



# **Composição fenólica e propriedades bioativas de amostras de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.**

Catarina Santos Pires Lourenço Lopes

Tese apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais

Orientada por  
Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira  
Ana Maria Carvalho  
Lillian Barros

Bragança

2017



---

Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377\_Iberphenol\_6\_E.





## Agradecimentos

Durante o meu percurso, nesta etapa académica que está agora a terminar, tive sempre a ajuda, a dedicação e o apoio de várias pessoas, que merecem os meus mais sinceros agradecimentos, por tornarem possível o desenvolvimento deste trabalho.

De modo particular gostaria de agradecer:

À **Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira**, à **Professora Doutora Ana Maria Carvalho** e à **Doutora Lillian Barros** não só pela orientação, disponibilidade e simpatia, mas também pelos conhecimentos que me transmitiram e por todas as experiências que me disponibilizaram.

À **Doutora Eliana Pereira** por todo o cuidado, empenho e ajuda que sempre me disponibilizou durante este trabalho, por todas as coisas que me ensinou sempre com simpatia e boa disposição e pelo carinho e amizade com que me recebeu desde o início.

Ao **Doutor Ricardo Calhella** pela atenção, simpatia e ensinamentos que me transmitiu durante este percurso.

Ao **Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada**, em particular ao **BioChemCore**, e a todos aqueles que lá trabalham, por todas as dúvidas momentâneas que me esclareceram, as ajudas quando algo correu menos bem e pela constante boa disposição, que torna o laboratório um lugar acolhedor.

À **Eng. Ana Maria Barata**, **Eng. Filomena Rocha** e **Eng. Violeta Lopes**, do Banco Português de Germoplasma Vegetal, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.), pela gentil cedência das amostras. Foi com muito gosto que fiz parte desta parceria.

Às minhas colegas e amigas **Célia Jiménez**, **Ingride Rita**, **Joana Botas**, **Marcela Silva** e **Joana Pinto** por todos os desabafos que ouviram, encorajamento

## Agradecimentos

---

que ofereceram e distrações que me proporcionaram depois de muitas horas em frente ao computador. Obrigada pelos bons momentos e pela vossa amizade.

Aos meus **pais** por todos os sacrifícios que fazem para que eu possa sempre seguir os meus sonhos. Muito obrigada por todo o amor, incentivo, motivação e por sempre apoiarem o meu trabalho.

Às minhas irmãs **Madalena** e **Francisca**, e à minha prima **Leonor** por me motivarem e apoiarem nesta etapa do meu percurso académico.

Às minhas queridas **Avó** e **Madrinha** por estarem sempre presentes mesmo estando tão longe e por toda a paciência que têm tido ao longo dos anos para ler os meus trabalhos e acrescentar todas as vírgulas e acentos de que eu sempre me esqueço.

Por fim, a toda a minha família, amigos e a todas as outras pessoas, que direta ou indiretamente, fizeram com que este trabalho fosse possível.

A todos, MUITÍSSIMO OBRIGADA.

**Abreviaturas**

$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo
$^{13}\text{C}$	Carbono 13
$^1\text{H}$	Protão
$A_{\text{DPPH}}$	Absorvância da solução de DPPH
AH	Antioxidantes doadores de hidrogénio
$A_s$	Absorvância da solução na presença de extrato
BPGV	Banco Português de Germoplasma
CA	Califórnia
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
CFU	Unidade formadora de Colónias
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
CN	Cianeto
$\text{D}_2\text{O}$	Água deuterada
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Diphenil-1-picrylhydrazyl
$\text{EC}_{50}$	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
ECACC	“European Collection of Animal Cell Culture”
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtOH	Etanol
ESI	Fonte de ionização electrospray
FBS	Soro fetal de bovino
Fe	Ferro
$\text{GI}_{50}$	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
$\text{H}_2\text{O}$	Água
HBSS	Solução salina de Hank’s
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
$\text{IC}_{50}$	Concentração que inibe 50% da proliferação celular
INT	Cloreto de iodonitrotetrazólio

K	Potássio
LC-MS	Cromatografia Líquida – Espetrometria de Massa
LPS	Lipopolissacáridos
MA	Agar de malte
MAs	Massachusetts
MBC	Concentração Mínima Bactericida
MDA	Malodialdeído
MFC	Concentração Mínima Fungicida
MH	Agar Mueller-Hinton
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MO	Missouri
MS	Espetrometria de Massa
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
nd	não detetado
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NO	Óxido Nítrico
pH	Potencial de Hidrogénio
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécie Reativa de Azoto
ROOH	Composto orgânico oxidado
ROS	Espécie Reativa de Oxigénio
RPMI-1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
RSA	Atividade Captadora de Radicais
RSS	Espécie Reativa de Enxofre
Rt	Tempo de Retenção
SC	Carolina do Sul
SD	Desvio Padrão
SRB	Sulforodamina B
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TF	Flavonóides Totais
TMS	Tetrametilsilano
TPA	Ácidos fenólicos totais

TPC	Compostos fenólicos totais
tr	Vestigial
TSB	Caldo de soja trípico
U	Unidades de massa
UK	Reino Unido
USA	Estados Unidos da América
UT	Utah
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WI	Wisconsin



---

**Índice**

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>5</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>7</b>
<b>Índice .....</b>	<b>11</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>13</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. As plantas fonte de nutrientes e princípios ativos .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Caracterização botânica da espécie estudada.....	20
<b>1.2. Propriedades bioativas de <i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.....</b>	<b>23</b>
1.2.1. A bioatividade de metabolitos secundários.....	23
1.2.2. O caso particular da espécie <i>L. pedunculata</i> .....	26
<b>1.3. Mecanismos de ação dos compostos bioativos .....</b>	<b>30</b>
1.3.1. Ação antioxidante .....	30
1.3.2. Ação antimicrobiana.....	34
1.3.3. Ação anti-tumoral.....	35
1.3.4. Absorção e metabolismo.....	36
<b>1.4. Detecção e determinação de moléculas bioativas .....</b>	<b>36</b>
<b>1.5. Objetivos.....</b>	<b>42</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1. Amostras.....</b>	<b>46</b>

<b>2.2. Padrões e Reagentes.....</b>	<b>48</b>
<b>2.3. Avaliação do potencial bioativo .....</b>	<b>49</b>
2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante .....	49
2.3.3. Avaliação da atividade antitumoral.....	54
2.3.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória .....	55
2.3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	56
2.3.6. Determinação do perfil fenólico.....	58
<b>2.4. Análise estatística.....</b>	<b>59</b>
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Compostos Fenólicos.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2. Atividade Antioxidante e Anti-inflamatória .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3. Citotoxicidade .....</b>	<b>71</b>
<b>3.4. Atividade Antimicrobiana .....</b>	<b>74</b>
<b>4. Considerações finais .....</b>	<b>79</b>
<b>5. Referências bibliográficas .....</b>	<b>83</b>

**Índice de Figuras**

Figura 1 - <i>Lavandula pedunculata</i> (Mill.) Cav.....	21
Figura 2 - Pormenor de brácteas oblongas de inflorescência de <i>L. pedunculata</i> .....	21
Figura 3 - Via biossintética de compostos fenólicos .....	25
Figura 4 - Estrutura química do ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico .....	27
Figura 5 - Estrutura química do ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico .....	27
Figura 6 - Estrutura química do ácido rosmarínico .....	28
Figura 7 - Estrutura química da luteolina .....	28
Figura 8 - Estrutura química da apigenina.....	29
Figura 9 - Propriedades bioativas dos compostos fenólicos presentes na espécie <i>L. pedunculata</i> .....	29
Figura 10 - Fatores endógenos e exógenos que influenciam a produção de ROS no organismo.....	32
Figura 11 - Bioatividades de diferentes compostos .....	33
Figura 12 – Técnicas utilizadas para a deteção, quantificação e elucidação de moléculas bioativas .....	40
Figura 13 – Esquematização do plano de trabalho .....	43
Figura 14 – Formação da hidrazina de cor amarela pálido.....	51
Figura 15 – Formação do Complexo MDA-TBA.....	54
Figura 16 - Perfil cromatográfico da amostra 3 registado a 280 nm .....	66

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Compostos bioativos de <i>L. pedunculata</i> descritos em trabalhos anteriores	26
<b>Tabela 2.</b> Informação Geográfica acerca das amostras de <i>L. pedunculata</i> estudadas.	47
<b>Tabela 3.</b> Tempo de retenção (Rt), comprimentos de absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{\max}$ ), dados de massa espectral e identificação provisória dos compostos fenólicos em amostras de <i>L. pedunculata</i> .	65
<b>Tabela 4.</b> Quantificação de compostos fenólicos (mg/g de extrato, média $\pm$ SD) em extratos hidroetanólicos e aquosos de <i>L. pedunculata</i> .	67
<b>Tabela 5.</b> Atividade Antioxidante e anti inflamatória de extratos hidroetanólicos e aquosos de <i>L. pedunculata</i> (Média $\pm$ SD).	70
<b>Tabela 6.</b> Propriedades Citotóxicas de extratos hidroetanólicos e aquosos de <i>L. pedunculata</i> (média $\pm$ SD).	73
<b>Tabela 7.</b> Atividade antibacteriana (MIC e MBC, mg/mL) de extratos hidroetanólicos e aquosos de <i>L. pedunculata</i> .	76
<b>Tabela 8.</b> Atividade antifúngica (MIC e MFC, mg/mL) de extratos hidroetanólicos e aquosos de <i>L. pedunculata</i> .	77

**Abstract**

Plants were used by our ancestors, not only as food, but also as a therapeutic solution. Taking into account their health benefits and, according to the World Health Organization (WHO), their use as an ingredient in the pharmaceutical and food industries has increased significantly, over time.

Bioactive compounds are an important group present in plants, acting in the prevention of human diseases associated with oxidative stress. The aim of this study was to characterize the phenolic composition and evaluate the bioactivity of several samples of *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav, whose seeds were provided from various natural populations of different regions of Portugal, and compare aqueous and hydroethanolic extracts. From the HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> analysis thirteen compounds were identified, being salvianolic acid B, rosmarinic acid and luteolin-7-*O*-glucuronide, the main compounds present. *L. pedunculata* aqueous extract revealed a higher antioxidant potential, which could be related to its higher concentration in phenolic compounds; however, the hydroethanolic extract showed a higher anti-inflammatory potential and anti-proliferative capacity. Thus, this study highlights the bioactive effects of this species and opens possibilities for uses in food and pharmaceutical formulations. However, there are potential differences in such properties according to geographical origin of plant material, as in general, the samples from Alentejo presented higher results in all the bioactivities, compared with Trás-os-Montes samples.

## Resumo

As plantas foram usadas pelos nossos ancestrais, não só como alimento, mas também como uma solução terapêutica. Tendo em conta os seus benefícios para a saúde e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a sua utilização como ingrediente na indústria farmacêutica e alimentar, aumentou significativamente, ao longo do tempo.

Os compostos bioativos são um grupo importante presente nas plantas, atuando na prevenção de doenças humanas associadas ao stresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi caracterizar a composição fenólica e avaliar a bioatividade de várias amostras de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav, cujas sementes são provenientes de diversas populações naturais de diferentes regiões de Portugal, e comparar os seus extratos aquosos e hidroetanólicos. A partir da análise HPLC-DAD-ESI/MSn foram identificados treze compostos, sendo o ácido salvianólico B, o ácido rosmarínico e luteolina-7-*O*-glucurónido, os principais compostos presentes. O extrato aquoso de *L. pedunculata* revelou maior potencial antioxidante, que pode estar relacionado com a sua maior concentração em compostos fenólicos; no entanto, o extrato hidroetanólico demonstrou maior potencial anti-inflamatório e capacidade anti-proliferativa. Assim, este estudo destaca os efeitos bioativos desta espécie e abre possibilidades para o seu uso em formulações alimentares e farmacêuticas. No entanto, existem potenciais diferenças nestas propriedades de acordo com a origem geográfica do material vegetal, visto que as amostras do Alentejo apresentaram, em geral, melhores resultados para todas as bioatividades, comparativamente com as amostras de Trás-os-Montes.

---

# 1. Introdução



### 1.1. As plantas fonte de nutrientes e princípios ativos

O reino das plantas (*Plantae*) engloba um vasto grupo de seres pluricelulares, eucariontes e autotróficos, capazes de sintetizar aminoácidos e vitaminas através da fixação desses elementos inorgânicos, o que lhes permite não depender de uma fonte externa de produção de proteínas para sobreviver (Lambers et al., 2017).

A sua evolução ao longo de milhares de anos e a seleção natural, como resposta a diversos tipos de alterações, permitem que hoje em dia, exista uma grande variedade de espécies, muitas das quais de extrema relevância na alimentação dos seres heterotróficos. Assim, ao longo da história da humanidade, aproximadamente 7000 espécies de plantas diferentes têm sido utilizadas como alimento pelo homem, sendo um recurso essencial para o seu bem-estar, estando direta e indiretamente presentes na cadeia alimentar (Lambers et al., 2017).

No que concerne à sua aplicabilidade terapêutica, um quarto dos medicamentos prescritos é derivado ou originário diretamente das plantas e 4 em cada 5 pessoas no mundo dependem de plantas para os cuidados de saúde primários (Lambers et al., 2017).

As espécies do género *Lavandula* são muito utilizadas, não só na medicina popular, como também na indústria alimentar, no fabrico de bebidas aromatizadas, gelados, doces, pastelaria e pastilhas elásticas. São também matéria-prima nas indústrias de perfumaria e farmacêutica, fazendo parte da formulação de sabonetes, perfumes, colónias, loções para a pele e outros cosméticos (Kim & Lee, 2002).

Em Portugal, os usos tradicionais das espécies silvestres de *Lavandula* estão sobretudo relacionados com cuidados terapêuticos, cerimónias religiosas, jardinagem, aromaterapia e decoração. Também se utilizam como plantas e como plantas melíferas na alimentação das abelhas (Zuzarte et al., 2010; Carvalho & Ramos, 2012).

Considerando a importância da etnoflora na identificação de compostos e princípios ativos com interesse alimentar, medicinal e industrial, e a utilização tradicional das espécies de *Lavandula* em várias regiões portuguesas, o estudo de material vegetal proveniente destas espécies parece ser promissor no âmbito da investigação em farmácia e produtos naturais.

### 1.1.1 Caracterização botânica da espécie estudada

A *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., representada na **Figura 1**, é uma planta pertencente à família das Lamiaceae, que habita preferencialmente na metade ocidental da Península Ibérica, em Portugal e em Espanha (por exemplo na Galiza, em Castela-Leão, Estremadura, Castela - La Mancha), chegando até à parte ocidental da Andaluzia, podendo também ocorrer no Norte de África e Turquia (Font Quer, 1999; Zuzarte et al.; 2010). Esta espécie é a mais resistente de todas as espécies do género *Lavandula*, distinguindo-se por aguentar os frios intensos dos climas continentais e crescer em altitudes até aos 1500 m (González, 2016; Font Quer, 1999).

A *L. pedunculata* é conhecida em Portugal por rosmaninho, arçã, rosmaninho maior ou lavanda. O tipo biológico da espécie varia entre caméfito (menos de 30cm de altura) e nanofanerófito com um porte até cerca de 170 cm. Trata-se de uma planta lenhosa, com folhas verde-acinzentado-tomentosas, inteiras e de margens revolutas; as flores estão organizadas em inflorescências do tipo espiga que têm um pedúnculo de cerca de mais de duas vezes o comprimento da inflorescência (Morales, 2010). As espigas compactas são maiores do que as de uma lavanda comum (*Lavandula angustifolia* Mill.) e têm uma forma ovóide ou subcilíndrica, com 1 a 6 brácteas superiores, oblongas de cor violácea a pálido-lilacéneas ou, mais raramente, de cor branca, como se pode observar na **Figura 2** (Franco, 1984).



**Figura 1** - *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav.. Fonte: thegardencentregroup.co.uk



**Figura 2** - Pormenor de brácteas oblongas de inflorescência de *L. pedunculata*

M.Porto (2017). Flora-On: Flora de Portugal Interativa, Sociedade Portuguesa de Botânica.  
<http://www.flora-on.pt/#wLavandula+pedunculata+subsp.+pedunculata>.

A designação botânica actual corresponde a *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., no entanto esta espécie pode também ser identificada por diversas sinonímias, tais como: *Lavandula eliasii* Sennen, *Lavandula pedunculata* subsp. *pedunculata*, *Lavandula stoechas* subsp. *pedunculata* (Mill.) Samp. ex Rozeira, e *Stoechas pedunculata* Mill. (The Plant List).

Esta designação pode incluir ainda os seguintes taxa infraespecíficos: : *Lavandula pedunculata* subsp. *atlantica* (Braun-Blanq.) Romo, *Lavandula pedunculata* subsp. *cariensis* (Boiss.) Upson & S.Andrews, *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco e *Lavandula pedunculata* subsp. *sampaiana* (Rozeira) Franco (The Plant List).

## **1.2. Propriedades bioativas de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav**

### **1.2.1. A bioatividade de metabolitos secundários**

A elevada preocupação do consumidor em praticar, cada vez mais, uma alimentação saudável, faz com que os alimentos ricos em metabolitos bioativos estejam diariamente presentes na dieta (Dias et al., 2016). A fruta, os legumes e outros alimentos de origem vegetal são extremamente ricos em compostos bioativos disponíveis em formas livres ou conjugados solúveis (Acosta-Estrada et al., 2014).

Estes compostos biológicos podem ser divididos em 2 grandes grupos: metabolitos primários e metabolitos secundários. Os metabolitos primários - hidratos de carbono, aminoácidos, lípidos e ácidos nucleicos - são responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento dos organismos. Por outro lado, os metabolitos secundários são um grupo de compostos que, embora não sejam essenciais, conferem às plantas capacidade para sobreviver e ultrapassar diversos obstáculos (i.e. factores climáticos adversos, herbivoria), e permite-lhes interagir com o que as rodeia e adaptar-se (Lobo & Lourenço, 2007). A produção de metabolitos secundários diferentes, em espécies também diferentes, está principalmente associada à evolução seletiva e à necessidade particular de cada indivíduo e espécie.

A maioria dos compostos bioativos presentes nas plantas são efetivamente produzidos como metabolitos secundários. Todos os seres vivos processam estes metabolitos para sobreviver e subsistir (Azmir et al., 2013). São muitas vezes produzidos como resposta às alterações do meio envolvente; a mesma espécie de planta, crescendo em locais distintos poderá ter diferentes concentrações dos compostos, ou até mesmo, diferentes compostos na sua constituição (Santos et al., 2016).

Entre os vários metabolitos secundários, alguns têm efeitos nos sistemas biológicos e são, por isso, considerados bioativos, tendo efeitos farmacológicos ou tóxicos em humanos e animais (Azmir et al., 2013; Lobo & Lourenço, 2007).

Os compostos bioativos são moléculas que exercem um efeito benéfico nos organismos vivos, tecidos ou células. Estes estão presentes numa vasta variedade de alimentos (frutas, legumes, plantas silvestres, entre outros), e a sua ingestão proporciona a melhoria do funcionamento do organismo, no que concerne à prevenção e/ou tratamento de várias doenças (Komes et al., 2011). São vários os

compostos com potencial bioativo presentes nas plantas, tais como vitaminas, carotenoides (licopeno,  $\beta$ -caroteno e xantofilas) e polifenóis (Komes et al., 2011).

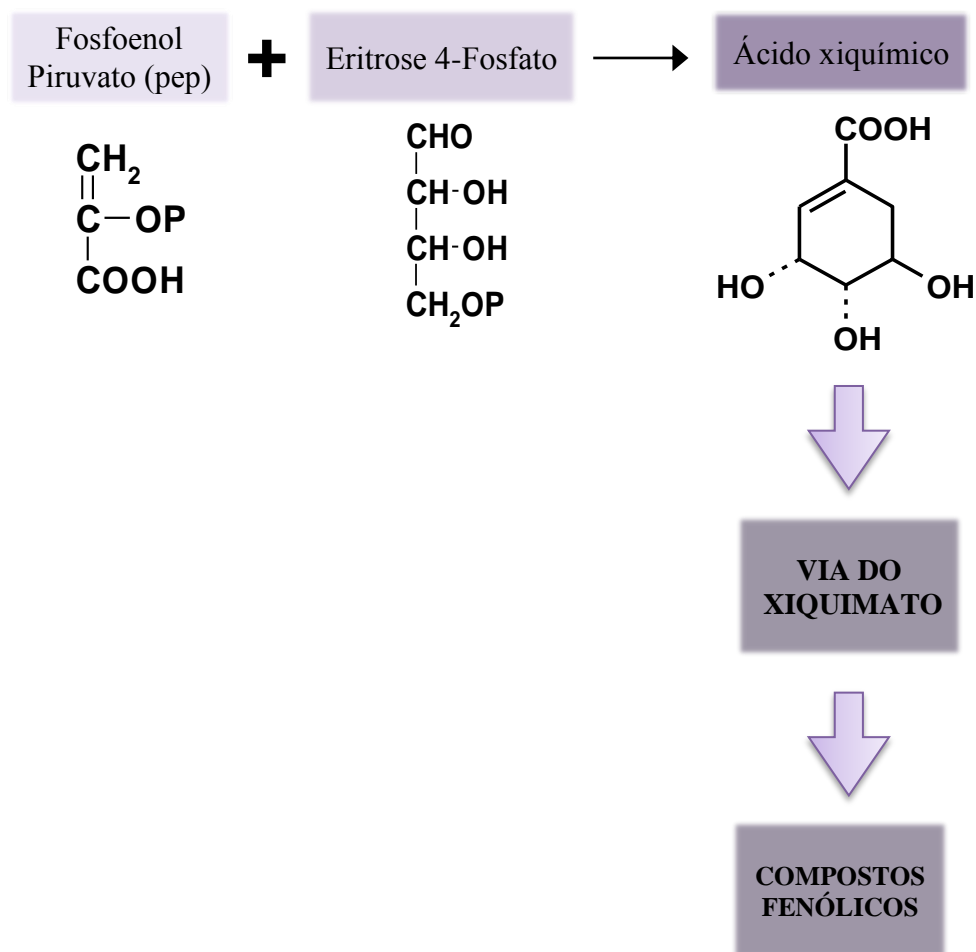
Pelo facto dos compostos fenólicos fazerem parte de um conjunto de plantas e atuarem benéficamente no metabolismo humano, torna-se relevante a sua análise, bem como o seu efeito e interação terapêutica, nomeadamente em doenças humanas (Barbosa-Pereira et al., 2014).

Os compostos fenólicos são uma grande classe de metabolitos secundários que têm como base um grupo hidroxilo ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático (sendo o mais simples denominado de fenol). Estes compostos são classificados como fenóis simples ou polifenóis, dependendo do número de unidades de fenol que têm na sua molécula e são sintetizados como resposta a pressões ecológicas, como radiação UV, ataques de agentes patogénicos e insetos ou feridas (Dias et al., 2016). Caracterizam-se, também, por serem um grupo muito heterogéneo de uma grande variedade de compostos, como ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e lenhina (Costa et al., 2013a,b; Port et al., 2013).

Os flavonóides são um dos grupos mais abundantes dentro dos compostos fenólicos, e encontram-se principalmente acumulados na epiderme de folhas e na pele de frutos, estando envolvidos na proteção contra os raios UV, na pigmentação dos frutos, na resistência contra doenças e indução da fixação de azoto (Carocho & Ferreira, 2013b).

O principal mecanismo de ação destes compostos passa pela sua capacidade de captar espécies reativas de oxigénio e de quelar iões metálicos, dispondo assim, de uma distinta ação antioxidante (Port et al., 2013).

São várias as vias metabólicas envolvidas na biossíntese de compostos fenólicos, no entanto, a via metabólica mais relevante é a do ácido xiquímico e por isso a formação do xiquimato é um passo crucial na formação destes compostos (**Figura 3**). Esta via é igualmente responsável pela formação de aminoácidos que, consequentemente, vão dar origem a proteínas essenciais à formação de tecidos nas plantas, competindo diretamente com a formação de compostos fenólicos (Costa et al., 2013b).



**Figura 3** - Via biossintética de compostos fenólicos (Lobo & Lourenço, 2007)

Ao longo dos anos, os compostos fenólicos têm sido largamente estudados em vários alimentos, nomeadamente em plantas, devido às suas capacidades terapêuticas em patologias relacionadas com o sistema nervoso e gastrointestinal (Costa et al., 2013a).

### 1.2.2. O caso particular da espécie *L. pedunculata*

O facto de muitas espécies de lavanda produzirem moléculas bioativas confere-lhes propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticolinesterases. A sua atividade antioxidante relaciona-se com a proteção eficiente das células contra o stresse oxidativo, atuando como captadores de radicais livres, agentes redutores ou dadores de prótons (Costa et al., 2013a; Zuzarte et al., 2009). Tendo em conta estas características, a espécie *L. pedunculata* tem sido utilizada popularmente como agente terapêutico com ação anti-séptica, para limpeza de feridas, recorrendo a lavagem das mesmas com extratos aquosos (infusões) deste material vegetal (Font Quer, 1999).

Tendo em conta estudos anteriores, foram vários os compostos fenólicos detetados na espécie de *L. pedunculata*, como se encontra esquematizado na **Tabela 1**, nomeadamente o ácido 4-*O*-cafeoilquínico, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, o ácido rosmarínico, a luteolina e a apigenina (Costa et al., 2013b).

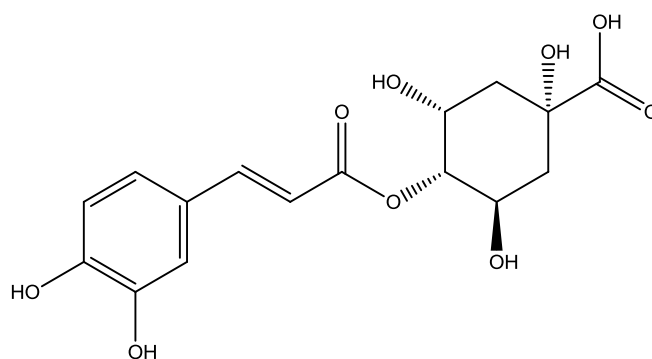
**Tabela 1.** Compostos bioativos de *L. pedunculata* descritos em trabalhos anteriores

Classe de compostos	Compostos bioativos	Referências
	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico, Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico, Ácido rosmarínico	Costa et al., 2013b
Ácidos Fenólicos	Ácido rosmarínico	Pereira et al., 2015
	Ácido rosmarínico, Ácido 6-hidroxicafeico	Pedersen, 2000
Flavonóides	Luteolina, Apigenina	Costa et al., 2013b

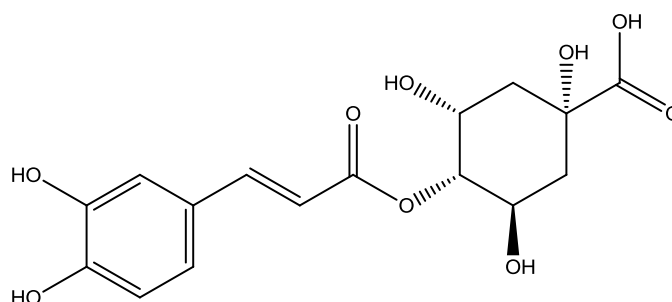
Fonte: Costa et al., 2013b

Os ácidos cafeoilquínicos detetados são habitualmente encontrados num vasto conjunto de plantas e pertencem à família dos ácidos clorogénicos. Em *L. pedunculata* têm sido identificados o ácido 4-*O*-cafeoilquínico (cuja denominação comum é ácido criptoclorogénico), representado na **Figura 4**, e o ácido 5-*O*-

cafeoilquínico (comumente designado de ácido clorogénico), representado na **Figura 5**. Estes dois compostos apresentam atividade microbiana, antioxidante, antitumoral e anti-histamínica, o que os torna interessantes para aplicação em diversos sectores industriais - farmacêutico, alimentar e cosmético (Bajko et al., 2016; Forino et al., 2015; Miyamae et al., 2011).

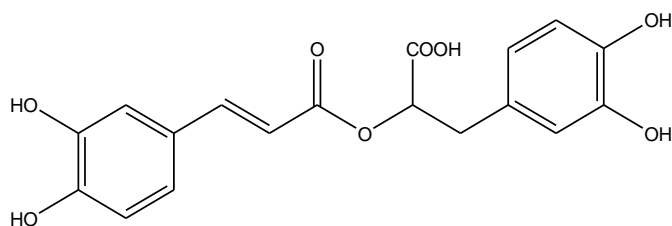


**Figura 4** - Estrutura química do ácido 4-*O*-cafeoilquínico



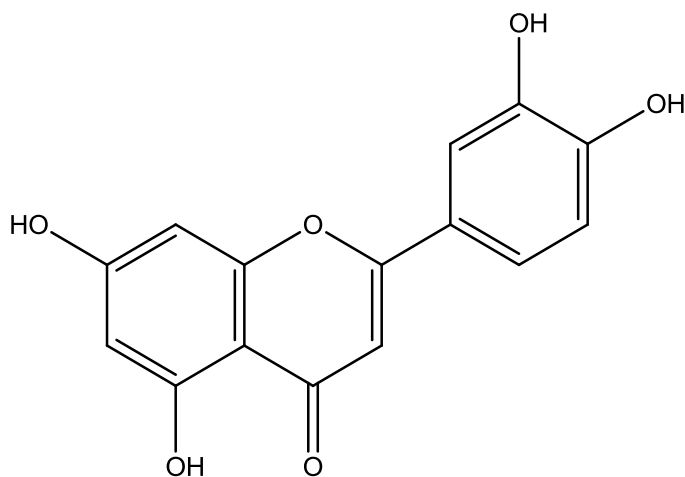
**Figura 5** - Estrutura química do ácido 5-*O*-cafeoilquínico

Outro dos compostos comumente identificado nesta espécie é o ácido rosmarínico (**Figura 6**). Este, para além de possuir propriedades antioxidantes e analgésicas, também demonstrou forte atividade anti-inflamatória em ratos, sendo por isso um potencial candidato a tratamentos de dores neuropáticas e diferentes distúrbios neurológicos associados à inflamação (Adomako-Bonsu et al., 2017; Nicolai et al., 2016; Rahbardar et al., 2017).



**Figura 6** - Estrutura química do ácido rosmarínico

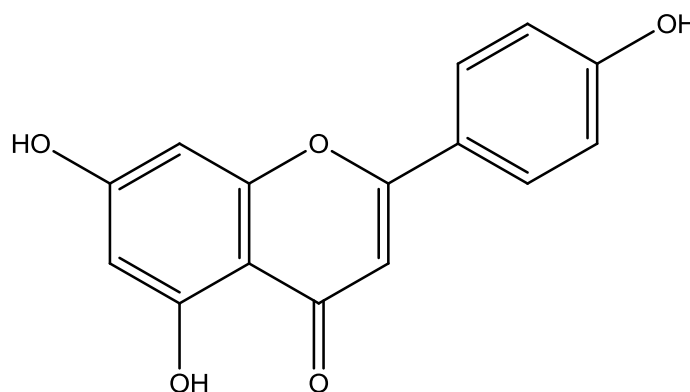
A luteolina representa outro dos fenóis geralmente identificados nesta espécie (**Figura 7**). É uma flavona presente em muitas frutas e vegetais, que possui potencial antioxidante demonstrado, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. As suas propriedades antioxidantes, anti-irritantes e anti-inflamatórias, quimiopreventivas e quimeoterapêuticas permite-lhe atuar na prevenção e/ou combate de algumas doenças, nomeadamente a nível cancerígeno (Kasala et al., 2016). Tendo em conta os estudos realizados, este composto pode ser utilizado em suplementos alimentares para o tratamento ou prevenção da degeneração macular relacionada com a idade (doença caracterizada por inflamação prolongada e excesso de stresse oxidativo) (Hyttý et al., 2017). A luteolina possui, ainda, atividade antiviral contra o vírus da encefalite japonesa (Género *Flavivirus*, família Flaviviridae transmitido pela picada de insectos) (Fan et al., 2016).



**Figura 7** - Estrutura química da luteolina

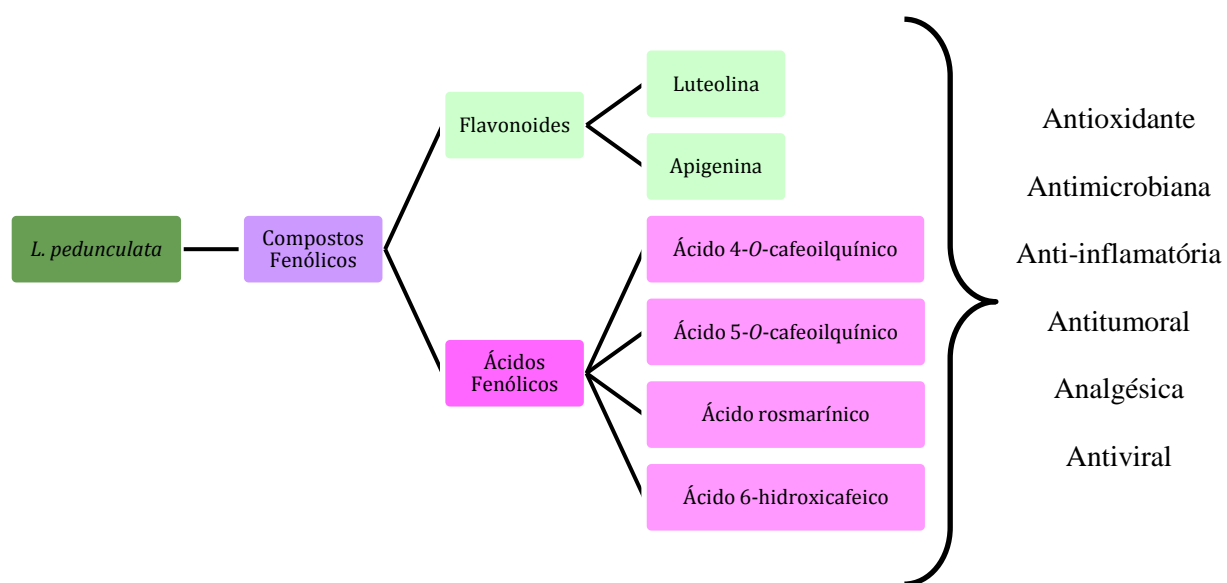
A apigenina, representada na **Figura 8**, é também um composto frequentemente detetado, apresentando atividade antitumoral, especialmente como quimiopreventivo

e grande potenciador da atividade quimioterapêutica do 5- fluorouracilo para o tratamento de cancro de mama em ratos (Gaballah et al, 2017). A apigenina para além do seu potencial antioxidante tem, também, a capacidade de induzir apoptose em linhas celulares tumorais de próstata, resistentes às terapêuticas convencionais (Ganai, 2017; Telange et al., 2016).



**Figura 8** - Estrutura química da apigenina

A espécie *L. pedunculata* tem também vindo a ser estudada de forma a caracterizar não só os seus compostos biológicos mas também as suas bioatividades, que se encontram esquematizadas na **Figura 9**.



**Figura 9** - Propriedades bioativas dos compostos fenólicos presentes na espécie *L. pedunculata*

Num estudo realizado por Ferreira et al. (2006) foram analisados extratos polares (água: etanol) de *L. pedunculata* que demonstraram uma capacidade antioxidante apreciável. De acordo com estes autores, a planta é utilizada, na medicina tradicional, na forma de infusão das inflorescências, administrada por via oral para tratamentos de ansiedade, insónias, anorexia, tosse e bronquites.

Costa et al. (2013a) avaliaram também o potencial antioxidante de *L. pedunculata* e demonstraram que esta espécie é uma fonte de compostos naturais capazes de prevenir doenças neurodegenerativas. A atividade antioxidante foi também confirmada por Pereira et al. (2015), que testaram extratos aquosos e metanólicos e concluíram que esta capacidade antioxidante parece correlacionar-se com o alto teor em polifenóis totais e flavonóides dos extratos. Esta espécie mostrou, não só potencial antioxidante e antibacteriano, mas também ausência de citotoxicidade. Assim, pelo facto destes extratos não apresentarem efeitos tóxicos ou diminuírem a viabilidade celular, o seu uso em formulações cosméticas não apresenta qualquer risco para a saúde humana, sendo, por isso, ideais para serem utilizados em cremes ou outros produtos anti-envelhecimento e para tratamentos cutâneos.

### **1.3. Mecanismos de ação dos compostos bioativos**

#### **1.3.1. Ação antioxidante**

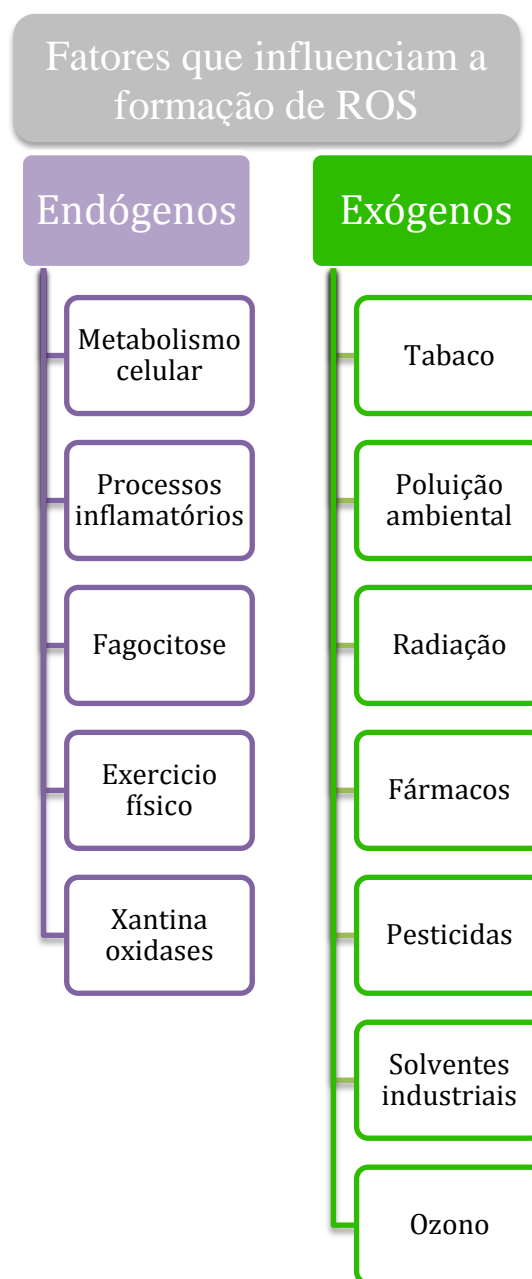
Uma vez que os antioxidantes naturais provenientes de plantas podem atuar através de vários mecanismos, torna-se importante estudá-los em pormenor e perceber a sua relação com diferentes bioatividades (Komes et al., 2011).

Uma grande parte dos antioxidantes são ácidos fenólicos e flavonóides, que exibem poder antioxidante, mas também anti-tumoral, anti-inflamatório, antiviral, entre outros (Komes et al., 2011). Estes compostos são capazes de remover espécies reactivas de oxigénio formadas nas células e, por isso, proteger o organismo de doenças (Bajpai et al., 2015).

Os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal do organismo, nomeadamente no metabolismo celular, em particular das mitocôndrias, mas também podem ser influenciados por processos inflamatórios, fagocitose, atividade de xantina oxidases, peroxissomas, exercício físico, entre outros. Existem

também fatores externos ao organismo como o tabaco, a poluição ambiental, a radiação, fármacos, pesticidas, solventes industriais e ozono, que ajudam a promover a produção de radicais livres (Prasad et al., 2017). Tanto os fatores endógenos como exógenos estão esquematizados na **Figura 10**.

Embora o oxigênio seja essencial à vida, as suas espécies reativas têm efeitos nefastos no nosso organismo. Ainda que o corpo humano tenha formas de defesa contra estes ataques, várias substâncias com efeitos antioxidantes têm vindo a ser estudadas, cada vez mais aprofundadamente, no sentido de encontrar fontes exógenas que auxiliem as defesas endógenas do organismo (Carocho & Ferreira, 2013a).

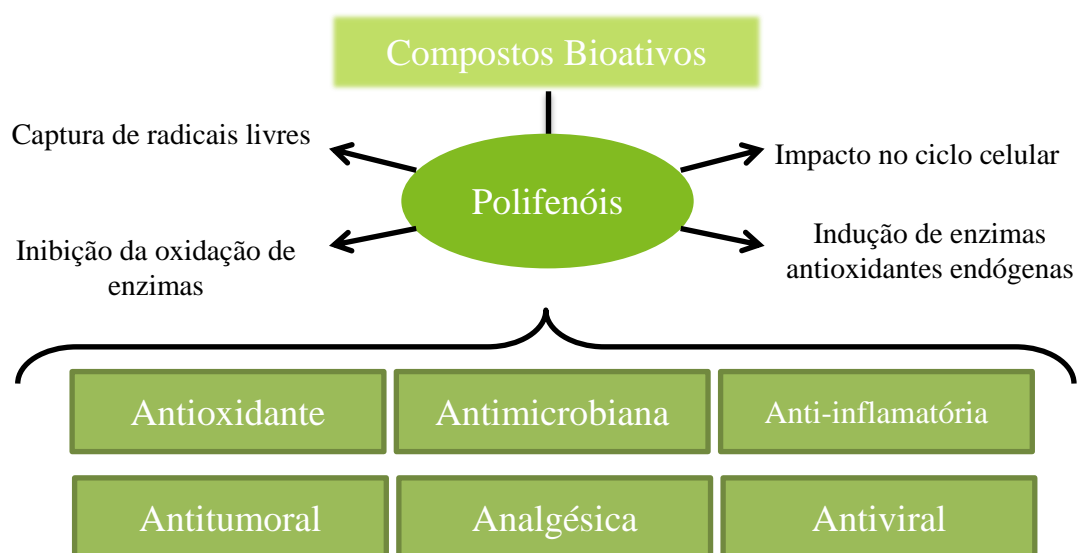


**Figura 10** - Fatores endógenos e exógenos que influenciam a produção de ROS no organismo (Barros et al., 2016)

O equilíbrio entre a produção e a neutralização destas espécies reactivas de oxigénio (ROS) pelos antioxidantes é bastante delicado, e se esse equilíbrio tender para o excesso de produção de ROS, a célula começa a sofrer consequências do stresse oxidativo (Akhtar et al., 2017).

Para além das ROS existem também espécies reactivas de azoto (RNS) e de enxofre (RSS) e os principais alvos destes radicais livres são proteínas, moléculas de DNA e RNA, açúcares e lípidos. Estima-se que cada célula humana seja alvo de ROS, em média, 150 vezes durante a sua vida, induzindo stresse oxidativo, que tem sido associado a doenças como cancro, doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos, hipertensão, problemas de fígado, inflamação, Diabetes *mellitus*, obesidade, autismo, Alzheimer, Parkinson, úlceras gástricas, entre outras (Carocho & Ferreira, 2013a).

Os antioxidantes são substâncias que retardam, previnem ou removem danos oxidativos, tendo também a capacidade de captar ROS, atuando indiretamente na regulação das defesas antioxidantes ou inibindo a produção de radicais livres (Miranda-Vizueté & Veal, 2017). Com a evolução humana, as defesas endógenas do nosso corpo contra os radicais livres, melhoraram gradualmente, permitindo manter um balanço entre estes e o stresse oxidativo e, embora tenhamos essas defesas, podemos ainda complementá-las pela inclusão de compostos bioativos na dieta através dos alimentos ou de suplementos alimentares (Carocho & Ferreira, 2013b).



**Figura 11** - Bioatividades de diferentes compostos (Kasala et al., 2016, Miyamae et al., 2011)

A ingestão de antioxidantes pode controlar significativamente a severidade de doenças crônicas, providenciando uma relação próxima entre a captação de radicais livres e o envolvimento das respostas endócrinas, como se encontra representado na **Figura 11**. Assim, a importância da inclusão de antioxidantes na dieta para a prevenção de doenças crônicas e uma melhoria da saúde geral tem sido grande alvo de pesquisa nas últimas décadas (Bajpai et al., 2015).

### 1.3.2. Ação antimicrobiana

A presença de compostos fenólicos em plantas está, também, associada a atividade antimicrobiana. De acordo com alguns autores, este potencial antimicrobiano está relacionado com o alto teor em flavonóides e taninos condensados, presentes em algumas espécies (Belhadj et al., 2016).

A atividade antimicrobiana já foi estudada numa grande variedade de plantas, que demonstraram ser portadoras de compostos fenólicos eficazes contra microrganismos patogênicos como *Candida* spp., *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp.. A utilização de antibióticos para controlar estes microrganismos pode desencadear respostas negativas no organismo humano nomeadamente hipersensibilidade, imunossupressão, reações alérgicas, má absorção de medicamentos e aumento de resistência a patógenos como *Staphylococcus* e *Enterococci* (Ghimire et al., 2017). Por essa razão, a aplicação de antimicrobianos naturais para utilização como conservantes, especialmente na indústria alimentar, tem vindo a receber cada vez mais atenção devido à crescente preocupação dos consumidores em consumir produtos mais naturais (Cetin-Karaca et al., 2015).

Os antifúngicos e antibióticos têm sido medicamentos largamente prescritos nas últimas décadas e o seu extenso uso, devido a infeções recorrentes, tem levado ao aparecimento de microrganismos multirresistentes aos antibióticos e antifúngicos convencionais. O desenvolvimento de antibióticos é um tema bastante estudado mas, com o seu uso indiscriminado sem se saber exatamente qual o agente infeccioso, não só em humanos mas também em animais, têm aparecido cada vez mais microrganismos com mutações que os tornam resistentes aos medicamentos anteriores. Novos medicamentos sintéticos têm vindo a ser eficazes contra a maioria destas infeções, mas o problema dos seus efeitos secundários e toxicidade mantêm-se, pois não atacam apenas os microrganismos responsáveis pela infeção mas também a

flora saudável dos intestinos, provocando por vezes várias complicações (Martins et al., 2014)

À medida que se foram verificando estes problemas, o interesse global nas propriedades antimicrobianas dos compostos fenólicos tem vindo a aumentar, dando-lhes um reconhecimento acrescido, visto que apesar de serem eficazes, não possuem efeitos secundários ou toxicidade quando utilizados corretamente. Estas moléculas bioativas apresentam um amplo espectro clínico graças às suas reações de sinergia, antagonismo e polivalência, que permitem o desaparecimento ou/e neutralização dos seus possíveis efeitos secundários e toxicidade (Martins et al., 2015).

### **1.3.3. Ação anti-tumoral**

Tem-se observado um aumento significativo da prevalência de doenças crónicas a nível mundial, conduzindo, conseqüentemente, ao aumento dos custos de cuidados de saúde. Tal facto provoca um interesse acrescido entre os investigadores e o público em geral para alimentos com múltiplos benefícios para a saúde, incluindo a diminuição do risco de cancro e auxílio no seu tratamento (Kaefer & Milner, 2008).

Hoje em dia, mais de 60% dos fármacos que intervêm no tratamento do cancro provêm de compostos naturais ou derivados dos mesmos, tornando estes compostos bioativos, cada vez mais interessantes para a indústria farmacêutica (Martins et al., 2015). Tendo em conta estudos anteriores, está comprovado que os extratos de plantas podem apresentar efeitos antitumorais em linhas celulares, sendo os compostos fenólicos (que englobam cerca de 8000 estruturas diferentes no reino das plantas) muitas vezes responsáveis por estas propriedades (Carocho & Ferreira, 2013a).

Até à data, centenas de compostos têm sido identificados como potenciais inibidores de doenças oncológicas e também quimiopreventivos, vários dos quais são ingredientes ativos em ervas e especiarias, bem como frutos e outros vegetais (Kaefer & Milner, 2008).

Os polifenóis são uma das principais classes de compostos orgânicos resultantes do metabolismo secundário de plantas, com importantes propriedades comprovadas tanto *in vitro* como *in vivo*, tendo sido identificada capacidade de inibição de crescimento de vários tipos de células tumorais (como por exemplo de linhas celulares de cancro da próstata, fígado, mama, cervical e pulmão) e também a capacidade de apoptose das mesmas (Bernal et al., 2011; Carocho & Ferreira, 2013a).

### **1.3.4. Absorção e metabolismo**

São várias as vias de absorção de compostos bioativos no trato gastrointestinal, sendo que microrganismos, enzimas e até transportadores de glucose estão envolvidos no seu transporte. As ligações fenólicas são parcialmente destruídas no lúmen gastrointestinal, de forma a potencializar a absorção e metabolização e extrair o máximo de benefícios (Acosta-Estrada et al., 2014).

Uma das formas de metabolização ocorre graças à microflora existente no cólon, onde se dá a fermentação enzimática devido à libertação das enzimas esterase e xilanase (Acosta-Estrada, et al., 2014). Existem compostos bioativos insolúveis, cujas ligações sobrevivem à digestão no estômago e no intestino e alcançam o cólon, já que as paredes celulares fibrosas são de difícil digestão. Deste modo, alguns fenóis simples conseguem ainda ser transportados através da parede intestinal como glicósidos por transportadores de açúcar (Acosta-Estrada, et al., 2014).

O consumo de compostos livres ou com ligações fortes vai permitir obter diferentes benefícios para a saúde. Por exemplo, a ingestão de formas com ligações fortes tem uma ação protetora contra cancro no cólon, uma vez que são mais dificilmente absorvidos e se mantêm por mais tempo nesta zona (Acosta-Estrada, et al., 2014).

### **1.4. Deteção e determinação de moléculas bioativas**

Nas últimas décadas, tem sido crescente o interesse em compostos bioativos o que conduziu a diversos estudos, nomeadamente no âmbito da sua caracterização. É de máxima relevância analisar o seu comportamento, mas também, determinar as relações entre as moléculas encontradas, a sua estrutura química e as atividades que desempenham (Barros et al., 2009).

Ao longo dos últimos anos, várias técnicas de análise de moléculas bioativas têm sido desenvolvidas em diferentes matrizes, a fim de analisar as suas atividades, tanto em alimentos, como em sistemas biológicos. A espectroscopia, eletroquímica e a quimioluminescência são algumas das técnicas que permitem avaliar a atividade antioxidante, conferida por diferentes compostos, presentes nas matrizes vegetais. Contudo, estas não permitem identificar exatamente qual a molécula individual responsável por este potencial (Carocho & Ferreira, 2013b).

Para tal, e com o propósito de corresponder de forma completa aos objetivos dos estudos, outras técnicas de determinação de moléculas individuais têm vindo a ser otimizadas. A técnica de deteção mais comum consiste na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a diferentes dispositivos de deteção como o MS (espectroscopia de massa), DAD (detetor de foto díodos), UV-Vis (ultravioleta – visível) e fluorescência (Gouveia-Figueira & Castilho, 2015).

A deteção por HPLC consiste numa técnica versátil e amplamente utilizada para a separação de compostos. Na maioria dos casos, a separação é efetuada em fase reversa (colunas C18), utilizando um sistema de solvente binário, que abrange um solvente polar aquoso e um solvente orgânico menos polar. Para tal, são, frequentemente, utilizados acetonitrilo e metanol (Barros et al., 2009; Zhang et al., 2013; Oroian & Escriche, 2015).

A determinação e avaliação dos compostos é, usualmente, feita através de métodos clássicos de deteção UV-Vis a um ou vários comprimentos de onda. No entanto, outros métodos como MS, RMN (espectroscopia de ressonância magnética nuclear), fluorometria ou eletroquímica podem ser utilizados, dependendo das propriedades químicas das moléculas alvo e também dos objetivos da análise (Barros et al., 2009).

Relativamente à espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) consiste na absorção ou reflexão na região do espectro ultravioleta e visível, significando isto que a luz utilizada é nos comprimentos de onda visíveis e adjacentes. A absorção ou reflexão no intervalo do visível altera a cor dos compostos envolvidos. Nesta região do espectro eletromagnético, os átomos e moléculas sofrem várias transições eletrónicas. Um espectrofotómetro de UV-Vis pode ser utilizado como detetor de HPLC. A presença dos analítos vai originar uma resposta proporcional à concentração dos mesmos na amostra. Para resultados precisos, a resposta do instrumento ao analíto na amostra desconhecida deve ser comparada com a resposta de um padrão (Ciu et al., 2014). O uso desta tecnologia é, muitas vezes, associada a um sistema de HPLC em que é utilizado um sistema de deteção de díodos (DAD), onde uma lâmpada de tungsténio emite luz visível enquanto uma lâmpada de deutério emite, para além da luz visível, luz ultravioleta. O feixe de luz policromática divide-se em diferentes comprimentos de onda e a intensidade de cada um é medida por uma matriz ou foto díodo. Este método permite medir simultaneamente todos os comprimentos de onda disponíveis, e os espectros podem ser obtidos para múltiplos comprimentos de onda

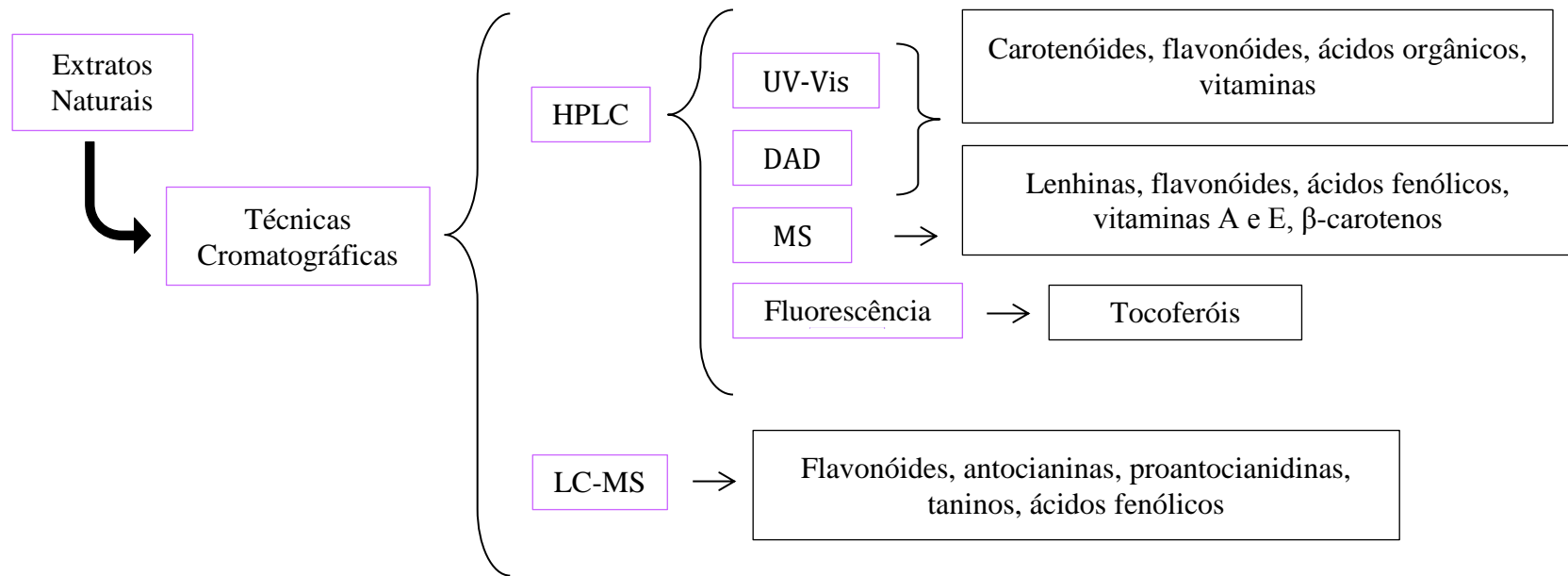
ao mesmo tempo por diferentes matrizes de díodos. Cada substância pode depois ser identificada pelo seu espectro, o que torna o DAD uma técnica altamente seletiva (Ciu et al., 2014). Deste modo, a detecção UV-Vis ou detecção de díodos (DAD) são, normalmente, utilizadas com o objetivo de determinar carotenóides e compostos fenólicos, respetivamente (Barros et al., 2009; Zhang et al., 2013; Oroian e Escriche, 2015).

A espectrometria de massas (MS) é uma poderosa técnica analítica utilizada para identificar compostos desconhecidos de uma amostra ou ainda para elucidar a estrutura e propriedades químicas de diferentes moléculas. O processo completo envolve a conversão da amostra em iões gasosos, com ou sem fragmentação, que são posteriormente caracterizados com base na sua relação massa/carga e abundâncias relativas. Assim, esta técnica estuda o efeito de energia ionizante em moléculas (Atkins & Jones, 2010). De outro modo, a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) permite detetar núcleos atómicos e permite, também, saber em que ambiente é que estes se encontram dentro da molécula. A amostra do composto é dissolvida em solvente apropriado (como Clorofórmio Deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou Água Deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ )) e colocada num campo magnético forte. Todos os núcleos com spin ficam com diferentes níveis de energia e o número de diferentes níveis de energia depende dos valores de spin, sendo que para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , numa amostra de RMN, existem dois níveis de energia. A amostra é irradiada com curtas pulsações de radiofrequências que perturbam o equilíbrio entre os dois níveis de energia: alguns núcleos absorvem a energia e são promovidos para níveis de energia superiores, sendo que, posteriormente a energia devolvida é detetada quando os núcleos voltam ao seu estado de energia mais baixo, usando um recetor de ondas rádio (Clayden et al., 2001). Após a análise da amostra, os resultados são observados num gráfico de intensidade (nº de absorções) por frequência. No entanto, na observação de um espectro de RMN a escala não surge em unidades de campo magnético, mas sim em ppm (partes por milhão) para ser possível comparar diferentes espectros de máquinas com campos magnéticos distintos e em diferentes ambientes. Dessa forma, os sinais são marcados de acordo com a sua distância a uma amostra de referência. O composto mais frequentemente utilizado como referência é o TMS (Tetrametilsilano, 0 ppm), que é mais eletropositivo que o carbono e, por isso, a sua frequência de ressonância é inferior à da maioria dos compostos orgânicos não ficando no meio do espectro (Clayden et al., 2001).

Na técnica de fluorometria é utilizado um espectrofluorómetro. Este consiste num aparelho que aproveita as propriedades fluorescentes de alguns compostos de forma a providenciar informação relativa à concentração e ambiente químico da amostra. Este método é utilizado em particular para análises que necessitam de alta sensibilidade e seletividade, especialmente quando o analíto não absorve luz ultravioleta. A fluorescência é vastamente utilizada em campos alimentares, ambientais e farmacêuticos, especialmente com amostras contendo altos níveis de impurezas (Scott, 1986).

A deteção de HPLC-fluorescência tem um importante número de benefícios, como alta sensibilidade, alta seletividade e reprodutibilidade. Com a capacidade de identificar e quantificar compostos alvo em concentrações muito baixas, tornando-se um ótimo complemento para a cromatografia líquida em aplicações que requeiram análises eficientes e fidedignas (Scott, 1986).

Outra das técnicas é o LC-MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa), que atualmente se tornou numa técnica amplamente utilizada para a identificação de moléculas provenientes de matrizes naturais, tais como vários compostos fenólicos, nomeadamente antocianinas, proantocianidinas, flavonoides e ácidos fenólicos (Bursal et al., 2013; Flamini, 2003). Esta tecnologia envolve o uso de um aparelho de HPLC, que separa inicialmente os vários componentes individuais de uma mistura, sendo estes de seguida ionizados e separados com base no seu índice a massa/carga elétrica num aparelho de MS. Os iões separados, são depois direcionados, para um detetor para que possam ser posteriormente quantificados e identificados. As principais vantagens desta técnica consistem na sua sensibilidade, especificidade e precisão pois a análise é feita a nível molecular (Pitt, 2009).



**Figura 12** – Técnicas utilizadas para a detecção, quantificação e elucidção de moléculas bioativas (Pereira, 2016).



## 1.5. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a bioatividade de diferentes amostras de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., cultivadas no Banco Português de Germoplasma (BPGV) a partir de sementes recolhidas em exemplares silvestres, de populações naturais de diferentes regiões de Portugal, e conservadas *ex-situ* no BPGV.

Pretendeu-se ainda estabelecer uma eventual relação entre a composição fenólica e a proveniência das diferentes populações/amostras.

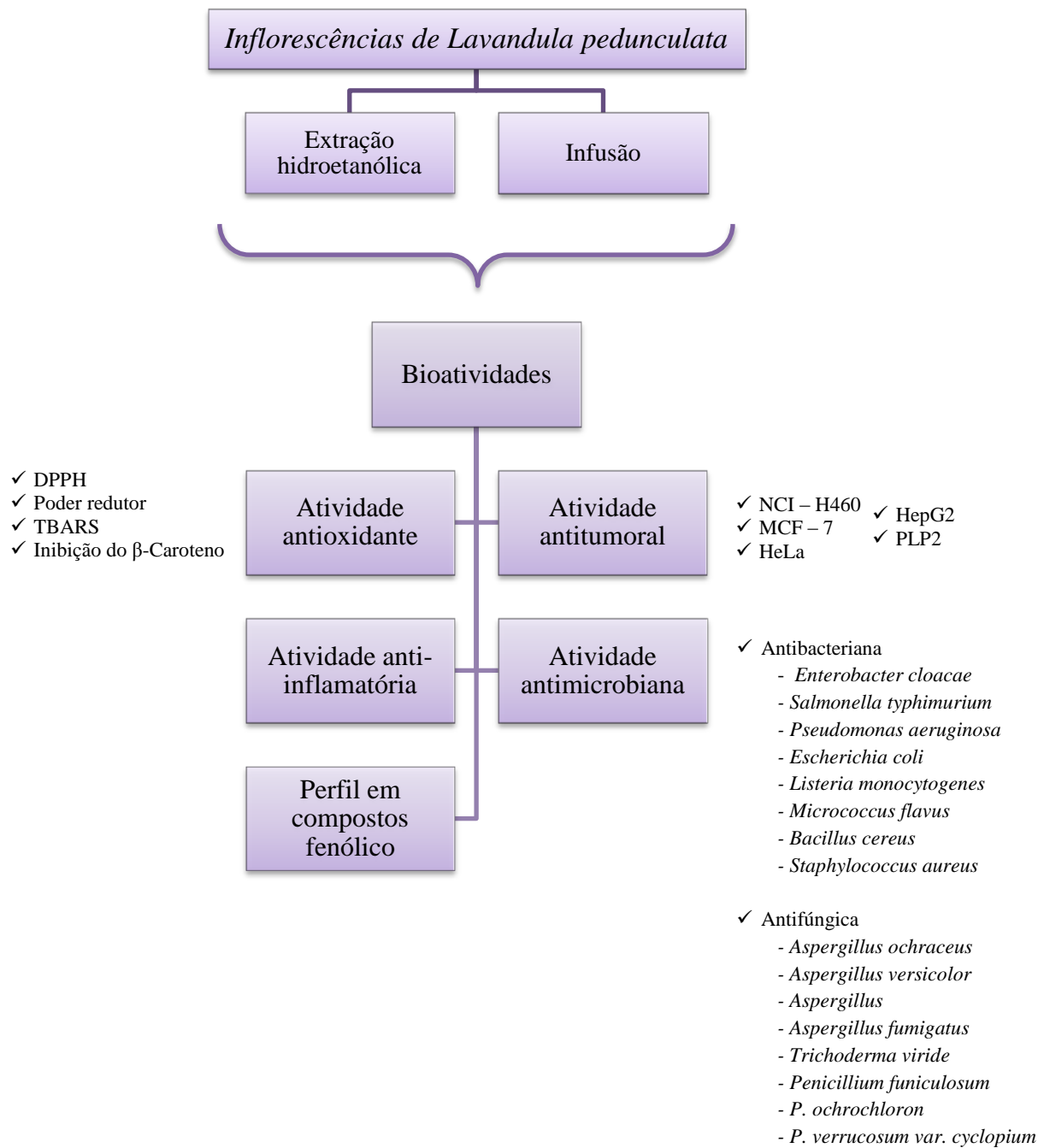
Para tal o estudo desenvolveu-se de acordo com as seguintes etapas:

i) Confirmação da identificação botânica de treze amostras de *L. pedunculata* multiplicadas pelo BPGV.

ii) Determinação de compostos fenólicos presentes nas espécies silvestres, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detetor de arranjo de díodos (DAD) e a um espectrómetro de massa (MS).

iii) Avaliação de diferentes propriedades bioativas:

- Potencial antioxidante por diferentes ensaios *in vitro*: atividade captadora de radicais livres (ensaio DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), poder redutor (ensaios Ferricianeto/azul da Prússia e *Folin Ciocalteu*), e inibição da peroxidação lipídica (ensaio  $\beta$ -caroteno/linoleato e TBARS- espécies reativas do ácido tiobarbitúrico- em homogeneizados cerebrais).
- Potencial citotóxico em linhas celulares tumorais humanas (carcinoma hepatocelular - HepG2, cervical - HeLa, pulmão - NCI-H460 e mama - MCF-7) e em culturas primárias de células de fígado de porco (não tumorais- PLP2), pelo método da sulforrodamina B (SRB).
- Atividade antimicrobiana: atividade antibacteriana avaliada pelo método de microdiluição com o corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólio) e atividade antifúngica pelo método de diluições sucessivas.
- Atividade anti-inflamatória em células macrófagas RAW 264.7 de rato.



**Figura 13** – Esquematização do plano de trabalho

## **2. Material e Métodos**



## 2.1. Amostras

O material de *L. pedunculata* ensaiado corresponde à inflorescência e a cerca de 10 cm do respetivo pedúnculo, medidos desde o ponto de inserção na espiga, em direção à base da planta.

Este material vegetal foi cedido pelo Banco Português de Germoplasma (BPGV) e resultou de ensaios de multiplicação e regeneração de 13 acessos (amostras de semente) de *L. pedunculata* conservadas no BPGV.

Os acessos estudados são originários de várias regiões de Portugal (ver Tabela 2) e a sua recolha corresponde ao resultado de missões de colheita de germoplasma silvestre levadas a cabo pelo BPGV.

No âmbito destas missões, as sementes de *L. pedunculata* foram colhidas, limpas e mantidas por técnicas de conservação *ex-situ* nas instalações do BPGV.

Em 2013, as sementes destes acessos foram multiplicadas e regeneradas nos campos do BPGV, localizados na Quinta de S. José, Merelim, Braga.

A instalação e o acompanhamento do ensaio de campo incluiu as seguintes etapas e tratamentos:

- Sementeira a 17 de abril de 2013;
- Transplante para local definitivo a 9 de outubro de 2013;
- Rega gota a gota, duas vezes por semana, entre junho e setembro;
- Recurso a soluções de agricultura biológica, como sabão e óleo de chorume de urtigas, como fertilizante natural e para a proteção sanitária das plantas;
- Recolha de material para extração de óleos essenciais no primeiro ano do ensaio de campo, corte das inflorescências e pedúnculos, realizado no período de floração, em maio de 2014;
- Recolha do material para análise química e bioatividade no segundo ano do ensaio de campo, corte das inflorescências e pedúnculos, executado no estágio de floração, a 21 de abril de 2015.

Apesar das amostras ensaiadas terem diferentes proveniências, a circunstância de terem sido cultivadas sob as mesmas condições edafo-climáticas nas parcelas do BPGV permite eliminar este potencial fator de variação da sua composição química.

Realizada a confirmação botânica das treze amostras de *L. pedunculata*, o material correspondente a cada uma das amostras (inflorescências e pedúnculos de cada um dos treze acessos) foi liofilizado (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA), reduzido a um pó fino (20 mesh) e misturado para obter uma amostra homogénea.

**Tabela 2.** Informação geográfica acerca das amostras de *L. pedunculata* estudadas.

<b>Amostras</b>	<b>Número de Acesso BPGV</b>	<b>Origem</b>	<b>Dados do Site Altitude (m)</b>
1	10378	Marvão. Portalegre	333
2	09845	Évora	198
3	09838	Vila Viçosa. Évora	420
4	11290	Bragança	810
5	10372	Arronches. Portalegre	375
6	10400	Portalegre	375
7	10418	Nisa. Portalegre	291
8	10387	Ponte de Sôr. Portalegre	175
9	10391	Évora	155
10	10412	Castelo de Vide. Portalegre	358
11	10369	Elvas. Portalegre	267
12	10379	Castelo de Vide. Portalegre	353
13	11308	Bragança	667

Mais informação em Lopes & Barata (2017); Acessos de dados de passaporte documentados estão disponíveis no banco de dados Grin-Global (<http://bpgv.iniav.pt>).

## 2.2. Padrões e Reagentes

Atividade antioxidante: o padrão trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico),  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). De outro modo, o 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi obtido na empresa Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA) e o Tween 80 na empresa Panreac (Barcelona, Espanha). Todos os outros solventes e reagentes foram comprados a revendedores científicos.

Análise citotóxica: O sêrum fetal de bovino (FBS), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a trypsin-EDTA (ácido etilenediaminatetraacético), a solução de penicilina/streptomina (100 U/mL e 100 mg/mL), o RPMI-1640 (meio Roswell Park Memorial Institute) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (*Dulbecco Modified Eagle*)) foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, UT, USA). O ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforodamina B (SRB), azul de trypan, ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A água foi tratada através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

Compostos fenólicos: O solvente acetonitrilo 99,9% de grau HPLC foi fornecido pela Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Os padrões dos compostos fenólicos (apigenina-6-C-glucósido, ácido caféico, ácido clorogénico, hesperetina, luteolina-7-O-glucósido, naringenina, quercetina-3-O-rutinósido e ácido rosmarínico) foram adquiridos na Extrasyntheses (Genay Cedex, França).

Atividade anti-inflamatória: As células RAW 264.7 foram compradas à ECACC ("European Collection of Animal Cell Culture") (Salisbury, UK) e o DMEM à Hyclone (Logan, Utah, USA). O Griess Reagent System Kit foi adquirido da Promega (Madison, WI, USA).

Atividade antimicrobiana: Mueller-Hinton agar (MH) e o malte agar (MA) foram obtidos no Institute of Immunology and Virology, Torlak (Belgrade, Serbia).

## **2.3. Avaliação do potencial bioativo**

### 2.3.1. Preparação dos extratos

#### 2.3.1.1. Extrato hidroetanólico

Os extratos foram obtidos a partir do material vegetal seco. Adicionou-se 30 mL de uma solução EtOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) a 1g de amostra e colocou-se a macerar durante 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi filtrado utilizando papel Whatman N°4, e o resíduo da planta foi re-extraído adicionando, novamente, 30 mL de EtOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). A fração etanólica do extrato foi evaporada a 40 °C (rotary evaporator Büchi R-210, Flawil, Switzerland), ficando a fração aquosa que posteriormente foi liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA). O extrato liofilizado foi redissolvido numa concentração de 10 mg/mL em EtOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) para os ensaios de atividade antioxidante (secção 2.3.2), e determinação do perfil fenólico (secção 2.3.6) e em água destilada numa concentração de 8 mg/mL para a avaliação do potencial citotóxico (secção 2.3.3), anti-inflamatório (secção 2.3.4), antimicrobiano (secção 2.3.5).

#### 2.3.1.2. Extrato aquoso

Os extratos aquosos foram obtidos a partir de infusões. Estas foram preparadas a partir do material vegetal seco. A 2 g de amostra, foram adicionados 200 mL de água a 100 °C, ficando em repouso durante 5 minutos. Posteriormente foram filtradas, congeladas e liofilizadas. O extrato obtido foi redissolvido em água destilada com uma concentração de 10 mg/mL para os ensaios de atividade antioxidante, antimicrobiana, e determinação do perfil fenólico, e de 8 mg/mL para os ensaios de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória.

## **2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante**

### 2.3.2.1. Avaliação da atividade captadora de radicais DPPH

Para esta técnica foram utilizadas microplacas de 96 poços, nas quais foram colocados em cada poço soluções de extrato aquoso ou hidroetanólico (30 µL) de *L.*

*pedunculata* com diferentes concentrações e adicionada a solução metanólica de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L; 270  $\mu$ L). As placas foram deixadas em repouso durante 60 minutos ao abrigo da luz, de forma a estabilizar os valores de absorvância, sendo que a redução do radical DPPH é avaliada pela medição da absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800).

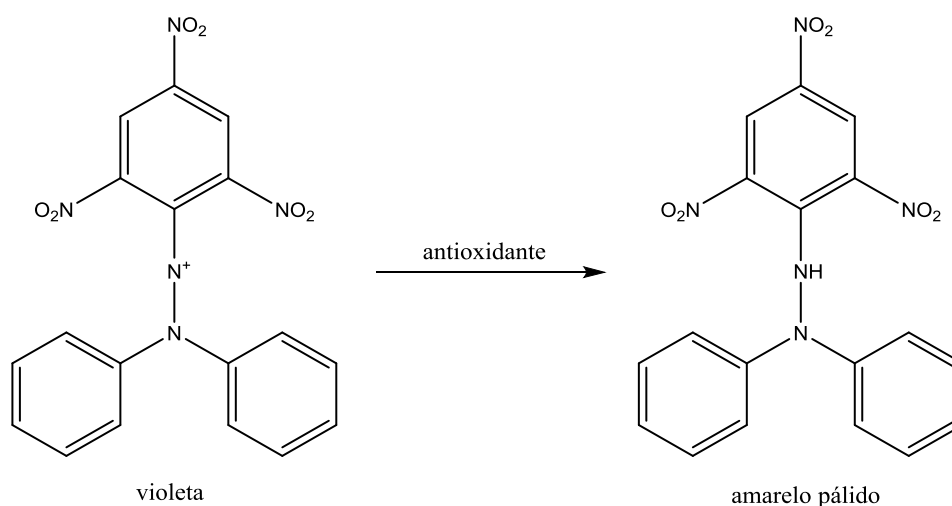
A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada usando a equação:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100,$$

onde  $A_{\text{S}}$  é a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato correspondente a 50% de atividade captadora de radicais ( $\text{EC}_{50}$ ) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem de RSA em função da concentração do extrato. O padrão utilizado neste ensaio laboratorial foi o Trolox (Barros et al., 2010).

Fundamento teórico:

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de azoto estável, que se encontra disponível comercialmente, apresentando uma cor púrpura intensa e reage com compostos que tenham a capacidade de doar um átomo de hidrogénio. Este método baseia-se na captação do  $\text{DPPH}^{\bullet}$  através da adição de uma espécie ou um radical antioxidante que vai descolorar a solução de DPPH (Antolovich et al., 2002; Amarowicz et al., 2004). Ocorre, então, a formação da correspondente hidrazina (**Figura 14**) que apresenta uma cor amarela pálida, e a absorvância a 517 nm vai diminuir. A atividade captadora de radicais (RSA) é então calculada como percentagem da descoloração da solução de DPPH.



**Figura 14** – Formação da hidrazina de cor amarela pálido

#### 2.3.2.2. Avaliação do poder redutor

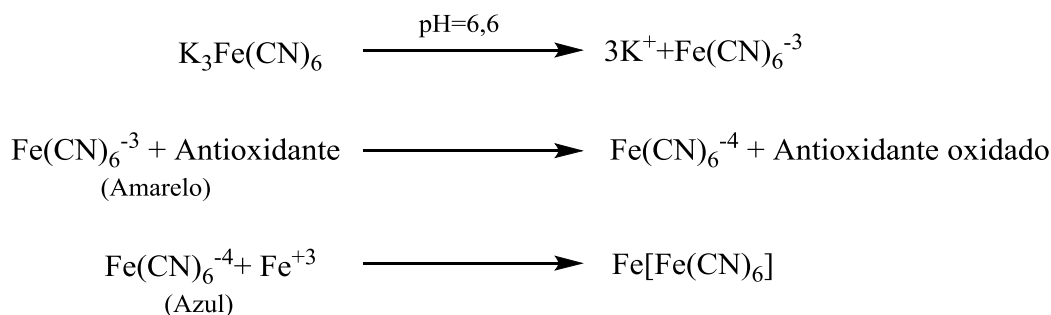
Neste ensaio foi utilizado o leitor de microplacas anteriormente descrito. O ensaio foi efetuado em placas de 48 poços. Foram colocadas diferentes concentrações de extrato (hidroetanólico ou aquoso) (0,5 mL), tampão fosfato de sódio (200 mmol/l; pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v; 0,5 mL) em eppendorfs que foram incubados a 50 °C durante 20 min, adicionando em seguida ácido tricloroacético (10% w/v; 0,5 mL). A solução (0,8 mL) foi então colocada em microplacas, onde foi, ainda, adicionada água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v; 0,16 mL). Seguidamente a absorvância foi medida a 690 nm.

A concentração de extrato que fornece 0,5 de absorvância (EC<sub>50</sub> - 50% do valor máximo de absorvância no qual se aplica a Lei de Lambert-Beer) foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Foi usado o Trolox como padrão (Barros et al., 2010).

#### Fundamento teórico:

Este ensaio permite medir a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto [FeCl<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] à forma ferrosa Fe(II) (Berker, 2007). Assim, dependendo do poder redutor dos compostos, a cor amarela da solução do ensaio modifica-se para diferentes tons de verde ou azul, e pode ser medida espectrofotometricamente, a 690 nm.

A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pelas seguintes equações:



### 2.3.2.3. Avaliação da inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno

Preparou-se inicialmente uma solução de  $\beta$ -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL), pipetando-se, posteriormente, 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Após a evaporação de clorofórmio a 40 °C no evaporador rotativo, adicionou-se emulsificante Tween 80 (400 mg), ácido linoleico (40 mg) e água destilada (100 mL), e agitou-se vigorosamente.

Foram colocados 4,8 mL da solução preparada anteriormente em tubos de ensaio contendo as soluções de diferentes concentrações de extrato (0,2 mL) e fez-se a leitura em espectrofotômetro (Specord 250, AnalytikJena). Em seguida os tubos foram encubados a 50 °C, com agitação de 50 rpm, durante 2 horas. Após duas horas os tubos foram retirados do banho e voltou a ser medida a absorvância.

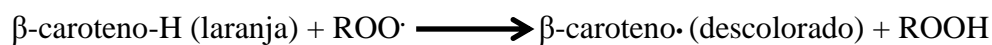
A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Inibição da descoloração do } \beta \text{ caroteno} = \frac{\text{Conteúdo de } \beta \text{ caroteno após } 2h}{\text{Conteúdo inicial de } \beta \text{ caroteno}} \times 100$$

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno em função da concentração de extrato. O padrão utilizado foi o Trolox (Barros et al., 2010).

Fundamento teórico:

O ensaio de descoloração do  $\beta$ -caroteno é baseado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno e avalia a atividade de inibição de radicais livres que são gerados durante a peroxidação do ácido linoleico; a absorvância é medida a 470 nm. O mecanismo de reação envolve a descoloração dos carotenóides através da oxidação induzida pelo calor. Essa descoloração pode ser inibida ou diminuída pela adição de antioxidantes contidos na amostra (Amarowicz et al., 2004; Kaur et al., 2006):



#### 2.3.2.4. Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

Para a realização desta metodologia foi utilizada uma porção de cérebro de porco, à qual foi adicionado tampão tris-HCl (20mM, pH=7,4), homogeneizado e centrifugado (10 min; 3500 g).

Aos extratos de diferentes concentrações, contido nos tubos de ensaio (200  $\mu\text{L}$ ), foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico, 100  $\mu\text{L}$  de sulfato de ferro e 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da suspensão de cérebro.

Os tubos foram colocados num banho a 37 °C durante 1 hora, ao fim da qual foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (28%) e 380  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (2%).

Seguidamente, os tubos foram encubados a 80 °C, durante 20 minutos, após os quais foram centrifugados e medida a absorvância do sobrenadante a 532 nm (Barros et al., 2010).

Fundamento teórico:

A peroxidação lipídica pode ser determinada através da reação entre os produtos de oxidação e o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo compostos de cor

rosa, normalmente denominados como espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Um dos produtos utilizados mais frequentemente como biomarcador de peroxidações lipídicas é o malodialdeído (MDA) que quando se associa com o TBA na presença de  $H^+$  formam um complexo MDA-TBA, que apresenta uma tonalidade rosa. Nesta metodologia, a oxidação de uma preparação rica em lípidos, é induzida pela adição de um íon metálico (ferro ou cobre) e a extensão da reação com o TBA é determinada pela capacidade que os antioxidantes presentes na amostra têm de parar o processo de oxidação, inibindo assim a formação do complexo de coloração rosa, representado na **Figura 15** (Gutteridge, 1995; Ng et al., 2000; Kaur & Geetha, 2006).

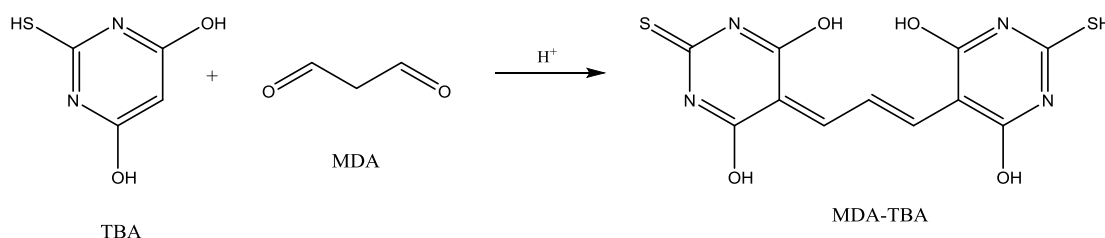


Figura 15 – Formação do Complexo MDA-TBA

### 2.3.3. Avaliação da atividade antitumoral

O efeito dos extratos no crescimento de linhas celulares tumorais humanas foi avaliado através do ensaio da Sulfarodamina B (SRB), a fim de determinar a inibição do crescimento celular. Para tal foram utilizadas 4 linhas celulares tumorais: MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular).

As células foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% heat-inactivated FBS (MCF-7 e NCI-H460) ou em DMEM suplementado com 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100  $\mu$ g/mL streptomomicina (células HeLa e HepG2), a 37 °C numa incubadora com ar humidificado e 5%  $CO_2$ .

Cada linha celular foi preparada à densidade apropriada ( $1.0 \times 10^4$  células/poço) em placas de 96 poços e deixadas a aderir durante 24h. Após esse tempo as células foram testadas por 48h com várias concentrações dos extratos.

A seguir a este período de incubação, as células aderentes foram fixadas adicionando ácido tricloroacético 10% frio (TCA, 100 µL) e deixadas a repousar durante 60 min a 4 °C. As placas foram depois lavadas com água desionizada e secas. A cada poço foram adicionados 100 µL da solução SRB (0.1% em 1% de ácido acético) e as placas foram deixadas a incubar à temperatura ambiente, por 30 min. A SRB em excesso foi removida lavando as placas com ácido acético 1% e foram deixadas a secar ao ar. Depois a SRB ligada foi solubilizada com 10 mM Tris (200 µL) e a absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Biotek Elx800).

As curvas de dose-resposta foram obtidas para cada extrato e linha celular testadas. Foi também calculado o valor de GI<sub>50</sub> que corresponde à concentração de extrato que inibe 50% do crescimento celular (Vichai & Kirtikara, 2006; Abreu et al., 2011). Como controlo positivo foi utilizada a Elipticina.

Para as células não tumorais foi preparada uma cultura celular, a partir de fígado de porco obtido no matadouro local, que foi designada de PLP2. O tecido de fígado foi lavado com Hank's balanced salt solution contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina e dividido em 3 explantes de 1×1 mm.

Alguns destes explantes foram colocados em frascos de tecido de 25 cm<sup>2</sup>, com meio DMEM suplementado com sêrum fetal de bovino 10%, 2mM de aminoácidos não essenciais e 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina e incubados a 37 °C com atmosfera humidificada e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 2 dias.

O cultivo das células foi continuado com monitorização direta a cada 2 ou 3 dias utilizando um microscópio de contraste de fases.

Posteriormente foi feita uma subcultura de células e estas foram colocadas em placas de 96 poços com a densidade de 1.0 x10<sup>4</sup> células/poço e cultivadas em meio DMEM com FBS 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomina (Abreu et al., 2011).

#### **2.3.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória**

As células macrófagas RAW 264.7 de rato foram usadas para avaliar a atividade anti-inflamatória de acordo com o procedimento de Jabeur et al. (2016). Foram feitas cultura de células em meio DMEM, suplementado com 10% de soro

bovino inativado por calor e L-glutamina, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar humidificado.

As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador de células, a densidade experimental das células foi estabelecida a  $5 \times 10^5$  células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1%, de acordo com o teste de exclusão de Azul de Trypan. Seguidamente, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços (150000 células/poço) e deixadas a aderir à microplaca durante a noite.

Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de *L. pedunculata* durante 1 hora, seguido de estimulações com lipopolisacáridos (LPS) (1 µg/mL) ao longo de 18 horas. Foram preparados controlos sem a adição de LPS de forma a observar se estes induziam alterações nos níveis basais de óxido nítrico (NO).

A presença de óxido nítrico foi determinada utilizando um Kit de Reagentes Griess (Promega) que contém sulfanilamida, hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. O sobrenadante das células (100 µL) foi transferido para a placa e misturado com sulfanilamida e solução NED, 5 a 10 minutos cada, à temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado medindo a absorvância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek) e comparado com a curva de calibração (Jabeur et al., 2016).

### **2.3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana**

#### 2.3.5.1. Avaliação da atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana foi seguida a metodologia previamente descrita por Carocho et al. (2014). As bactérias Gran-negativas testadas foram *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC – American type culture collection, 35210); as bactérias Gran-positivas testadas foram estirpes de *Listeria monocytogenes* (NCTC- National collection of type cultures) 7973), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Bacillus cereus* (clinical isolate) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (MBC) foram determinadas utilizando o método

da microdiluição (Espinel-Ingroff, 2001). Para este ensaio utilizaram-se placas de 96 poços. As culturas de bactérias foram ajustadas através do espectrofotómetro ficando com uma concentração de  $1 \times 10^5$  CFU/mL, correspondendo a uma suspensão bacteriana determinada num espectrofotómetro a 625 nm. As diluições de inóculos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação e verificar a validade do inóculo. As diferentes diluições de solventes do extrato hidroetanólico e infusões foram pipetadas nos poços contendo 100  $\mu$ L de caldo de soja tríptico (TSB) e, posteriormente, foram adicionados 10  $\mu$ L de inóculo a todos os poços. As microplacas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. A MIC das amostras foi detetada após a adição de 40  $\mu$ L de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0.2 mg/mL) e incubação a 37°C durante 30 min. A menor concentração que produziu uma inibição significativa (cerca de 50%) do crescimento da bactéria, em comparação com o controlo positivo, foi identificada como a MIC. As concentrações mínimas inibitórias (MIC's) obtidas a partir do teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato testado foram determinados também por um teste de viabilidade microbiana colorimétrica com base na redução de uma cor INT e comparado com controlo positivo para cada cepa bacteriana (CSLI, 2006; Tsukatani et al., 2012). MBC foi determinado por sub-cultivo em série de 10  $\mu$ L em microplacas contendo 100  $\mu$ L de TSB. A menor concentração que não mostra crescimento após essa subcultura foi lida como o MBC. Os compostos padrão, nomeadamente a estreptomicina e a ampicilina, foram utilizadas como controlos positivos. 5% DMSO (dimetilsulfóxido) foi usado como controlo negativo.

#### 2.3.5.2. Avaliação da atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica foi utilizado o procedimento descrito por Carcho et al. (2014), utilizando os seguintes microfungos: *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Trichoderma viride* (IAM-Culture Collection, Center for Cellular and Molecular Research, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Universidade de Tokyo, Japão), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrochloron* (ATCC 9112) and *P. verrucosum* var. *cyclopium* (isolados de alimentos). A Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Fungicida (MFC) foram determinadas

utilizando o método da microdiluição. Os micromicetos foram mantidos em agar de malte (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e subcultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados à superfície a partir de placas de agar com uma solução salina estéril de 0,85% contendo 0,1% Tween 80 (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril a uma concentração de, aproximadamente,  $1.0 \times 10^5$  num volume final de 100 µL/por poço. O inóculo foi armazenado a 4 °C para uso posterior. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido, a fim de verificar a ausência de contaminação e a validade do inóculo.

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC's) foi executada através do uso de uma técnica de diluição em série numa microplaca de 96 poços. O extrato investigado foi dissolvido em solução a 5% de DMSO e adicionado a meio de malte de caldo com inóculo fúngico. As microplacas foram incubadas durante 72 h a 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (no microscópio binocular) foram definidas como MIC. A concentração mínima fungicida (MFCs) foi determinada por sub-cultivo em série de 2 µL em placas de microtitulação, contendo 100 µL de caldo de malte em cada poço e posterior incubação durante 72h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como o MFC, indicando 99,5% de morte do inóculo original. 5% de DMSO foi usado como controlo negativo, enquanto que o bionazol e o cetoconazol foram usados como controlos positivos.

### **2.3.6. Determinação do perfil fenólico**

Os extratos redissolvidos como mencionado em 2.3.1.1 e em 2.3.1.2 foram seguidamente filtrados através de um filtro descartável LC de 0,22-µm antes da sua análise cromatográfica. Em seguida a análise foi feita utilizando um sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um desgasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efetuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm e acoplado a um detetor de espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MSn).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4.6 mm × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA), a 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O

gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção de MS foi feita utilizando uma espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi); o sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Os compostos foram identificados através da informação obtida (tempos de retenção, e espectros UV-Vis e Massa) por comparação com compostos padrão, quando disponíveis, ou utilizando dados repostados na literatura. Para a quantificação foram obtidas curvas de calibração de compostos fenólicos padrão (apigenin-6-*C*-glucósido, ácido caféico, ácido clorogénico, hesperetina, luteolin-7-*O*-glucósido, naringenina, quercetin-3-*O*-rutinosído, ácido rosmarínico), e foi baseada nos sinais de UV-Vis, utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Para identificar os compostos sem padrão comercial disponível, a quantificação foi executada através da curva de calibração de outros compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

## **2.4. Análise estatística**

Para cada um dos acessos foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios  $\pm$  desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste HSD de Tukey com  $\alpha = 0,05$ . Este tratamento foi realizado utilizando o programa SPSS v. 23.

## **3. Resultados e Discussão**



### 3.1. Compostos Fenólicos

Os dados relacionados com a identificação dos compostos fenólicos (tempo de retenção,  $\lambda_{\text{max}}$  na zona do visível, iões moleculares, principais fragmentos em MS<sup>2</sup> e identificação) obtidos por análise de HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. estão apresentados na **Tabela 3**.

Todas as amostras analisadas apresentam um perfil idêntico, como o apresentado na **Figura 16**, revelando a presença de treze compostos fenólicos diferentes, tanto nos extratos hidroetanólicos como nos aquosos, sendo nove destes, identificados como ácidos fenólicos (principalmente dímeros, trímeros e tetrâmeros do ácido cafeico) e quatro como flavonóides (sobretudo derivados glicosados de eriodictiol e luteolina).

O ácido cafeico (composto 4), a luteolina-7-*O*-glucoronida (composto 8) e o ácido rosmarínico (composto 10) foram identificados por comparação com padrões comerciais. O ácido rosmarínico tem sido um dos principais compostos identificados noutras espécies de *Lavandula* (Torras-Claveria et al., 2007; Costa et al. 2013a; Costa et al., 2013b; Nunes et al., 2016).

Os compostos 1 e 2, 3 e 7 foram identificados como hexósidos de ácido cafeico, *p*-cumárico e rosmarínico, com base nos respetivos padrões de fragmentação libertados a  $m/z$  179 [ácido cafeico-H]<sup>-</sup>, 163 [ácido cumárico-H]<sup>-</sup> e 359 [ácido rosmarínico-H]<sup>-</sup> após a perda de um hexósido (-162 mu). Com a exceção do hexósido do ácido rosmarínico, os compostos mencionados foram encontrados em *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur (Torras-Claveria et al., 2007).

O composto 9 ([M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  719) apresentou um fragmento MS<sup>2</sup> base com  $m/z$  359 ([M-2H]<sup>2-</sup>, ácido rosmarínico), que permitiu a sua identificação como ácido sigerínico (Barros et al., 2013).

O composto 11 ([M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  537) apresentou um espectro de UV e padrão de fragmentação semelhante, a um trímero do ácido cafeico, sendo identificado como ácido litospérmico A (Chen et al., 2011; Zeng et al., 2006; Barros et al., 2013). Outros compostos, com o mesmo peso molecular (por exemplo ácidos salvianólicos H/I), foram descartados pois os seus padrões de fragmentação são bastante diferentes (Ruan et al., 2012; Zeng et al., 2006).

O composto 13 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  717) apresentou um padrão de fragmentação com sucessivas perdas de unidades de 198 mu (*danshensu*) ou de 180 mu (ácido cafeico), coerentes como ácido salvianólico B (também conhecido como ácido litospérmico B) (Zeng et al., 2006; Ruan et al., 2012). Estes tipo de compostos ainda não tinham sido descritos previamente em espécies de *Lavandula*.

Os restantes compostos correspondem a flavonas glicosiladas. Os fragmentos  $MS^2$  do composto 5 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  623) revelaram a perda alternativa de resíduos hexosil ( $m/z$  a 461; -162 u) e glucoronil ( $m/z$  a 285; -176 u), indicando a localização de cada resíduo em diferentes posições da aglicona. Como não foi possível obter nenhuma informação sobre a identidade dos açúcar presentes ou a sua posição na aglicona, o composto foi identificado como luteolina-*O*-hexosil-*O*-glucurónido. O composto 6 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  463) foi identificado como um derivado de eriodictiol devido ao seu espectro de UV-Visível e ao seu padrão de fragmentação  $MS^2$ . Este pico revelou a perda de glucoronil (-176 u), sendo por isso identificado como eriodictiol-*O*-glucurónido. O composto 12 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  623) apresentou uma massa 42 mu acima do composto 8, sendo por isso atribuído a grupo metilo, sendo identificado como luteolina-*O*-metilglucurónido. Estes três últimos compostos foram identificados pela primeira vez em espécies de *Lavandula*.

Em estudos realizados por Costa et al. (2013a), utilizando extratos polares (hidroetanólicos e etanólicos) de *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica*, foram detetados seis compostos fenólicos diferentes (ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 4-*O*-cafeoilquínico, 5-*O*-cafeoilquínico, ácido rosmarínico, luteolina e apigenina), no entanto, o único ácido comum encontrado foi o ácido rosmarínico, contudo apresentou uma menor concentração comparativamente aos valores apresentados neste estudo.

As diferenças observadas na composição química das distintas amostras podem ser eventualmente explicadas pela influência que a origem geográfica influi na composição química das plantas, nomeadamente no que se refere ao habitat e vegetação dominante, e ao efeito das características químicas do solo e dos fatores do clima (Santos et al., 2016). Contudo, no caso das frequentes variações morfológicas também observáveis neste espécime, Morales (2010) confirma que ocorrem em toda a área de distribuição, não existindo um padrão geográfico de ocorrência dessa variabilidade (Morales, 2010).

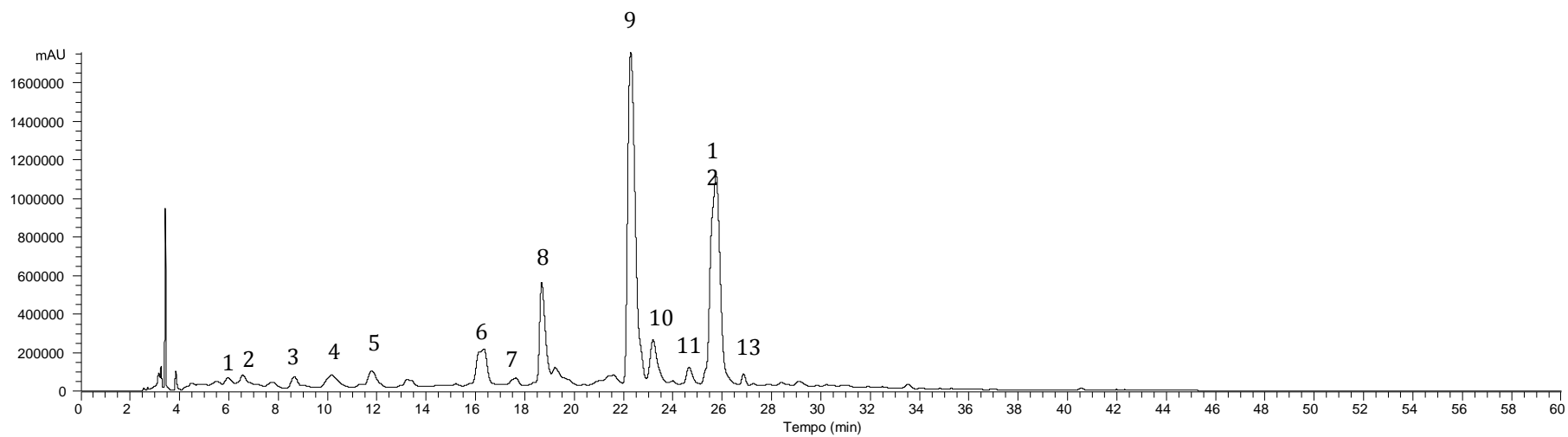
Para além disso, e com a exceção de Costa et al. (2013a), não existem mais estudos descrevendo a composição fenólica da *L. pedunculata* (Mill.) Cav..

Os ácidos fenólicos representam uma parte significativa do perfil fenólico (**Tabela 4**), salientando o ácido salvianólico B (composto 13) e o ácido rosmarínico (composto 10) como os compostos fenólicos maioritários presentes em ambos os tipos de extrato. Relativamente aos flavonóides, a luteolina-7-*O*-glucuronido (composto 8) foi o composto maioritariamente presente (**Tabela 4**).

Em geral, os extratos aquosos apresentaram maior concentração em compostos fenólicos, sendo a amostra 8 (proveniente de Ponte de Sôr, Portalegre) a que revelou maior concentração de ácidos fenólicos, flavonóides e compostos fenólicos totais para ambos os extratos estudados.

**Tabela 3.** Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorvância máxima na região do visível ( $\lambda_{\text{max}}$ ), informação dos espectros de massa e identificação de compostos fenólicos em amostras de *L. pedunculata*.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identificação Tentativa
1	5.97	320	341	179(100)	Hexósido de ácido cafeico
2	6.57	320	341	179(100)	Hexósido de ácido cafeico
3	8.65	310	325	163(100)	Hexósido de ácido <i>p</i> -coumárico
4	10.16	320	179	119(100)	Ácido cafeico
5	13.22	332	623	461(27),285(100)	Luteolina- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -glucurónido
6	16.34	284,330sh	463	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -glucurónido
7	17.64	320	521	359(100),197(8),179(14),161(3),135(5)	Hexósido de ácido rosmarínico
8	18.68	347	461	285(100)	Luteolina-7- <i>O</i> -glucurónido
9	19.23	283,338sh	719	539(29),521(18),359(100),179(32),161(5),135(5)	Ácido sangerínico
10	22.29	325	359	197(27),179(37),161(100),135(5)	Ácido rosmarínico
11	23.19	288,328sh	537	493(18),359(100),313(11),295(5),197(3),179(3)	Ácido litospérmico A
12	24.65	340	475	299(100),284(68)	luteolina- <i>O</i> -metilglucurónido
				537(47),519(17),493(40),359(97),339(10),321(8),313(17),295(100),197(7),17	Ácido salvianólico B
13	25.75	309,338sh	717	9(27)	



**Figura 16** - Perfil cromatográfico da amostra 3 (Vila Viçosa, Évora) registado a 280 nm

**Tabela 4.** Quantificação de compostos fenólicos (mg/g de extrato, média ± SD) em extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata*.

Compostos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Extratos hidroetanólicos</b>													
1	0,28±0,01 <sup>f</sup>	0,034±0,003 <sup>k</sup>	0,179±0,001 <sup>l</sup>	tr	0,210±0,005 <sup>h</sup>	0,23±0,01 <sup>g</sup>	0,11±0,04 <sup>j</sup>	2,44±0,02 <sup>a</sup>	0,37±0,01 <sup>d</sup>	0,44±0,01 <sup>c</sup>	0,277±0,004 <sup>f</sup>	0,59±0,02 <sup>b</sup>	0,33±0,02 <sup>e</sup>
2	0,18±0,02 <sup>h</sup>	0,079±0,003 <sup>j</sup>	0,31±0,001 <sup>d</sup>	0,120±0,003 <sup>i</sup>	0,22±0,02 <sup>g</sup>	0,295±0,001 <sup>e</sup>	0,24±0,01 <sup>f</sup>	1,87±0,02 <sup>a</sup>	0,40±0,01 <sup>c</sup>	0,31±0,02 <sup>de</sup>	0,22±0,01 <sup>fg</sup>	0,54±0,02 <sup>b</sup>	0,115±0,001 <sup>i</sup>
3	0,77±0,01 <sup>f</sup>	1,002±0,001 <sup>d</sup>	0,80±0,002 <sup>f</sup>	0,50±0,01 <sup>h</sup>	0,95±0,02 <sup>e</sup>	0,98±0,01 <sup>de</sup>	1,48±0,03 <sup>a</sup>	1,27±0,07 <sup>b</sup>	1,16±0,03 <sup>c</sup>	0,98±0,03 <sup>de</sup>	0,80±0,01 <sup>f</sup>	1,26±0,01 <sup>b</sup>	0,57±0,03 <sup>g</sup>
4	0,63±0,02 <sup>f</sup>	0,805±0,002 <sup>f</sup>	0,88±0,001 <sup>d</sup>	0,639±0,002 <sup>hi</sup>	1,01±0,02 <sup>c</sup>	0,85±0,02 <sup>e</sup>	1,14±0,02 <sup>b</sup>	1,49±0,03 <sup>a</sup>	1,00±0,04 <sup>c</sup>	0,802±0,001 <sup>f</sup>	0,72±0,03 <sup>g</sup>	1,12±0,04 <sup>b</sup>	0,65±0,02 <sup>h</sup>
5	2,05±0,03 <sup>f</sup>	2,33±0,03 <sup>c</sup>	2,68±0,01 <sup>b</sup>	1,37±0,01 <sup>k</sup>	1,846±0,001 <sup>g</sup>	1,84±0,01 <sup>g</sup>	1,599±0,004 <sup>i</sup>	1,54±0,01 <sup>j</sup>	2,22±0,01 <sup>d</sup>	2,695±0,003 <sup>a</sup>	2,09±0,01 <sup>e</sup>	2,06±0,01 <sup>f</sup>	1,698±0,003 <sup>h</sup>
6	0,137±0,003 <sup>h</sup>	tr	0,40±0,01 <sup>c</sup>	0,74±0,01 <sup>b</sup>	0,082±0,003 <sup>i</sup>	tr	0,060±0,001 <sup>j</sup>	0,782±0,003 <sup>a</sup>	tr	0,299±0,005 <sup>d</sup>	0,150±0,003 <sup>g</sup>	0,231±0,004 <sup>e</sup>	0,17±0,01 <sup>f</sup>
7	1,18±0,01 <sup>g</sup>	1,379±0,001 <sup>de</sup>	1,52±0,01 <sup>b</sup>	0,93±0,02 <sup>i</sup>	1,40±0,05 <sup>cd</sup>	1,355±0,004 <sup>ef</sup>	1,39±0,04 <sup>cd</sup>	1,78±0,06 <sup>a</sup>	1,51±0,09 <sup>b</sup>	1,32±0,01 <sup>f</sup>	1,38±0,05 <sup>de</sup>	1,43±0,03 <sup>c</sup>	1,047±0,002 <sup>h</sup>
8	13,10±0,01 <sup>l</sup>	19,93±0,02 <sup>e</sup>	21,68±0,03 <sup>c</sup>	22,35±0,06 <sup>b</sup>	12,15±0,02 <sup>m</sup>	17,37±0,02 <sup>i</sup>	18,62±0,01 <sup>g</sup>	20,66±0,01 <sup>d</sup>	19,7±0,1 <sup>f</sup>	15,60±0,02 <sup>k</sup>	17,57±0,01 <sup>h</sup>	16,54±0,02 <sup>j</sup>	24,36±0,04 <sup>n</sup>
9	1,99±0,01 <sup>e</sup>	2,34±0,05 <sup>c</sup>	2,25±0,04 <sup>d</sup>	2,90±0,01 <sup>a</sup>	1,77±0,08 <sup>g</sup>	1,97±0,01 <sup>ef</sup>	2,38±0,03 <sup>bc</sup>	2,4±0,1 <sup>b</sup>	2,84±0,08 <sup>a</sup>	2,20±0,05 <sup>d</sup>	1,93±0,01 <sup>f</sup>	1,13±0,04 <sup>i</sup>	1,41±0,03 <sup>b</sup>
10	21,4±0,40 <sup>i</sup>	34,4±0,4 <sup>e</sup>	38,5±0,60 <sup>b</sup>	16,9±0,5 <sup>k</sup>	36,0±0,2 <sup>c</sup>	32,5±0,6 <sup>f</sup>	26,11±0,05 <sup>h</sup>	50,9±0,9 <sup>a</sup>	30,4±0,4 <sup>g</sup>	35,2±0,6 <sup>d</sup>	23,5±0,2 <sup>i</sup>	17,0±0,6 <sup>k</sup>	7,5±0,2 <sup>l</sup>
11	2,89±0,01 <sup>k</sup>	4,27±0,06 <sup>f</sup>	5,4±0,4 <sup>c</sup>	4,00±0,09 <sup>gh</sup>	3,52±0,08 <sup>j</sup>	3,546±0,002 <sup>ij</sup>	3,69±0,09 <sup>j</sup>	6,4±0,1 <sup>a</sup>	5,15±0,04 <sup>d</sup>	4,4±0,1 <sup>e</sup>	3,95±0,1 <sup>h</sup>	4,1±0,6 <sup>g</sup>	6,0±0,1 <sup>b</sup>
12	2,520±0,001 <sup>i</sup>	2,73±0,02 <sup>h</sup>	5,09±0,02 <sup>a</sup>	3,57±0,01 <sup>c</sup>	1,78±0,01 <sup>k</sup>	2,41±0,01 <sup>j</sup>	2,76±0,02 <sup>g</sup>	nd	3,14±0,01 <sup>f</sup>	2,41±0,01 <sup>j</sup>	5,06±0,01 <sup>b</sup>	3,41±0,03 <sup>e</sup>	3,52±0,001 <sup>d</sup>
13	20,2±0,50 <sup>h</sup>	36,8±0,3 <sup>b</sup>	30,9±0,5 <sup>d</sup>	14,89±0,04 <sup>j</sup>	30,27±0,04 <sup>e</sup>	30,9±0,8 <sup>d</sup>	29,8±0,4 <sup>f</sup>	44,3±0,2 <sup>a</sup>	34,1±0,5 <sup>c</sup>	30,6±0,4 <sup>de</sup>	25,9±0,4 <sup>g</sup>	16,7±0,5 <sup>i</sup>	8,7±0,01 <sup>k</sup>
TPA	50±1 <sup>b</sup>	81±1 <sup>b</sup>	81±2 <sup>b</sup>	40,8±0,4 <sup>j</sup>	75,4±0,3 <sup>d</sup>	72,6±0,2 <sup>c</sup>	66±1 <sup>f</sup>	113±1 <sup>a</sup>	77±1 <sup>c</sup>	76,351±0,003 <sup>c</sup>	59±1 <sup>g</sup>	43,97±0,04 <sup>i</sup>	26,3±0,5 <sup>k</sup>
TF	17,81±0,01 <sup>l</sup>	25,0±0,01 <sup>e</sup>	29,85±0,03 <sup>a</sup>	28,04±0,04 <sup>c</sup>	15,86±0,03 <sup>m</sup>	21,62±0,01 <sup>j</sup>	23,04±0,01 <sup>g</sup>	22,988±0,002 <sup>h</sup>	25,1±0,1 <sup>d</sup>	21,00±0,02 <sup>k</sup>	24,86±0,01 <sup>f</sup>	22,2±0,1 <sup>i</sup>	29,75±0,02 <sup>b</sup>
TPC	68±1 <sup>k</sup>	106±1 <sup>c</sup>	111±2 <sup>b</sup>	68,9±0,5 <sup>i</sup>	91,3±0,3 <sup>g</sup>	94,2±0,2 <sup>f</sup>	89±1 <sup>h</sup>	136±1 <sup>a</sup>	102±1 <sup>d</sup>	97,36±0,02 <sup>e</sup>	84±1 <sup>i</sup>	66,17±0,02 <sup>l</sup>	56,1±0,5 <sup>m</sup>
<b>Extratos Aquosos</b>													
1	1,18±0,06 <sup>d</sup>	0,87±0,04 <sup>g</sup>	1,02±0,02 <sup>e</sup>	0,59±0,02 <sup>h</sup>	1,31±0,01 <sup>b</sup>	1,20±0,06 <sup>cd</sup>	1,23±0,01 <sup>c</sup>	7,9±0,1 <sup>a</sup>	1,19±0,06 <sup>d</sup>	0,91±0,05 <sup>fg</sup>	0,96±0,04 <sup>f</sup>	1,02±0,05 <sup>e</sup>	0,28±0,04 <sup>i</sup>
2	2,36±0,02 <sup>h</sup>	1,97±0,04 <sup>j</sup>	2,65±0,01 <sup>f</sup>	2,55±0,08 <sup>g</sup>	2,31±0,01 <sup>hi</sup>	3,8±0,1 <sup>c</sup>	3,83±0,03 <sup>c</sup>	5,03±0,07 <sup>a</sup>	2,37±0,05 <sup>h</sup>	2,28±0,05 <sup>i</sup>	4,3±0,01 <sup>b</sup>	3,19±0,03 <sup>d</sup>	3,06±0,08 <sup>e</sup>
3	3,5±0,1 <sup>d</sup>	3,18±0,03 <sup>g</sup>	3,002±0,002 <sup>h</sup>	1,52±0,06 <sup>i</sup>	3,22±0,02 <sup>f</sup>	3,83±0,02 <sup>c</sup>	4,19±0,06 <sup>a</sup>	4,13±0,03 <sup>b</sup>	2,98±0,04 <sup>h</sup>	3,30±0,03 <sup>c</sup>	2,77±0,08 <sup>j</sup>	2,19±0,09 <sup>k</sup>	2,90±0,05 <sup>i</sup>
4	3,25±0,006 <sup>f</sup>	3,46±0,08 <sup>e</sup>	2,917±0,004 <sup>h</sup>	2,80±0,03 <sup>i</sup>	3,29±0,04 <sup>f</sup>	3,14±0,08 <sup>g</sup>	3,99±0,08 <sup>b</sup>	3,87±0,05 <sup>c</sup>	3,18±0,04 <sup>g</sup>	2,80±0,04 <sup>i</sup>	2,61±0,05 <sup>j</sup>	3,63±0,01 <sup>d</sup>	4,35±0,04 <sup>a</sup>
5	6,49±0,02 <sup>c</sup>	6,71±0,02 <sup>b</sup>	8,76±0,01 <sup>a</sup>	3,681±0,003 <sup>k</sup>	5,18±0,04 <sup>f</sup>	5,28±0,01 <sup>d</sup>	4,1±0,10 <sup>i</sup>	4,45±0,02 <sup>g</sup>	3,32±0,02 <sup>i</sup>	3,79±0,01 <sup>j</sup>	4,34±0,01 <sup>h</sup>	2,95±0,03 <sup>m</sup>	5,22±0,03 <sup>e</sup>
6	12,83±0,04 <sup>d</sup>	9,36±0,02 <sup>h</sup>	8,87±0,03 <sup>i</sup>	16,73±0,04 <sup>a</sup>	8,6±0,1 <sup>k</sup>	10,8±0,1 <sup>g</sup>	11,6±0,10 <sup>f</sup>	12,9±0,1 <sup>d</sup>	8,17±0,02 <sup>i</sup>	12,97±0,04 <sup>c</sup>	13,31±0,05 <sup>b</sup>	8,8±0,1 <sup>j</sup>	12,26±0,02 <sup>e</sup>
7	2,52±0,01 <sup>cd</sup>	2,41±0,09 <sup>e</sup>	3,33±0,01 <sup>a</sup>	1,6±0,2 <sup>h</sup>	2,45±0,08 <sup>de</sup>	2,26±0,04 <sup>f</sup>	2,38±0,07 <sup>c</sup>	2,83±0,01 <sup>b</sup>	2,61±0,03 <sup>c</sup>	3,3±0,2 <sup>a</sup>	2,16±0,09 <sup>g</sup>	2,74±0,01 <sup>b</sup>	2,11±0,06 <sup>g</sup>
8	70,81±0,04 <sup>g</sup>	64,31±0,02 <sup>k</sup>	76,4±0,1 <sup>d</sup>	101,5±0,1 <sup>a</sup>	42,12±0,01 <sup>m</sup>	66,8±0,1 <sup>i</sup>	65,9±0,1 <sup>j</sup>	84,1±0,1 <sup>c</sup>	73,56±0,09 <sup>f</sup>	67,35±0,08 <sup>h</sup>	73,8±0,1 <sup>e</sup>	53,6±0,2 <sup>l</sup>	99,43±0,02 <sup>b</sup>
9	4,4±0,1 <sup>ef</sup>	3,26±0,03 <sup>i</sup>	4,4±0,4 <sup>ef</sup>	6,6±0,1 <sup>a</sup>	3,73±0,03 <sup>h</sup>	4,3±0,5 <sup>g</sup>	4,6±0,1 <sup>e</sup>	5,2±0,1 <sup>d</sup>	6,2±0,5 <sup>b</sup>	5,7±0,4 <sup>c</sup>	3,30±0,01 <sup>i</sup>	4,3±0,30 <sup>g</sup>	5,8±0,3 <sup>c</sup>
10	290,0±0,4 <sup>e</sup>	293±3 <sup>d</sup>	353,0±0,3 <sup>b</sup>	190±2 <sup>j</sup>	288,6±0,2 <sup>f</sup>	318,0±0,7 <sup>c</sup>	211±1 <sup>i</sup>	550±3 <sup>a</sup>	266,3±0,7 <sup>g</sup>	291±4 <sup>e</sup>	218,4±0,5 <sup>h</sup>	52,2±0,6 <sup>k</sup>	27,1±0,3 <sup>l</sup>
11	11,5±0,3 <sup>i</sup>	13,9±0,4 <sup>g</sup>	16,37±0,06 <sup>c</sup>	15,1±0,4 <sup>d</sup>	9,8±0,3 <sup>j</sup>	12,2±0,6 <sup>h</sup>	9,63±0,02 <sup>j</sup>	16,8±0,2 <sup>b</sup>	14,83±0,07 <sup>de</sup>	14,7±0,4 <sup>e</sup>	14,14±0,09 <sup>f</sup>	16,9±0,1 <sup>b</sup>	26,2±0,6 <sup>a</sup>
12	11,25±0,03 <sup>e</sup>	7,75±0,02 <sup>j</sup>	16,08±0,01 <sup>b</sup>	15,1±0,1 <sup>c</sup>	4,45±0,04 <sup>k</sup>	8,54±0,04 <sup>i</sup>	8,9±0,1 <sup>h</sup>	nd	10,9±0,1 <sup>f</sup>	8,51±0,02 <sup>i</sup>	19,8±0,1 <sup>a</sup>	9,73±0,02 <sup>g</sup>	13,7±0,1 <sup>d</sup>
13	381±5 <sup>d</sup>	390±2 <sup>c</sup>	366,7±0,9 <sup>e</sup>	212,9±0,4 <sup>k</sup>	309,9±0,4 <sup>h</sup>	405±3 <sup>b</sup>	279±2 <sup>j</sup>	582±1 <sup>a</sup>	343±2 <sup>f</sup>	340±4 <sup>e</sup>	305,7±0,5 <sup>i</sup>	62,8±0,3 <sup>l</sup>	47,7±0,8 <sup>m</sup>
TPA	699±5 <sup>d</sup>	712±1 <sup>c</sup>	753,4±0,7 <sup>b</sup>	433±3 <sup>j</sup>	621,6±0,8 <sup>g</sup>	754±3 <sup>b</sup>	519±3 <sup>i</sup>	1177±3 <sup>a</sup>	643±2 <sup>f</sup>	664±9 <sup>e</sup>	554,3±0,1 <sup>h</sup>	148,9±0,6 <sup>k</sup>	119±1 <sup>l</sup>
TF	101,4±0,2 <sup>e</sup>	88,13±0,05 <sup>j</sup>	110,06±0,01 <sup>d</sup>	137,0±0,2 <sup>a</sup>	60,3±0,1 <sup>i</sup>	91,4±0,1 <sup>h</sup>	90,4±0,2 <sup>i</sup>	101,4±0,2 <sup>e</sup>	96,0±0,2 <sup>f</sup>	92,6±0,1 <sup>g</sup>	111,2±0,1 <sup>c</sup>	75,1±0,3 <sup>k</sup>	130,6±0,2 <sup>b</sup>
TPC	801±5 <sup>d</sup>	801±1 <sup>d</sup>	863,5±0,7 <sup>b</sup>	570±3 <sup>j</sup>	681,9±0,7 <sup>g</sup>	845±3 <sup>c</sup>	610±3 <sup>i</sup>	1278±3 <sup>a</sup>	739±2 <sup>f</sup>	756±9 <sup>e</sup>	665,6±0,2 <sup>h</sup>	224±1 <sup>l</sup>	250±1 <sup>k</sup>

nd-não detectado; tr-vestigial. TPA- ácidos fenólicos totais; TF- flavonóides totais; TPC- compostos fenólicos totais; 1<sup>LP</sup>- hexósido de ácido cafeico; 2<sup>LP</sup>- Hexósido de ácido cafeico; 3<sup>LP</sup>- hexósido de ácido *p*-coumárico; 4<sup>LP</sup>- ácido cafeico; 5<sup>LP</sup>- luteolina-*O*-hexosil-*O*-glucurônido; 6<sup>LP</sup>- eriodictiol-*O*-glucurônido; 7<sup>LP</sup>- hexósido de ácido rosmarínico; 8<sup>LP</sup>- luteolina-7-*O*-glucurônido; 9<sup>LP</sup>- ácido sangerínico; 10<sup>LP</sup>- ácido rosmarínico; 11<sup>LP</sup>- ácido litoespérmico A; 12<sup>LP</sup>- luteolina-*O*-metilglucurônido; 13<sup>LP</sup>- ácido salvianólico B. Curvas de calibração padrão: ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ ,  $R^2 = 0,994$ ); ácido *p*-coumárico ( $y = 301950x + 6966,7$ ,  $R^2 = 0,999$ ); apigenina-7-*O*-glucósido ( $y = 10683x - 45794$ ,  $R^2 = 0,996$ ); hesperetina ( $y = 34156x + 268027$ ,  $R^2 = 0,999$ ); e ácido rosmarínico ( $y = 191291x - 652903$ ,  $R^2 = 0,999$ ). Em cada linha e para cada extrato (hidroetanólico ou aquoso) letras diferentes significam diferenças significativas entre as quantidades totais de compostos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Atividade Antioxidante e Anti-inflamatória

A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata* foi avaliada utilizando diferentes ensaios *in vitro* (atividade captadora do radical DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica – TBARS) e os resultados encontram-se na **Tabela 5**.

Todas as amostras, para ambos os extratos estudados, revelaram potencial antioxidante. No geral, não existe uma grande divergência dos valores  $EC_{50}$  entre os extratos hidroetanólicos e os aquosos.

O extrato aquoso da amostra 8 (proveniente de Ponte de Sôr, Portalegre) revelou maior potencial na captação de radicais DPPH ( $EC_{50} = 0.073$  mg/mL), enquanto que a infusão da amostra 2 (proveniente de Évora) revelou maior poder redutor ( $EC_{50} = 0.051$  mg/mL). O extrato hidroetanólico e aquoso da amostra 10 (proveniente de Castelo de Vide) apresentaram os valores mais baixos de  $EC_{50}$  para o ensaio de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno, e também os extratos hidroetanólicos das amostras 12 (também oriunda de Castelo de Vide, Portalegre) e 13 (proveniente de Bragança). Relativamente ao ensaio de TBARS, a infusão da amostra 1 (proveniente de Marvão, Portalegre) revelou os resultados mais promissores ( $EC_{50} = 0.014$  mg/mL).

Estes resultados encontram-se em conformidade com os obtidos por Costa et al. (2013a), onde o potencial antioxidante da *L. pedunculata* foi avaliado através do ensaio de TBARS e para a concentração mais elevada testada (5 mg/mL), os extratos de infusão, água e água:etanol preveniram a produção de MDA.

Num estudo realizado por Pereira et al. (2015b), a atividade antioxidante de diferentes extratos (n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol e água) de *L. pedunculata* foram avaliados através do índice de peroxidação lipídica (%), obtendo valores entre 26 a 41%. Para além disso, Ferreira et al., (2006) testaram os extratos etanólicos e decocções de *L. pedunculata* utilizando os ensaios de inibição de  $\beta$ -caroteno e DPPH, nas quais, as amostras revelaram atividade antioxidante, apresentando valores entre 93 e 20 mg/mL, respetivamente.

Os resultados da atividade anti-inflamatória *in vitro* também foram avaliados e encontram-se representados na **Tabela 5**. Em geral, os extratos hidroetanólicos revelaram um potencial anti-inflamatório mais promissor (com valores de  $EC_{50}$  entre 124 e 216  $\mu$ g/mL), e mostrando valores inferiores aos obtidos nos extratos aquosos

(valores de  $EC_{50}$  entre 140 e 301  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso, várias amostras não apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo a ausência desta bioatividade mais elevada no extrato aquoso. O extrato hidroetanólico da amostra 6 (proveniente de Portalegre) apresentou o maior potencial anti-inflamatório, enquanto que o extrato aquoso da amostra 8 (oriunda de Ponte de Sôr, Portalegre) revelou a maior eficiência. Algieri et al. (2016), estudaram a atividade anti-inflamatória de extratos hidroetanólicos de *L. stoechas*, que exibiram uma inibição significativa do edema em patas de rato induzido por carragenina. Deste modo, os extratos hidroetanólicos podem ser também considerados uma boa fonte de moléculas com propriedades anti-inflamatórias.

**Tabela 5.** Atividade Antioxidante e anti inflamatória de extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata* (média ± SD).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Extratos Hidroetanólicos</b>													
<b>Atividade antioxidante (Valores EC<sub>50</sub>, mg/mL)</b>													
Atividade captadora de radicais DPPH	0,14± 0,01 <sup>ef</sup>	0,139± 0,003 <sup>ef</sup>	0,139± 0,002 <sup>ef</sup>	0,21± 0,01 <sup>b</sup>	0,137± 0,003 <sup>f</sup>	0,139± 0,001 <sup>f</sup>	0,150± 0,002 <sup>d</sup>	0,087± 0,002 <sup>g</sup>	0,150± 0,002 <sup>d</sup>	0,15± 0,01 <sup>de</sup>	0,181± 0,002 <sup>c</sup>	0,14± 0,01 <sup>ef</sup>	0,26± 0,01 <sup>a</sup>
Poder Redutor	0,110± 0,001 <sup>f</sup>	0,098± 0,001 <sup>g</sup>	0,118± 0,001 <sup>e</sup>	0,149± 0,002 <sup>b</sup>	0,097± 0,002 <sup>g</sup>	0,107± 0,002 <sup>f</sup>	0,129± 0,001 <sup>d</sup>	0,072± 0,001 <sup>h</sup>	0,067± 0,001 <sup>i</sup>	0,13± 0,01 <sup>c</sup>	0,133± 0,003 <sup>cd</sup>	0,133± 0,001 <sup>cd</sup>	0,22± 0,01 <sup>a</sup>
Inibição da descoloração do β-caroteno	1,01± 0,09 <sup>d</sup>	0,82± 0,03 <sup>e</sup>	1,06± 0,06 <sup>d</sup>	0,51± 0,08 <sup>f</sup>	1,18± 0,04 <sup>c</sup>	1,58± 0,08 <sup>b</sup>	0,54± 0,04 <sup>f</sup>	1,83± 0,2 <sup>a</sup>	0,37± 0,02 <sup>g</sup>	0,25± 0,01 <sup>h</sup>	0,19± 0,02 <sup>h</sup>	0,223± 0,003 <sup>h</sup>	0,21± 0,01 <sup>h</sup>
Inibição de TBARS	0,028± 0,001 <sup>g</sup>	0,017± 0,001 <sup>i</sup>	0,026± 0,001 <sup>h</sup>	0,035± 0,001 <sup>e</sup>	0,04± 0,01 <sup>d</sup>	0,06± 0,01 <sup>a</sup>	0,04± 0,01 <sup>c</sup>	0,03± 0,01 <sup>h</sup>	0,04± 0,01 <sup>d</sup>	0,048± 0,002 <sup>b</sup>	0,062± 0,004 <sup>a</sup>	0,03± 0,01 <sup>gh</sup>	0,03± 0,01 <sup>f</sup>
<b>Potencial Anti-inflamatório (Valores EC<sub>50</sub>, µg/mL)</b>													
Produção de Óxido Nítrico (NO)	190± 3 <sup>c</sup>	198± 5 <sup>b</sup>	190± 6 <sup>c</sup>	> 400	> 400	124± 8 <sup>f</sup>	> 400	> 400	> 400	216± 12 <sup>a</sup>	171± 3 <sup>d</sup>	162± 4 <sup>e</sup>	> 400
<b>Extratos Aquosos</b>													
<b>Atividade antioxidante (Valores EC<sub>50</sub>, mg/mL)</b>													
Atividade captadora de radicais DPPH	0,109± 0,004 <sup>f</sup>	0,099± 0,002 <sup>g</sup>	0,099± 0,001 <sup>g</sup>	0,07± 0,01 <sup>i</sup>	0,099± 0,002 <sup>g</sup>	0,115± 0,001 <sup>e</sup>	0,125± 0,002 <sup>d</sup>	0,073± 0,001 <sup>h</sup>	0,098± 0,003 <sup>g</sup>	0,115± 0,002 <sup>e</sup>	0,133± 0,01 <sup>c</sup>	0,14± 0,01 <sup>b</sup>	0,191± 0,002 <sup>a</sup>
Poder Redutor	0,101± 0,002 <sup>f</sup>	0,051± 0,002 <sup>i</sup>	0,113± 0,004 <sup>e</sup>	0,137± 0,005 <sup>b</sup>	0,099± 0,003 <sup>f</sup>	0,093± 0,004 <sup>g</sup>	0,111± 0,003 <sup>e</sup>	0,073± 0,002 <sup>h</sup>	0,110± 0,002 <sup>e</sup>	0,125± 0,004 <sup>cd</sup>	0,12± 0,01 <sup>d</sup>	0,13± 0,01 <sup>c</sup>	0,167± 0,001 <sup>a</sup>
Inibição da descoloração do β-caroteno	0,27± 0,01 <sup>f</sup>	0,25± 0,01 <sup>fg</sup>	0,27± 0,01 <sup>f</sup>	0,39± 0,01 <sup>d</sup>	0,47± 0,01 <sup>b</sup>	0,47± 0,02 <sup>b</sup>	0,42± 0,02 <sup>c</sup>	0,39± 0,02 <sup>d</sup>	0,45± 0,01 <sup>b</sup>	0,24± 0,01 <sup>g</sup>	0,305± 0,004 <sup>e</sup>	0,39± 0,03 <sup>d</sup>	0,53± 0,02 <sup>a</sup>
Inibição de TBARS	0,014± 0,001 <sup>i</sup>	0,02± 0,01 <sup>de</sup>	0,016± 0,001 <sup>h</sup>	0,029± 0,001 <sup>c</sup>	0,02± 0,01 <sup>fg</sup>	0,022± 0,001 <sup>f</sup>	0,02± 0,01 <sup>g</sup>	0,02± 0,01 <sup>g</sup>	0,021± 0,001 <sup>g</sup>	0,04± 0,01 <sup>a</sup>	0,025± 0,01 <sup>d</sup>	0,02± 0,01 <sup>e</sup>	0,036± 0,001 <sup>b</sup>
<b>Potencial Anti-inflamatório (Valores EC<sub>50</sub>, µg/mL)</b>													
Produção de Óxido Nítrico (NO)	> 400	> 400	> 400	301±7 <sup>a</sup>	237±7 <sup>b</sup>	> 400	205±7 <sup>c</sup>	140±5 <sup>d</sup>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400

\* EC<sub>50</sub>: Concentração de extrato correspondendo a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 da absorvância no ensaio do poder redutor. Trolox (control positivo) Valores EC<sub>50</sub>: 41 µg/mL (poder redutor), 42 µg/mL (atividade captadora de radicais DPPH), 18 µg/mL (inibição da descoloração do β-caroteno) e 23 µg/mL (inibição de TBARS). Atividade anti-inflamatória está expressa em valores de EC<sub>50</sub> correspondentes a 50% da inibição da produção de NO (Óxido nítrico) em comparação com o controlo negativo (100% de produção de NO). Dexametasona (controlo positivo) Valores de EC<sub>50</sub>: 16 µg/mL. Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05).

### 3.3. Citotoxicidade

Na **Tabela 6** encontram-se os resultados obtidos relativamente ao efeito dos extratos aquosos (preparados a partir de infusões) e hidroetanólicos (EtOH/H<sub>2</sub>O, 80:20) de *L. pedunculata* na inibição do crescimento de quatro linhas celulares tumorais (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2). Neste estudo, foi evidente a atividade citotóxica de *L. pedunculata* em todas as linhas tumorais testadas.

Comparando os dois tipos de extratos, o extrato aquoso demonstrou maior potencial anti-proliferativo num maior número de amostras estudadas e em mais linhas celulares. No entanto, foi o extrato hidroetanólico que, no geral, demonstrou maior potencial citotóxico, isto é, menor valor de GI<sub>50</sub>.

O extrato hidroetanólico da amostra 6 (proveniente de Portalegre) apresentou o melhor potencial citotóxico nas linhas celulares MCF-7 (com valores entre 53 e 236 µg/mL) e HepG2 (com valores entre 34 e 212 µg/mL). Por outro lado, a amostra 12 (proveniente de Castelo de Vide, Portalegre) apresentou uma capacidade anti-proliferativa mais elevada na linha celular NCI-H460 (valores GI<sub>50</sub> = 119 µg/mL); e a amostra 10 (também proveniente de Castelo de Vide, Portalegre) tem um valor de GI<sub>50</sub> menor na linha celular HeLa (62 µg/mL). Por sua vez, o extrato aquoso da amostra 9 (proveniente de Évora) revelou um melhor potencial citotóxico em linhas celulares MCF-7 e HepG2, com valores de 150 e 118 µg/mL, respetivamente. Em geral, na linha celular NCI-H460, os valores variaram entre 374 e 113 µg/mL, destacando-se a amostra 4 (proveniente de Bragança) com a atividade anti-proliferativa mais elevada. No entanto, para a linha celular HeLa, a amostra 12 (proveniente de Castelo de Vide, Portalegre) apresentou os valores de GI<sub>50</sub> mais baixos (82 µg/mL), ou seja, melhor potencial anti-proliferativo.

Considerando a cultura de células PLP2, as amostras testadas não apresentaram toxicidade (GI<sub>50</sub> > 400 µg/mL), com a exceção do extrato hidroetanólico da amostra 12 (proveniente de Castelo de Vide, Portalegre), e os extratos aquosos das amostras 7 (proveniente de Nisa, Portalegre), 8 (proveniente de Ponte de Sôr, Portalegre) e 9 (de Évora). No entanto, as concentrações observadas eram superiores às obtidas para a inibição das linhas celulares tumorais.

Apesar de todas as amostras pertencerem à mesma espécie, é frequente ocorrer a heterogeneidade de resultados observada. As características da área geográfica de recolha das sementes pode influenciar diretamente a composição química das plantas,

devido a fatores bióticos e abióticos (Santos et al., 2016). Visto que neste estudo, as sementes são provenientes de diferentes áreas geográficas de Portugal, a origem pode ser um dos fatores importantes a considerar para explicar as oscilações observadas no potencial bioativo das amostras estudadas.

Até à data, existem poucos estudos citotóxicos utilizando esta espécie, contudo os resultados descritos na literatura revelam um potencial citotóxico menor do que o obtido neste estudo. De acordo com Pereira et al. (2015), os resultados obtidos com extratos metanólicos de *L. pedunculata* sugerem que para concentrações até 15 µg/mL e num período de incubação de 24 horas, não foram observados quaisquer efeitos citotóxicos relevantes. Tang et al. (2017) testou cinco linhas celulares tumorais humanas (NB4, A549, SHSY5Y, PC3 e MCF-7) utilizando extratos metanólicos de *L. angustifolia* e estes apresentaram uma baixa atividade inibitória em todas as linhas celulares testadas (valores de IC<sub>50</sub> entre 2,2 e 8,2 mM).

**Tabela 6.** Propriedades Citotóxicas de extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata* (média ± SD).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Extratos hidroetanólicos</b>													
<b>Linhas celulares tumorais (Valores GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>													
MCF-7 (carcinoma mamário)	61±2 <sup>f</sup>	57±3 <sup>fg</sup>	58±2 <sup>fg</sup>	115±9 <sup>c</sup>	82±8 <sup>d</sup>	53±5 <sup>g</sup>	70±2 <sup>e</sup>	61±4 <sup>f</sup>	60±4 <sup>f</sup>	53±3 <sup>g</sup>	61±3 <sup>f</sup>	236±8 <sup>a</sup>	212±1 <sup>b</sup>
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	285±22 <sup>bc</sup>	275±22 <sup>c</sup>	277±10 <sup>c</sup>	> 400	> 400	340±21 <sup>a</sup>	> 400	> 400	> 400	> 400	297±6 <sup>b</sup>	119±7 <sup>e</sup>	241±23 <sup>d</sup>
HeLa (carcinoma cervical)	70±5 <sup>de</sup>	65,0±0,2 <sup>fgh</sup>	69±2 <sup>def</sup>	200±14 <sup>c</sup>	216±7 <sup>b</sup>	66,2±0,2 <sup>efgh</sup>	67±2 <sup>efgh</sup>	63,3±0,1 <sup>gh</sup>	73,1±0,3 <sup>d</sup>	62,2±0,6 <sup>h</sup>	65±2 <sup>fgh</sup>	68±3 <sup>efg</sup>	222±6 <sup>a</sup>
HepG2 (carcinoma hepatocellular)	82±4 <sup>e</sup>	67±1 <sup>f</sup>	94±6 <sup>d</sup>	144±10 <sup>c</sup>	191±16 <sup>b</sup>	34±3 <sup>g</sup>	212±19 <sup>a</sup>	67±10 <sup>f</sup>	100±3 <sup>d</sup>	62±5 <sup>f</sup>	65±1 <sup>f</sup>	203±14 <sup>a</sup>	204±4 <sup>a</sup>
<b>Células não tumorais (Valores GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>													
PLP2	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	291±11	> 400
<b>Extratos aquosos</b>													
<b>Linhas celulares tumorais (Valores GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>													
MCF-7 (carcinoma mamário)	> 400	270±14 <sup>c</sup>	267±2 <sup>c</sup>	287±8 <sup>b</sup>	267,7±0,3 <sup>c</sup>	222±14 <sup>e</sup>	223±6 <sup>e</sup>	185±16 <sup>g</sup>	150±9 <sup>h</sup>	290±12 <sup>b</sup>	256,2±0,6 <sup>d</sup>	270±14 <sup>f</sup>	342±14 <sup>a</sup>
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	329±15 <sup>c</sup>	256±5 <sup>e</sup>	334±15 <sup>c</sup>	113±9 <sup>i</sup>	142±12 <sup>h</sup>	226±14 <sup>f</sup>	188±12 <sup>g</sup>	183±11 <sup>g</sup>	258±14 <sup>e</sup>	245±13 <sup>e</sup>	349±5 <sup>b</sup>	293±12 <sup>d</sup>	374±7 <sup>a</sup>
HeLa (carcinoma cervical)	> 400	> 400	310,2±0,4 <sup>b</sup>	343,92±0,01 <sup>a</sup>	253±23 <sup>d</sup>	262±14 <sup>d</sup>	199±12 <sup>f</sup>	159±16 <sup>g</sup>	286±4 <sup>c</sup>	195±11 <sup>f</sup>	224±11 <sup>e</sup>	82±14 <sup>h</sup>	298±17 <sup>bc</sup>
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	315±6 <sup>a</sup>	254±14 <sup>c</sup>	251±14 <sup>c</sup>	293±10 <sup>b</sup>	> 400	211±17 <sup>d</sup>	194±15 <sup>e</sup>	179±14 <sup>f</sup>	118±8 <sup>h</sup>	256±4 <sup>c</sup>	191±143 <sup>ef</sup>	148±1 <sup>g</sup>	324±6 <sup>a</sup>
<b>Células não tumorais (Valores GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>													
PLP2	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	349±12 <sup>b</sup>	362±21 <sup>a</sup>	240±16 <sup>c</sup>	> 400	> 400	> 400	> 400

Valores GI<sub>50</sub> – concentração que inibiu 50% do crescimento celular. Valores GI<sub>50</sub> de Elipticina (controlo positivo): 1,21 µg/mL (MCF-7), 1,03 µg/mL (NCI-H460), 0,91 µg/mL (HeLa), 1,10 µg/mL (HepG2) e 2,29 µg/mL (PLP2). Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05).

### 3.4. Atividade Antimicrobiana

Os resultados das atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata* são apresentados nas **Tabelas 7 e 8**. As amostras foram testadas contra um conjunto de oito estirpes de bactérias e fungos, especificamente selecionados com base na sua importância para a saúde pública. Para a avaliação do potencial antibacteriano foram usadas as estirpes *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*. De igual modo, para a determinação do potencial antifúngico, foram usadas as estirpes *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrocloron* e *Penicillium verrucosum var. cyclopium*.

Para a atividade antibacteriana (**Tabela 7**) dos extratos hidroetanólicos, as amostras 1 (proveniente de Marvão, Portalegre) e 5 (proveniente de Arronches, Portalegre) revelaram a atividade mais elevada (MICs menores) para todas as estirpes testadas. Nestes casos, os valores de MIC variaram entre 0,002 mg/mL para a amostra 1 da estirpe *Staphylococcus aureus* e 0,04 mg/mL na amostra 5 para a estirpe de *Enterobacter cloacae*. O valor de MBC mais baixo foi observado para as amostras 1 e 3 (provenientes de Marvão, Portalegre e Vila Viçosa, Évora, respetivamente) na inibição da estirpe de *Staphylococcus aureus* (0,04 mg/mL).

Na avaliação do extrato aquoso de *L. pedunculata*, a amostra 5 apresentou o MIC e MBC mais baixos, sendo mais potente para a estirpe de *Bacillus cereus* (MIC = 0,075 mg/mL e MBC = 0,15 mg/mL), juntamente com o MBC da amostra 8 (de Ponte de Sôr, Portalegre) na estirpe de *Escherichia coli* (também com valores de 0,15 mg/mL).

Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente, onde outras espécies de plantas também apresentaram atividade antimicrobiana, como por exemplo, as flores de *Castanea sativa* Mill. (Carocho et al., 2014), as partes aéreas de *Alnus rugosa* L. (Rashed et al., 2014) e de *Veronica urticifolia* Jacq. (Zivkovic et al., 2014). Em Nikolic et al. (2014) foram estudados óleos essenciais de diferentes espécies de tomilho, especificamente *T. serpyllum*, *T. algeriensis* e *T. vulgaris*, que demonstraram atividade antimicrobiana. No entanto, não foram encontrados estudos reportando a atividade antibacteriana de espécies de *Lavandula*.

Considerando a atividade antifúngica, todos os extratos hidroetanólicos das 13 amostras de *L. pedunculata* estudadas revelaram atividade inibitória e fungicida, como podemos observar na **Tabela 8**. A amostra 3 apresentou o melhor valor de MIC, para os extratos hidroetanólicos, em todas as estirpes testadas, com exceção de *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus ochraceus*, onde as amostras 2 e 9 (ambas provenientes de Évora), apresentaram maior potencial, respetivamente. Globalmente, em relação ao MFC, a maioria das amostras revelou resultados promissores, sendo o melhor resultado para a amostra 13, no extrato aquoso.

Relativamente aos extratos aquosos, nem todas as amostras obtiveram resultados positivos em todas as estirpes de fungos estudadas, no entanto as amostras 2, 11, 12 e 13 apresentaram potencial inibitório e fungicida para todas as estirpes de fungos estudadas. A amostra 11 apresentou o maior potencial inibitório para todas as estirpes de fungos analisadas, com exceção de *Penicillium funiculosum*, onde a amostra 2 apresentou os melhores resultados. A melhor capacidade fungicida foi evidente na amostra 11 contra a estirpe de *Aspergillus versicolor*.

Não foram encontrados estudos relativos à atividade antifúngica de *L. pedunculata*. Contudo, os resultados obtidos para o potencial antifúngico desta espécie estão de acordo com outros ensaios realizados em espécies vegetais, tais como *Castanea sativa* (Carocho et al., 2014) e *Alnus rugosa* (Rashed et al., 2014).

**Tabela 7.** Atividade antibacteriana (MIC e MBC, mg/mL) de extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata*.

<b>Atividades antibacteriana</b>																
<b>Extratos Hidroetanólicos</b>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	S	A	
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	
	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	
<i>B.c.</i>	0,05 0,075	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,05 0,075	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,20 0,30	0,10 0,20	0,25 0,40
<i>M.f.</i>	0,075 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,075 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,30 0,45	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,40	0,25 0,40
<i>S.a.</i>	0,02 0,04	0,04 0,075	0,03 0,04	0,15 0,30	0,10 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,15	0,15 0,30	0,20 0,30	0,45 0,60	0,20 0,30	0,04 0,10	0,25 0,45	0,25 0,45
<i>L.m.</i>	0,10 0,15	0,15 0,30	0,10 0,15	0,15 0,30	0,10 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,60	0,45 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,40 0,50
<i>E.c.</i>	0,075 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,075 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,10 0,15	0,20 0,30	0,45 0,60	0,20 0,30	0,20 0,50	0,40 0,50
<i>En.cl.</i>	0,04 0,075	0,04 0,075	0,04 0,075	0,05 0,75	0,04 0,075	0,04 0,075	0,10 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,075 0,15	0,20 0,30	0,45 0,60	0,20 0,30	0,25 0,50
<i>P.a.</i>	0,10 0,15	0,15 0,30	0,10 0,15	0,15 0,30	0,10 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,45	0,30 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,75 1,20
<i>S.t.</i>	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,10 0,15	0,20 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,25 0,50	0,40 0,75
<b>Extratos Aquosos</b>																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	S	A	
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	
	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC	
<i>B.c.</i>	0,20 0,30	0,30 0,45	0,15 0,30	0,30 0,45	0,075 0,15	0,20 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,45	0,30 0,30	0,15 0,30	0,10 0,20	0,25 0,40
<i>M.f.</i>	0,20 0,30	0,30 0,45	0,20 0,30	0,30 0,45	0,20 0,30	0,30 0,45	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,45 0,60	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,40	0,25 0,40
<i>S.a.</i>	0,30 0,45	0,30 0,45	0,30 0,60	0,30 0,45	0,45 0,60	0,30 0,45	0,20 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,30 0,45	0,30 0,45	0,30 0,60	0,30 0,60	0,04 0,10	0,25 0,45	0,25 0,45
<i>L.m.</i>	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,45 0,60	0,30 0,45	0,30 0,45	0,30 0,45	0,15 0,30	0,30 0,45	0,30 0,45	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,30	0,20 0,30	0,40 0,50
<i>E.c.</i>	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,10 0,15	0,20 0,30	0,45 0,60	0,20 0,30	0,45 0,90	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,50	0,40 0,50
<i>En.cl.</i>	0,15 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,25 0,50
<i>P.a.</i>	0,30 0,45	0,45 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,45	0,30 0,60	0,15 0,45	0,15 0,30	0,30 0,45	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,20 0,30	0,75 1,20
<i>S.t.</i>	0,45 0,60	0,45 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,45	0,15 0,30	0,30 0,45	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,25 0,50	0,40 0,75	0,40 0,75

MIC: Concentração Mínima Inibitória; MBC: Concentração Mínima Bactericida S: Streptomicina; A: Ampicilina; *B.c.*: *Bacillus cereus*; *M.f.*: *Micrococcus flavus*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *En.cl.*: *Enterobacter cloacae*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S.t.*: *Salmonella typhimurium*

**Tabela 8.** Atividade antifúngica (MIC e MFC, mg/mL) de extratos hidroetanólicos e aquosos de *L. pedunculata*.

<b>Atividade Antifúngica</b>															
<b>Extratos Hidroetanólicos</b>															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	K	B
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC
<i>A.fum.</i>	0,075 0,15	0,15 0,30	0,075 0,15	0,075 0,15	0,10 0,15	0,04 0,075	0,15 0,30	0,075 0,15	0,10 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,25 0,50	0,15 0,20
<i>A.v.</i>	0,04 0,075	0,03 0,075	0,04 0,15	0,04 0,075	0,075 0,15	0,04 0,075	0,04 0,075	0,04 0,075	0,075 0,15	0,15 0,30	0,075 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,50	0,10 0,20
<i>A.o.</i>	0,04 0,075	0,04 0,075	0,05 0,075	0,04 0,075	0,075 0,15	0,04 0,075	0,05 0,075	0,04 0,10	0,02 0,04	0,075 0,15	0,04 0,075	0,10 0,30	0,20 0,30	1,50 2,00	0,15 0,20
<i>A.n.</i>	0,05 0,075	0,075 0,15	0,04 0,075	0,075 0,15	0,15 0,30	0,075 0,15	0,15 0,30	0,075 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,15 0,30	0,20 0,30	0,20 0,50	0,15 0,20
<i>T.v.</i>	0,02 0,04	0,04 0,075	0,02 0,04	0,03 0,04	0,075 0,15	0,03 0,04	0,03 0,04	0,05 0,075	0,015 0,02	0,05 0,075	0,03 0,04	0,075 0,15	0,10 0,15	1,00 1,00	0,15 0,20
<i>P.f.</i>	0,075 0,15	0,075 0,15	0,04 0,075	0,075 0,15	0,20 0,30	0,075 0,015	0,075 0,15	0,04 0,075	0,075 0,15	0,075 0,15	0,15 0,30	0,20 0,30	0,20 0,30	0,20 0,50	0,20 0,25
<i>P.o.</i>	0,04 0,075	0,04 0,075	0,03 0,04	0,04 0,075	0,10 0,15	0,04 0,075	0,04 0,075	0,15 0,20	0,04 0,075	0,075 0,15	0,075 0,15	0,30 0,45	0,30 0,45	2,50 3,50	0,20 0,25
<i>P.v.c.</i>	0,075 0,15	0,15 0,30	0,05 0,075	0,10 0,15	0,20 0,30	0,075 0,15	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,15 0,30	0,30 0,45	0,30 0,45	0,20 0,30	0,10 0,20
<b>Extratos Aquosos</b>															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	K	B
	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC	MFC
<i>A.fum.</i>	0,30 0,60	0,30 0,60	0,60 1,20	- -	0,60 1,20	0,30 0,60	- -	- -	0,60 0,90	0,60 1,20	0,30 0,45	0,30 0,60	0,45 0,90	0,25 0,50	0,15 0,20
<i>A.v.</i>	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,60 1,20	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,60	0,30 0,45	0,20 0,45	0,10 0,20	0,15 0,30	0,20 0,30	0,20 0,50	0,10 0,20
<i>A.o.</i>	0,60 1,20	0,90 1,20	- -	- -	- -	0,60 1,20	0,30 0,60	- -	0,20 0,45	0,30 0,60	0,15 0,30	0,30 0,45	0,20 0,45	1,50 2,00	0,15 0,20
<i>A.n.</i>	- -	0,30 0,60	- -	- -	- -	0,60 1,20	- -	- -	0,30 0,45	- -	0,20 0,45	0,45 0,90	0,45 0,90	0,20 0,50	0,15 0,20
<i>T.v.</i>	0,60 1,20	0,30 0,60	0,60 1,20	0,60 1,20	- -	0,60 1,20	- -	- -	0,10 0,30	0,30 0,60	0,20 0,45	0,45 0,60	0,45 0,60	1,00 1,00	0,15 0,20
<i>P.f.</i>	0,60 1,20	0,30 0,60	0,60 1,20	- -	0,60 1,20	- -	- -	- -	- -	- -	0,45 0,60	0,45 0,90	0,45 0,90	0,20 0,50	0,20 0,25
<i>P.o.</i>	0,90 1,20	0,45 0,60	0,60 1,20	- -	0,60 1,20	- -	- -	- -	0,20 0,45	- -	0,45 0,60	0,45 0,90	0,45 0,90	2,50 3,50	0,20 0,25
<i>P.v.c.</i>	- -	0,60 1,20	0,60 1,20	- -	- -	- -	- -	- -	0,20 0,45	0,45 0,90	0,45 0,60	0,45 0,90	0,45 0,90	0,20 0,30	0,10 0,20

MIC: Concentração Mínima Inibitória; MFC: Concentração Mínima Fungicida; K: Ketoconazole; B: Bifonazole; *A.fum.*: *Aspergillus fumigatus*; *A.v.*: *Aspergillus versicolor*; *A.o.*: *Aspergillus ochraceus*; *A.n.*: *Aspergillus niger*; *T.v.*: *Trichoderma viride*; *P.f.*: *Penicillium funiculosum*; *P.o.*: *Penicillium ochrochloron*; *P.v.c.*: *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*. (-) – não apresentou inibição à concentração testada.

---

## **4. Considerações finais**



---

O estudo de matrizes naturais permite um conhecimento aprofundado da sua composição química, e portanto, proporciona informação detalhada com uma aplicabilidade mais adequada. Nesse sentido foram estudadas amostras de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav., provenientes de diferentes populações silvestres do Alentejo e Trás-os-Montes.

A maioria das amostras estudadas apresentam propriedades bioativas diversas, tais como citotoxicidade, potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano. Ao analisar os dois tipos de extratos estudados (aquoso e hidroetanólico), os extratos aquosos demonstraram maiores concentrações de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante, no entanto, os extratos hidroetanólicos revelaram maior potencial anti-inflamatório na maioria das amostras, e também uma maior capacidade anti-proliferativa. É também relevante destacar que para a actividade antibacteriana e antifúngica, alguns dos resultados obtidos conseguiram superar os resultados dos farmacos convencionais.

Para além das importantes propriedades bioativas que se evidenciam em *L. pedunculata*, estes resultados destacam também a existência de variações entre amostras com diferentes origens geográficas, verificando-se que, em geral, as amostras do Alentejo apresentaram melhores resultados em todas as bioatividades comparativamente com as amostras de Trás-os-Montes.

Foram identificados 13 compostos fenólicos, à exceção da amostra 8 que não apresentou luteolina-*O*-metilglucurónido, sendo que todas as amostras demonstraram diferenças estaticamente significativas entre os compostos fenólicos detetados. A luteolina-7-*O*-glucurónido (composto 8) foi o flavonoide maioritário e o ácido rosmarínico (composto 10) e ácido salvianólico B foram os ácidos fenólicos que evidenciaram maior concentração. Estes compostos podem estar correlacionados com as bioatividades apresentadas pelas amostras.

Tendo em conta estes resultados, verificou-se que é importante proceder a mais estudos para correlacionar os fatores bióticos e abióticos com a composição química desta espécie.

Deste modo, e como perspectivas futuras, seria interessante ter em atenção a possibilidade de existirem quimiotipos e realizar uma análise mais aprofundada a nível nutricional e químico de material vegetal desta espécie, a fim de perceber melhor a influência da origem geográfica e do processamento do material vegetal no teor dos compostos presentes.

---

---

## **5. Referências bibliográficas**



- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adega, F., Chaves, R., Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46,12, 5800-5806.
- Acosta-estrada, B. A., Gutiérrez-uribe, J. A., Serna-saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Adomako-bonsu, A. G., Chan, S. L. F., Pratten, M., Fry, J. R. (2017). Toxicology in Vitro Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems : Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, 40, 248–255.
- Akhtar, M. J., Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Alshamsan, A. (2017) Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*, 186, 802–813.
- Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza T., Garrido-Mesa, J., Garrido-Mesa, N., Utrilla, M. P., González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Molero-Mesa, J., Contreras, M. M., Segura-Carretero, A., Pérez-Palacio, J., Diaz, C., Vergara, N., Vicente, F., Rodriguez-Cabezas, M. E., Galvez, J. (2016). Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 142–158.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Atkins, P., Jones, L. (2010). Chemical Principles – The Quest for Insight. Freeman 5th Edition, 758.

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436.
- Bajko, E., Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejczyk, L. (2016). 5- O - Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 471- 479.
- Bajpai, V.K., Agrawal, P., Bang, B.H., Park, Y.-H. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant and antilipid peroxidation effects of a medicinal plant, *Adhatoda vasica*. *Frontiers in Life Science*, 8, 305-312.
- Barbosa-pereira, L., Bilbao, A., Vilches, P., Angulo, I., Lluís, J., Fité, B. (2014). Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimization of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 145, 191–197.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1076-1079.
- Barros, L.; Carvalho, A. M.; Morais, J. S.; Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247–254.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, 136, 1–8.
- Barros, L. ; Morales, P. ; Carvalho, A. M. ; Ferreira, I. C. F. R. Capítulo 10 : Antioxidant Potencial of Wild Plant Foods. Livro : *Mediterranean Wild Edible Plants – Ethnobotany and Food Composition Tables*. Springer (2016).
- Belhadj, F., Somrani, I., Aissaoui, N., Messaoud, C., Boussaid, M., Marzouki, M. N. (2016). Bioactive compounds contents, antioxidant and antimicrobial activities

- during ripening of *Prunus persica* L. varieties from the North West of Tunisia. *Food Chemistry*, 204, 29–36.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, bathophenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157- 1165.
- Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 758–774.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. *Food Research International*, 51, 66-74.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R. (2013a). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236-1258.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R. (2013b). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.
- Carocho, M., Calhella, R. C., Queiroz, M. J. R.Q.P, Bento, A., Morales, P., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R. (2014). Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers a self effective antitumor and antimicrobial matrices. *Industrial Crops and Products*, 62, 42-46.
- Carvalho, A. M., Ramos, M. T. (2012). *Etnoflora da Terra de Miranda*. Bragança, Portugal: FRAUGA & Instituto Politécnico de Bragança
- Cetin-Karaca, H., Newmann, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience*, 11, 8–16.

- Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., Wang, Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLCDAD and ESI/MSn. *Phytochemical Analysis*, 22, 247–257.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Methods for dilution microbial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—7th edition M7-A7. Wayne, PA, USA.
- Clayden, Greeves, Warren and Wothers. *Organic Chemistry*, 1st Edition 2001, Oxford University Press, p.47-61.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P. B., Almeida, C., Nogueira, J. M. F., Romano, A. (2013a). Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp . *lusitanica* (Chaytor) Franco: Studies on the essential oil and polar extracts. *Food Chemistry*, 141, 2501–2506.
- Costa, P., Gonçalves, S., Valentão, P., Andrade, P.B., Romano, A. (2013b). Accumulation of phenolic compounds in in vitro cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L’Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 69-74.
- Cui, L., Poon, J., Poon, S. K., Chen, H., Gao, j., Kwan, P., Fan, K., Ling, K. (2014) An improved independent component analysis model for 3D chromatogram separation and its solution by multi-areas genetic algorithm. *BMC Bioinformatics*, 15(Suppl 12):S8.
- Dias, M. I. Sousa, M. J. Alves, R. C. Ferreira, I. C. F. R. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82, 9–22.
- Fan, W. Qian, S. Qian, P. Li, X. (2016). Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. *Virus Research*, 220, 112–116.

- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., Araújo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 31–37.
- Flamini, R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, 22, 218-250.
- Font Quer, P. (1999). *Plantas Medicinales – El Dioscorides renovado*. Barcelona: Ediciones Península
- Forino, M., Tenore, G. C., Tartaglione, L., Carmela, D. A., Novellino, E., Ciminiello, P. (2015). (1S, 3R, 4S, 5R) 5-O-Caffeoylquinic acid: Isolation, stereo-structure characterization and biological activity. *Food Chemistry*, 178, 306–310.
- Franco, J. do A. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores), Volume II Clethraceae – Compositae*. Lisboa: Edição do autor.
- Gaballah, H. H., Gaber, R. A., Mohamed, D. A. (2017). Apigenin potentiates the antitumor activity of 5-FU on solid Ehrlich carcinoma: Crosstalk between apoptotic and JNK-mediated autophagic cell death platforms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 316, 27–35.
- Ganai, S. A. (2017). Plant-derived flavone Apigenin: The small-molecule with promising activity against therapeutically resistant prostate cancer. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 85, 47–56.
- Ghimire, B. K.; Seong, E. S.; Yub, C. Y.; Kima, S. H.; Chung, I. M. (2017). Evaluation of phenolic compounds and antimicrobial activities in transgenic *Codonopsis lanceolata* plants via overexpression of the  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase ( $\gamma$ -tmt) gene. *South African Journal of Botany*, 109, 25–33.
- González, G. L. (2016). *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*, Tomo II, 2ª Edição. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa

- Gouveia-Figueira, S.C., Castilho, P.C. (2015). Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSn and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. *Industrial Crops and Products*, 73, 28-40.
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41, 1819-1828.
- Hytti, M., Szabó, D., Piippo, N., Korhonen, E., Honkakoski, P., Kaarniranta, K., Petrovski, G., Kauppinen A. (2017). Two dietary polyphenols, fisetin and luteolin, reduce inflammation but augment DNA damage-induced toxicity in human RPE cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, 37–42.
- Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhelha, R. C., Henriques, M., Silva, S., Achour, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, 89, 422-431.
- Kaefer, C. M., J. A. Milner (2008). The Role of Herbs and Spices in Cancer Prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 347–361.
- Kasala, E. R., Narendra, L., Barua, C. C., Gogoi, R. (2016). Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 82, 568-577.
- Kaur, I.P., Geetha, T. (2006). Screening methods for antioxidants - A review. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 305-312.
- Kim, N., Lee. D. (2002). Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 982, 31–47.
- Komes, D., Belščak-cvitanović, A., Horžić, D. (2011). Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Traditionally Used Medicinal Plants Affected by the Extraction Time and Hydrolysis. *Phytochemical Analysis*, 22, 172–180.

- Lambers, H., Yopp, J. H., Dickison, W. C., Schmid, R., Rothwell, G. W., Woodwell, G. M. (2017). *Plant – Biology*. Encyclopedia Britannica.
- Lobo, A. M., Lourenço, A. M. (2007). *Biossíntese de Produtos Naturais*. Lisboa: IST Press
- Martins, N., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Silva, S., Henriques, M. (2014). Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, 177, 5, 223–240.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, 74, 648–670.
- Miranda-Vizuetea, A., Veal, E. A. (2017). *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biology*, 11, 708–714.
- Miyamae, Y. M., Kurisu, M. K., Han, J. H., Isoda, H. I., Higemori, H. S. (2011). Structure – Activity Relationship of Caffeoylquinic Acids on the Accelerating Activity on ATP Production. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59, 502–507.
- Morales, R. (2010). *Lavandula L.* in Castroviejo, S., (coord. gen.). *Flora Iberica*, 12, 490–491. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R. F., Pinto, C., Roberto, A., Rijo, P. (2016). Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*, 89, 328–332.
- Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural compounds from plants. *Life Sciences*, 66, 709–723.
- Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, A., Markovic, T., Markovic, D., Giwelie, A., Sokovic, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus*

- serpyllum L., Thymus algeriensis Boiss. and Reut and Thymus vulgaris L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190.
- Nunes, R., Pasko, P., Tyszka-Czochara, M., Szewczyk, A., Szlosarczyk, M., & Carvalho, I.S. (2016). Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. *Pharmaceutical Biology*, 55, 114-123.
- Oroian, M., Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Pedersen, J. A. (2000). Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 229-253.
- Pereira, E.A.P.C. Evaluation of the effects of radiation on the chemical composition and bioactivity of the plants used in the pharmaceutical and/or food industries. Salamanca. Faculdade de Farmácia, Universidade de Salamanca, 2016. Tese de Doutorado.
- Pereira, F., Baptista, R., Ladeiras, D., Madureira, A. M., Teixeira, G., Rosado, C., Rijo, P. (2015). Production and characterization of nanoparticles containing methanol extracts of Portuguese Lavenders. *Measurement*, 74, 170–177.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clinical Biochemistry Version*, 30, 19-34.
- Port, S., Chisté, R. C., Godoy, H. T., Prado, M. A. (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *FRIN*, 53, 875–881.
- Prasad, S., Gupta, C. S., Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.

- Rahbardar, M. G., Amin, B., Mehri, S., Javad, S., Hosseinzadeh, H. (2017). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 441.
- Rashed, K., Ciric, A., Glamoclijab, J., Calhelha, R.C., Ferreira, I.C.F.R., Sokovic, M. (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Alnus rugosa* L. aerial parts and identification of the bioactive components. *Industrial Crops and Products*, 59, 189–196.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59, 184-189.
- Santos, E. S., Manuela, M., Saraiva, J. A. (2016). Mutielemental concentration and physiological responses of *Lavandula pedunculata* growing in soils developed on different mine. *Environmental Pollution*, 213, 43-52.
- Scott, R.P.W. (1986). *Liquid Chromatography Detectors*. Elsevier Science, 2nd Edition Volume 33, 602-608.
- Tang, S., Shia, J., Liu, C., Zhang, J., Xang, N., Liu, X., Chen, Y., You, J., Shen, O., Miao, M., Liu, Z., Yanga, G. (2017). Three new arylbenzofurans from *Lavandula angustifolia* and their bioactivities. *Phytochemistry Letters*, 19, 60–63.
- Telange, D. R., Patil, A. T., Pethe, A. M., Fegade, H., Anand, S., Dave, V. S. (2016). Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential. *European Journal of Pharmaceutical Science*, PHASCI-03826.
- The Plant List (2013). Version 1.1. (Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>) [Consultado a 21 de Fevereiro de 2017].

- Torras-Claveria, L., Jauregui, O., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F. (2007). Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8436–8443.
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K. (2012). Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 90, 160–166.
- Vichai, V., Kirtikara, K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112-1116.
- Zhang, Q.-A., Fan, X.-H., Zhang, Z.-Q., Li, T., Zhu, C.-P., Zhang, X.-R., Song, W. (2013). Extraction, antioxidant capacity and identification of Semen Astragali Complanati (*Astragalus complanatus* R. Br.) phenolics. *Food Chemistry*, 141, 1295-1300.
- Zeng, G., Xiao, H., Liu, J., Liang, X. (2006). Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 499–506.
- Živkovic, J., Barreira, J.C.M., Stojkovic, D., Cebovic, T., Santos-Buelga, C., Maksimovic, Z., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Phenolic profile, antibacterial, antimutagenic and antitumour evaluation of *Veronica urticifolia* Jacq.. *Journal of functional foods*, 9, 192–201.
- Zuzarte, M. R. Dinis, A. M. Cavaleiro, C. Salgueiro, L. R. Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 32, 580–587.