL). Os tubos foram agitados vigorosamente e incubaram-se os tubos à temperatura ambiente no escuro durante 30 minutos. A absorvência foi quantificada a 490nm. Efetuou-se um ensaio e um branco contendo 1mL de solução *stock*, 50 μ L de tween 20 e 50 μ L de etanol (Tepe *et al.* 2007).

Determinou-se a atividade antioxidante pela fórmula:

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

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

3.5.2 Método do β -Caroteno/ Ácido Linoleico

O método do β -caroteno/ácido linoleico foi o primeiro descrito por Miller (1971) e é um dos ensaios antioxidantes adequado para amostras de plantas. Por este método, a atividade antioxidante é determinada medindo a inibição da produção de compostos orgânicos voláteis e a formação de dienos hidroperóxidos conjugados resultantes da oxidação do ácido linoleico (Figura 16), resultando na descoloração do β -caroteno (Krishnaiah *et al.* 2010) e consequente diminuição da absorvência na região do visível. A adição de uma amostra contendo antioxidante ou antioxidante puro, ou extratos naturais retarda a oxidação do β -caroteno (Roginsky *et al.* 2005).

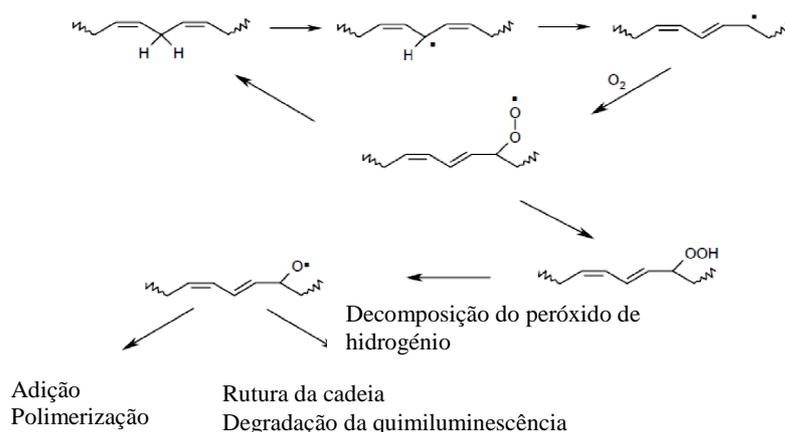


Figura 16- Descrição esquemática da auto-oxidação do ácido linoleico Adaptado de Stenberg *et al.*, 2005

A atividade antioxidante, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, foi avaliada para óleos essenciais (0.5-14 mg/mL) de *L. luisieri* (folhas e espigas) e do óleo essencial das folhas de *L. viridis*, e para os hidrolatos (0.03-1 mg/ml) das folhas e das espigas de *L. luisieri* e *L. viridis*. Como padrões usou-se o ácido ascórbico (0.5-32 mg/mL) e a quercetina (12.5-100 μ g/mL). Para realizar o ensaio, preparou-se uma solução *stock* de β -Caroteno/ácido linoleico, dissolvendo-se 0.5mg de β -Caroteno num 1mL de clorofórmio e adicionam-se 25 μ L de ácido linoleico e 200mg de tween 40. Procedeu-se à evaporação do clorofórmio em evaporador rotativo a pressão reduzida a cerca de

40°C. Após completa evaporação adicionou-se ao resíduo 100mL de água destilada previamente saturada em oxigénio (100 mL/min; 30 minutos).

As concentrações dos óleos e dos padrões foram preparadas em etanol absoluto. As concentrações dos óleos foram preparadas a partir de uma solução de óleo previamente preparada, de concentração conhecida (ST), por diluição em tween 20 (20 µL de tween 20 por mililitro de volume de solução final) e só depois se completou o volume com etanol absoluto. A solução ST preparou-se por diluição do óleo em igual volume de tween 20 e depois adicionou-se etanol absoluto até perfazer o volume final.

Procedeu-se à avaliação da atividade antioxidante adicionando, num tubo de ensaio, 2.5mL de solução *stock* a 350µL de amostra/padrão, em triplicado. Os tubos foram agitados vigorosamente e mediu-se a absorvência a 490 nm. Incubaram-se os tubos em banho-maria a 50°C durante 2horas. Mediu-se novamente a absorvência a 490 nm. Efetuou-se um branco contendo 2.5mL de solução *stock* e 350µL de etanol (Tepe *et al.* 2005; Mata *et al.* 2007).

Determinou-se a atividade antioxidante pela fórmula:

$$I (\%) = \frac{\Delta A \text{ 490 nm (branco)} - \Delta A \text{ 490 nm (amostra)}}{\Delta A \text{ 490 nm (branco)}} \times 100$$

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

3.6 Avaliação atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais e extratos obtidos a partir de várias plantas ganharam, recentemente, popularidade e interesse científico, nomeadamente no tratamento de doenças infecciosas, patologias do sistema respiratório, aparelho urinário e gastrointestinal, biliar e sistemas, bem como sobre a pele (Ríos *et al.* 2005). Os testes para avaliar a atividade antimicrobiana podem ser classificados como métodos difusão, diluição ou bioautográficos. Os princípios e a prática destes métodos de ensaio estão descritos na literatura (Burt 2004).

3.6.1 Preparação das suspensões de microrganismos

Para os ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana, foram preparadas suspensões dos microrganismos a estudar em soro fisiológico estéril (NaCl 0.9%).

Para as bactérias e leveduras, as suspensões de células foram preparadas nas concentrações correspondentes a uma turvação de 0.5 na escala de *McFarland*. Os ensaios dos microrganismos patogénicos foram realizados em Câmara de Fluxo de Ar Laminar (AireGard 126 Vertical Flow CleanBench, NUAIRE, classe II) no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário da Universidade de Évora (Oke *et al.* 2009).

Para as suspensões de fungos, as suspensões de esporos foram preparadas de modo a obter uma concentração correspondente a 10^8 UFC/mL (contagem em câmara de *Neubauer*).

Para determinar a concentração mínima inibitória, as suspensões foram diluídas de 10^8 UFC/mL para 2×10^6 UFC/mL.

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

3.6.2 Método de difusão em meio sólido

Para a avaliação da atividade antimicrobiana prepararam-se os meios de cultura adequados para os microrganismos em estudo: SDA para fungos filamentosos e leveduras e NA para bactérias. Os meios foram previamente esterilizados em autoclave a $115^\circ\text{C}/15\text{min}$ e armazenados à temperatura ambiente (NCCLS 2008). Posteriormente procedeu-se à liquefação dos meios e distribuição em placas de *Petri*.

As placas foram inoculadas por espalhamento, com $100\mu\text{L}$ da suspensão contendo 10^8 UFC/mL de cada microrganismo em estudo. Colocaram-se três discos equidistantes de papel *Whatman* estéril (\emptyset 6mm) em cada placa. O óleo essencial foi aplicado nos 3 discos de cada placa (triplicados). O estudo foi efetuado para o volume de $5\mu\text{L}$ de óleo essencial puro (NCCLS 2003; NCCLS 2008; NCCLS 2009), para cada microrganismo. De modo a evitar a volatilização do óleo essencial procedeu-se à pré-incubação das placas de *Petri* durante duas horas a 4°C (Oke *et al.* 2009). Como controlos positivos utilizaram-se discos contendo antibióticos específicos para as

estirpes bacterianas e a nistatina (33 µg ≈ 1000UI) para as leveduras e fungos filamentosos. Posteriormente procedeu-se à incubação das culturas em estufa a 37°C/24 horas para as bactérias, 37°C/48 horas para as leveduras e 28°C/4-5 dias para os fungos filamentosos.

3.6.3 Concentração mínima inibitória

Os ensaios de atividade antimicrobiana em meio líquido são recomendados para a determinação da CMI, definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo pelo método da macrodiluição (NCCLS 2003), efetuando as alterações necessárias ao estudo de óleos essenciais. A concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais que apresentaram atividade foi avaliada face às bactérias patogénicas testadas, utilizando o método de diluição em meio líquido (macrodiluição), método de referência para testar a atividade dos agentes microbianos (NCCLS 2008), sendo a resposta evidenciada pela turvação do meio (Naghetini 2006).

Preparou-se uma solução inicial de óleo essencial em DMSO, de concentração 40000 µg/mL. As restantes soluções de óleo essencial, de concentrações compreendidas entre 31.25 e 2000 mg/mL, foram obtidas por diluições sucessivas da solução preparada inicialmente.

As suspensões de microrganismos foram preparadas como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicado, em tubos de ensaio de 5mL estéreis. A 100µL de óleos em diferentes concentrações, adicionou-se 900µL de meio de cultura líquido e 1mL de inóculo do microrganismo.

Para as culturas das bactérias utilizou-se meio NB e para os fungos meio SDB. As culturas foram incubadas com agitação orbital (100 rpm) a temperatura e tempo pré-definidos: 37°C/24 horas para as bactérias, 37°C/48 horas para as leveduras e 28°C/4-5 dias para os fungos filamentosos.

Após incubação, o crescimento do microrganismo foi determinado pela leitura visual direta e por métodos espectrofotométricos (630 nm).

3.7 Avaliação da atividade toxicológica e farmacológica

Os extratos de plantas são misturas complexas e a determinação dos seus compostos ativos e respetivos mecanismos de ação é um grande desafio devido à presença de compostos de diferentes classes ou diferentes estruturas, contribuindo para a mesma atividade. Assim, a seleção de bioensaios para determinar o efeito específico é uma etapa importante. Os bioensaios devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (Chang 2000; Maciel *et al.* 2002).

3.7.1 Avaliação da citotoxicidade em *Artemia salina*

O teste de mortalidade 50 com *Artemia salina* é um bioensaio simples, barato, seguro e de resposta rápida. O ensaio permite avaliar a toxicidade em geral, sendo considerado um ensaio preliminar no estudo da bioatividade de extratos vegetais, correlacionando-a com a sua citotoxicidade (Bastos *et al.* 2009; Hossain *et al.* 2012).

Para determinação da atividade citotoxicológica, procedeu-se de acordo com as indicações do *Artoxkit M*, realizando as seguintes alterações: as soluções padrão/amostra devem ser preparadas 10 vezes mais concentradas que a concentração a testar, sendo adicionados, no poço, 100 μ L da solução de amostra/padrão a 900 μ L de água do mar sintética. Os óleos essenciais foram testados num intervalo de concentrações 5-1000 μ g/mL e os hidrolatos foram testados num intervalo de concentrações 0.25-10 mg/mL. O ensaio foi realizado em triplicados.

As concentrações dos óleos foram preparadas 10 vezes mais concentradas usando como solvente DMSO 10%, enquanto as concentrações dos hidrolatos foram preparados por dissolução em água bidestilada (Sharififar *et al.* 2009). Após as 24 horas de incubação, procedeu-se ao cálculo da percentagem da mortalidade e determinação da concentração letal 50 (CL_{50}). Considerou-se como critério de toxicidade: valores $CL_{50} > 1000$ μ g/mL (não tóxico); $\geq 500 \leq 1000$ μ g/mL (baixa toxicidade) e < 500 μ g/mL (tóxico) (Bastos *et al.* 2009).

3.7.2 Avaliação do perfil hipocrático e determinação da dose letal 50 (DL50)

A determinação do "screening" hipocrático é feita por um conjunto de testes e de técnicas simples de realizar e de baixo custo, as quais, com grande rapidez e com uma pequena quantidade de substância/ extrato, permitem uma observação preliminar de vários tipos de atividade, que poderá ser completada posteriormente por técnicas mais seletivas e complexas que melhor esclareçam os resultados obtidos.

Para avaliar a toxicidade aguda dos extratos (óleo essencial e extrato hidrolato) da folha de *L. luisieri*, selecionaram-se grupos de ratos fêmea *Swiss* com 13-15 semanas e peso 20-30g, provenientes do Biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora, de acordo com as linhas gerais para o uso responsável de animais em experimentações (Diretiva Europeia e legislação nacional Portaria 1005/92 de 23 de Outubro) (Hau *et al.* 2003). Os procedimentos de experimentação em animais de laboratório foram supervisionados por uma investigadora acreditada como pessoa competente (investigadora coordenadora) pela Direção Geral de Veterinária (Portaria 1005/92 de 23 de Outubro) e pela FELASA (nº 020/08). Para iniciação dos testes os animais foram marcados, pesados e separados. A administração da dose dos extratos foi efetuada por via oral, com recurso a sonda gástrica, nas doses de 175, 550 e 2000 mg/Kg de peso corporal no grupo tratado e apenas o veículo para o grupo controlo (OECD 2001; OECD 2001; OECD 2001). Os animais ficaram sob observação constante nos primeiros 60 minutos, avaliando os parâmetros: catalepsia, reflexos de postura, tração, sensibilidade da cauda (teste de Haffner), reflexo pineal, atividade motora e conduta (passiva, agressiva, temor) (Vogel *et al.* 2002). O ensaio foi realizado de acordo com as normas da OCDE, utilizando o procedimento *Up-and-Down* (OECD 2001), avaliando a evolução do comportamento animal durante 14 dias consecutivos, registando a latência quando não se observou morte ou qualquer outro sinal de toxicidade.

Após o término do ensaio, procedeu-se ao sacrifício do animal por punção cardíaca terminal, recolhendo o soro (centrifugação do sangue 3000g, 15 min - conservar a -4°C) e os órgãos fígado e rins em tampão de homogeneização (análise histopatológica).

3.7.3 Análise histológica e histomorfométrica

A análise histológica e histomorfométrica, como métodos complementares de avaliação toxicológica, permitem inferir acerca da toxicidade dos extratos ao nível dos órgãos e das células. Estes métodos permitem a avaliação estrutural e funcional dos tecidos e a avaliação da atividade e dos mecanismos da fisiologia celular. Os cortes histológicos foram realizados no Laboratório de Biologia, sob supervisão da Eng^a Mónica Lima e do Prof. Orlando Lopes.

Os órgãos foram limpos e pesados e procedeu-se à fixação do material, inclusão, desidratação, microtomia, coloração dos cortes histológicos e microscopia ótica foram realizados de acordo com o protocolo interno laboratório de biologia. Cortes seriados de 5 μ m de espessura distanciados 30 μ m foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e observados ao microscópio ótico.

Os parâmetros histomorfométricos foram medidos em imagens digitais tiradas de cortes histológicos com uma câmara digital Leica DC acoplado a um microscópio Dialux Leitz 20 e usando um *software* de análise de imagem interativa (Sigma Scan Pro5).

Para cada amostra de fígado, procedeu-se à medição (na ampliação de 400X, com cerca de 142552 μ m² de área ótica), da área nuclear de hepatócitos e da área sinusoidal em 5 imagens escolhidas aleatoriamente para cada animal a partir de cinco diferentes secções histológicas das área periportal / pericentral do fígado. Mediu-se um total de 20 núcleos por espécime. A área sinusoidal foi calculada pela soma da área medida para cada sinusoide em cada imagem.

Para cada amostra de rim, mediu-se a maior área de secção transversal dos glomérulos, e a espessura do epitélio do túbulo proximal. Quinze glomérulos e quinze túbulos proximais foram analisados em imagens digitalizadas da região do córtex renal a partir de cortes seriados com 5 μ m de espessura e distanciados 30 μ m entre si. A espessura do epitélio dos túbulos proximais foi medida em vários pontos escolhidos aleatoriamente.

3.7.4 Avaliação da atividade analgésica

Existem muitas abordagens para diferenciar as diversas ações de analgésicos fortes, utilizando modelos animais. Neste estudo, o método utilizado para avaliar a atividade analgésica é a prova de *Amour-Smith* (método do calor radiante). Esta metodologia tem sido utilizada por muitos autores para avaliar a atividade analgésica em experiências com animais (roedores), medindo a alterações, induzida por drogas, na sensibilidade ao *stress* térmico aplicado nas suas caudas (Vogel *et al.* 2002).

Este ensaio foi efetuado em 6 grupos de 6 ratos machos *Wistar* (200-300 g). Os grupos administrados oralmente com óleo essencial da folha de *L. luisieri* (100 e 200 mg/Kg) foram comparados com um grupo testemunha administrado oralmente com uma solução Tween 20 1% (veículo), enquanto os grupos administrados com o hidrolato da folha de *L. luisieri* (500 e 1000 mg/Kg) foram comparados com um grupo testemunha administrados oralmente com água. Para controlo padrão administrou-se uma solução de morfina (10 mg/Kg) subcutaneamente (na parte dorsal, junto à cabeça do animal) a um grupo de 6 animais.

Após um período de jejum de 16h, os animais foram imobilizados em gaiolas individuais adequadas de maneira que a cauda repouse na calha do aparelho provida de uma célula fotoelétrica. Ligou-se a lâmpada (fonte de calor) e mediu-se o tempo de reação (t_0) do animal ao estímulo térmico, caracterizado pelo comportamento de levantar a cauda. Assumiu-se com tempo de exposição máxima 10 segundos para evitar lesão tecidual. Procedeu-se à administração das soluções nos respetivos grupos e avaliou-se o tempo de reação (t_i) do animal ao estímulo térmico após 30, 60 e 90 minutos. Os óleos essenciais foram diluídos numa solução de tween 20 1% e os extratos foram diluídos em água destilada.

A atividade analgésica foi calculada com base na equação:

$$AA_n (\%) = \frac{(t_i - t_0)_{\text{testemunha}} - (t_i - t_0)_{\text{amostra}}}{(t_i - t_0)_{\text{testemunha}}} \times 100$$

3.7.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória

São várias as metodologias descritas para avaliar a atividade anti-inflamatória, permitindo avaliar processos inflamatórios agudos, subagudos e crónicos.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo teste de indução, pela carragenina, de edema na pata. Este método baseia-se na capacidade de um composto inibir o edema produzido na pata posterior do rato após a injeção de um agente inflamatório, neste caso, a carragenina (Vogel *et al.* 2002; Hajhashemi *et al.* 2003).

Este ensaio foi efetuado em 6 grupos de 6 ratos machos *Wistar* (200-300 g). Os grupos administrados oralmente com óleo essencial da folha de *L. luisieri* (100 e 200 mg/Kg) foram comparados com um grupo testemunha administrado oralmente com uma solução Tween 20 1% (veículo), enquanto os grupos administrados com o hidrolato da folha de *L. luisieri* (500 e 1000 mg/Kg) foram comparados com um grupo testemunha administrados oralmente com água. Para controlo padrão administrou-se oralmente uma solução de dexametasona (1 mg/Kg), preparada numa solução de tween 20 1%. Sessenta minutos após a administração oral, administrou-se subcutaneamente, na região plantar da mesma pata do animal, 0.1 mL duma solução de carragenina 1% (p/V) (NaCl 0.9%). O volume da pata foi medido 4 e 5 horas após a produção da inflamação (Vt).

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

$$AAI (\%) = \frac{(Vt - V0)_{\text{testemunha}} - (Vt - V0)_{\text{amostra}}}{(Vt - V0)_{\text{testemunha}}} \times 100$$

3.8 Análise estatística dos resultados

Os estudos foram efetuados com o objetivo final de comparar as várias atividades dos óleos essenciais e dos hidrolatos. Para comparação dos resultados procedeu-se à análise de variância (ANOVA - One way), usando o programa SPSS[®] 18.0 para Windows *Copyright*[©], *Microsoft Corporation*. Foram considerados como valores significativos aqueles cuja probabilidade de ocorrência foi superior a 95% ($p < 0.05$). A comparação múltipla de médias foi efetuada pelo teste de Tukey, no caso dos resultados de quantificação de fenóis e flavonoides totais e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana e análise morfométrica dos cortes histológicos, e pelo teste de Duncan nos restantes ensaios efetuados em animais.

4 Apresentação e discussão dos resultados

4.1 Caraterização química dos óleos essenciais

O rendimento de extração dos óleos, por hidrodestilação, a densidade e o índice de refração estão indicados na Tabela 6, para cada uma das frações de cada uma das plantas em estudo (folha e espiga floral).

Tabela 6 - Caraterísticas dos óleos essenciais

Óleo essencial	Rendimento extração (%)	Densidade	Índice de refração
<i>L. luisieri</i> folha	0.80 ± 0.11	0.95 ± 0.01	1.4718 ± 0.0001
<i>L. luisieri</i> espiga	0.51 ± 0.04	0.94 ± 0.05	1.4787 ± 0.0001
<i>L. pedunculata</i> folha	0.41 ± 0.22	0.93 ± 0.01	1.4727 ± 0.0001
<i>L. pedunculata</i> espiga	0.37 ± 0.07	0.96 ± 0.01	1.4733 ± 0.0001
<i>L. viridis</i> folha	0.83 ± 0.39	0.92 ± 0.01	1.4723 ± 0.0001
<i>L. viridis</i> espiga	0.17 ± 0.13	0.90 ± 0.01	1.4759 ± 0.0001

Para as três espécies de *Lavandula* estudadas, o rendimento de extração dos óleos foi superior nas folhas do que nas espigas respetivas, tendo variado entre 0.83% e 0.41% para a folha e de 0.17% e 0.51% para a espiga. Os óleos essenciais apresentaram densidades variáveis entre 0.90 e 0.96 e índices de refração de 1.472 a 1.479, apesar dos óleos das espigas florais das três espécies terem apresentado um desvio ótico superior ao desvio dos óleos essenciais das folhas.

São muitos os fatores que afetam o rendimento de extração dos óleos essenciais, e a sua composição química, nomeadamente a espécie, a parte da planta usada, as diferentes funções metabólicas dos tecidos, as condições climatéricas, o tipo de solo (Cavanagh *et al.* 2002; Sanz *et al.* 2004).

A composição química dos óleos essenciais foi avaliada por GC-FID (Anexo I - Figura 32), tendo os componentes dos óleos essenciais sido identificados por comparação dos seus tempos de retenção dos com os tempos de retenção de padrões submetidos às mesmas condições analíticas e em co-eluição. A quantificação foi calculada em percentagem de área sem correção de fator de resposta. Os cromatogramas obtidos para cada um dos óleos essenciais estão apresentados na

Figura 32. Na Tabela 7 estão indicados os tempos de retenção e a % (média±DP) para cada componente do óleo essencial.

Tabela 7 - Composição química dos óleos essenciais

Componentes	Tempo de retenção (min)	% (média ± DP) ^a					
		<i>L. luisieri</i>		<i>L. pedunculata</i>		<i>L. viridis</i>	
		folhas	Espigas	folhas	espigas	Folhas	espigas
α-pineno	3.653	1.24±0.11	2.80±0.30	9.40±0.18	8.92±2.17	5.04±0.56	5.40±0.01
canfeno	4.089	-	0.71±0.10	4.62±0.01	4.98±1.21	1.54±0.53	3.23±0.01
β-pineno	-	3.99±0.10	6.05±0.60	0.75±0.01	1.97±0.01	0.75±0.18	1.32±0.02
mirceno	5.952	-	-	-	0.89±0.01	-	-
α-terpineno	6.191	-	-	-	-	-	1.62±0.03
limoneno	6.722	-	-	1.23±0.01	3.25±0.79	-	3.75±0.02
1.8-cineol	6.998	22.44±0.71	13.45±1.30	6.79±0.09	1.11±0.19	42.47±1.43	-
γ-terpineno	7.655	0.89±0.11	-	0.97±0.05	-	0.33±0.01	-
sabineno	8.411	-	-	-	-	0.40±0.01	0.68±0.02
α-terpinoleno	9-099	-	-	-	-	0.72±0.04	1.13±0.05
fenchona	13.238	2.55±0.10	7.31±0.70	10.26±0.12	29.20±7.20	-	-
Sabineno hidratado	15.432	0.87±0.10	-	-	-	-	-
cânfora	17.288	3.76±0.10	10.45±0.90	37.99±0.43	35.20±2.02	11.57±1.43	13.10±0.91
Linalol	17.652	4.14±0.21	4.09±0.40	-	-	11.16±0.46	13.17±0.80
Acetate de linalilo	18.051	-	-	-	-	-	0.82±0.03
acetato de bornilo	20.335	19.07±4.82	19.29±1.50	13.00±0.15	6.73±2.39	-	0.55±0.02
β-cariofileno	20.802	4.08±0.20	5.66±2.60	-	-	0.72±0.01	-
4-terpineol	21.064	4.11±2.50	5.78±3.60	-	-	0.54±0.01	-
mirtanal	21.955	1.31±0.00	-	-	-	-	-
α-aromadendreno	22.536	3.68±0.00	2.56±1.70	-	-	1.37±0.06	0.25±0.01
isoborneol	23.154	7.03±2.80	4.31±0.30	-	-	-	-
estragol	23.865	-	-	1.04±0.06	-	0.89±0.01	-
lavandulol	23.985	0.82±0.00	1.42±0.20	-	-	1.87±0.01	-
acetato de terpenilo	24.394	-	-	2.32±0.07	2.10±0.04	-	-
borneol	24.546	0.70±0.00	1.68±0.10	1.92±0.06	1.48±0.84	4.91±0.15	3.25±0.10
α-terpineol	24.876	-	-	1.44±0.02	1.88±0.04	2.68±0.43	0.59±0.05
verbenona	25.452	2.06±0.00	1.34±0.50	-	-	-	-
carvona	27.106	-	-	-	-	-	1.59±0.01
1-decanol	27.463	-	-	-	-	2.76±0.05	-
acetato de geranilo	27.543	1.99±0.00	2.18±0.00	-	-	1.63±0.31	3.42±0.20
anetol	29.698	-	-	-	-	0.96±0.003	0.66±0.03
metil eugenol	36.482	2.15±0.20	1.37±0.10	-	-	-	-
acetato cinamilo	40.829	-	4.42±0.40	-	-	-	1.27±0.09
eugenol	41.245	-	1.44±0.05	-	-	-	-
timol	41.812	-	-	-	-	0.90±0.01	0.91±0.02
carvacrol	43.002	-	-	-	-	-	2.51±0.15
Total		87	96	93	95	92	60
Grupos de componentes							
Monoterpenos hidrocarbonados		6.99	9.56	16.97	23.04	9.96	17.12
Monoterpenos oxigenados		72.13	74.11	75.55	71.67	79.59	40.88
Sesquiterpenos hidrocarbonados		7.76	8.22	-	-	2.09	0.25
Outros		-	4.42	-	-	-	1.27

^a média correspondente a três replicados.

Neste estudo, observamos que a composição química dos óleos essenciais, tanto na presença/ausência como na percentagem dos componentes, varia consoante a espécie e o tecido da planta de onde é extraído, podendo estes constituir importantes marcadores de quimiotipo para caracterização destas espécies.

O óleo essencial das folhas de *L. luisieri* apresentou como constituintes maioritários o 1,8-cineol (22.4 %), acetato de bornilo (19.07%), lavandulol (7.03%), linalol (4.14%), 4-terpineol (4.11%) e β -cariofileno (4.08%), enquanto o óleo das espigas florais apresentou como constituintes maioritários o acetato de bornilo (19.29%), 1,8-cineol (13.45%), cânfora (10.45%), fenchona (7.31%), β -pineno (6.05%), 4-terpineol (5.78%), β -cariofileno (5.66), acetato de cinamilo (4.42%), lavandulol (4.31%) e linalol (4.09%). O óleo essencial das folhas de *L. viridis* apresentou como constituintes maioritários o 1,8-cineol (44.9%), cânfora (16.28%), linalol (9.94%), α -pineno (5.09%) e borneol (4.63%), e o óleo essencial das espigas apresentou como compostos maioritários a verbenona (34.28%), cânfora (16.65%), α -pineno (11.84%), borneol (5.88%) e acetato de geranilo (4.36%). O óleo essencial das folhas de *L. pedunculata* apresentou como constituintes maioritários a cânfora (37.99%), o acetato de bornilo (13%), a fenchona (10.26%), o α -pineno (9.40%) e o 1,8-cineol (6.79%), e o óleo essencial das espigas apresentou como compostos maioritários a fenchona (29.20%), a cânfora (29.17%), o α -pineno (8.92%), o acetato de bornilo (6.73%) e o canfeno (4.98%).

Alguns estudos com *Lavandula* spp. mencionam que os óleos essenciais das espécies deste género são constituídos maioritariamente por monoterpenos hidrocarbonados e oxigenados e por sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados (González-Coloma *et al.* 2011). Estudos anteriores, revelam que o óleo essencial da *L. luisieri*, um óleo muito distinto do das outras espécies *Lavandula* spp., apresenta na sua composição 1,8-cineol, lavandulol, linalol e seus acetatos, além dos outros compostos também presentes nas outras espécies deste género (Nogueira *et al.* 2002; Hajhashemi *et al.* 2003; González-Coloma *et al.* 2011; Zuzarte *et al.* 2012). Estudos efetuados com *L. viridis*, citam que o óleos essencial da parte aérea desta espécie contém maioritariamente monoterpenos oxigenados (> 50%) e hidrocarbonados (>20%) e sesquiterpenos (<5%), apresentando como compostos maioritários: 1,8-cineol (22-42%), cânfora (2.9-31.5%), α -pineno (0.3-14.4%) e linalol (0.2-7.8%)

(Nogueira *et al.* 2002; Gonçalves *et al.* 2008; Zuzarte *et al.* 2011). Um estudo realizado com *L. pedunculata* do centro de Portugal (Zuzarte *et al.* 2009) refere que o seu óleo essencial é constituído maioritariamente por monoterpenos oxigenados (69-89%) e monoterpenos hidrocarbonados (4.25-22.5%), apresentando como constituintes maioritários a fenchona (1.3 – 59.7%), o 1,8-cineol (2.4 – 55.5%) e a canfora (3.6 – 48.0%).

4.2 Caracterização dos extratos de *Lavandula* spp.

Na Tabela 8 apresentam-se os rendimentos obtidos, após liofilização, dos extratos de hidrodestilação das folhas e espigas de *L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L. viridis*.

Tabela 8 - Rendimento de extração dos hidrolatos

Planta	Rendimento extração (%)
<i>L. luisieri</i> (folha)	11.07 ± 1.11
<i>L. luisieri</i> (espiga)	5.15 ± 0.31
<i>L. pedunculata</i> (folha)	10.89 ± 1.09
<i>L. pedunculata</i> (espiga)	5.17 ± 0.36
<i>L. viridis</i> (folha)	4.83 ± 0.28
<i>L. viridis</i> (espiga)	4.31 ± 0.34

Para as três espécies de *Lavandula* estudadas, o rendimento de extração dos hidrolatos foi superior nas folhas do que nas espigas respetivas, tendo variado entre 4.83% e 11.07% para a folha e de 4.31% e 5.17% para a espiga.

Os extratos vegetais são misturas complexas, constituídos por vários grupos de compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas. Assim, a avaliação química dos seus constituintes é uma etapa fundamental da sua caracterização.

Estudos recentes (Lee *et al.* 2012) referem que o processo e o método de decoção é um fator importante na obtenção de compostos vegetais com interesse farmacológico. Durante o processo de cozimento, ocorrem uma série de reações responsáveis pela conversão de muitos dos constituintes das plantas aromáticas e medicinais.

Os resultados dos testes qualitativos, efetuados para elucidar a composição química dos extratos obtidos, identificando a presença/ausência dos principais grupos de compostos biologicamente ativos, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição fitoquímica dos hidrolatos

Grupos de compostos	Hidrolatos			
	<i>L. luisieri</i>		<i>L. viridis</i>	
	(folhas)	(espigas)	(folhas)	(espigas)
Alcaloides	0	0	0	0
Antocianidinas	0	0	0	0
Antocianinas	0	0	0	0
Auronas	0	0	0	0
Catequinas	++	++	++	++
Chalconas	0	0	0	0
Cumarinas	0	0	0	0
Fenóis simples	+	+	+	+
Flavonas	++	++	++	++
Flavonoides	++	+	+++	++
Flavanonas	0	0	0	0
Flavanonóis	0	0	0	0
Leucoantocianidinas	0	0	0	0
Saponinas	++	++	++	++
Taninos catéquicos	++	++	++	++
Taninos pirogálicos	0	0	0	0
Triterpenóides	++	+	+++	S
Xantonas	++	++	++	++
Oses e polioses	+++	+++	+++	++

Presença intensa: +++ Presença: ++ Vestígios: + Ausente: 0

Na análise de pesquisa fitoquímica, os extratos de hidrodestilação em estudo revelaram, na sua composição, a presença de catequinas, fenóis simples, flavonas, flavonoides, saponinas, taninos catéquicos, triterpenóides, xantonas, e oses e polioses.

Não se conhecem estudos de caracterização da composição química dos extratos de hidrodestilação de *Lavandula* spp., no entanto, alguns estudos realizados com *L. angustifolia* Mill., referem que as partes aéreas e florais são ricas em linalol, acetato de linalilo e outros monoterpenos e sesquiterpenos, flavonoides, triterpenóides e cumarinas, responsáveis pelas propriedades biológicas que lhes são atribuídas, nomeadamente, antidepressivas, anti-convulsionante, sedativa, espasmolítica, anestésico, antioxidante, antimicrobiana (Upson *et al.* 2000; Hajhashemi *et al.* 2003).

Na caracterização química dos extratos procedeu-se também à quantificação de fenóis totais, pelo método de *Folin-Ciocalteu*, utilizando o ácido pirogálico como composto padrão, no intervalo de concentrações entre 0,0039- 0,25 mg/mL, tendo-se obtido a equação da reta $A (630 \text{ nm}) = 0.0014 [\text{ácido pirogálico, mg/mL}] + 0.0633$, $R=0.9966$ (Anexoll - Figura 33 e Figura 34). Os resultados em compostos fenólicos totais de cada extrato foram expressos em ácido pirogálico (mg/mL) (Figura 17).

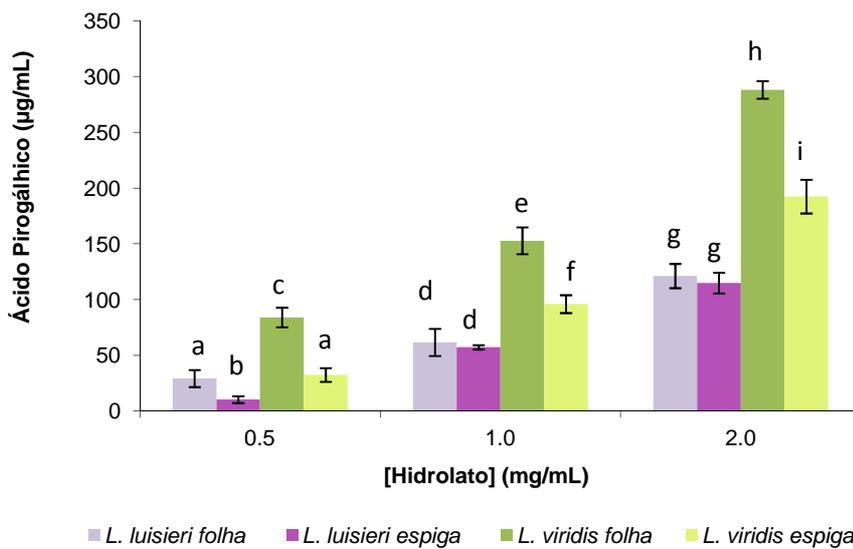


Figura 17 – Concentração de fenóis totais expressos em concentração de ácido pirogálico (µg/mL). Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Para cada um dos extratos estudados, observou-se uma proporcionalidade direta entre a concentração de fenóis totais e a absorvência da amostra, para o intervalo de concentrações até 4 mg/mL (Anexo II - Figura 34). A concentração de compostos fenólicos no extrato de hidrodestilação das folhas de *L. luisieri* (0.5 mg/mL) foi significativamente superior do que no hidrolato da espiga correspondente ($p < 0.05$) (Anexo II - Tabelas 20 e 21). Paralelamente, hidrolato obtido da folha de *L. viridis* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos significativamente superior ($p < 0.05$) ao hidrolato da espiga, na concentração correspondente (Anexo II – Tabelas 20 e 21). Observou-se, ainda, que os hidrolatos de *L. viridis* apresentaram uma composição mais rica em compostos fenólicos que os hidrolatos de *L. luisieri*. Assim, para a concentração de 1 mg/mL, os hidrolatos da folha de *L. luisieri* e *L. viridis*,

apresentaram um conteúdo em compostos fenólicos correspondente a 61.75 e 156.33 µg/ml de ácido pirogálico, respetivamente, enquanto os extratos das espigas florais, apresentaram um conteúdo correspondente a 51.21 e 96.04 µg de ácido pirogálico, respetivamente. Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados Anexo II.

Alguns estudos efetuados com plantas da família Lamiaceae, incluindo do género *Lavandula*, sugerem que os compostos fenólicos estão presentes nas espécies desta família, observando-se variações características de cada género ou espécie na composição em compostos fenólicos (Upson *et al.* 2000; Matkowski *et al.* 2006)

Dentro dos compostos fenólicos, um dos grupos importantes no que respeita às atividades biológicas são os flavonoides. Estes são um grupo de compostos polifenólicos amplamente distribuído nas plantas medicinais, legumes e frutas. O flavonoides totais (Anexo II - Figura 36) foram expressos em concentração do padrão quercetina, um flavonoides natural existente em muitas plantas (Figura 18). Para o efeito construiu-se uma curva de calibração de quercetina, num intervalo de concentrações de 0.0063-1 mg/mL, com a equação da reta $A = 3.3893$ [quercetina, mg/mL] - 0.0123 com $R^2 = 0.9952$ e $R = 0.9976$ (Anexos II- Figura 35).

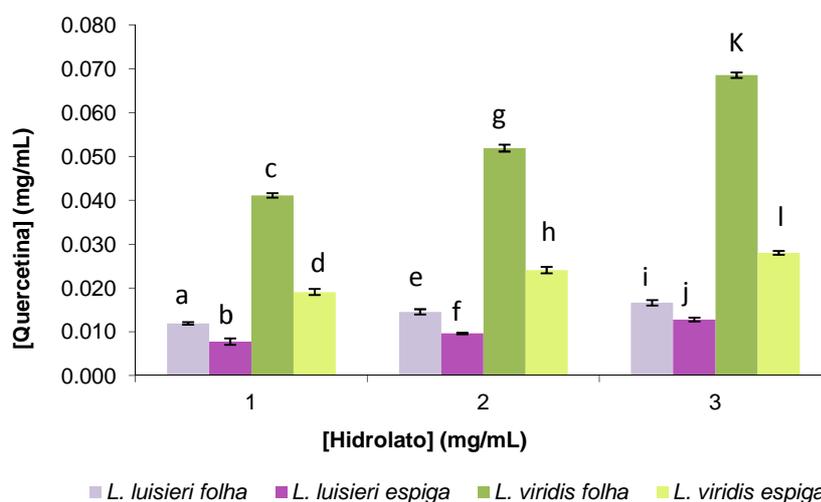


Figura 18 – Concentração de flavonoides totais expressos em concentração de quercetina (mg/mL). Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os extratos de *L. viridis* apresentam um conteúdo em flavonoides superior ao dos extratos de *L. luisieri*. Os valores foram também mais elevados nos extratos das folhas do que nas espigas correspondentes. A análise de variância (ANOVA) mostrou que os extratos das folhas de *L. luisieri* e *L. viridis* apresentaram maior conteúdo em flavonoides totais, significativamente diferentes ($p < 0.05$) que os extratos das espigas correspondentes. Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados no Anexo II.

Estes dados estão coerentes com os dados apresentados para a quantificação de fenóis totais onde os extratos das folhas e os extratos de *L. viridis* apresentam teores superiores de fenóis totais. Assim, por exemplo, para a concentração de 1 mg/mL, os hidrolatos das folhas e das espigas de *L. luisieri* apresentaram um conteúdo em flavonoides correspondente a 0.012 e 0.008 $\mu\text{g/ml}$ de quercetina, respetivamente, enquanto os extratos das folhas e das espigas de *L. viridis*, na mesma concentração, apresentaram um conteúdo correspondente a 0.041 e 0.052 μg de quercetina, respetivamente.

Alguns estudos experimentais demonstraram que os flavonoides possuem vários efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo a proteção cardiovascular, na proteção de doenças neurodegenerativas, atividade anticancerígena, e propriedades antialérgica, antiviral, e anti-inflamatória, podendo estes benefícios estar associados à atividade de antioxidante natural dos flavonoides (Shaghghi *et al.* 2008; White *et al.* 2012).

4.3 Avaliação das propriedades antioxidantes dos óleos e extratos

A atividade antioxidante, nos óleos essenciais e nos extratos de hidrodestilação de *L. luisieri* e *L. viridis*, foi avaliada por dois mecanismos diferentes, através dos métodos do radical DPPH• e o sistema β -caroteno/ácido linoleico, utilizando-se como padrões o ácido ascórbico e a quercetina, dois antioxidantes naturais. De referir que, não se procedeu ao referido estudo no óleo essencial das espigas de *L. viridis* devido à baixa quantidade de amostra obtida.

Na Figura 19 podemos observar o perfil de inibição da oxidação dos óleos e hidrolatos, pelo método do radical DPPH, observando-se que a um aumento da concentração corresponde um aumento da percentagem de inibição da oxidação.

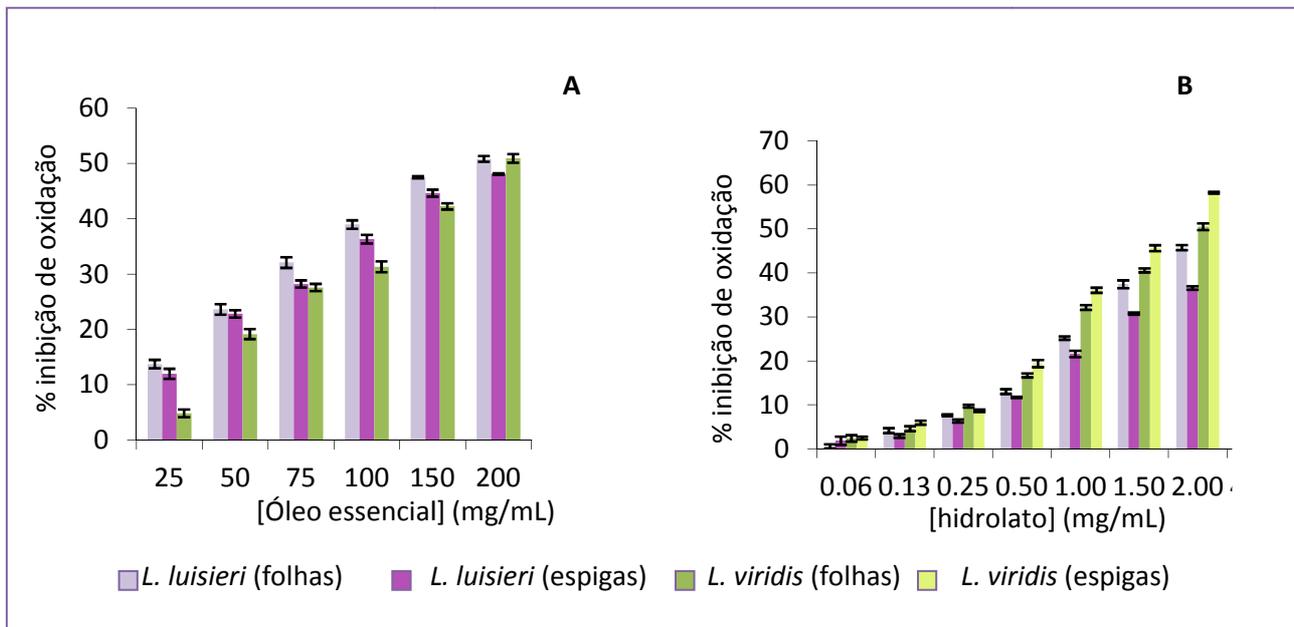


Figura 19 – Atividade antioxidante pelo método de radical DPPH

A- Perfil de atividade para os óleos essenciais; B- Perfil de atividade para os hidrolatos

Os valores da percentagem de inibição da oxidação foram expressos em concentração de padrão. Na Figura 20 são apresentados os valores de atividade antioxidante pelo método do radical DPPH, expressos em ácido ascórbico, para os óleos essenciais (A) e para o hidrolato (B). Os resultados de atividade antioxidante correspondentes, expressos em quercetina, são apresentados na Figura 21. As curvas de inibição de oxidação dos padrões estão apresentadas no Anexo III - Figura 37.

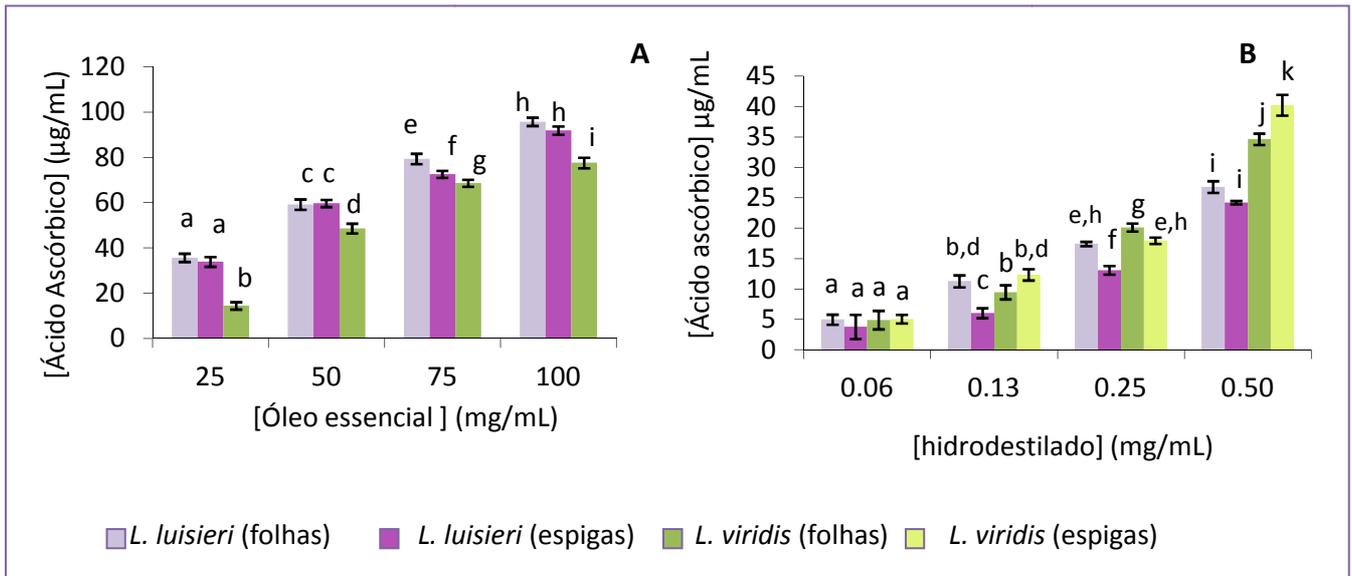


Figura 20 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do radical DPPH[•], expressa em [ácido ascórbico].

A-Óleos essenciais; B-hidrolatos

Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para p < 0,05.

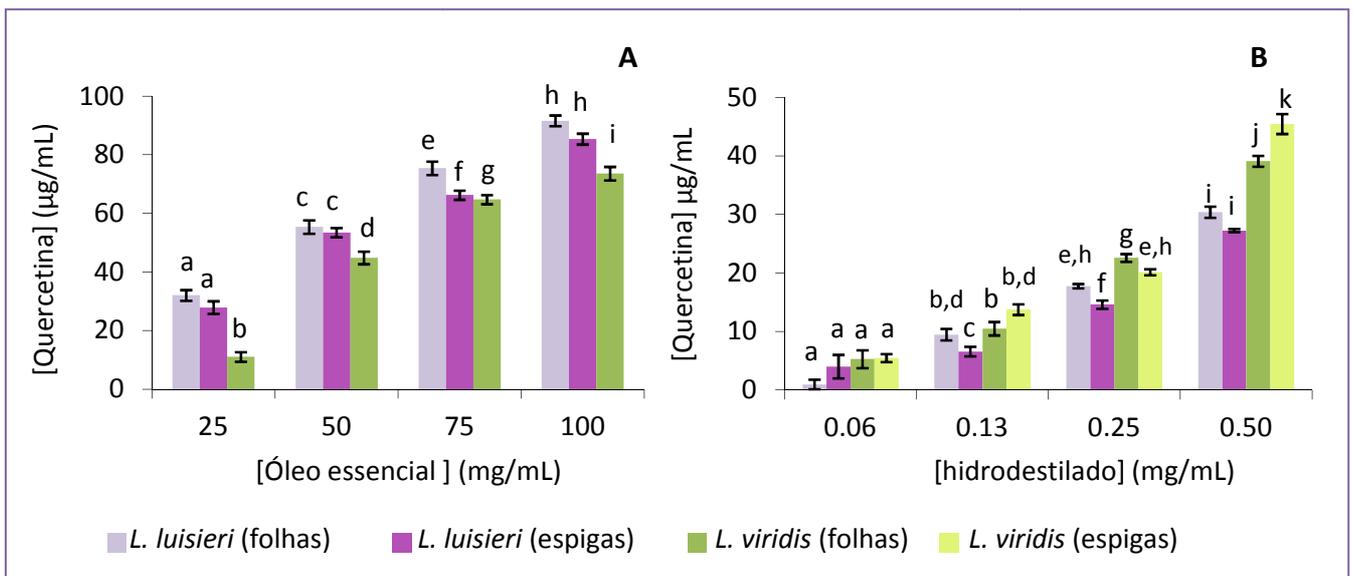


Figura 21 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do radical DPPH[•], expressa em [quercetina].

A-Óleos essenciais; B-hidrolatos

Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para p < 0,05.

Os óleos essenciais e os hidrolatos testados apresentaram atividade antioxidante pelo método da captura de radicais livres. No entanto, os hidrolatos mostraram maior eficácia na captura de radicais livres, quando comparados com os

óleos essenciais, apresentando diferenças significativas ($p < 0.05$). Assim, os óleos essenciais, na concentração 50 mg/mL, de *L. luisieri* (folhas e espigas) e de *L. viridis* (folhas), apresentaram atividade antioxidante na captura de radicais livres, equivalente a 59.3, 59.7 e 48.7 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico e 55.4, 53.5 e 44.9 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, respetivamente. Os hidrolatos, na concentração 0.5 mg/mL, apresentaram atividade equivalente a 26.8, 24.2, 34.7 e 40.3 mg/mL de ácido ascórbico e a 30.4, 27.3, 39.1 e 45.5 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, respetivamente. A análise de comparação múltipla de médias (Tukey) mostrou que a atividade antioxidante pelo método do DPPH foi significativamente diferente para algumas diferentes concentrações de óleo essencial e hidrolatos testadas ($p < 0.05$). Por outro lado, observou-se que os hidrolatos de *L. viridis*, apresentaram atividade antioxidante superior à demonstrada pelos óleos essenciais e extratos de *L. luisieri*, com diferenças significativas entre si ($p < 0.05$) (Anexo III). Observou-se que para as diferentes concentrações, os óleos de *L. luisieri* (folha e espiga) e *L. viridis* apresentaram diferenças significativas. No entanto, comparando os óleos de *L. luisieri*, o óleo da folha apenas apresentou diferenças significativas ($p < 0.05$) com o respetivo óleo da espiga diferenças na concentração de 75 mg/mL. No caso dos hidrolatos, observou-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as folhas e as espigas de *L. luisieri* para as concentrações de 0.13, 0.25 e 0.50 mg/ml, enquanto para a *L. viridis* só se observou diferenças significativas entre as folhas e as espigas para as concentrações 0.25 e 0.50 mg/mL. Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados no Anexo III - Tabela 24-Tabela 27.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na quantificação de fenóis e flavonoides totais, sugerindo a presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes na capacidade de captação de radicais livres (DPPH radical) nos extratos em estudo. Assim, por exemplo, na concentração 1 mg/mL, os extratos de *L. viridis* e *L. luisieri* apresentaram um conteúdo em fenóis totais equivalente a 156.33 e 61.75 $\mu\text{g/mL}$, e uma concentração de flavonoides equivalentes a 0.41 e 0.12 mg/mL, respetivamente.

Muitas das plantas medicinais pertencentes à família Lamiaceae apresentam potencial antioxidante. Estudo efetuados com plantas medicinais sugerem que a sua

atividade antioxidante deve-se às reações redox dos compostos fenólicos, que lhes permitem agir como agentes redutores, doando átomos de hidrogénio e captando oxigénio singuleto (Moyo *et al.* 2010). Alguns estudos efetuados com espécies do género *Lavandula* sugerem que os óleos essenciais das partes aéreas destas plantas possuem atividade antioxidante na proteção do substrato lipídico e na captação de radicais livres (Cavanagh *et al.* 2002; Miguel *et al.* 2009; Albano *et al.* 2011; González-Coloma *et al.* 2011).

Na Figura 22 podemos observar o perfil de inibição da oxidação dos óleos e hidrolatos, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, observando-se que os óleos essenciais e hidrolatos inibem a peroxidação lipídica.

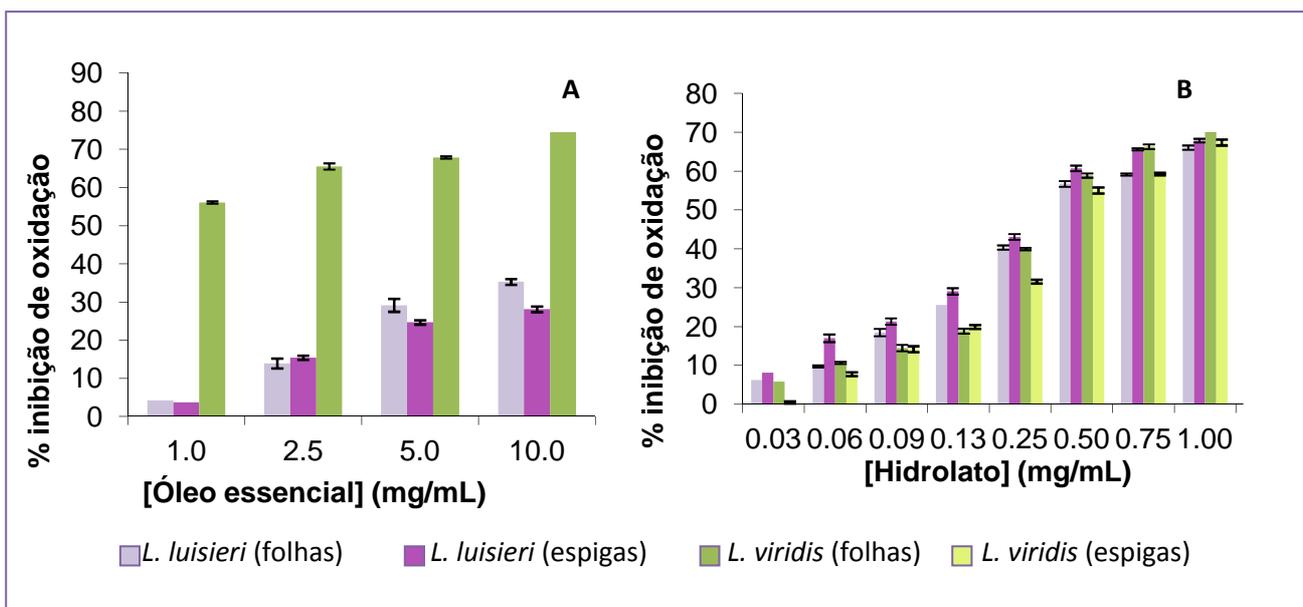


Figura 22 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A- Perfil de atividade para os óleos essenciais; B- Perfil de atividade para os hidrolatos

Na Figura 23 são apresentados os valores de atividade antioxidante pelo método do β -caroteno/ácido linoleica, expressos em ácido ascórbico, para os óleos essenciais (A) e para o hidrolato (B). Os resultados de atividade antioxidante correspondentes, expressos em quercetina, são apresentados na Figura 24. A curva de inibição de oxidação dos padrões, estão apresentadas no Anexo III - Figura 38.

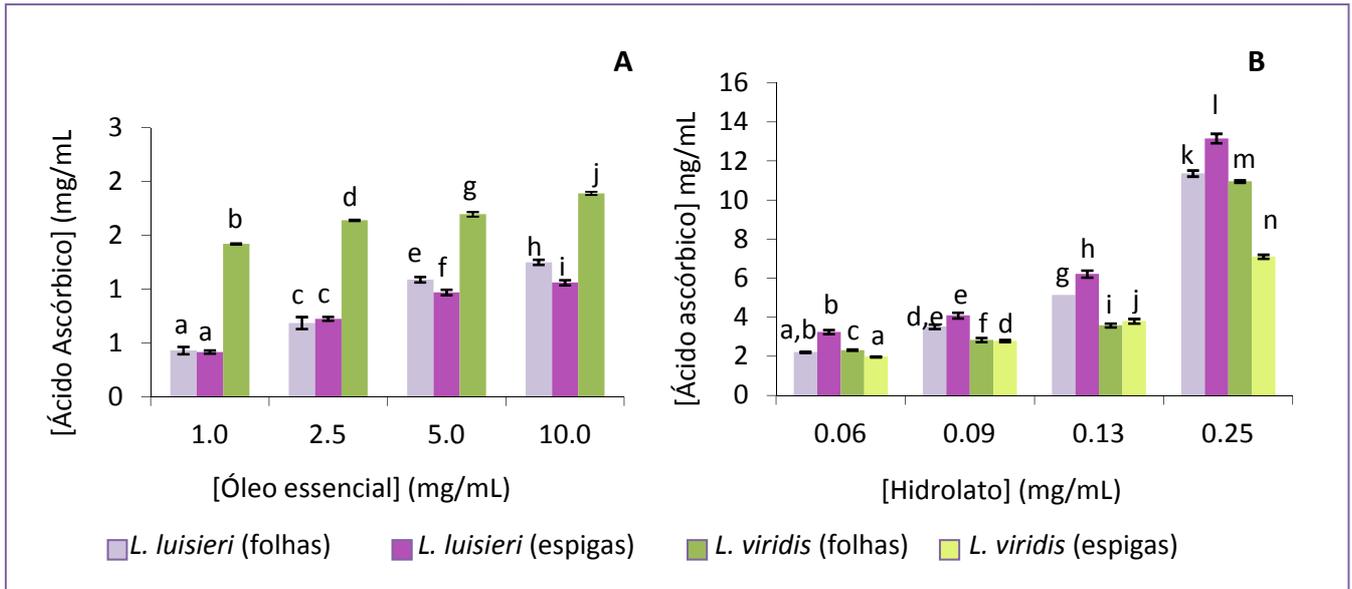


Figura 23 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, expressa em [ácido ascórbico] A-Óleos essenciais; B-hidrolatos
Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Para cada concentração, os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

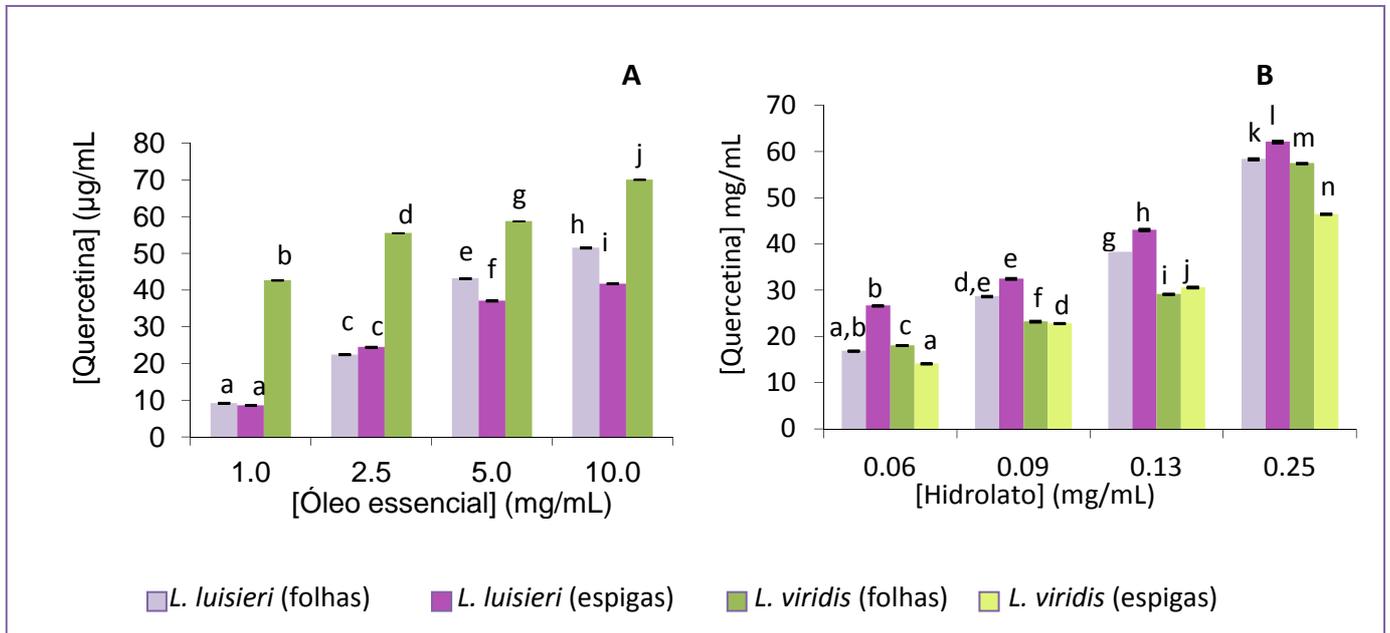


Figura 24 – Atividade antioxidante, avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, expressa em [quercetina]. A-Óleos essenciais; B-hidrolatos
Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Para cada concentração, os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

O método do β -caroteno/Ácido linoleico permite-nos inferir acerca da capacidade do óleo essencial inibir a peroxidação lipídica. Por este método podemos observar que os extratos vegetais estudados (óleos e hidrolatos) inibem a peroxidação lipídica, no entanto os extratos de hidrodestilação mostraram maior eficácia na proteção do substrato lipídico, quando comparados com os óleos essenciais, apresentando diferenças significativas ($p < 0.05$). Os óleos essenciais apresentaram, na concentração 5 mg/mL, o equivalente a 1.1, 1.0 e 1.7 mg/mL de ácido ascórbico e a 43.2, 37.1 e 58.8 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina para os óleos essenciais de *L. luisieri* (folhas e espigas) e *L. viridis* (folhas), respetivamente. Os hidrolatos apresentaram, na concentração 0.25 mg/mL, o equivalente a 11.4, 13.16, 11.0 e 7.1 mg/mL de ácido ascórbico e a 58.4, 62.1, 57.5 e 46.5 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina para os óleos essenciais de *L. luisieri* (folhas e espigas) e *L. viridis* (folhas e espigas), respetivamente.

A análise de variância ANOVA (*one way*) apresentou diferenças significativas ($p < 0.05$) entre e inter-grupos. Assim, procedeu-se à análise de comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey mostrou que a atividade antioxidante determinada pelo método β -caroteno/Ácido linoleico foi significativamente diferente para algumas diferentes concentrações de óleo essencial e hidrolatos ($p < 0,05$). Observou-se que para as diferentes concentrações, os óleos de *L. luisieri* (folha e espiga) e *L. viridis* apresentaram diferenças significativas, no entanto só se observou diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os óleos da folha e da espiga de *L. luisieri* nas concentrações de 5 e 10 mg/mL. No caso dos hidrolatos, observou-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as folhas e as espigas de *L. luisieri* para as concentrações de 0.13 e 0.25 mg/ml, enquanto para a *L. viridis* só se observou diferenças significativas entre as folhas e as espigas para as concentrações 0.06 e 0.09 mg/mL. Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados nos Anexo III – Tabela 28 -Tabela 31.

Alguns estudos têm demonstrado que plantas com níveis elevados de compostos fenólicos exibem capacidades antioxidantes elevadas, prevenindo ou reduzindo o branqueamento de β -caroteno por radicais peróxido, formados pela reação de lípidos, tais como o ácido linoleico, com espécies reativas de oxigénio (ROS)

e oxigénio. Estes radicais reagem com o β -caroteno, promovendo o branqueamento da cor laranja do β -caroteno. Na presença de antioxidantes, estes reagem competitivamente com os radicais, evitando ou minimizando o branqueamento do β -caroteno (Moyo *et al.* 2010). Assim, os compostos fenólicos e flavonoides apresentam um importante papel na estabilização da oxidação de lípidos, relacionando-os com a atividade antioxidante (Liu *et al.* 2007).

Para comparação da atividade antioxidante dos extratos, pelos dois métodos estudados, procedeu-se ao cálculo do valor de IC₅₀, por interpolação gráfica da atividade antioxidante (%) vs concentração das amostras em estudo (Figura 19, Figura 22 e Anexo III – Figura 37 e Figura 38). A Tabela 10 indica o valor de IC₅₀.

Tabela 10 - Valores de IC₅₀ (mg/mL)

	radical DPPH•		β -caroteno/ácido linoleico	
Ácido ascórbico	0.10		19.05	
Quercetina	0.09		0.07	
	Óleo essencial	Hidrolato	Óleo essencial	Hidrolato
<i>L. luisieri</i> folha	193.27	2.60	12.51	0.43
<i>L. luisieri</i> espiga	223.52	3.20	14.02	0.35
<i>L. viridis</i> folha	208.90	2.50	0.88	0.39
<i>L. viridis</i> espiga	-	1.70	-	0.47

Comparando os dois padrões em estudo, observou-se que a quercetina apresentou atividade antioxidante pelos 2 métodos, enquanto o ácido ascórbico apresenta atividade preferencialmente pelo método do DPPH, com um valor de IC₅₀ de 0.1 mg/mL. As amostras apresentaram atividade antioxidante pelos dois métodos estudados, DPPH e do β -caroteno/ácido linoleico. Em ambos os métodos estudados, observou-se um aumento não linear da % de inibição da oxidação com o aumento da concentração (Figura 19, Figura 22 e Anexo III – Figura 37 e Figura 38). Porém, as percentagens de atividade antioxidante dos óleos e hidrolatos observadas pelo método do β -caroteno/ácido linoleico foram superiores às observadas pelo método do DPPH pelo que é possível referir que o mecanismo predominante de atividade

antioxidante é a proteção do substrato lipídico, apesar de também apresentar capacidade de captura de radicais livres. Assim, como seria esperado, as amostras apresentam menores valores de IC₅₀ pelo método do β-caroteno/ácido linoleico. Os óleos essenciais apresentam, pelo método do radical DPPH e pelo método do β-caroteno/ácido linoleico, valores mais próximo do valor de IC₅₀ do ácido ascórbico (0.10 e 19.9 mg/mL) do que do valor de IC₅₀ da quercetina (0.09 e 0.07 mg/mL, respetivamente). Pode-se também observar que, pelos dois métodos, os hidrolatos apresentam atividade antioxidante superior à atividade dos óleos, apresentando menores valores de IC₅₀, indicando que os polifenóis ou flavanonas e flavonoides desempenham papéis importantes na atividade (Tepe *et al.* 2005). Contrariamente às amostras, o padrão mostrou-se mais eficaz na captura de radicais livres do que na proteção do substrato lipídico, apresentando valores de IC₅₀ pelo método do radical DPPH.

A maioria dos estudos visa explicar a importância do perfil fenólico sobre a capacidade antioxidante de diferentes produtos, no entanto as várias as famílias de polifenóis, flavonoides, flavonóis e ácidos fenólicos apresentam capacidade antioxidante, sendo difícil estimar a capacidade antioxidante do conteúdo de compostos fenólicos. As relações sinérgicas são frequentemente propostas para explicar as diferenças entre os valores estimados e os observados para capacidades antioxidantes (Podsdek 2007; Lobo *et al.* 2009). Além disso, como não foi possível estabelecer uma relação direta entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante das amostras, quer pela captura de radicais livres quer pela inibição da peroxidação lipídica, pode-se assumir que outros compostos, sem estrutura fenólica, contribuem para a atividade antioxidante. A presença de terpenóides, presentes nos óleos essenciais e hidrolatos, pode explicar, em parte, a atividade antioxidante demonstrada por estas plantas (Mata *et al.* 2007).

4.4 Avaliação da citotoxicidade em *Artemia salina*

Alguns estudos têm demonstrado que o ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina* é um bom método para a avaliação preliminar de toxicidade, permitindo avaliar plantas medicinais utilizadas popularmente para vários fins e monitorizar o isolamento de uma grande variedade de compostos biologicamente ativos (Bastos *et al.* 2009; Hossain *et al.* 2012).

O estudo da avaliação da citotoxicidade efetuado para os óleos essenciais das folhas de *L. luisieri* e de *L. viridis* e respetivos hidrolatos, mostrou que estes compostos apresentaram uma baixa mortalidade de *A. salina* comparativamente ao dicromato de potássio (padrão). Os valores de CL_{50} foram determinados por interpolação gráfica e comparados com o padrão dicromato de potássio (Tabela 11). As curvas de dose-resposta das amostras e do padrão estão apresentadas no Anexo IV - Figura 39.

Tabela 11 - Valores de concentração letal 50 (CL_{50})

	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
[$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$]	50.20 \pm 1.71	
	Óleo essencial	Hidrolato
<i>L. luisieri</i> folha	109.80 \pm 4.20	4042.58 \pm 50.33
<i>L. luisieri</i> espiga	-	3632.49 \pm 250.20
<i>L. viridis</i> folha	85.42 \pm 4.13	3605.98 \pm 421.24
<i>L. viridis</i> espiga	-	4559.04 \pm 382.44

As amostras em estudo apresentaram valores de CL_{50} superiores ao composto padrão, sendo, portanto, consideradas menos tóxicas do que o dicromato de potássio. Os óleos apresentaram toxicidade elevada para *Artemia salina*, com valores de CL_{50} inferiores a 500 $\mu\text{g/mL}$, no entanto apresentaram valores de CL_{50} superiores ao valor do dicromato de potássio, utilizado como padrão. Os hidrolatos não apresentaram toxicidade para *A. salina* ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), apresentando valores de CL_{50} ($> 3500 \mu\text{g/mL}$) muito superiores ao valor de CL_{50} do dicromato de potássio (Bastos *et al.* 2009).

Estes valores de toxicidade podem estar relacionados com a presença de flavonoides, taninos e polifenóis e a ausência de alcaloides, que poderão sugerir

atividade antitumoral dos óleos essenciais, no entanto, esta terá que ser confirmada em linhas celulares específicas (Sharififar *et al.* 2009).

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

O estudo da avaliação da atividade antimicrobiana foi efetuado para os óleos essenciais de *L. luisieri* (folhas e espigas) e *L. viridis* (folhas) pelos métodos de difusão em meio sólido e determinação da concentração mínima inibitória (NCCLS 2003; NCCLS 2008; NCCLS 2009). Os hidrolatos de *L. luisieri* e *L. viridis* não apresentaram atividade antibacteriana nem antifúngica.

Os resultados de atividade antibacteriana dos óleos pelo método de difusão em meio sólido, face às estirpes patogénicas, Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurim*) são apresentados na Tabela 12, com indicação dos halos de inibição (mm).

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

	Ø halo de inibição (mm)			TE
	<i>L. luisieri</i> folha	<i>L. luisieri</i> espiga	<i>L. viridis</i> folha	
<i>Escherichia coli</i> LFG 03	8.0 ± 0.0 ^a	6.0 ± 0.0 ^b	9.3 ± 0.6 ^c	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11.0 ± 1.0 ^d	9.0 ± 1.0 ^d	30.0 ± 2.0 ^e	30
<i>Morganella morganii</i> LFG 08	9.0 ± 0.0 ^f	7.3 ± 0.6 ^f	9.7 ± 0.6 ^f	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFG 02	7.0 ± 0.0 ^g	13.0 ± 0.0 ^h	6.0 ± 0.0 ^g	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Si	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	18
<i>Proteus mirabilis</i> LFG 04	9.3 ± 0.6 ⁱ	7.0 ± 0.0 ^j	11.0 ± 1.0 ⁱ	8
<i>Salmonella enteritidis</i> LFG 05	8.7 ± 0.6 ^k	8.3 ± 0.6 ^k	11.7 ± 0.6 ^l	26
<i>Salmonella typhimurium</i> LFG 06	7.7 ± 0.6 ^m	Si ⁿ	8.0 ± 0.0 ^m	10
<i>Enterococcus faecalis</i> LFG 01	10.0 ± 0.0 ^o	7.7 ± 0.6 ^p	11.3 ± 0.6 ^q	15
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10.7 ± 0.6 ^r	9.3 ± 0.6 ^r	9.7 ± 0.6 ^r	16
<i>Staphylococcus aureus</i> LFG 07	21.3 ± 2.3 ^s	14.3 ± 0.6 ^t	19.7 ± 1.5 ^s	44
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	20.3 ± 0.6 ^u	16.3 ± 0.6 ^v	16.7 ± 1.2 ^v	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	13.3 ± 1.2 ^w	12.3 ± 0.6 ^w	9.3 ± 0.6 ^x	14

Legenda: si – sem inibição; TE-Tetraciclina (30 µg)

Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão. Para cada estirpe, os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para p < 0,05.

Os óleos essenciais mostraram capacidade para inibir o crescimento das estirpes estudadas, exceto para o óleo essencial das folhas de *L. luisieri* para a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e para o óleo essencial das espigas de *L. luisieri* para a *S. typhimurium* LFG06. Os óleos essenciais apresentaram um largo espectro de ação antibacteriano, com inibição das estirpes *Gram+* e *Gram-*, observando-se diferenças significativas ($p < 0.05$) para os três óleos face às estirpes *E. coli* LFG03 e face à estirpe *E. faecalis* LFG 07, no entanto não se observou diferenças significativas ($p > 0.05$) para as respetivas estirpes ATCC. Os óleos da folha revelaram maior atividade face às estirpes *Gram+* (em especial *S. aureus*) e face à maioria das estirpes de *Enterobactérias* testadas (*Gram-*) do que o óleo da espiga. No entanto, o óleo da espiga de *L. luisieri* revelou maior atividade face às estirpes de *P. aeruginosa* do que os óleos das folhas.

Comparando os óleos das folhas das duas espécies de *Lavandula*, o óleo de *L. viridis* apresentou melhores resultados do que o óleo das folhas de *L. luisieri* face às estirpes *Gram-* (exceto para as estirpes de *P. aeruginosa*), enquanto o óleo das folhas de *L. luisieri* apresentou maior atividade do que o óleo das folhas de *L. viridis* face às estirpes *Gram+* estudadas.

Os resultados obtidos para as mostras foram comparados com os resultados obtidos para um conjunto de antibióticos padrão, usados na medicina convencional, testados nas mesmas condições, para cada estirpe bacteriana (Anexos V - Tabela 32).

O óleos essenciais das folhas de *L. luisieri* e *L. viridis* apresentaram-se mais ativo do que os antibióticos padrão tetraciclina no caso das bactéria *Gram-negativas* *E. coli* LFG 03, *M. morgani* LFG 08 e *P. mirabilis* 04, e mais ativo do que o antibiótico padrão gentamicina para as estirpes *Gram-positivas* estudadas, enquanto o óleo das espigas de *L. luisieri* apenas apresentou maior atividade face à estirpe *P. mirabilis* LFG 04.

Além disso, os óleos essenciais também apresentaram boas atividades para as estirpes *Gram-positivas* estudadas, como é o caso do antibiótico gentamicina para o qual o óleo essencial das folhas de *L. luisieri* apresentou maior atividade face a todos as estirpes *Gram-positivas* estudadas e o óleo essencial das folhas de *L. viridis* apresentou maior atividade do que este padrão para as estirpes *S. aureus*. Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados nos Anexo VIII –Tabela 33 e Tabela 34.

Na Tabela 13 estão registados os valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os óleos e bactérias testadas e para o cloridrato de tetraciclina, antibiótico utilizado como padrão.

Tabela 13 - Valores da concentração mínima inibitória

	CMI (µg/mL)			Cloridrato de tetraciclina
	<i>L. luisieri</i>		<i>L. viridis</i>	
	folha	espiga	folha	
<i>Escherichia coli</i> LFG 03	500	500	> 2000	> 40
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 1000	>1000	1000	0.25
<i>Morganella morganii</i> LF G08	500	500	1000	> 40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFG 02	250	250	500-750	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	>1000	> 1000	5
<i>Proteus mirabilis</i> LFG 04	250	250	1000	40
<i>Salmonella enteritidis</i> LFG 05	750-1000	750	500-750	0.25
<i>Salmonella typhimurium</i> LF G06	750-1000	>1000	> 1000	> 40
<i>Enterococcus faecalis</i> LFG 01	500	500	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	125	1000	62.5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> LFG 07	250	250	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	250	250-500	125-250	0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	125	250	125	40

Legenda: -: não efetuado

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que os óleos essenciais apresentam atividade bacteriostática para as estirpes *Gram+*, com valores de CMI no intervalo 62.5-1000 µg/mL, onde tanto o valor mais baixo (62.5 µg/mL, óleo da folha de *L. viridis*) como o valor mais alto (1000 µg/mL, óleo da espiga de *L. luisieri*) correspondem à estirpe *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Para as estirpes *Gram-*, os óleos essenciais apresentam atividade bacteriostática com valores de CMI no intervalo 250-2000 µg/mL. O valor 250 µg/mL corresponde aos valores de CMI dos óleos de *L. luisieri* face à estirpe *Pseudomonas aeruginosa* LFG02 e o valor >2000 µg/mL valores de CMI do óleos das folhas de *L. viridis* face à estirpe *Escherichia coli* LFG03.

É importante referir que estas estirpes são patogénicas e que a maior parte desenvolve resistência ao tratamento com antibióticos de síntese, sendo, portanto, necessário pesquisar novos compostos aos quais estes microrganismos sejam sensíveis e que poderão ser posteriormente aplicados na terapêutica.

O estudo de atividade antifúngica revelou que os óleos essenciais apresentaram atividade face a leveduras patogénicas e face a fungos filamentosos fitopatogénicos (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividade antifúngica dos óleos essenciais

		Ø halo de inibição (mm)			
		<i>L. luisieri</i>		<i>L. viridis</i>	Nistatina (33 µg)
		folha	espiga	folha	
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	20.00 ± 2.00 ^a	12.67 ± 0.58 ^b	-	14.33 ± 1.53 ^b
	<i>Candida krusei</i>	16.33 ± 0.58 ^c	9.67 ± 0.58 ^d	-	8.33 ± 2.08 ^d
	<i>Candida parapsilosis</i>	It ^e	10.00 ± 1.00 ^f	-	13.00 ± 1.00 ^g
	<i>Geotrichum klebahnii</i>	It ^h	It ^h	-	19.00 ± 5.29 ⁱ
Fungos filamentosos	<i>Aspergillus japonicus</i>	It ^j	8.67 ± 0.47 ^k	It ^j	25.00 ± 3.60 ^l
	<i>Aspergillus niger</i>	It ^m	6.67 ± 0.47 ⁿ	11.00 ± 2.00 ^o	13.67 ± 1.15 ^p
	<i>Aspergillus oryzae</i>	6.33 ± 0.58 ^q	7.00 ± 1.00 ^q	6.33 ± 0.58 ^q	10.00 ± 1.00 ^r
	<i>Fusarium oxysporum</i>	It ^s	10.33 ± 0.47 ^t	It ^s	9.67 ± 0.58 ^u
	<i>Penicillium</i> spp.	It ^v	6.67 ± 0.47 ^w	It ^v	6.0 ± 0.0 ^w
	<i>Rhizopus oryzae</i>	12.33 ± 0.58 ^x	6.33 ± 0.58 ^y	9.33 ± 0.58 ^z	9.33 ± 0.58 ^z
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	6.00 ± 0.00 [*]	6.00 ± 0.00 [*]	7.00 ± 1.00 [*]	Si ^{**}

Legenda: it: inibição total; si: sem inibição; -: não efetuado

Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão. Para cada estirpe, os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

O óleo essencial das folhas de *L. luisieri* apresentou maior atividade do que o padrão nistatina, para as estirpes fúngicas estudadas com exceção da estirpe *A. Orizae*. Este óleo apresentou inibição total do crescimento face às estirpes de leveduras *C. parapsilosis* e *G. klebahnii* e face às estirpes fúngicas *A. japonicus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *Penicillium* spp, apresentando diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparado com o óleo das respetivas espigas face à estirpes fúngicas estudadas com exceção das estirpes *G. klebanii*, *A. orizae* e *R. stolonifer*. O óleo das espigas de *L. luisieri* apresentou atividade antifúngica superior à nistatina face às estirpes *C. krusei* e *G. klebahnii*. O óleo essencial de *L. viridis* apresentou maior atividade que a nistatina face à estirpe *Rhizopus stolonifer* e apresentou inibição total do crescimento face às estirpes *A. japonicus*, *F. oxysporum* e *Penicillium* spp, diferindo significativamente ($p < 0.05$) dos óleos de *L. luisieri* face às estirpes *R. oryzae* e *A. niger*. Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados nos Anexo VIII –Tabela 35 – Tabela 38.

A concentração mínima inibitória foi avaliada face às estirpes estudadas para os óleos essenciais de *L. luisieri*, observando-se valores de CMI entre 125 e 250 µg/mL e 250-500 µg/mL para o óleo das folhas e das espigas, respetivamente, face às estirpes de leveduras e observou-se valores de CMI entre 250 e 100 µg/mL para os óleos das folhas e das espigas face às estirpes de fungos filamentosos (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores da concentração mínima inibitória para as estirpes fúngicas

		CMI (µg/mL)	
		<i>L. luisieri</i>	
		folha	espiga
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	250	500
	<i>Candida krusei</i>	125	250
	<i>Candida parapsilosis</i>	125	250
	<i>Geotrichum klebahnii</i>	125	250
Fungos filamentosos	<i>Fusarium oxysporum</i>	500	>1000
	<i>Aspergillus niger</i>	250	500
	<i>Aspergillus japonicus</i>	250	500
	<i>Aspergillus orizae</i>	>1000	>1000
	<i>Penicillium</i> spp	250	250

Algumas plantas e seus derivados são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. Neste contexto, extratos de *Lavandula* spp. têm sido usados na medicina tradicional, e, mais recentemente, como agentes antimicrobianos (Hanamanthagouda *et al.* 2010). Os estudos que existem na literatura referem que os óleos essenciais de *Lavandula* spp. apresentaram atividade antibacteriana. Um estudo efetuado com óleo de *Lavandula bipinnata* refere que as estirpes *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* são sensíveis ao óleo essencial desta planta aromática (Murthy *et al.* 2010). Além disso,

A bibliografia refere que óleos ricos em terpenoides (carvacrol, eugenol e cânfora) e compostos fenólicos apresentaram atividade antimicrobiana, e alguns estudos efetuadas com estes compostos na sua forma pura sugerem que estes compostos químicos são responsáveis pela atividade antimicrobiana dos óleos, quer porque se apresentam como compostos maioritários quer pelo facto de

desempenharem um papel importante devido aos efeitos sinérgicos (Rodríguez *et al.* 2007; Gilles *et al.* 2010; Weerakkody *et al.* 2010).

Os óleos essenciais são conhecidos pelos seus efeitos sinérgicos e alguns estudos efetuados demonstraram que a mistura da totalidade dos componentes dos óleos essenciais apresentou maior atividade que a mistura dos seus constituintes maioritários (Burt 2004; Weerakkody *et al.* 2010).

4.6 Avaliação da toxicidade aguda e *screening* farmacológico

Os resultados da avaliação do perfil hipocrático e da toxicidade aguda após administração do óleo e extrato de *L. luisieri* durante 14 dias consecutivos (*Up-and-Down*, OCDE, 2001), estão apresentados nas Tabela 12 (óleo) e 13 (extrato de hidrodestilação). O óleo e o extrato. As amostras testadas apresentam baixa toxicidade, com DL₅₀ superior a 2000 mg/Kg, uma vez que não se observou morte ou qualquer outro sinal de toxicidade durante o ensaio. Além disso, efetuou-se o registo dos pesos dos animais e dos órgãos e observou-se que os animais dos grupos de teste tiveram maior variação de massa corporal (3-4g) e o peso do fígado variou, em média, no intervalo de 0.93-1.24 g, enquanto o peso médio do rim variou no intervalo de 0.11-0.15 g, no entanto, pela análise de variância (ANOVA-*one way*), não se observaram diferenças significativas entre os grupos.

Durante o ensaio, os ratos *Swiss* administrados com óleo essencial apresentaram alterações comportamentais durante as primeiras 24h, nomeadamente ao nível da sensibilidade aos estímulos aplicados nas orelhas e na base da cauda, enquanto os animais administrados com o hidrolato, não apresentaram alterações comportamentais. Observou-se ainda, no grupo da dose de óleo essencial mais elevada, 2000 mg/Kg, uma conduta passiva nos primeiros 30 min, sugerindo uma ação calmante. Após este período de 24h os animais apresentaram comportamento normal. Os resultados obtidos sugerem que o óleo possui atividade analgésica e sedativa.

Alguns estudos efetuados com óleos essenciais, referem que óleos ricos em monoterpenos oxigenados, nomeadamente 1,8-cineol, linalol, borneol e seus acetatos,

apresentam capacidade analgésica e anti-inflamatória (Cavanagh *et al.* 2002; Peana *et al.* 2002; Vogel *et al.* 2002; Hajhashemi *et al.* 2003).

Tabela 16 - Resumo do perfil hipocrático para o óleo essencial das folhas de *L. luisieri*

Dose (mg/Kg)	175					550					2000				
Tempo (h)	0	0.5	1	8	24	0	0.5	1	8	24	0	0.5	1	8	24
Parâmetros															
Catalepsia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tração	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0
Reflexo pineal (orelhas)	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0
Atividade motora (min)	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Conduta de temor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aumento: + Diminuição: - Normal: 0

Tabela 17 - Resumo do perfil hipocrático para o hidrolato das folhas de *L. luisieri*

Dose (mg/Kg)	175					550					2000				
Tempo (h)	0	0.5	1	8	24	0	0.5	1	8	24	0	0.5	1	8	24
Parâmetros															
Catalepsia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tração	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo pineal (orelhas)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade motora (min)	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
Conduta de temor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aumento: + Diminuição: - Normal: 0

Para complementar o estudo de avaliação da toxicidade, procedeu-se às análises histológica e morfométrica do fígado e rim dos animais administrados com óleo essencial e hidrolato (nas doses 175 mg/Kg, 550 mg/Kg e 2000 mg/Kg) e respetivos controlos), com vista a avaliar eventuais alterações estruturais causados nos órgãos mais envolvidos no processo de metabolização. Nas Figuras 25 a 29 podem observar-se imagens de cortes histológicos transversais dos órgãos em estudo, fígado (Figura 25 – 26) e rim (Figuras 27-29). Nas Tabela 18 estão indicados os valores da análise morfométrica. Os dados foram submetidos a análise estatística (ANOVA-one way – anexo VI – Tabelas 41 e 42 .

A análise histológica do fígado mostrou que nos indivíduos administrados com as doses mais elevadas (550 e 2000 mg/Kg) de óleo essencial foram registados focos de alteração da arquitetura hepática, com um notório desarranjo da disposição cordonal dos hepatócitos. Além disso, foi possível observar nalguns indivíduos administrados com o óleo essencial focos onde os hepatócitos possuem um citoplasma claro, provavelmente vacuolizado, e núcleos com cromatina condensada (Figuras 25C e 26C). Nos indivíduos administrados com os hidrolatos os efeitos sobre a estrutura hepática são mais discretos quando comparado com o observado nos indivíduos administrados com o óleo essencial. Congestionamento vascular foi também identificado no fígado não só dos indivíduos administrados quer com o óleo essencial, quer com os hidrolatos, mas também nos indivíduos do grupo controlo (Figuras 25 e 26).

Uma análise morfométrica mostrou que a área do núcleo dos hepatócitos nos indivíduos administrados é maior do que aquela nos indivíduos do grupo controlo (Tabela 18). Os valores mais elevados correspondem aos indivíduos administrados com o óleo essencial, nomeadamente àqueles das doses mais elevadas (550 e 2000 mg/kg). De acordo com a análise estatística (anexo VI), a diferença das médias da área nuclear dos hepatócitos é significativa ($p < 0.05$) entre os grupos administrados com o óleo essencial e o grupo controlo. Em contrapartida, as diferenças observadas entre os grupos administrados com o hidrolato, assim como as diferenças entre estes e o grupo controlo mostraram não ser significativas ($p > 0.05$). Estes resultados indicam que a administração do óleo essencial induz uma evidente hipertrofia do núcleo dos

hepatócitos. Um aumento do núcleo poderá corresponder a um aumento da atividade metabólica dos hepatócitos induzida pela administração do óleo essencial.

A análise morfométrica do fígado mostrou também que a área relativa ocupada pelos sinusoides nos campos de amostragem selecionados varia em termos percentuais entre 5.5-11.5% nos grupos administrados com óleo essencial, e entre 5.16 e 9.53% nos grupos administrados com hidrolato (Tabela 18). Nos grupos administrados com o óleo essencial, observaram-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o grupo administrado com a dose de 175 mg/kg e os restantes grupos testados. Em contrapartida as diferenças registadas entre os indivíduos administrados com as doses mais elevadas (550 e 2000 mg/Kg) e o grupo controlo não foram significativas ($p > 0.05$). Face aos resultados obtidos, pode dizer-se que não há uma correlação consistente entre a dose administrada de óleo essencial e a área dos sinusoides.

Já nos grupos administrados com o hidrolato verificou-se uma tendência de diminuição da área dos sinusoides com o aumento da dose administrada, sendo as diferenças registadas significativas ($p < 0.05$) (Tabela 18), no entanto as diferenças observadas não são significativas uma vez que não se observaram diferenças significativas entre os indivíduos administrados com a dose 2000 mg/Kg e o grupo controlo ($p > 0.05$).

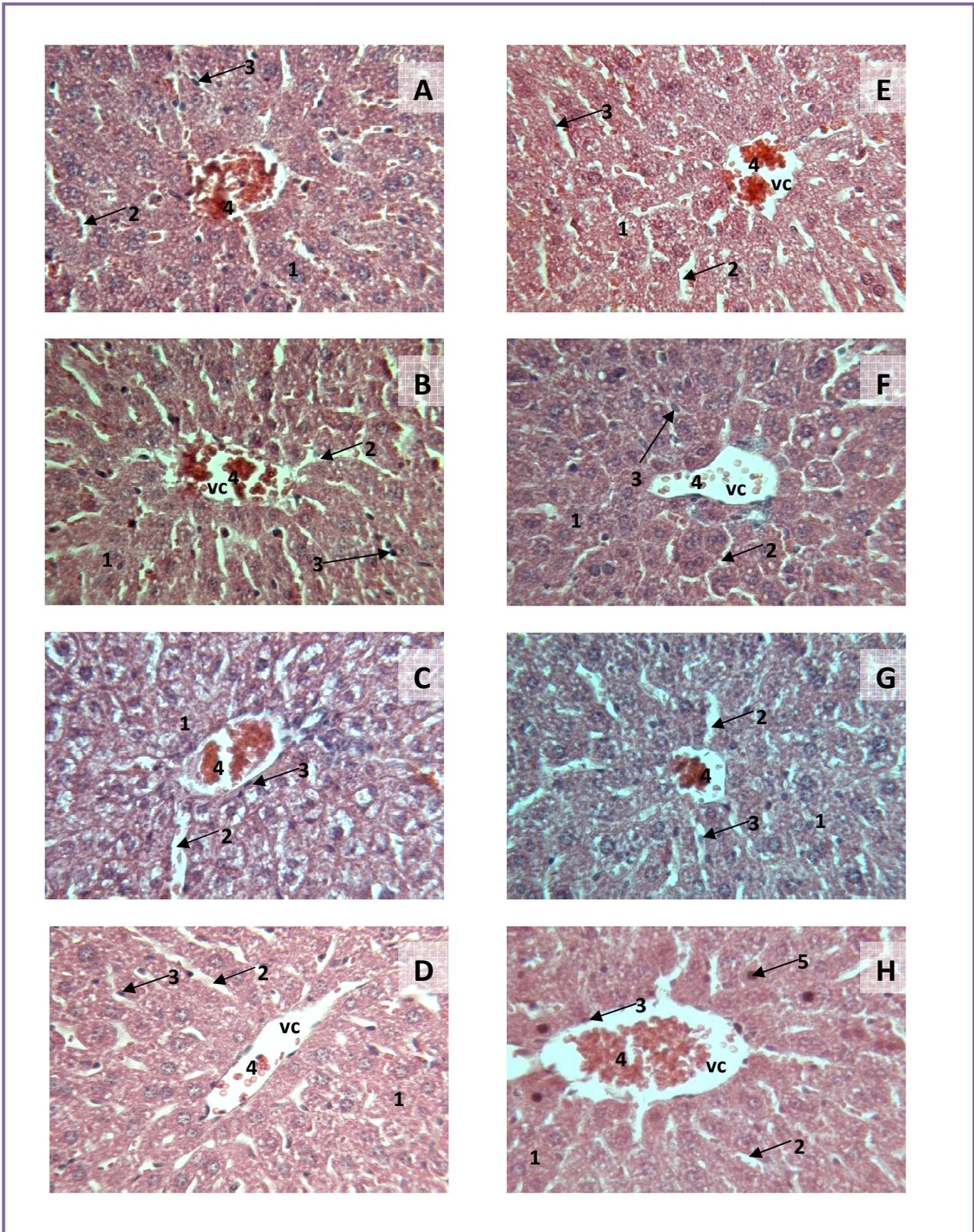


Figura 25 – Cortes histológicas da região pericentral do fígado corados à Hematoxilina e Eosina (H&E)

A-D: animais administrados com óleo essencial (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 E-H: animais administrados com extrato hidrolato (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 vc- veia central hepática; 1- hepatócito; 2- sinusoide; 3- célula de kupffer; 4- células sanguíneas; 5- núcleos condensados.
 Ampliação:250X

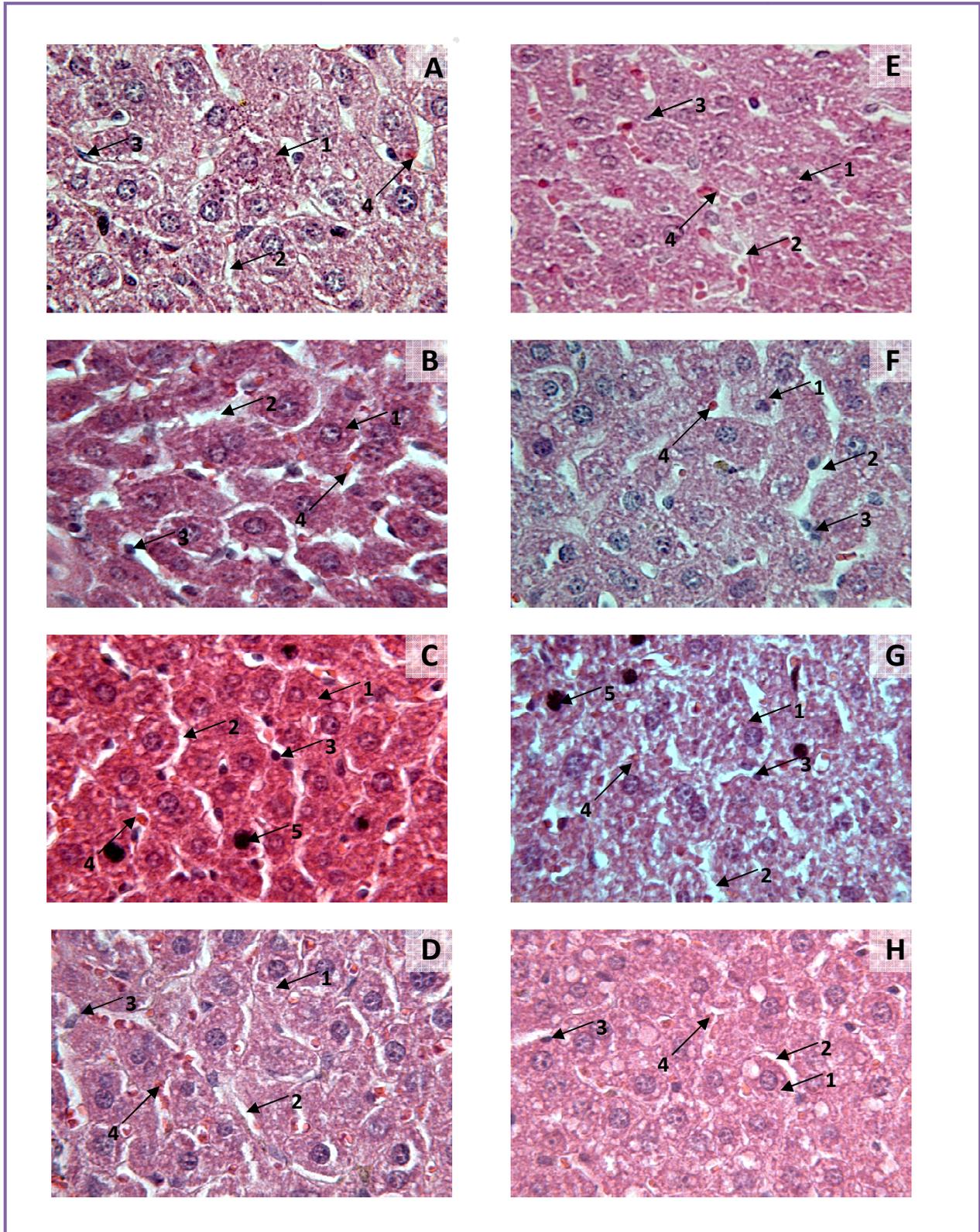


Figura 26 – Cortes histológicas da região pericentral do fígado

A-D: animais administrados com óleo essencial (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 E-H: animais administrados com extrato hidrolato (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 1 - hepatócito; 2 - sinusóide; 3 - célula de kupffer; 4 – células sanguíneas; 5- núcleos condensados.
 Ampliação:400X

Tabela 18 - Valores da análise histomorfométrica do fígado para o óleo e hidrolato da folha de *L. luisieri*

	Dose (mg/Kg)	Hepatócitos	Sinusoides
		Área nuclear (μm^2)	(% área)
Óleo essencial	0	43.75±4.79 ^a	7.38±3.05 ^e
	175	48.96±6.29 ^b	11.45±4.43 ^f
	550	52.36±12.71 ^b	5.49±2.51 ^e
	2000	51.63±11.96 ^b	5.75±1.79 ^e
Hidrolato	0	45.61±6.11 ^c	5.16±2.10 ^g
	175	40.69±6.17 ^d	9,53±2.46 ^h
	550	44.53±6.88 ^c	7.48±1.79 ⁱ
	2000	44.89±8.27 ^c	5.27±1.93 ^g

Cada linha representa o valor médio dos replicados \pm desvio padrão. Para cada parâmetro, os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

A análise histológica do rim e os dados morfométricos revelaram a existência de algumas diferenças a nível das estruturas tubulares (Figuras 27-29; Tabela 19).

Assim, ao nível dos túbulos proximais, os dados morfométricos mostraram que para os grupos administrados com óleo essencial o diâmetro do lúmen variou entre 10.60 e 12.78 μm , com os valores mais elevados registados nos grupos administrados com a dose 175 mg/Kg e 550 mg/Kg, e o valor mais baixo correspondendo ao grupo administrado com a dose mais elevada (2000 mg/Kg) (Tabela 19). Relativamente aos grupos administrados com o hidrolato, o valor mais elevado do diâmetro do lúmen dos túbulos proximais corresponde ao grupo controlo e o valor mais baixo ao grupo administrado com a dose 175 mg/Kg.

Além disso, foram visíveis alterações ao nível das células epiteliais dos túbulos renais dos indivíduos administrados com o óleo essencial nas doses mais elevadas (550 e 2000 mg/Kg) (Figura 27C e D). Entre as alterações identificadas estão: vacuolização/degeneração descamação das células epiteliais dos túbulos proximais e

distais, assim como descamação de células epiteliais nalguns túbulos proximais. De referir ainda a observação de núcleos hiper cromático e/ou picnótico.

Em relação aos glomérulos, os resultados da análise morfométrica mostraram que a área média dos glomérulos nos grupos administrados com óleo essencial variou entre 4363.48 e 6979.72 μm^2 , com o valor mais elevado registado no grupo administrado com a dose 175 mg/kg e o mais baixo referente ao grupo administrado com a dose 550 mg/Kg (Tabela 19). A análise estatística não revelou diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos administrados com as doses mais elevadas ($p > 0.05$). No caso dos grupos administrados com o hidrolato, a área média dos glomérulos situou-se entre 4107.14 e 5827.40 μm^2 , com o valor mais elevado registado no grupo controlo e o mais baixo registado no grupo administrado com a dose mais elevada. No entanto, as diferenças registadas não foram estatisticamente significativas ($p > 0.05$).

A área do espaço de Bowman para os grupos administrados com óleo essencial variou entre 1169.16 e 2304.34 μm^2 , com o valor mais elevado registado no grupo administrado com a dose mais elevada (2000 mg/Kg), enquanto o valor mais baixo corresponde ao grupo administrado com a dose 550 mg/kg (Tabela 19), não se observando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$). Nos grupos administrados com o hidrolato observou-se que o valor médio mais elevado da área do espaço de Bowman pertence aos indivíduos administrados com a dose mais elevada (2000 mg/Kg), enquanto o valor mais baixo corresponde aos indivíduos controlo. No entanto, as diferenças registadas entre os diferentes grupos não foram significativas ($p > 0.05$).

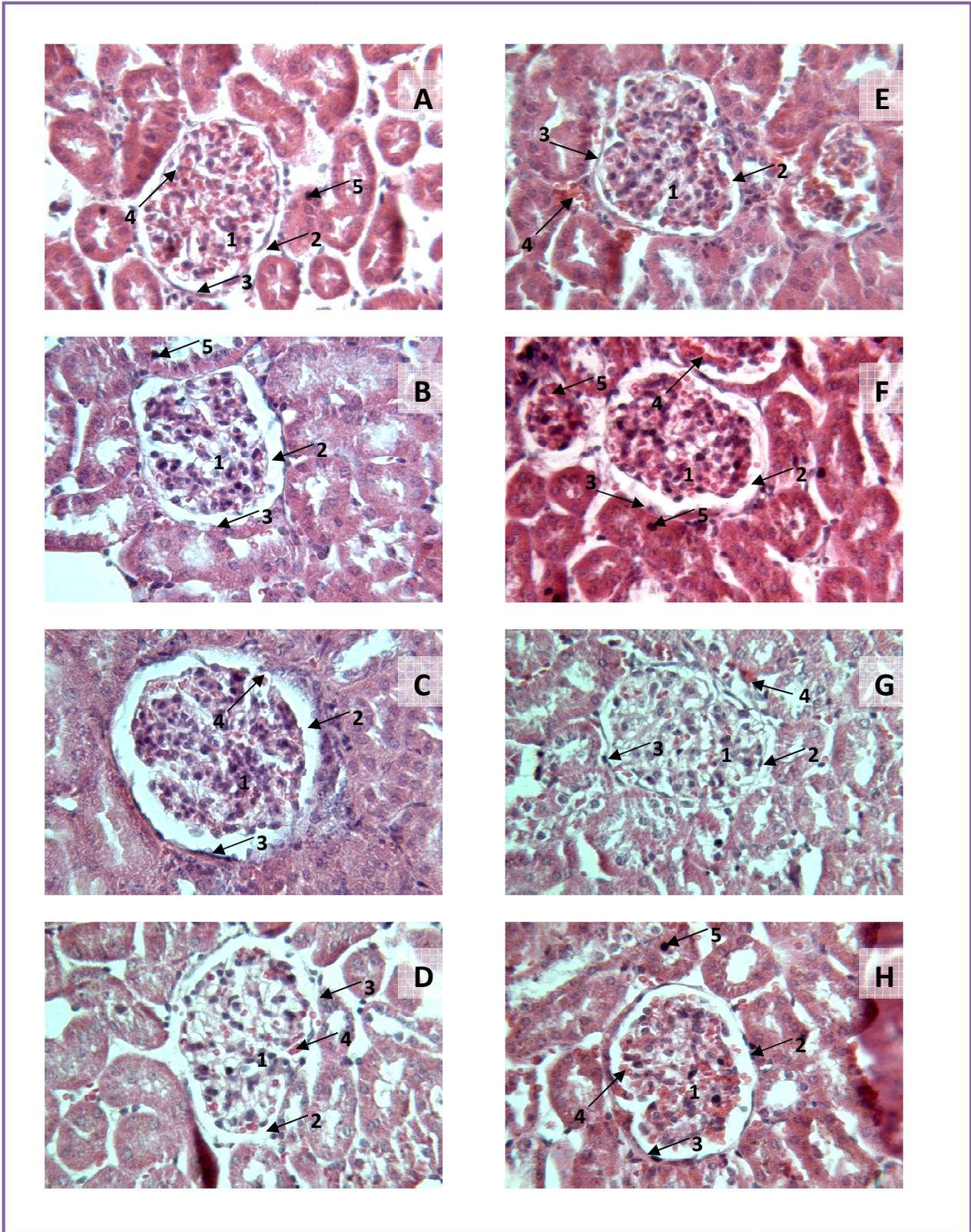


Figura 27 – Região cortical do rim, observando-se secções transversais dos túbulos proximais e de glomérulos

A-D: animais administrados com óleo essencial (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)

E-H: animais administrados com extrato hidrolato (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)

1- Glomérulo de Malpighi; 2- espaço de Bowman; 3- cápsula de Bowman; 4- células sanguíneas; 5- núcleos condensados. Ampliação:250X

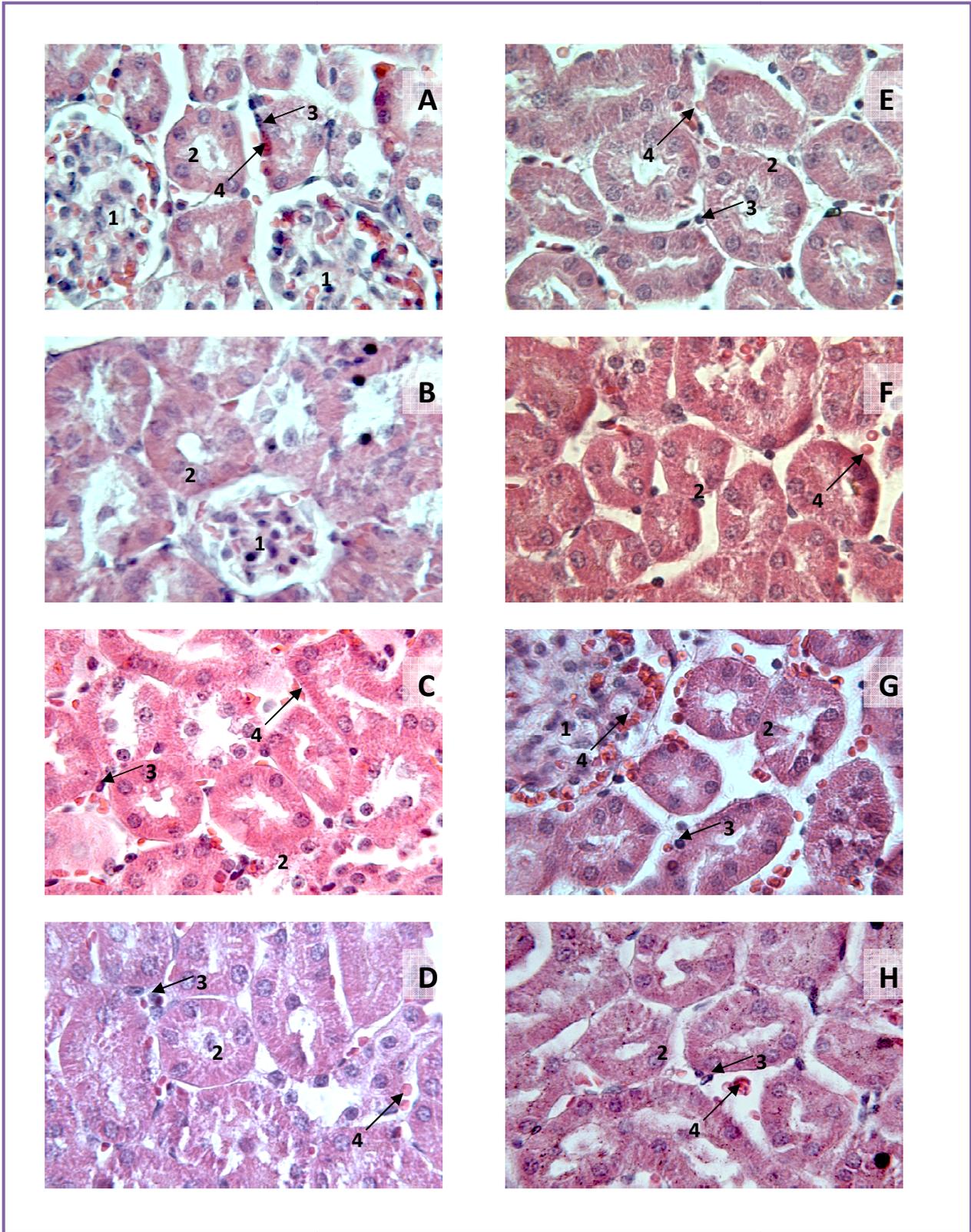


Figura 28 – Região medular do rim, onde se destacam os túbulos proximais sectionados transversalmente

A-D: animais administrados com óleo essencial (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 E-H: animais administrados com extrato hidrolato (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 1- Glomérulo de Malpighi; 2- túbulo; 3 - célula de kupffer; 4- células sanguíneas.
 Ampliação:400X

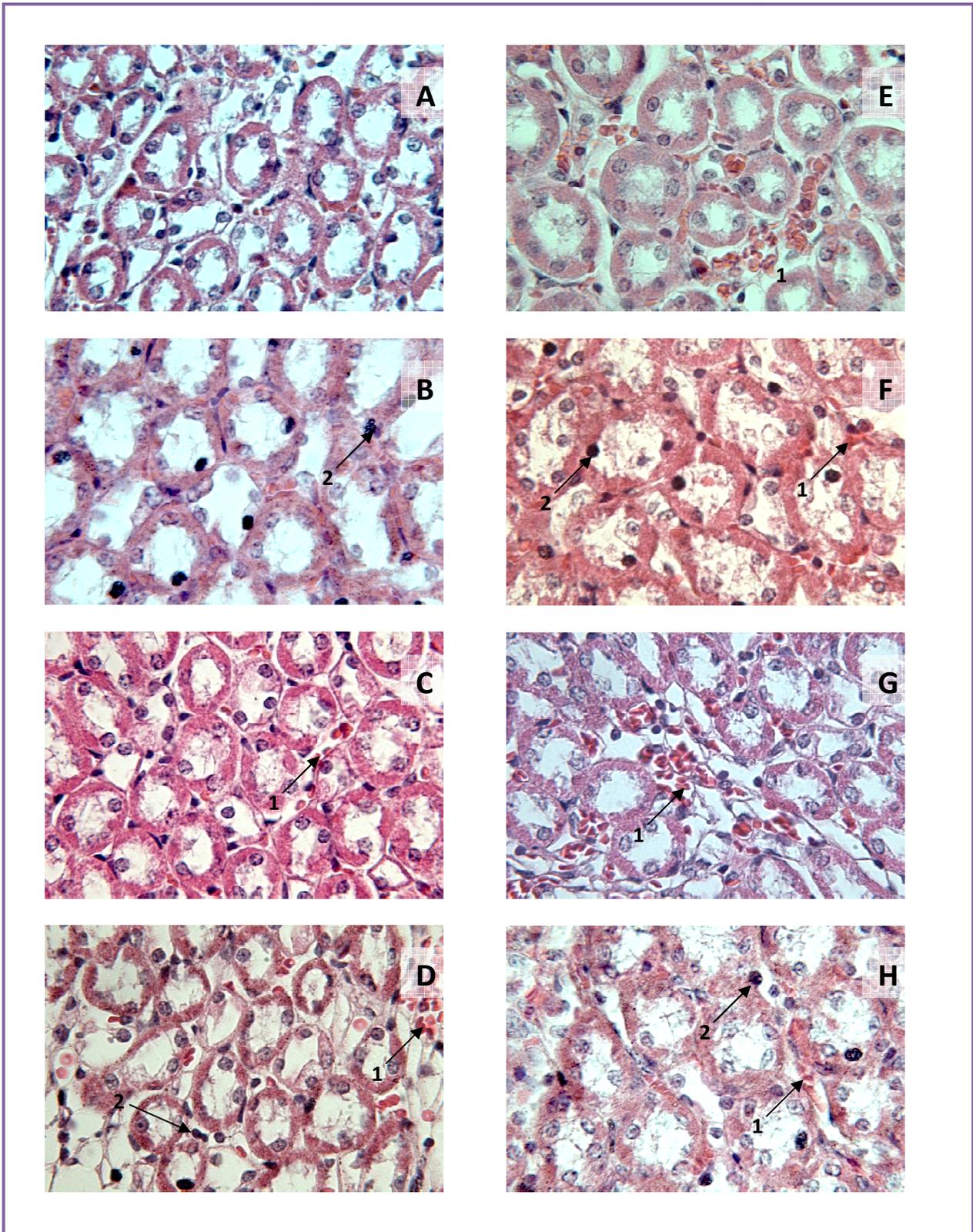


Figura 29 – Região medular do rim. Observam-se secções transversais da porção espessa da alça de Henle, cuja parede é constituída por epitélio cúbico simples

A-D: animais administrados com óleo essencial (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 E-H: animais administrados com extrato hidrolato (veículo, 175, 550 e 2000 mg/Kg, respetivamente)
 1- células sanguíneas; 2- núcleos condensados
 Ampliação: 400X

Tabela 19 - Valores da análise histomorfométrica do rim para o óleo e hidrolato da folha de *L. luisieri*

	Dose (mg/Kg)	Túbulos (μm)	Glomérulo (μm^2)	Espaço de Bowman (μm^2)
Óleo essencial	0	11.17 \pm 1.69 ^a	4912,52 \pm 686.10 ^e	1442,78 \pm 91.31 ^j
	175	12,74 \pm 1.84 ^b	6979,72 \pm 782.60 ^g	1680,93 \pm 174.59 ^j
	550	12.78 \pm 1.75 ^b	4363,48 \pm 424.07 ^{e,f}	1169,16 \pm 107.92 ^j
	2000	10,60 \pm 1.86 ^a	4707,29 \pm 426.42 ^f	2304,34 \pm 267.56 ^j
Hidrolato	0	13.63 \pm 2.33 ^c	5827,40 \pm 572.54 ^h	1352,09 \pm 152.59 ^k
	175	11.96 \pm 1.85 ^d	4868,66 \pm 451.38 ^{h,i}	1553,99 \pm 205.59 ^{k,l}
	550	12.22 \pm 1.46 ^d	5472,42 \pm 421.26 ⁱ	1437,29 \pm 178.89 ^{l,m}
	2000	12.37 \pm 1.81 ^d	4107,14 \pm 154.93 ^{h,i}	1742,78 \pm 191.20 ^m

Cada linha representa o valor médio dos replicados \pm desvio padrão. Para cada parâmetro, os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em suma, do conjunto das análises histológicas realizadas admite-se a hipótese da administração do óleo essencial de *L. luisieri* nas doses mais elevadas testadas (550 e 2000 mg/Kg) poder induzir um conjunto de alterações histopatológicas no fígado e no rim, as quais aparecem descritas em, e associadas a situações de toxicidade. Por outro lado, a administração dos hidrolatos nas doses mais elevadas testadas parece não ter efeitos tão injuriosos na estrutura do fígado e do rim em comparação com o óleo essencial.

4.7 Avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória

O óleo essencial e o hidrolato de *L. luisieri* apresentaram importantes valores de atividade analgésica pela prova de *Amour-Smith* (método do calor radiante), apesar dos valores serem inferiores aos valores apresentados pelo padrão morfina (10 mg/Kg) com 100% de atividade (Figura 30).

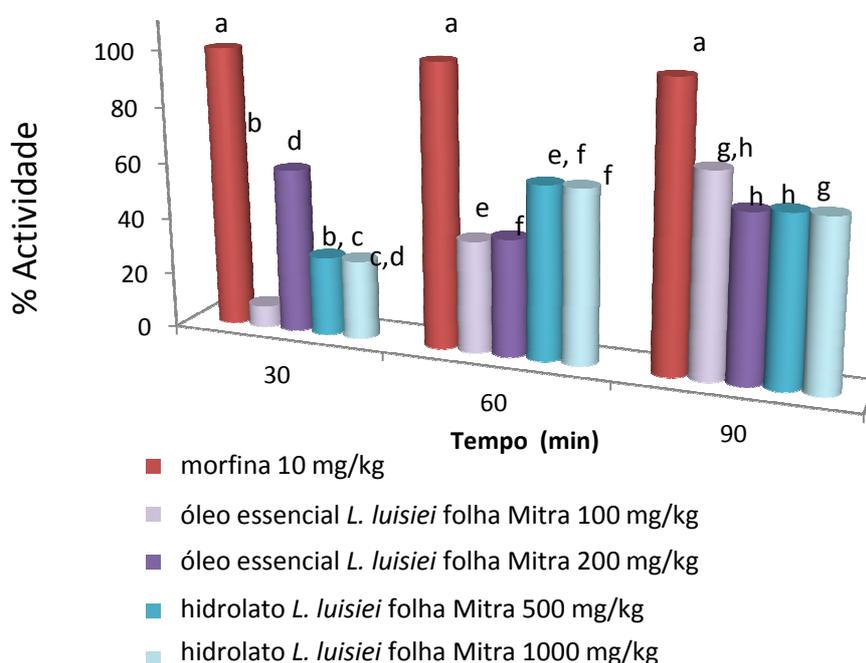


Figura 30 – Atividade analgésica para o óleo essencial e hidrolato das folhas de *L. luisieri*. Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados \pm desvio padrão. Para cada tempo, os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

O óleo essencial na dose 200 mg/Kg mostrou-se mais eficaz nos primeiros 30 min com valores de atividade superiores a 50%, enquanto na dose 100 mg/Kg, no mesmo período de tempo, a atividade foi inferior a 20%. Após 60 min, a atividade dos óleos apresenta valores próximos dos 40% para as duas doses testadas. Noventa minutos após a administração, o óleo essencial apresenta atividades superiores a 60% para a dose de 100 mg/Kg e valores ligeiramente inferiores para a dose de 200 mg/Kg. O grupo administrado com o óleo essencial na dose 100 mg/kg diferiu

significativamente ($p < 0.05$) do grupo administrado com a dose de 200 mg/kg nos três tempos avaliados. Nos grupos administrados com hidrolato, observou-se um aumento da atividade até aos 60 min, atingindo valores próximos dos 60% para as duas doses testadas, não se observando diferenças significativas entre a dose mais baixa e a dose mais elevada ($p > 0.05$). Aos 90 min, a atividade do hidrolato apresentava valores de atividade ligeiramente inferiores, no entanto os valores da % de atividade ainda eram superiores a 50%, observando-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre a dose mais baixa (500 mg/kg) e a dose mais elevada administrada (1000 mg/kg). Os dados sugerem, não haver diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as doses 100 mg/kg de óleo essencial e 500 mg/kg de hidrolato e entre as doses 200 mg/kg de óleo essencial e 1000 mg/kg de hidrolato. Os grupos administrados com os extrato apresentaram valores de atividade significativamente diferentes ($p < 0.05$) dos valores apresentados pelo grupo administrado com a morfina (padrão). Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados no Anexo 0 - Tabela 43 e Tabela 44.

Na bibliografia não se encontra estudos de atividade analgésica efetuados com *L. luisieri*, no entanto, um estudo realizado com óleos e extratos das folhas de *L. angustifolia* Mill. refere que extratos destas plantas apresentam atividade analgésica superior a 50% (óleo entre 83 e 90% e hidrolato entre 69 e 93%), sugerindo um fundamento racional para o uso tradicional das plantas do género *Lavandula* (Hajhashemi *et al.* 2003).

Na avaliação da atividade anti-inflamatória, observou-se que o óleo essencial e o hidrolato apresentaram valores de atividade entre os 50 e os 80%, enquanto a dexametasona 1 mg/Kg (padrão) apresentou valor de percentagem de atividade de 64% (Figura 31).

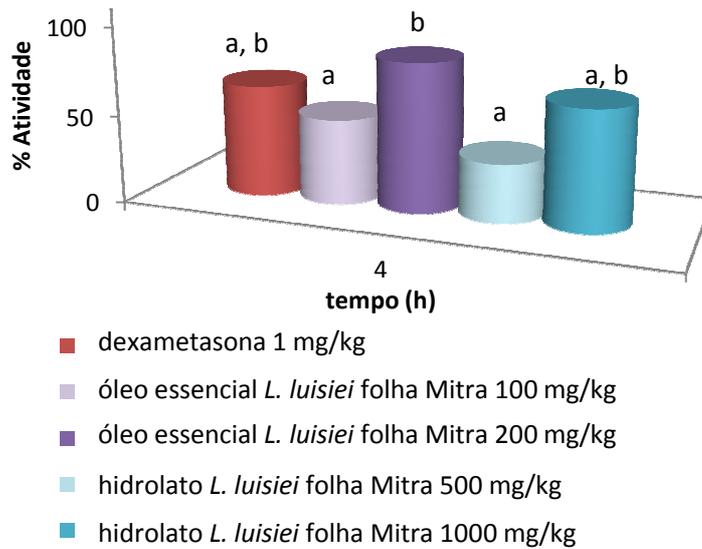


Figura 31 – Atividade anti-inflamatória para o óleo essencial e hidrolato das folhas de *L. luisieri*. Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas são significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Os grupos administrados com o óleo essencial apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) com atividade anti-inflamatória próxima dos 50% na dose mais baixa e superior a 80% na dose 200 mg/Kg.

O hidrolato apresentou valores de atividade superiores a 50% para as duas doses testadas (59% para a dose de 500 mg/Kg e 67% para a dose 1000 mg/Kg), no entanto as diferenças de atividade observadas para as duas doses não são significativas ($p > 0,05$).

Assim, temos que o óleo na concentração mais baixa e o hidrolato na concentração mais alta apresentaram valores de atividade próximos dos valores apresentados pelo padrão. A dose de 200 mg/Kg apresentou atividade muito superior a apresentada pelo padrão. No entanto, as diferenças observadas entre as diferentes doses dos dois extratos e o padrão não são significativas, sugerindo não haver diferenças significativas entre as entre os duas doses do óleo essencial e do hidrolato e o padrão ($p > 0,05$). Os resultados da análise de comparação múltipla de médias estão apresentados nos Anexo VII - Tabela 45 e Tabela 46.

Estes valores são superiores aos valores apresentados num estudo efetuado com uma espécie do género *Lavandula*, a *L. angustifolia* Mill., que apresenta valores de atividade de 48% para a dose de 200 mg/Kg de óleo essencial (Hajhashemi *et al.* 2003).

5 Conclusões e perspetivas futuras

A análise por GC-FID dos óleos essenciais revelou importantes diferenças na composição química dos óleos essenciais, quanto à diversidade e quanto à proporção dos seus constituintes, apresentando maioritariamente monoterpenos oxigenados (>50%), monoterpenos hidrocarbonados (6-23%) e sesquiterpenos hidrocarbonado (0.25-8%). Os óleos das espigas de *L. luisieri* e *L. viridis* apresentaram, também, na sua composição pequenas percentagens de compostos pertencentes a outros grupos, como o acetato de cinamilo (4.42 e 2.27%, respetivamente).

Os hidrolatos apresentaram na sua composição os compostos bioativos catequinas, fenóis simples, flavonas, flavonoides, saponinas, taninos catéquicos, triterpenóides, xantonas, e oses e polioses, variando em proporção consoante a espécie e a parte da planta à qual se procedeu à extração. Os conteúdos em compostos fenólicos e flavonoides totais foram avaliados para os hidrolatos das folhas e das espigas de *L. luisieri* e *L. viridis*, observando-se que os extratos de *L. viridis*, particularmente o hidrolatos das folhas, são mais ricos nestes compostos bioativos do que os extratos de *L. luisieri* (folha e espiga).

Os óleos essenciais e os hidrolatos testados apresentaram atividade antioxidante pelos dois métodos estudados, observando-se maior atividade pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, no qual os óleos apresentaram valores de IC₅₀ próximos do valor de IC₅₀ do ácido ascórbico. Observou-se, também, que os hidrolatos, devido aos seus teores em fenóis e flavonoides, apresentaram maior atividade pelos dois métodos do que os óleos essenciais.

Os óleos essenciais das folhas de *L. luisieri* e de *L. viridis* apresentaram citotoxicidade face a *Artemia salina*, com valores de CL₅₀ de 109.80 e de 85.42 μ g/mL,

respetivamente. Os hidrolatos não apresentaram citotoxicidade, com valores de CL_{50} muito superiores a 3500 $\mu\text{g/mL}$.

Os óleos essenciais da folha e da espiga floral de *L. luisieri* e da folha de *L. viridis* apresentaram atividade antibacteriana, face às estirpes *Gram-* de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa* e *Gram+* de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*. Estes óleos também mostraram elevada atividade antifúngica, face às estirpes de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *G. klebahnii*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. orizae*, *F. oxysporum* e *Penicillium* sp.. Os hidrolatos não apresentaram atividade antimicrobiana face às estirpes bacterianas e fúngicas estudadas, observando-se um aumento da proliferação em torno do disco.

Na avaliação da toxicidade aguda em ratos *Swiss* do óleo essencial e hidrolato da folha de *L. luisieri*, com análise histológica de órgãos envolvidos no processo de desintoxicação, observou-se valores de DL_{50} muito superiores a 2000 mg/kg, não se observando alterações severas ao nível do fígado e do rim após a administração oral dos extratos, nas doses estudadas.

Além das propriedades biológicas referidas, os óleos essenciais de *L. luisieri* (folha) apresentaram importantes propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, tendo demonstrado atividade analgésica com valores superiores a 50%, nas duas doses testadas, aos 90 min, após a administração, e grande atividade anti-inflamatória (200 mg/kg).

No sentido de melhor caracterizar as propriedades biológicas dos óleos essenciais destas espécies, pretende-se prosseguir os estudos tendo em vista a:

- Avaliar as propriedades biológicas dos óleos essenciais e hidrolatos de *L. pedunculata*;
- Caracterizar os óleos e hidrolatos por técnicas de espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS);
- Estudar os extratos orgânicos, biológica e quimicamente, de modo a avaliar a presença/ausência de atividade e identificar os princípios ativos responsáveis pelas mesmas;

- Realizar métodos bioautográficos para estimar quais os constituintes do óleo essencial responsáveis pela inibição do crescimento microbiano;
- Determinar com maior precisão o valor de CMI dos óleos essenciais para cada um dos microrganismos estudados, utilizando concentrações intermédias de óleo;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos selecionados por difusão em meio sólido e determinação de CMI para as bactérias e fungos testados;
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos e extratos recorrendo também a outros métodos, nomeadamente aos métodos do poder redutor do complexo Fe³⁺ e ácido tio barbitúrico (TBAR);
- Avaliar a toxicidade dos óleos essenciais e/ou extratos, em linhas celulares, e considerar a possibilidade de os integrar em fórmulas farmacêuticas ou como aditivos na indústria alimentar devido às atividades antimicrobianas e antioxidantes apresentadas e ainda pelas propriedades aromatizantes que estes óleos apresentam;
- Avaliar a toxicidade subaguda/crónica, com determinação dos níveis enzimáticos de ALT e AST, GGT, ALP, glutathione-transferase, glutathione-reductase, CAT, SOD, entre outras.
- Avaliar o mecanismo bioquímico associado à inibição dos processos inflamatórios pelas ciclo-oxigenases e a sua potencial ação anti-tumoral pela inibição da síntese de prostaglandinas pela via COX-2.
- Desenvolver modelos computacionais baseados em inteligência artificial, que permitam correlacionar as atividades biológicas, a composição e proporção dos constituintes presentes nos óleos essenciais com os géneros e espécies das plantas em estudo, tendo também em conta outras variáveis como a época do ano e as condições ambientais.

6 Referências bibliográficas

- Aharoni, A. and G. Galili (2011). "Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface." Current Opinion in Biotechnology **22**(2): 239-244.
- Albano, S. M. and M. G. Miguel (2011). "Biological activities of extracts of plants grown in Portugal." Industrial Crops and Products **33**: 338-343.
- Almeida, R. N., D. S. Navarro and J. M. Barbosa-Filho (2001). "Plants with central analgesic activity." Phytomedicine **8**(4): 310-322.
- Anyasor, G. N., K. O. Ogunwenmo, O. A. Oyelana and B. E. Akpofunure (2010). "Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl. (*Costaceae*)." African Journal of Biotechnology **9**(31): 4880-4884.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar (2008). "Biological effects of essential oils – A review." Food and Chemical Toxicology **46**: 446–475.
- Baldovini, N., S. Lavoine-Hanneguelle, G. Ferrando, G. Dusart and L. Lizzani-Cuvelier (2005). "Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*." Phytochemistry **66**: 1651–1655.
- Bastos, M. L. A., M. R. F. Lima, L. M. Conserva, V. S. Andrade, E. M. Rocha and R. P. Lemos (2009). "Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (*Bignoniaceae*) extracts and their main constituents." Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials **8**(16): 1-6.
- Benchaar, C., S. Calsamiglia, A.V. Chaves, G.R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister and K. A. Beauchemin (2008). "A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production." Animal Feed Science and Technology **145**: 209–228.
- Bernardo-Gil, M. G., M. A. Ribeiro and M. M. Esquível (2002). "Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluídos supercríticos." Boletim de Biotecnologia-Industria Alimentar: 14-21.
- Booth, I. R. (1985). "Regulation of cytoplasmatic pH in bacteria." Microbiological Reviews **49**: 359-378.
- Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier (2001). "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective." Plant Science **161**: 839–851.
- Bradley, B. F., N. J. Starkey, S. L. Brown and R. W. Lea (2007). "Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze." Journal of Ethnopharmacology **111**(3): 517-525.
- Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." International Journal of Food Microbiology **94**: 223– 253.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos and A. Ferret (2007). "Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation." Journal of Dairy Science **90**(6): 2580-2595.
- Calvello, R., M. A. Panaro, M. L. Carbone, A. Cianciulli, M. G. Perrone, P. Vitale, P. Malerba and A. Scilimati (2012). "Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells." Pharmacological Research **65**: 137–148.

- Camejo-Rodrigues, J., L. Ascensão, M. À. Bonet and J. Vallès (2003). "An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal)." Journal of Ethnopharmacology **89**: 199-209.
- Castroviejo, S., (Coordinador general) (2010). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares,12. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Cathcart, M.-C., K. J. O'Byrne, J. V. Reynolds, J. O'Sullivan and G. P. Pidgeon (2012). "COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: Novel targets for prevention and intervention." Biochimica et Biophysica Acta **1825**: 49-63.
- Cavanagh, H. M. A. and J. M. Wilkinson (2002). "Biological Activities of Lavender Essential Oil." Phytotherapy Research **16**: 301-308.
- Chang, J. (2000). "Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements?" Biochemical Pharmacology **59**: 211-219.
- Chiang, H.-M., H.-H. Chiu, Y.-M. Lai, C.-Y. Chen and H.-L. Chiang (2010). "Carbonyl species characteristics during the evaporation of essential oils." Atmospheric Environment **44**: 2240-2247.
- Chiu, H.-H., H.-M. Chiang, C.-C. Lo, C.-Y. Chen and H.-L. Chiang (2009). "Constituents of volatile organic compounds of evaporating essential oil." Atmospheric Environment **43**: 5743-5749.
- Conner, D. E. and L. R. Beuchat (1984). "Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeasts." Journal of Food Science **49**(2): 429-434.
- Costa, P., C. Grosso, S. Gonçalves, P. B. Andrade, P. Valentão, M. G. Bernardo-Gil and A. Romano (2012). "Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér." Food Chemistry **135**: 112-121.
- Cox, S. D., C. M. Mann, J. L. Markham, H. C. Bell, J. E. Gustafson, J. R. Warmington and S. G. Wyllie (2000). "The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)." Journal of Applied Microbiology **88**: 170-175.
- Cunha, A. P. d. (2006). Farmacognosia e Fitoquímica, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A. P. d., J. A. Ribeiro and O. R. Roque (2007). Plantas Aromáticas em Portugal: Caracterização e Utilizações. Lisboa, Portugal, Fundação Calouste Glubenkian.
- Delgado, F. (2010). Conservação e valorização de *Asphodelus bento-rainhae* P.Silva e *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas -Martínez da Beira Interior. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, Portugal, Universidade Técnica de Lisboa. **Doutoramento**: 163.
- Deng, J.-S., Y.-C. Chang, C.-L. Wen, J.-C. Liao, W.-C. Hou, Sakae Amagaya, S.-S. Huang and G.-J. Huang (2012). "Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Vitis thunbergii* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats through anti-oxidative activities." Journal of Ethnopharmacology.
- Descalzo, A. M. and A. M. Sancho (2008). "A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina." Meat Science **79**: 423-436.
- Directiva2004/24/EC (2004). "DIRECTIVE 2004/24/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL." Official Journal of the European Union.
- Dixon, R. A. (2005). "Natural products and plant disease resistance." Nature **411**: 843-847.

- Duarte-Almeida, Joaquim Santos, Ricardo Genovese, Maria Inês Lajolo and Franco (2006). "Avaliação da Actividade Antioxidante Utilizando o Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico e o Método de Sequestro de Radicais DPPH." Ciência e Tecnologia Alimentar **26**: 446-452.
- Ebrahimabadi, A. H., Z. Djafari-Bidgoli, A. Mazoochi, F. J. Kashi and H. Batooli (2010). "Essential oils composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodum* Boiss." Food Control **21**: 1173-1178.
- EMA. (1995). "EMA-European Medicines Agency - www.ema.europa.eu/."
- EMA/HMPC/611604/2009 (2009). Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC).
- Ferreira, W. F. C. and J. C. F. Sousa (1998). Microbiologia, Lidel – Edições Técnicas.
- Franco, J. d. A. (1984). Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Lisboa Editora, Portugal.
- Gajula, D., M. Verghese, J. Boateng, L. T. Walker, L. Shackelford, S. R. Mentreddy and S. Cedric (2009). "Determination of Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant and Chemopreventive Potential of Basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.)." International Journal of Cancer Research **5**(4): 130-143.
- Ghasemzadeh, A. and N. Ghasemzadeh (2011). "Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human." Journal of Medicinal Plants Research **5**(31): 6697-6703.
- Gilles, M., J. Zhao, M. An and S. Agboola (2010). "Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species." Food Chemistry **119**: 731-737.
- Gonçalves, S., H. Serra, J. M. F. Nogueira, R. Almeida, L. Custódio and A. Romano (2008). "Headspace-SPME of *in vitro* shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*." Biologia Plantarum **52**(1): 133-136.
- González-Coloma, A., F. Delgado, J. M. Rodilla, L. Silva, J. Sanz and J. Burillo (2011). "Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations." Biochemical Systematics and Ecology **39**: 1-8.
- Gulluce, M., F. Sahin, M. Sokmen, H. Ozer, D. Daferera, A. Sokmen, M. Polissiou, A. Adiguzel and H. Ozkan (2007). "Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*." Food Chemistry **103**: 1449-1456.
- Hajhashemi, V., A. Ghannadi and B. Sharif (2003). "Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill." Journal of Ethnopharmacology **89**: 67-71.
- Hanamanthagouda, M. S., S. B. Kakkalameeli, P. M. Naik, P. Nagella, H. R. Seetharamareddy and H. N. Murthy (2010). "Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities." Food Chemistry **118**: 836-839.
- Hartmann, T. (2007). "From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism." Phytochemistry **68**: 2831-2846.
- Hashem, M., A. M. Moharam, A. A. Zaid and F. E. M. Saleh (2010). "Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp." Crop Protection **29**: 1111e1117.

- Hau, J. and S. J. Schapiro (2003). Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Animal Models. New York, CRC Press; 2 edition (October 28, 2002).
- Hossain, S., G. Kader, F. Nikkon and T. Yeasmin (2012). "Cytotoxicity of the rhizome of medicinal plants." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine: 125-127.
- Huanga, P., H. Pelicano and D. Carney (2004). "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications." Drug Resistance Updates **7**: 97–110.
- Infarmed (2005). Farmacopeia Portuguesa VIII. Lisboa, Portugal, Infarmed, ed.
- Jeon, J., K. A. Park, H. Lee, S. Shin, T. Zhang, M. Won, H. K. Yoon, M. K. Choi, H. G. Kim, C. G. Son, J. H. Hong and G. M. Hur (2011). "Water extract of *Cynanchi atrati Radix* regulates inflammation and apoptotic cell death through suppression of IKK-mediated NF-kB signaling." Journal of Ethnopharmacology **137**: 626- 634.
- Kirsi-Marja Oksman-Caldentey, D. I. (20004). "Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites." TRENDS in Plant Science **9**
- Knobloch, K., A. Pauli, N. Iberl, N. Weigand and H. M. Weis (1989). "Antibacterial and antifungal properties of essential oil components." Journal of Essential Oil Research **1**: 119-128.
- Krishnaiah, D., R. Sarbatly and R. Nithyanandam (2010). "A review of the antioxidant potential of medicinal plant species." Food and Bioproducts Processing: doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008.
- Kumar, N., S. Drabu and S. C. Mondal (2011). "NSAID's and selectively COX-2 inhibitors as potential chemoprotective agents against cancer." Arabian Journal of Chemistry.
- Lambert, P. A. (2005). "Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites." Advanced Drug Delivery Reviews **57**: 1471– 1485.
- Lavoine-Hanneguella, S. and H. Casabianca (2004). "New Compounds from the Essential Oil and Absolute of *Lavandula luisieri* L." Journal of Essential Oil Research **16**: 445-448.
- Lee, H. J., J.-Y. Cho and J.-H. Moon (2012). "Chemical conversions of salvianolic acid B by decoction in aqueous solution." Fitoterapia **83**: 1196-1204.
- Lee, J., J. Lee, H. Chung and P.-S. Chang (2007). "Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)." Food Chemistry **103**: 662–669.
- Li, C.-J., J.-K. Chang, G.-J. Wang and M.-L. Ho (2011). "Constitutively expressed COX-2 in osteoblasts positively regulates Akt signal transduction via suppression of PTEN activity." Bone **48**: 286-297.
- Liu, X., M. Dong, X. Chen, M. Jiang, X. Lv and G. Yan (2007). "Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*." Food Chemistry **105**: 548-554.
- Lobo, A. P., Y. D. García, J. M. Sánchez, R. R. Madrera and B. S. Valles (2009). "Phenolic and antioxidant composition of cider." Journal of Food Composition and Analysis **22**: 644-648.
- Maciel, M., A. Pinto and V.F. Veiga-Jr (2002). "Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares." Quimica Nova **25**(3): 429-438.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl and D. P. Clark (2010). Brock Biology of Microorganisms (13th Edition). Southern Illinois University, Benjamin Cummings, 2010.

- Maimoona, A., I. Naeem, Z. Saddiqe and K. Jameel (2011). "A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract." Journal of Ethnopharmacology **133**: 261-277.
- Martins, M. R., M. T. Tinoco, A. S. Almeida and J. Cruz-Morais (2012). "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from portuguese flora." Journal of Pharmacognosy **3**(1): 39-44.
- Mata, A. T., C. Proença, A. R. Ferreira, M. L. M. Serralheiro, J. M. F. Nogueira and M. E. M. Araújo (2007). "Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices." Food Chemistry **103**: 778–786.
- Matkowski, A. and M. Piotrowska (2006). "Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae." Fitoterapia **77**: 346-353.
- Matos, F. J. A. (1997). Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC.
- McCurdy, C. R. and S. S. Scully (2005). "Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals)." Life Sciences **78**: 476 - 484.
- Mendes, S. S., R. R. Bomfim, H. C. R. Jesus, P. B. Alves, A. F. Blank, C. S. Estevam, A. R. Antonioli and S. M. Thomazzi (2010). "Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves." Journal of Ethnopharmacology **129**: 391-397.
- Miguel, M. G., F. Matos, J. Duarte, F. Venancio, C. Moiteiro, A. I. D. Correia, A. C. Figueiredo, J. G. Barróse and L. G. Pedro (2009). "Antioxidant Capacity of the Essential Oils From *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* Grown in Algarve (Portugal)." Journal of Essential Oil Research **21**: 327-337.
- Moon, J.-K. and T. Shibamoto (2009). "Antioxidant Assays for Plant and Food Components." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**: 1655-1666.
- Moyo, M., A. R. Ndhlala, J. F. Finnie and J. V. Staden (2010). "Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts." Food Chemistry **123**: 69-76.
- Murray, P. R. and K. S. Rosenthal (2010). Microbiologia Médica - 6ª Ed., ELSEVIER / MEDICINA NACIONAIS.
- Murthy, H. N., M. S. Hanamanthagouda, S. B. Kakkalameli, P. M. Naik, P. Nagella and H. R. Seetharamareddy (2010). "Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities." Food Chemistry **118**: 836-839.
- Nagegowda, D. A. (2010). "Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation." FEBS Letters **584**: 2965–2973.
- Naghetini, C. C. (2006). "Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma." Faculdade de Farmácia da UFMG Belo Horizonte, MG: 61.
- NCCLS (2003). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- NCCLS (2008). "Comité Nacional para a Padronização dos Laboratórios de Análises Clínicas."

- NCCLS (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility. Tests for Bacteria Isolated From Animals. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- NCCLS (2009). Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Nogueira, J. M. F. and A. Romano (2002). "Essential Oils from Micropropagated Plants of *Lavandula viridis*." Phytochemical Analysis **13**: 4-7.
- Nordberg, J. and E. S. J. Arnér (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiolredoxin system." Free Radical Biology & Medicine **31**: 1287–1312.
- OECD (2001). "Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method." OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS **423**.
- OECD (2001). "Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure." OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS **420**.
- OECD (2001). "Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure." OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS **425**.
- Oke, F., B. Aslim, S. Ozturk and S. Altundag (2009). "Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten." Food Chemistry **112**: 874–879.
- Oksman-Caldentey, K.-M. and D. Inzé (2004). "Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites." Trends in Plant Science **9**: 8, doi:10.1016/j.tplants.2004.07.006.
- Oliveira, A. C. d., I. B. Valentim, M. O. F. Goulart, C. A. Silva, E. J. H. Bechara and M. T. S. Trevisan (2009). "Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes." Química Nova **32**(3).
- Peana, A. T., P. S. D'Aquila, F. Panin, G. Serra, P. Pippia and M. D. L. Moretti (2002). "Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils." Phytomedicine **9**: 721-726.
- Pelczar, M. J., E. C. S. Chan and N. R. Krieg (1993). Microbiology: Concepts and Applications, McGraw-Hill, Inc., United States of America.
- Podsedek, A. (2007). "Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review." LWT - Food Science and Technology **40**: 1-11.
- Porto, C. D., D. Decorti and I. Kikic (2009). "Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods." Food Chemistry **112**(4): 1072-1078.
- Prats, M. (2007). "Farmacia profesional " Elsevier **21**(Núm. 05).
- Prista, L. N., A. C. Alves and R. M. R. Morgado (1991). Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica. Lisboa, Portugal.
- Rahayu, D. S., D. K. M.Si and E. F. M.Si. (2009). Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). Seminar Tugas Akhir. J. K. F. UNDIP. Semarang.
- Ratnam, V., M. N. V. R. Kumar, D. D. Ankola, V. Bhardwaj and D. K. Sahana (2006). "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective." Journal of Controlled Release **113**: 189–207.

- Rattan, R. S. (2010). "Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin." Crop Protection **29**: 913-920.
- Ríos, J.-L. (2010). "Effects of triterpenes on the immune system." Journal of Ethnopharmacology **128**: 1-14.
- Ríos, J. L. and M. C. Recio (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." Journal of Ethnopharmacology **100**: 80–84.
- Rodríguez, A., R. Batlle and C. Nerín (2007). "The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II." Progress in Organic Coatings **60**: 33-38.
- Roginsky, V. and E. A. Lissi (2005). "Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food." Food Chemistry **92**: 235–254.
- Roura, E. and A. Brenes (2010). "Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action." Animal Feed Science and Technology **158**(1-14).
- Russo, M., C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto and G. L. Russo (2012). "The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies." Biochemical Pharmacology **83**: 6-15.
- Sanz, J., A. C. Soria and M. C. García-Vallejo (2004). "Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1024**: 139–146.
- Shaghghi, M., J. L. Manzoori and A. Jouyban (2008). "Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method." Food Chemistry **108**: 695-701.
- Sharififar, F., M. H. Moshafi, G. D.-. Nudehe, A. Ameri, F. Alishahi and A. Pourhemati (2009). "Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants." Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences **22**(.3): 317-322.
- Sikkema, J., J. A. M. De Bont and B. Poolman (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." Microbiology Reviews **59**: 201-222.
- Ssegawa, P. and J. M. Kasenene (2007). "Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda." Journal of Ethnopharmacology **113**: 521-540.
- Stenberg, C., M. Svensson and M. Johansson (2005). "A study of the drying of linseed oils with different fatty acid patterns using RTIR-spectroscopy and chemiluminescence (CL)." Industrial Crops and Products **21**: 263-272.
- Suhaj, M. (2006). "Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review." Journal of Food Composition and Analysis **19**: 531–537.
- Suresh, V., V. Sruthi, B. Padmaja and V. V. Ash (2011). "In vitro anti-inflammatory and anti-cancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb." Journal of Ethnopharmacology **134**: 872-877.
- Taiz, L. and E. Zeiger (2002). Fisiologia Vegetal.
- Tepe, B., D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen and M. Polissiou (2005). "Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*)." Food Chemistry **90**: 333-340.

- Tepe, B., D. Daferera, A.-S. Tepe, M. Polissiou and A. Sokmen (2007). "Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey." Food Chemistry **103**: 1358–1364.
- Tepe, B., M. Sokmen, H. A. Akpulat and A. Sokmen (2005). "*In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey." Food Chemistry **92**: 89–92.
- Upton, T. and S. Andrews (2002). The taxonomy of the genus *Lavandula* L. Londres e Nova Iorque., Taylor and Francis.
- Upton, T. M., R. H. J. Grayer, J. R. Greenham, C. A. Williams, F. Al-Ghamdi and F.-H. Chen (2000). "Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*." Biochemical Systematics and Ecology **28**: 991-1007.
- Upton, T. M., R. J. Grayer, J. R. Greenham!, C. A. Williams, F. Al-Ghamdi and F.-H. Chen (2000). "Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*." Biochemical Systematics and Ecology **28**: 991-1007.
- Utar, Z., M. I. A. Majid, M. I. Adenan, M. F. A. Jamil and T. M. Lan (2011). "Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production induced by lipopolysaccharide in RAW264.7 macrophage cells." Journal of Ethnopharmacology **136**: 75-82.
- Venkataramanan, R., B. Komoroski and S. Strom (2006). "In vitro and in vivo assessment of herb drug interactions." Life Sciences **78**: 2105-2115.
- Vogel, H. G. and Vogel (2002). Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Weerakkody, N. S., N. Caffin, M. S. Turner and G. A. Dykes (2010). "*In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria." Food Control **21**: 1408-1414.
- White, J. B., J. Beckford, S. Yadegarynia, N. Ngo, T. Lialitska and M. d'Alarcao (2012). "Some natural flavonoids are competitive inhibitors of caspase-1, -3, and -7 despite their cellular toxicity." Food Chemistry **131**: 1453-1459.
- Zhao, J., M. Gilles, M. An and S. Agboola (2010). "Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species." Food Chemistry **119**: 731–737.
- Zuzarte, M., M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro, J. Canhoto, L. Vale-Silva, M. J. Silva, E. Pinto and L. Salgueiro (2011). "Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér." Journal of Medical Microbiology **60**: 612–618.
- Zuzarte, M., M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro, A. M. Dinis, J. M. Canhoto and L. R. Salgueiro (2009). "Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav." Chemistry & Biodiversity **6**.
- Zuzarte, M., M. J. Gonçalves, M. T. Cruz, C. Cavaleiro, J. Canhoto, S. Vaz, E. Pinto and L. Salgueiro (2012). "*Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs." Food Chemistry **135**: 1505-1510.
- Zuzarte, M. R., A. M. Dinis, C. Cavaleiro, L. R. Salgueiro and J. M. Canhoto (2010). "Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae)." Industrial Crops and Products **32**(3): 580-587.

Anexos

I. Caraterização química dos óleos essenciais

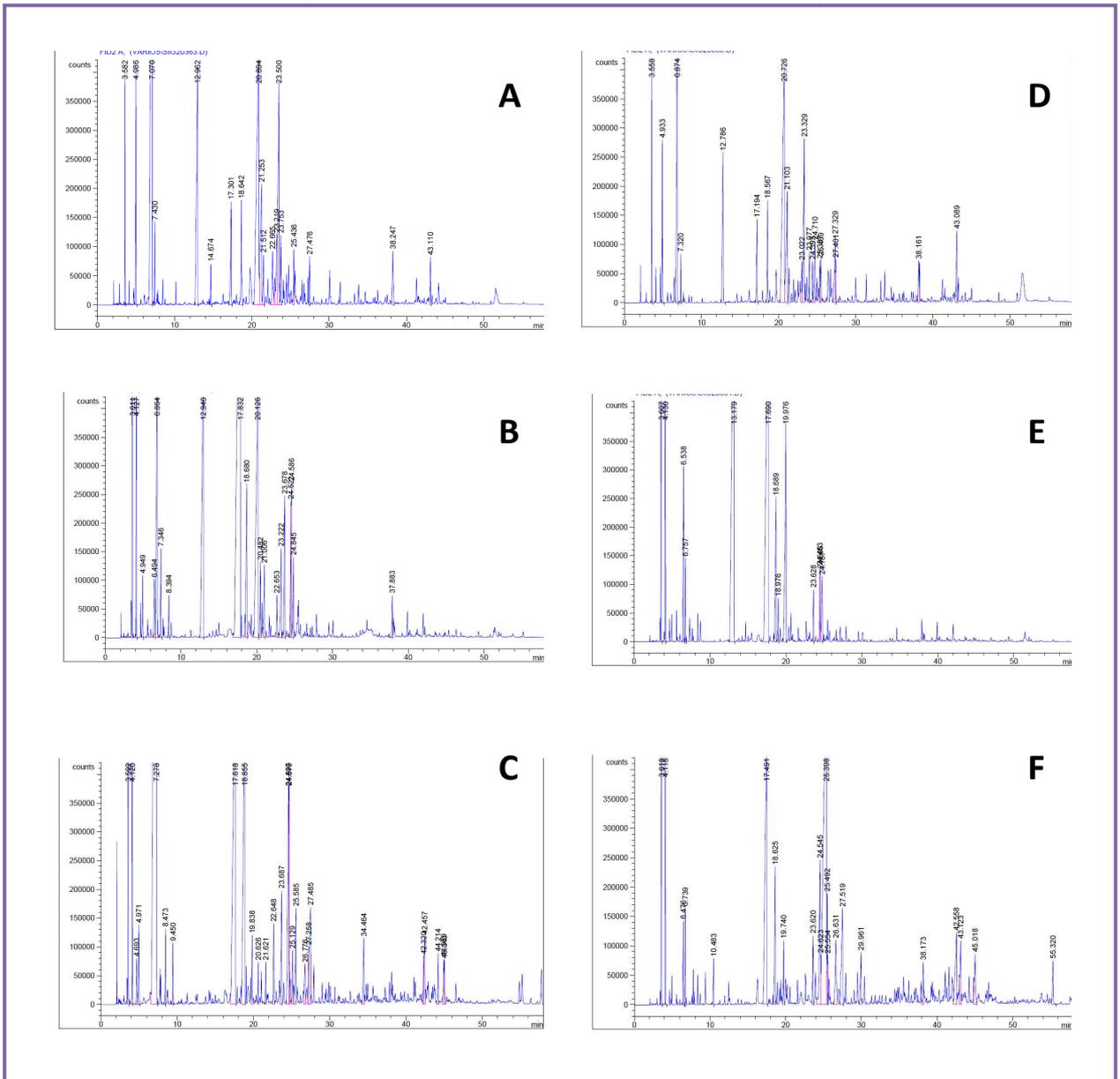


Figura 32- Cromatogramas tipo dos óleos essenciais
A-C – Folhas (*L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L.viridis*, respetivamente); D-F – Espigas (*L. luisieri*, *L. pedunculata* e *L.viridis*, respetivamente)

II. Caraterização dos extratos de hidrodestilação

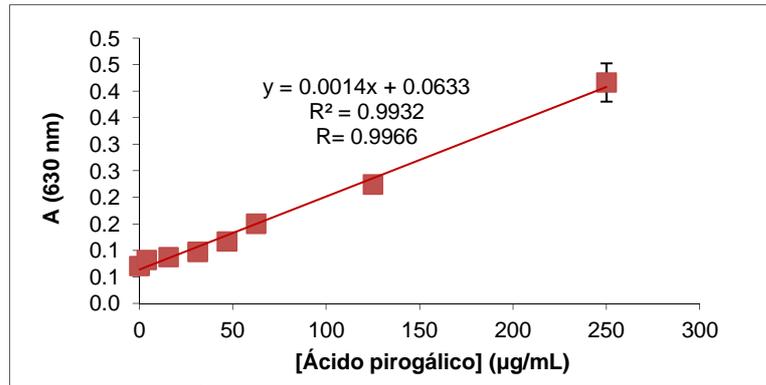


Figura 33 - Curva de calibração obtida para o padrão ácido pirogálico, para quantificação de fenóis totais.

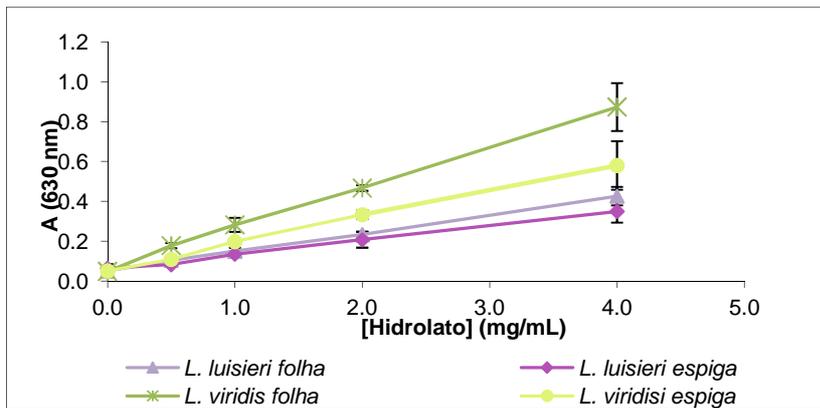


Figura 34 - Perfil da quantificação de fenóis totais nos hidrolatos método de *Folin-Ciocalteu*.

Tabela 20 - Análise de variância ANOVA para o método de *Folin-Ciocalteu*

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
C_0.5	Between Groups	11966.677	3	3988.892	86.689	0.000
	Within Groups	552.168	12	46.014		
	Total	12518.846	15			
C_1.0	Between Groups	23342.698	3	7780.899	86.846	0.000
	Within Groups	1075.128	12	89.594		
	Total	24417.825	15			
C_2.0	Between Groups	78163.361	3	26054.454	209.989	0.000
	Within Groups	1488.903	12	124.075		
	Total	79652.264	15			

Tabela 21 - Teste de Tukey para o método de *Folin-Ciocalteu* - Comparações múltiplas de médias

C_0.5

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
<i>L. luisieri</i> espiga	4	10.3214		
<i>L. luisieri</i> folha	4		29.2500	
<i>L. viridis</i> espiga	4		32.4643	
<i>L. viridis</i> folha	4			84.0714
Sig.		1.000	0.906	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

C_1.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
<i>L. luisieri</i> espiga	4	57.2857		
<i>L. luisieri</i> folha	4	61.7500		
<i>L. viridis</i> espiga	4		96.0357	
<i>L. viridis</i> folha	4			152.8214
Sig.		0.907	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

C_2.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
<i>L. luisieri</i> espiga	4	114.9643		
<i>L. luisieri</i> folha	4	121.2143		
<i>L. viridis</i> espiga	4		192.4643	
<i>L. viridis</i> folha	4			288.1786
Sig.		0.856	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

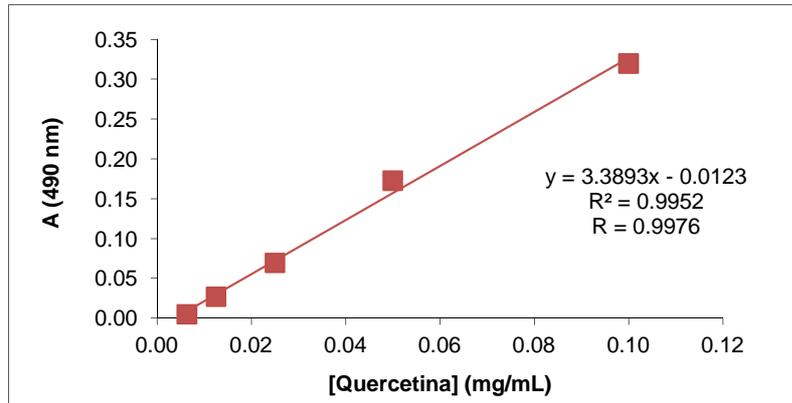


Figura 35 - Curva de calibração obtida para o padrão quercetina, para a quantificação de flavonoides totais.

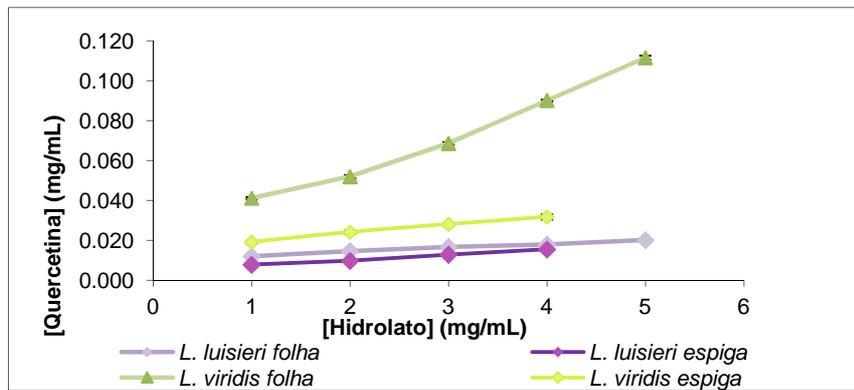


Figura 36 – Perfil da quantificação dos flavonoides totais para os hidrolatos

Tabela 22 - Análise de variância ANOVA para o método de quantificação de flavonoides

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
C_0.5	Between Groups	0.004	3	0.001	919.393	0.000
	Within Groups	0.000	8	0.000		
	Total	0.004	11			
C_1.0	Between Groups	0.008	3	0.003	1371.486	0.000
	Within Groups	0.000	8	0.000		
	Total	0.008	11			
C_2.0	Between Groups	0.011	3	0.004	4639.611	0.000
	Within Groups	0.000	8	0.000		
	Total	0.011	11			

Tabela 23 - Teste de Tukey para o método de quantificação de flavonoides

C_0.5

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>L. luisieri</i> espiga	3	0.0078			
<i>L. luisieri</i> folha	3		0.0119		
<i>L. viridis</i> folha	3			0.0411	
<i>L. viridis</i> espiga	3				0.0523
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_1.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>L. luisieri</i> espiga	3	0.0096			
<i>L. luisieri</i> folha	3		0.0145		
<i>L. viridis</i> folha	3			0.0519	
<i>L. viridis</i> espiga	3				0.0693
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_2.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>L. luisieri</i> espiga	3	0.0128			
<i>L. luisieri</i> folha	3		0.0166		
<i>L. viridis</i> folha	3			0.0685	
<i>L. viridis</i> espiga	3				0.0827
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

III. Avaliação das propriedades antioxidantes

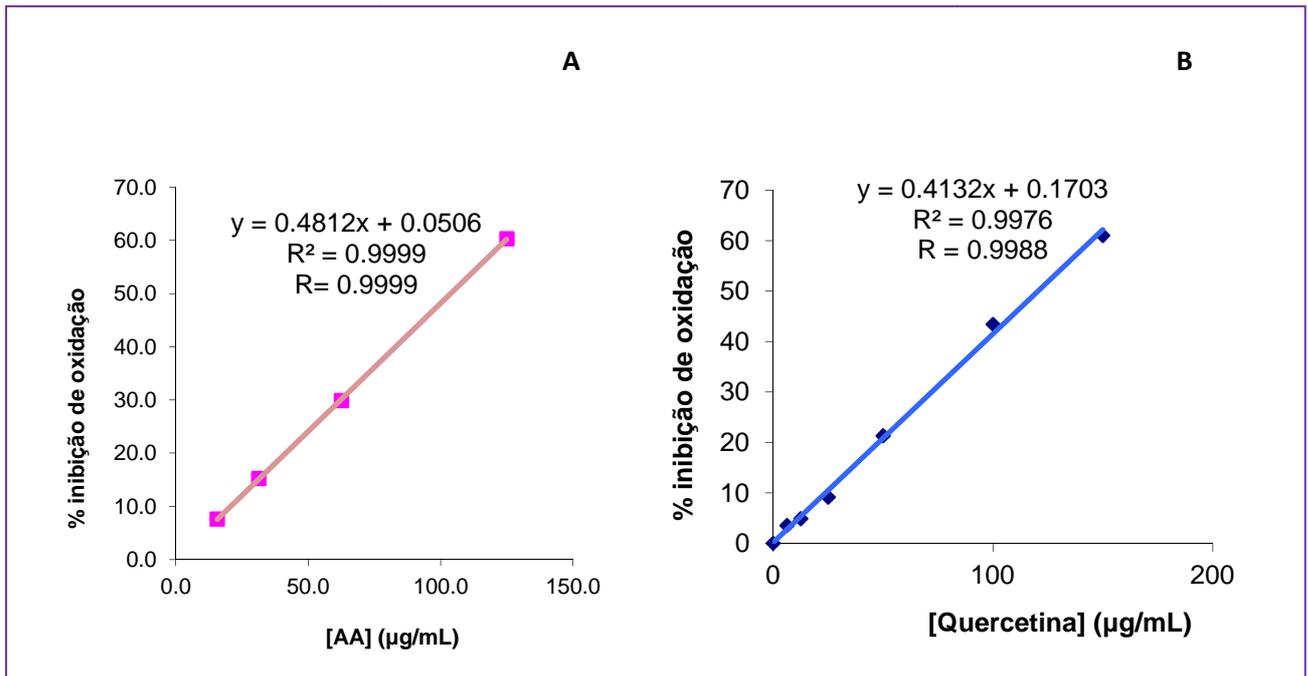


Figura 37 – Atividade antioxidante pelo método de radical DPPH, para os padrões
 A- ácido ascórbico; B- quercetina

Tabela 24 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do DPPH

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
C_25	Between Groups	773.936	2	386.968	79.113	0.000
	Within Groups	29.348	6	4.891		
	Total	803.284	8			
C_50	Between Groups	190.082	2	95.041	14.725	0.005
	Within Groups	38.727	6	6.455		
	Total	228.809	8			
C_75	Between Groups	1311.634	2	655.817	143.521	0.000
	Within Groups	27.417	6	4.569		
	Total	1339.051	8			
C_100	Between Groups	925.440	2	462.720	68.563	0.000
	Within Groups	40.493	6	6.749		
	Total	965.933	8			

Tabela 25 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do DPPH

C_25

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	15.2124	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3		33.9291
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		35.7166
Sig.		1.000	0.609

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_50

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	59.2446	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	59.7198	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		69.2224
Sig.		0.972	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_75

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	72.6152		
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		79.4404	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3			100.9452
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_100

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	91.9074	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	95.7989	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		115.0985
Sig.		0.237	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tabela 26 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos hidrolatos pelo método do DPPH

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
C_0.06	Between Groups	3.303	3	1.101	0.589	0.639
	Within Groups	14.957	8	1.870		
	Total	18.261	11			
C_0.13	Between Groups	68.700	3	22.900	24.060	0.000
	Within Groups	7.614	8	.952		
	Total	76.315	11			
C_0.25	Between Groups	77.992	3	25.997	76.238	0.000
	Within Groups	2.728	8	.341		
	Total	80.720	11			
C_0.50	Between Groups	484.284	3	161.428	135.218	0.000
	Within Groups	9.551	8	1.194		
	Total	493.835	11			

Tabela 27 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do DPPH

C_0.06

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
hidrolato <i>L.luisieri</i> espiga	3	3.7851	
hidrolato <i>L.viridis</i> folha	3	4.9098	
hidrolato <i>L.luisieri</i> folha	3	4.9889	
hidrolato <i>L.viridis</i> espiga	3	5.0705	
Sig.		0.671	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_0.13

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
hidrolato <i>L.luisieri</i> espiga	3	6.0469		
hidrolato <i>L.viridis</i> folha	3		9.4849	
hidrolato <i>L.luisieri</i> folha	3		11.2852	11.2852
hidrolato <i>L.viridis</i> espiga	3			12.3514
Sig.		1.000	0.187	0.566

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_0.25

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
hidrolato <i>L.luisieri</i> espiga	3	13.1037		
hidrolato <i>L.luisieri</i> folha	3		17.4242	
hidrolato <i>L.viridis</i> espiga	3		17.9656	
hidrolato <i>L.viridis</i> folha	3			20.1307
Sig.		1.000	0.680	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_0.50

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
hidrolato <i>L.luisieri</i> espiga	3	24.2318		
hidrolato <i>L.luisieri</i> folha	3	26.7901		
hidrolato <i>L.viridis</i> folha	3		34.6478	
hidrolato <i>L.viridis</i> espiga	3			40.2470
Sig.		0.080	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

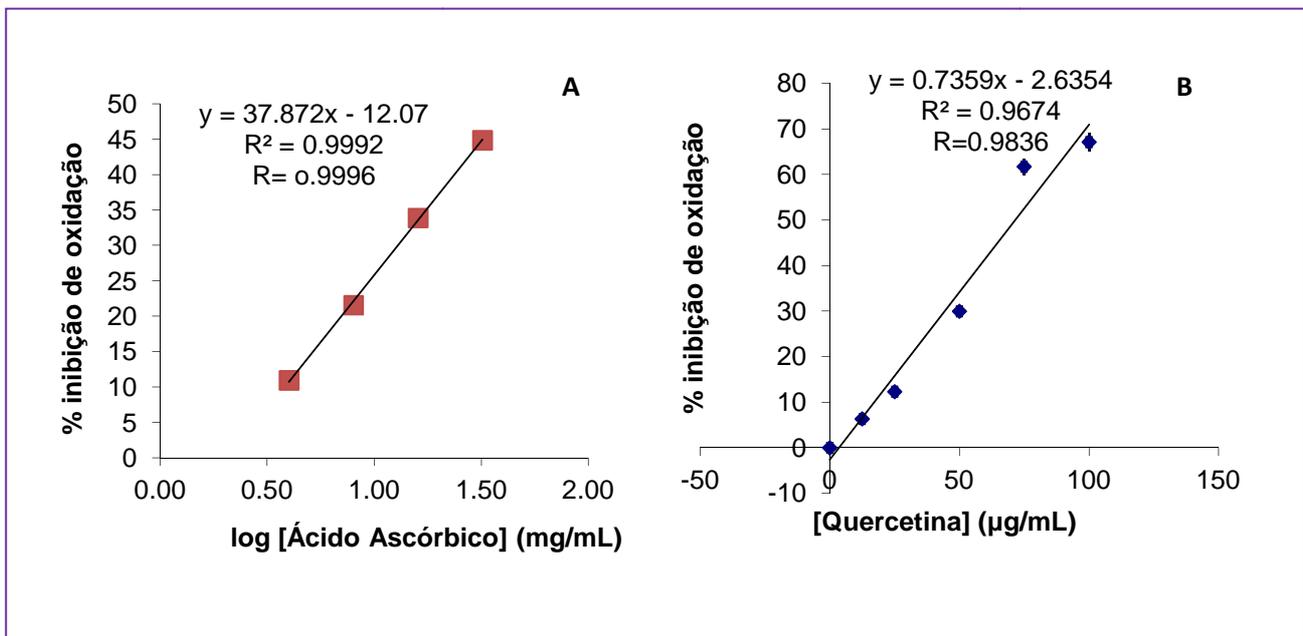


Figura 38 – Atividade antioxidante pelo método de radical β-caroteno/ácido linoleico, para os padrões A- ácido ascórbico; B- quercetina

Tabela 28 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do β -caroteno/ácido linoleico

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
C_1.0	Between Groups	1.994	2	0.997	2091.733	0.000
	Within Groups	0.003	6	0.000		
	Total	1.997	8			
C_2.5	Between Groups	1.753	2	0.877	748.397	0.000
	Within Groups	0.007	6	0.001		
	Total	1.760	8			
C_5.0	Between Groups	0.910	2	0.455	804.217	0.000
	Within Groups	0.003	6	0.001		
	Total	0.914	8			
C_10.0	Between Groups	1.134	2	0.567	1258.640	0.000
	Within Groups	0.003	6	0.000		
	Total	1.137	8			

Tabela 29 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do β -caroteno/ácido linoleico

C_1.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L.luisieri</i> espiga	3	0.4166	
óleo <i>L.luisieri</i> folha	3	0.4293	
óleo <i>L.viridis</i> folha	3		1.4215
Sig.		0.768	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_2.5

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L.luisieri</i> folha	3	0.6859	
óleo <i>L.luisieri</i> espiga	3	0.7254	
óleo <i>L.viridis</i> folha	3		1.6413
Sig.		0.393	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_5.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L.luisieri</i> espiga	3	0.9701		
óleo <i>L.luisieri</i> folha	3		1.0886	
óleo <i>L.viridis</i> folha	3			1.6962
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_10.0

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L.luisieri</i> espiga	3	1.0609		
óleo <i>L.luisieri</i> folha	3		1.2505	
óleo <i>L.viridis</i> folha	3			1.8906
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tabela 30 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos hidrolatos pelo método do β -caroteno/ácido linoleico

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
C_0.06	Between Groups	154.357	3	51.452	283.331	0.000
	Within Groups	1.453	8	0.182		
	Total	155.810	11			
C_0.09	Between Groups	276.049	3	92.016	835.048	0.000
	Within Groups	0.882	8	0.110		
	Total	276.930	11			
C_0.13	Between Groups	436.617	3	145.539	3021.402	0.000
	Within Groups	0.385	8	0.048		
	Total	437.002	11			
C_0.25	Between Groups	1967.937	3	655.979	3291.100	0.000
	Within Groups	1.595	8	0.199		
	Total	1969.532	11			

Tabela 31 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método do β -caroteno/ácido linoleico

C_0.06

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
hidrolato <i>L. viridis</i> espiga	3	1.9796		
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha	3	2.2095	2.2095	
hidrolato <i>L. luisieri</i> espiga	3		3.2505	
hidrolato <i>L. viridis</i> folha	3			10.6884
Sig.		0.909	0.067	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_0.09

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
hidrolato <i>L. viridis</i> espiga	3	2.7938		
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha	3	3.5163	3.5163	
hidrolato <i>L. luisieri</i> espiga	3		4.0919	
hidrolato <i>L. viridis</i> folha	3			14.4928
Sig.		0.107	0.225	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_0.13

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
hidrolato <i>L. viridis</i> espiga	3	3.8002			
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha	3		5.1398		
hidrolato <i>L. luisieri</i> espiga	3			6.2126	
hidrolato <i>L. viridis</i> folha	3				18.8406
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C_0.25

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
hidrolato <i>L. viridis</i> espiga	3	7.0996			
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha	3		11.3630		
hidrolato <i>L. luisieri</i> espiga	3			13.1545	
hidrolato <i>L. viridis</i> folha	3				39.6739
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

IV. Avaliação da citotoxicidade em *A salina*

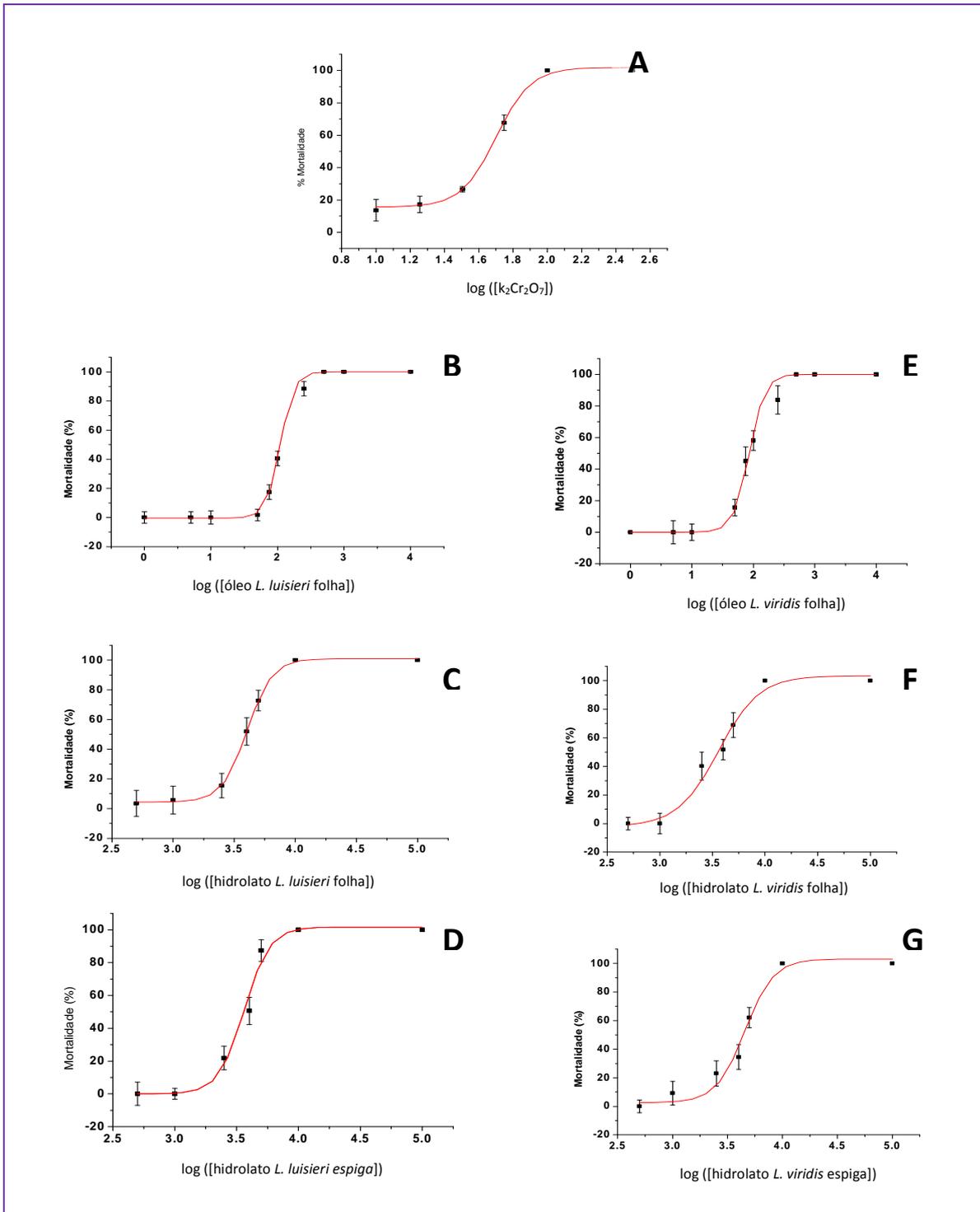


Figura 39 – Curvas dose-resposta para a determinação da CL₅₀ com ensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*

A - Dicromato de potássio; B-D – *L. luisieri* (óleo essencial da folha, hidrolato folha e hidrolato espiga, respetivamente); E-G – Espigas *L. viridis* (óleo essencial da folha, hidrolato folha e hidrolato espiga, respetivamente)

V. Avaliação da atividade antimicrobiana

Tabela 32 - Atividade antimicrobiana dos antibióticos específicos

	Ø halo inibição (mm)										
	AMC	TE	CF	GM	W	CRO	P	PB	AMP	MH	AK
<i>Escherichia coli</i> LFG03	22	6	6	14	6	23	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21	30	6	15	26	25	-	13	6	23	19
<i>Morganella morganii</i> LFG08	-	6	6	12	-	9	-	-	-	8	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFG02	6	15	-	15	6	6	-	-	6	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	18	si	20	6	si	-	13	si	17	24
<i>Proteus mirabilis</i> LFG04	30	8	13	12	16	28	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> LFG05	26	28	7	12	-	25	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> LFG06	si	10	14	20	6	22	-	12	si	13	20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	29	16	6	18	26	6	22	-	14	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> LFG 07	42	44	-	17	-	-	38	-	43	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	20	32	25	14	20	10	17	-	21	16	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	17	14	31	23	36	15	15	15	15	38	23

Legenda: - Não realizado; si - sem inibição; AMC-Amoxicilina+Ácido Clavulâmico (30 µg); AMP-Ampicilina (10 µg); AK-Amicacina (30 µg); CAZ- Ceftazidima (30 µg); GM-Gentamicina (10 µg); MH-Minociclina (30 µg); P -Penicilina G (10U); W- Trimetoprim (5 µg); TE-Tetraciclina (30 µg); CF – Cefalotina (30 µg); CRO-Ceftriaxona (5 µg).

Tabela 33 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antimicrobiana face a bactérias patogénicas

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>Escherichia coli</i> LFG 03	Between Groups	10.667	2	5.333	24.000	0.001
	Within Groups	1.333	6	0.222		
	Total	12.000	8			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Between Groups	806.000	2	403.000	201.500	0.000
	Within Groups	12.000	6	2.000		
	Total	818.000	8			
<i>Morganella</i> <i>morganii</i> LFG 08	Between Groups	1.556	2	0.778	3.500	0.098
	Within Groups	1.333	6	0.222		
	Total	2.889	8			
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> LFG 02	Between Groups	114.000	2	57.000	171.000	0.000
	Within Groups	2.000	6	.333		
	Total	116.000	8			
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	Between Groups	72.000	2	36.000		
	Within Groups	0.000	6	0.000		
	Total	72.000	8			
<i>Proteus mirabilis</i> LFG 04	Between Groups	24.222	2	12.111	27.250	0.001
	Within Groups	2.667	6	0.444		
	Total	26.889	8			
<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> LFG 05	Between Groups	22.889	2	11.444	51.500	0.000
	Within Groups	1.333	6	.222		
	Total	24.222	8			
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> LFG 06	Between Groups	122.889	2	61.444	553.000	0.000
	Within Groups	0.667	6	0.111		
	Total	123.556	8			
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> LFG 01	Between Groups	8.222	2	4.111	37.000	0.000
	Within Groups	0.667	6	0.111		
	Total	8.889	8			
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ATCC 29212	Between Groups	2.889	2	1.444	4.333	0.068
	Within Groups	2.000	6	0.333		
	Total	4.889	8			
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> LFG 07	Between Groups	137.556	2	68.778	25.792	0.001
	Within Groups	16.000	6	2.667		
	Total	153.556	8			
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 29213	Between Groups	29.556	2	14.778	22.167	0.002
	Within Groups	4.000	6	0.667		
	Total	33.556	8			
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> ATCC 12228	Between Groups	26.000	2	13.000	19.500	0.002
	Within Groups	4.000	6	0.667		
	Total	30.000	8			

Tabela 34 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antimicrobiana face a bactérias patogénicas

***Escherichia coli* LFG 03**

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	6.6667		
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		8.0000	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3			9.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Escherichia coli* ATCC 25922**

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	9.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	11.0000	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		30.0000
Sig.		0.269	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Morganella morganii* LFG 0**

8

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05
		1
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	8.6667
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	9.0000
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	9.6667
Sig.		0.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Pseudomonas aeruginosa* LFG 02**

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	6.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	7.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3		14.0000
Sig.		0.165	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Proteus mirabilis* LFG 04**

 Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	7.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		9.3333
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		11.0000
Sig.		1.000	0.050

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Salmonella enteritidis* LFG 05**

 Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	8.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	8.6667	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		11.6667
Sig.		0.269	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Salmonella typhimurium* LFG 06**

 Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	0.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		7.6667
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		8.0000
Sig.		1.000	0.483

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Enterococcus faecalis* LFG 01**

 Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	9.0000		
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		10.0000	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3			11.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

 Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05
		1
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	9.3333
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	9.6667
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	10.6667
Sig.		0.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Staphylococcus aureus* LFG 07**

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	12.3333	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		19.6667
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		21.3333
Sig.		1.000	0.470

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	16.3333	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	16.6667	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		20.3333
Sig.		0.874	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

***Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228**

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	9.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3		12.3333
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		13.3333
Sig.		1.000	0.355

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tabela 35 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antimicrobiana face a leveduras patogénicas

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>Candida albicans</i>	Between Groups	88.667	2	44.333	19.950	0.002
	Within Groups	13.333	6	2.222		
	Total	102.000	8			
<i>Candida krusei</i>	Between Groups	110.222	2	55.111	33.067	0.001
	Within Groups	10.000	6	1.667		
	Total	120.222	8			
<i>Candida parapsilosis</i>	Between Groups	2978.000	2	1489.000	2233.500	0.000
	Within Groups	4.000	6	0.667		
	Total	2982.000	8			
<i>Geotrichum klebahnii</i>	Between Groups	1922.000	2	961.000	102.964	0.000
	Within Groups	56.000	6	9.333		
	Total	1978.000	8			

Tabela 36 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antimicrobiana face a leveduras patogénicas

Candida albicans

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	12.6667	
nistatina	3	14.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		20.0000
Sig.		0.413	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Candida krusei

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
nistatina	3	8.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	9.6667	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		16.3333
Sig.		0.463	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Candida parapsilosis

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	10.0000		
nistatina	3		13.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3			50.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Geotrichum klebahnii

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
nistatina	3	19.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		50.0000
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3		50.0000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tabela 37 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antimicrobiana face a fungos filamentosos

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>Aspergillus japonicus</i>	Between Groups	3700.250	3	1233.417	370.025	0.000
	Within Groups	26.667	8	3.333		
	Total	3726.917	11			
<i>Aspergillus niger</i>	Between Groups	3646.917	3	1215.639	1620.852	0.000
	Within Groups	6.000	8	0.750		
	Total	3652.917	11			
<i>Aspergillus oryzae</i>	Between Groups	28.667	3	9.556	19.111	0.001
	Within Groups	4.000	8	0.500		
	Total	32.667	11			
<i>Fusarium oxysporum</i>	Between Groups	5010.250	3	1670.083	20041.000	0.000
	Within Groups	0.667	8	0.083		
	Total	5010.917	11			
<i>Penicillium spp#</i>	Between Groups	5721.000	3	1907.000	22884.000	0.000
	Within Groups	0.667	8	0.083		
	Total	5721.667	11			
<i>Rhizopus oryzae</i>	Between Groups	43.000	3	14.333	43.000	0.000
	Within Groups	2.667	8	0.333		
	Total	45.667	11			
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Between Groups	92.250	3	30.750	123.000	0.000
	Within Groups	2.000	8	0.250		
	Total	94.250	11			

Tabela 38 - Teste de Tukey para a avaliação da atividade antimicrobiana face a fungos filamentosos

Aspergillus japonicus

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	8.6667		
nistatina	3		25.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3			50.0000
óleo <i>L. viridis</i> folha	3			50.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Aspergillus niger

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	6.6667			
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		10.3333		
nistatina	3			13.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3				50.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Aspergillus orizae

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3	6.3333	
óleo <i>L. viridis</i> folha	3	6.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	6.6667	
Nistatina	3		10.0000
Sig.		0.936	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Fusarium oxysporum

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
nistatina	3	8.0000		
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3		10.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3			50.0000
óleo <i>L. viridis</i> folha	3			50.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Penicillium spp

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Nistatina	3	6.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	6.6667	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		50.0000
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		50.0000
Sig.		0.085	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Rhizopus oryzae

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3	6.3333		
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		9.3333	
nistatina	3		9.3333	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3			11.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Rhizopus stolonifer

Tukey HSD^a

extrato	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Nistatina	3	0.0000	
óleo <i>L. luisieri</i> folha	3		6.0000
óleo <i>L. luisieri</i> espiga	3		6.0000
óleo <i>L. viridis</i> folha	3		7.0000
Sig.		1.000	0.144

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

VI. Avaliação da toxicidade aguda e perfil farmacológico

 Tabela 39 - Perfil hipocrático para o óleo essencial das folhas de *L. luisieri*

Veículo										
Parâmetros	Tempo (h)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo pineal (orelhas)		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade motora (min)		>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose 175 mg/Kg										
Parâmetros	Tempo (h)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)		0	-	-	-	-	-	-	0	0
Reflexo pineal (orelhas)		0	0	-	-	-	-	-	0	0
Atividade motora (min)		>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose 550 mg/Kg										
Parâmetros	Tempo (h)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)		0	-	-	-	-	-	-	0	0
Reflexo pineal (orelhas)		0	0	-	-	-	-	-	0	0
Atividade motora (min)		>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose 2000 mg/Kg										
Parâmetros	Tempo (h)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)		0	-	-	-	-	-	-	0	0
Reflexo pineal (orelhas)		0	0	-	-	-	-	-	0	0
Atividade motora (min)		>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva		0	+	+	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor		0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aumento: + Diminuição: - Normal: 0

Tabela 40 - Perfil hipocrático para o hidrolato das folhas de *L. luisieri*

Veículo									
Parâmetros	Tempo (h)								
	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo pineal (orelhas)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade motora (min)	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose 175 mg/Kg									
Parâmetros	Tempo (h)								
	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo pineal (orelhas)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade motora (min)	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose 550 mg/Kg									
Parâmetros	Tempo (h)								
	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo pineal (orelhas)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade motora (min)	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose 2000 mg/Kg									
Parâmetros	Tempo (h)								
	0	0.25	0.5	1	2	4	8	24	25-336
Catalepsia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexos de postura	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de tracção	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Teste de Haffner (cauda)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo pineal (orelhas)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade motora (min)	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60
Conduta agressiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta passiva	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conduta de temor	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aumento: + Diminuição: - Normal: 0

Tabela 41 - Análise de variância ANOVA para a avaliação histomorfométrica

		ANOVA					
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Óleos essenciais	Área sinusoides u ² m	Between Groups	5473664.419	3	1824554.806	10.580	0.000
		Within Groups	1.052E7	61	172446.200		
		Total	1.599E7	64			
	Área nuclear hepatócitos u ² m	Between Groups	3317.699	3	1105.900	12.116	0.000
		Within Groups	21814.588	239	91.274		
		Total	25132.288	242			
	Túbulos um	Between Groups	113.984	3	37.995	12.014	0.000
		Within Groups	698.943	221	3.163		
		Total	812.926	224			
	Área glomérulo u ² m	Between Groups	9.886E7	3	3.295E7	14.649	0.000
		Within Groups	4.972E8	221	2249581.435		
		Total	5.960E8	224			
	Área espaço Bowman u ² m	Between Groups	5036196.457	3	1678732.152	3.640	0.014
		Within Groups	1.019E8	221	461230.718		
		Total	1.070E8	224			
Hidrolatos	Área sinusoides (%)	Between Groups	258.600	3	86.200	19.803	0.000
		Within Groups	330.817	76	4.353		
		Total	589.417	79			
	Área nuclear hepatócitos u ² m	Between Groups	1167.674	3	389.225	8.149	0.000
		Within Groups	15092.956	316	47.763		
		Total	16260.630	319			
	Túbulos um	Between Groups	99.591	3	33.197	9.406	0.000
		Within Groups	938.799	266	3.529		
		Total	1038.390	269			
	Área glomérulo u ² m	Between Groups	1.431E7	3	4771114.493	2.623	0.051
		Within Groups	4.838E8	266	1818831.592		
		Total	4.981E8	269			
	Área espaço Bowman u ² m	Between Groups	1.263E7	3	4208763.211	13.586	0.000
		Within Groups	8.240E7	266	309789.612		
		Total	9.503E7	269			

Tabela 42 - Teste de Tukey para a avaliação histomorfométrica

		área nuclear hepatócitos (u ² m)		
extrato dose		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^{a,c}	controlo óleo	80	43.7531	
	óleo <i>L. luisieri</i> folha175 mg/kg	40		48.9602
	óleo <i>L. luisieri</i> folha2000 mg/kg	60		51.6325
	óleo <i>L. luisieri</i> folha550 mg/kg	63		52.3582
	Sig.		1.000	0.231
Tukey HSD ^b	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	80	40.6906	
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	80		44.5290
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	80		44.8924
	controlo hidrolato	80		45.6085
	Sig.		1.000	0.756

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 57.110.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 80.000.

c. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

área sinusoides (%)

extrato dose		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^{a,c}	óleo <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	20	5.4960		
	óleo <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	15	5.7517		
	controlo óleo	20	7.3848		
	óleo <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	10		11.4505	
	Sig.		0.295	1.000	
Tukey HSD ^b	controlo hidrolato	20	5.1589		
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	20	5.2746		
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	20		7.4762	
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	20			9.5327
	Sig.		0.998	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.
- b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.
- c. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

túbulos (u²m)

extrato dose		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^{a,c}	controlo óleo	60	11.1657	
	óleo <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	60	11.5972	
	óleo <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	30		12.7452
	óleo <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	75		12.7835
	Sig.		0.619	1.000
Tukey HSD ^{b,c}	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	60	11.9620	
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	60	12.2228	
	hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	90	12.3738	
	controlo hidrolato	60		13.6283
	Sig.		0.593	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 50.000.
- b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 65.455.
- c. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

área glomérulo (μ^2m)

extrato dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a,c}				
óleo <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	60	4672.4207		
óleo <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	75	5269.6698	5269.6698	
controlo óleo	60		5843.8021	
óleo <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	30			6752.1527
Sig.		0.194	0.225	1.000
Tukey HSD ^{b,c}				
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	60	4826.4449		
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	90	5181.5424	5181.5424	
controlo hidrolato	60	5315.1045	5315.1045	
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	60		5491.9929	
Sig.		0.165	0.553	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 50.000.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 65.455.

c. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

área espaço Bowman (μ^2m)

extrato dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a,c}				
controlo óleo	60	1707.0203		
óleo <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	30	1783.7575		
óleo <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	60	2026.8043		
óleo <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	75	2040.1439		
Sig.		0.070		
Tukey HSD ^{b,c}				
controlo hidrolato	60	1218.5844		
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 175 mg/kg	60	1371.8325	1371.8325	
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 550 mg/kg	60		1535.6387	1535.6387
hidrolato <i>L. luisieri</i> folha 2000 mg/kg	90			1775.5491
Sig.		0.395	0.334	0.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 50.000.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 65.455.

c. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

VII. Avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória

Tabela 43 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade analgésica

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
t 30	Between Groups	18908.848	4	4727.212	10.196	0.000
	Within Groups	7881.785	17	463.634		
	Total	26790.633	21			
t 60	Between Groups	9655.655	4	2413.914	9.618	0.000
	Within Groups	4015.535	16	250.971		
	Total	13671.191	20			
t 90	Between Groups	9971.656	4	2492.914	13.999	0.000
	Within Groups	2849.247	16	178.078		
	Total	12820.902	20			

Tabela 44 - Teste de Duncan para a avaliação da atividade analgésica

t 30

Duncan^{a,b}

extrato n°	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
óleo essencial 100 mg/kg	3	15.1100			
hidrolato 1000 mg/kg	4	24.0925	24.0925		
hidrolato 500 mg/kg	5		49.2080	49.2080	
óleo essencial 200 mg/kg	5			58.5080	
Morfina 10 mg/kg	5				100.0000
Sig.		0.552	0.108	0.538	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.225.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

t 60

Duncan^{a,b}

extrato n°	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo essencial 100 mg/kg	3	39.1100		
hidrolato 500 mg/kg	6	50.0350	50.0350	
óleo essencial 200 mg/kg	3		67.1600	
hidrolato 1000 mg/kg	4		73.1475	
Morfina 10 mg/kg	5			100.0000
Sig.		0.350	0.070	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.896.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

t 90

Duncan^{a,b}

extrato nº	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
óleo essencial 200 mg/kg	3	44.2800		
hidrolato 500 mg/kg	6	44.3783		
óleo essencial 100 mg/kg	3	64.8867	64.8867	
hidrolato 1000 mg/kg	4		66.4600	
Morfina 10 mg/kg	5			100.0000
Sig.		0.057	0.871	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.896.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabela 45 - Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade anti-inflamatória

ANOVA

t 4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2532.866	4	633.217	3.353	0.036
Within Groups	3021.958	16	188.872		
Total	5554.825	20			

Tabela 46 - Teste de Duncan para a avaliação da atividade anti-inflamatória

t 4

Duncan^{a,b}

extrato nº	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
óleo essencial 100 mg/kg	3	48.4100	
hidrolato 500 mg/kg	6	59.1167	
Dexametasona 1 mg/kg	4	63.7575	63.7575
hidrolato 1000 mg/kg	4	67.2575	67.2575
óleo essencial 200 mg/kg	4		84.1950
Sig.		0.092	0.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.