



## **Caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades bioativas de tisanas preparadas a partir de plantas aromáticas e medicinais**

**Beatriz Helena Paschoalinotto**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná*

Orientadores

**Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira**

**Professora Doutora Lillian Barros**

**Professor Doutor Rafael Porto Ineu**

**Bragança**

**2019**





**Beatriz Helena Paschoalinotto**

Caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades bioativas de tisanas preparadas a partir de plantas aromáticas e medicinais

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná*

**Orientadores:**

Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira

Professora Doutora Lillian Barros

Professor Doutor Rafael Porto Ineu

**Bragança**

**2019**



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





## AGRADECIMENTOS

Após onze meses longe de todos e tudo que me eram habituais, percebo que estamos em constante evolução pessoal assim como profissional. Na reta final em Bragança, considero-me privilegiada por ter tido a oportunidade de aprender demasiadamente com toda a equipa do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), obrigada pelos ensinamentos.

Aos meus orientadores Doutora Isabel Ferreira e Doutor Rafael Ineu e co-orientadora Lillian Barros, um agradecimento especial, por orientarem o meu trabalho, carrego-os como inspirações a nível profissional.

À Maria Inês Dias por todo conhecimento compartilhado e paciência, que com certeza valorizo imensamente, guardo-te com muito carinho e desejo sempre tua felicidade.

Nada do que eternizei nesse período seria possível sem o apoio incansável da minha família. Minha infinita gratidão, essencialmente à minha mãe Elisete, que sonhou comigo e sei que sempre vai me amparar, me apoiar e me amar, ao meu irmão Bruno Henrique, que todos os dias demonstrou seu carinho por mim e faz-me sentir especial, se neste momento estou onde quero devo muito disso a vocês. Ao meu pai Sandro que sempre esteve pronto a ajudar-me em todas as mudanças exigidas pelas minhas escolhas e a minha amada irmã Barbara que reforçou nosso companherismo nos momentos que passamos juntas, ambos são motivação para que eu continue a buscar meus sonhos. Ao meu querido avô Toninho, que em todas nossas conversas me inspirou a ser uma pessoa melhor e me transmitiu a beleza de se viver leve, finalmente a minha tia Eliane, que juntamente com minha mãe e minhas avós Inês e Aparecida, são exemplos de mulheres para mim; a cada ciclo de evolução pessoal concluído peço aos céus de ter a resiliência delas, e não diferente dos outros, neste ciclo a concluir, reforço meu desejo.

Aos meus amigos que participaram total ou parcialmente desse processo junto a mim, com o companherismo e palavras reconfortantes em dias duvidosos. Um obrigado especial à Gracieli, minha amiga de infância, que suportou comigo minhas dificuldades diárias e que conecta-me à Deus através da sua fé. À Tainara, por quem tenho um enorme carinho e que independentemente do tempo, demonstra-me sua grande amizade, a torcer pelo meu sucesso. A dona Maria e seu Osmar, que considero-me parte da família, obrigada pelo carinho e por cuidar do meu querido filho de quatro patas, Joaquim. À Larissa, Liandra e Gabriela, que nesse momento já são muito mais que colegas de universidade, são minhas amigas e confidentes, estarei sempre a comemorar as vitórias de cada uma como se fossem minhas. À todos que conheci em Bragança, foi lindo compartilhar momentos com vocês.



## RESUMO

Verifica-se atualmente um crescente e exponencial interesse pelas plantas aromáticas e medicinais devido aos diversos benefícios que estas proporcionam à saúde do consumidor. A sua forma de consumo mais comum é sob a forma de tisana, ou popularmente conhecido por chá de ervas ou infusões. As propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas, quimiopreventivas e anti-inflamatórias de diferentes espécies já foram descritas, e têm sido correlacionadas com a composição em compostos fenólicos. A caracterização dos compostos fenólicos responsáveis pelas diferentes propriedades benéficas identificadas é de grande interesse para a indústria alimentar e nutracêutica, com foco em inúmeras aplicações, como por exemplo, na substituição de antioxidantes artificiais, desenvolvimento de suplementos alimentares ou nutracêuticos, entre outros. O presente estudo teve como objetivo a caracterização de compostos fenólicos por HPLC-DAD/ESI-MS de cinco tisanas preparadas a partir de misturas de plantas aromáticas e medicinais (T1, T2, T3, T4 e T5), assim como o estudo das suas propriedades bioativas nomeadamente, a atividade antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-tirosinase e antidiabética. Foi proposto ainda a caracterização da sua composição em ácidos orgânicos e tocoferóis por HPLC acoplado a um detector DAD e fluorescência, respectivamente. Foi ainda realizado um estudo de correlação de Pearson entre as propriedades bioativas e a presença de diferentes famílias de compostos fenólicos. Desta forma, a tisana 5, composta por tomilho-limão, hipericão do gerês, cravo e canela, foi a mistura que se destacou, apresentando os valores mais baixos para a inibição da peroxidação lipídica, anti-inflamatória, citotoxicidade para a linha tumoral de adenocarcinoma de mama e atividade antidiabética. Para além disso, apresentou a maior concentração de tocoferóis ( $\gamma$ -isoforma), ácidos fenólicos (derivados do ácido cafeoilquínico) e flavan-3-óis (derivados de catequina). Para a atividade anti-hemolítica, antimicrobiana (bactérias Gram-negativo) e citotóxica (linhas celulares HepG2, NCI H460 e HeLa), destacaram-se as tisanas T2 e T4, que também têm na sua composição tomilho-limão. O ácido rosmarínico e seus derivados foram os compostos fenólicos que mais se destacaram em todas as tisanas, seguindo-se de flavonóis/flavonas glicosilados. Os resultados obtidos sugerem que as infusões preparadas a partir de misturas de plantas aromáticas e medicinais podem ser fontes de compostos bioativos de alto valor acrescentado para aplicação na indústria alimentar, nutracêutica, entre outras.

*Palavras-chave:* plantas aromáticas e medicinais, tisanas, compostos fenólicos, bioativos, correlação de Pearson.

## ABSTRACT

Currently, there is a growing interest in aromatic and medicinal plants due to the various benefits they provide to consumer's health. Its most common form of consumption is as tisane, or popularly known as herbal teas or infusions. The antioxidant, antidiabetic, chemopreventive and anti-inflammatory properties of different species have been described and have been correlated with their composition in phenolic compounds. The characterization of phenolic compounds responsible for the different beneficial properties identified is of great interest to the food and nutraceutical industries, focusing on numerous applications, such as replacement of artificial antioxidants, development of food supplements or nutraceuticals, among others.

The present study aims to characterize the phenolic compounds by HPLC-DAD/ESI-MS of five tisanes (T1, T2, T3, T4 and T5) prepared from mixtures of medicinal and aromatic plants, as also to study their bioactive properties, namely antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory, anti-tyrosinase, and anti-diabetic. It was also proposed to characterize its composition in organic acids and tocopherols by HPLC coupled to a DAD and fluorescence detector, respectively. A Pearson's correlation study was also carried out between the bioactive properties and the presence of different families of phenolic compounds.

Thus, tisane 5, composed by lemon thyme, tutsan, cloves and cinnamon, was the most promising mixture, presenting the lowest values for the lipid peroxidation inhibition, anti-inflammatory, cytotoxicity for the breast adenocarcinoma tumor cell line and anti-diabetic activity. In addition, it showed the highest concentration of tocopherols ( $\gamma$ -isoform), phenolic acids (caffeoylquinic acids derivatives) and flavan-3-ols (catechin derivatives). For the anti-hemolytic, antimicrobial (Gram-negative bacteria) and cytotoxic activity (cell lines HepG2, NCI H460 and HeLa), tisanes T2 and T4, also containing lemon thyme, were highlighted as the best mixtures. Rosmarinic acid and its derivatives were the most important phenolics compounds in all tisanes, followed by glycosylated flavanols/flavones. The results suggest that tisanes prepared from mixtures of aromatic and medicinal plants can be sources of bioactive compounds with high added value for application in the food industry, among others.

*Keywords:* aromatic and medicinal plants, herbal teas, phenolic compounds, bioactives, Pearson's correlations.

## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xvii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xix
<b>1. Introdução</b> .....	2
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	3
<b>2.1. Tisanas de plantas aromáticas e medicinais</b> .....	3
<b>2.1.1. Chás versus tisanas</b> .....	4
<b>2.1.2. Métodos tradicionais e industriais de preparação de tisanas</b> .....	6
<b>2.1.3. Importância para a indústria alimentar e saúde do consumidor</b> .....	7
<b>2.2. Plantas aromáticas e medicinais usadas na preparação de tisanas</b> .....	8
<b>2.3. Caracterização fitoquímica de tisanas</b> .....	11
<b>2.3.1. Compostos fenólicos</b> .....	11
<b>2.3.2. Vitamina E</b> .....	13
<b>2.3.3. Ácidos orgânicos</b> .....	13
<b>2.4. Caracterização do potencial bioativo de tisanas</b> .....	14
<b>2.4.1. Potencial antioxidante</b> .....	14
<b>2.4.2. Potencial citotóxico</b> .....	16
<b>2.4.3. Potencial anti-inflamatório</b> .....	17
<b>2.4.4. Potencial antimicrobiano</b> .....	17
<b>2.4.5. Potencial antidiabético</b> .....	18
<b>3. Objetivos</b> .....	20
<b>3.1. Objetivos específicos</b> .....	20
<b>4. Material e Métodos</b> .....	24
<b>4.1. Padrões e reagentes</b> .....	24
<b>4.2. Material vegetal</b> .....	25
<b>4.3. Preparação das tisanas</b> .....	26
<b>4.4. Caracterização fitoquímica</b> .....	27
<b>4.4.1. Compostos fenólicos</b> .....	27
<b>4.4.2. Tocoferóis (Vitamina E)</b> .....	29
<b>4.4.3. Ácidos orgânicos</b> .....	28
<b>4.5. Avaliação das propriedades bioativas <i>in vitro</i></b> .....	30

<b>4.5.1. Potencial antioxidante</b> .....	30
4.5.1.1. Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	30
4.5.1.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA).....	31
<b>4.5.2. Citotoxicidade em células tumorais e hepatotoxicidade em células não tumorais</b> .....	31
<b>4.5.3. Potencial anti-inflamatório</b> .....	33
<b>4.5.4. Potencial antimicrobiano</b> .....	34
<b>4.5.5. Potencial anti-tirosinase</b> .....	35
<b>4.5.6. Potencial antidiabético</b> .....	35
<b>4.6. Análise estatística</b> .....	36
<b>5. Resultados e Discussões</b> .....	40
<b>5.1. Compostos fenólicos</b> .....	40
<b>5.2. Caracterização de ácidos orgânicos e tocoferóis</b> .....	51
<b>5.3. Bioatividades</b> .....	55
<b>5.3.1. Atividade antioxidante</b> .....	55
<b>5.3.2. Atividade citotóxica e hepatotóxica</b> .....	58
<b>5.3.3. Atividade anti-inflamatória</b> .....	59
<b>5.3.4. Atividade antimicrobiana</b> .....	62
<b>5.3.5. Atividade anti-tirosinase</b> .....	63
<b>5.3.6. Atividade antidiabética</b> .....	64
<b>5.4. Correlações entre composição fenólica e ensaios de bioatividades realizados</b> .....	66
<b>6. Conclusões</b> .....	72
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigénio singlete
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano)
AFT	Ácidos fenólicos totais
ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente vascular cerebral
BHT	Butil-hidroxitolueno
CFT	Compostos fenólicos totais
CGA	Ácido clorogénico
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detetor de diodos
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
ESI	Ionização por electropulverização
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F3OT	Flavan-3-óis totais
FBS	Soro fetal bovino
$\text{FeSO}_4$	Sulfato de ferro
FlaT	Flavonas totais
FFT	Flavonóis/flavonas totais
$\text{GI}_{50}$	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogénio
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido sulfúrico
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HNE	4-Hidroxinonenal
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência

IC <sub>50</sub>	Concentração responsável por 50% da atividade
iFlaT	Isoflavonas totais
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólico
L-DOPA	Levodopa
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LPS	Lipossacarídeo
<i>m/v</i>	Razão massa/volume
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MÉDIAA	Malonilaldeído
MHB	Caldo Mueller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MS	Espectrometria de massa
MS <sup>2</sup>	Dupla espectrometria de massa
NaCl	Cloreto de sódio
nd	Não detetado
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
NO·	Óxido nítrico·
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
nq	Não quantificado
°C	Graus Celsius
OCT	Outros compostos totais
OH	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Radical peroxinitrito
OxHLIA	Ensaio da inibição da hemólise oxidativa
PAM	Plantas Aromáticas e Medicinais
PBS	Tampão fosfato-salino
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação
RNS	Espécies reativas de nitrogénio
RO	Radical alcoxilo
ROO·	Radical peroxilo
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto

SRB	Sulforodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tr	Tempo de retenção
Tris	Trisaminometano
Tris-HCl	Trisaminometano-ácido clorídrico
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Radiação ultravioleta
UV/VIS	Radiação ultravioleta-visível
Vg	Vestígios
v/v	Razão volume/volume
$\Delta t$	Variação de tempo
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorção máxima



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Percentagem de tisanas lançadas nos anos de 2012 a 2015 (baseado em Pereira, (2015). .....	5
<b>Tabela 2.</b> Espécies de plantas aromáticas e medicinais.....	9
<b>Tabela 3.</b> Espécies de plantas aromáticas e medicinais (cont.). .....	10
<b>Tabela 4.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na tisana T1 (média $\pm$ DP). .....	43
<b>Tabela 5.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos e outros compostos na tisana T2 (média $\pm$ DP). .....	44
<b>Tabela 6.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos e outros compostos na tisana T3 (média $\pm$ DP). .....	45
<b>Tabela 7.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na tisana T4 (média $\pm$ DP). .....	47
<b>Tabela 8.</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na tisana T5 (média $\pm$ DP). .....	49
<b>Tabela 9.</b> Composição em ácidos orgânicos e tocoferóis nos extratos secos e nas preparações aquosas de tisanas das amostras T1, T2, T3, T4 e T5. ....	52
<b>Tabela 10.</b> Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> em $\mu\text{g/mL}$ ) medida pelos ensaios de TBARS e OxHLIA nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP).....	56
<b>Tabela 11.</b> Citotoxicidade e hepatotoxicidade (GI <sub>50</sub> , $\mu\text{g/mL}$ ) nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP). .....	59
<b>Tabela 12.</b> Atividade anti-inflamatória (IC <sub>50</sub> , $\mu\text{g/mL}$ ) nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP).....	61
<b>Tabela 13.</b> Atividade antimicrobiana (CMI e CMB, $\text{mg/mL}$ ) nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP).....	62
<b>Tabela 14.</b> Atividade anti-tirosinase nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP). .....	64

**Tabela 15.** Atividade antidiabética ( $IC_{50}$ , mg/mL) baseado na inibição da  $\alpha$ -glucosidase em origem fúngica e vegetal nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP).

..... 65

**Tabela 16.** Correlação ( $R^2$ ) das atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-tirosinase e antidiabética das cinco amostras de tisanas estudadas com as famílias de compostos fenólicos identificadas nas mesmas. .... 67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esqueleto básico e numeração de flavonoides: (A) estrutura básica e (B) estrutura básica com um grupo carbonílico no C-4 (Huber & Rodriguez-Amaya, 2008).....	12
<b>Figura 3.</b> Estrutura dos ácidos cítrico (A), málico (B), succínico (C), fumárico (D) e oxálico (E).....	13
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do $\alpha$ -tocoferol. ....	14
<b>Figura 4.</b> Produção de radicais livres proporcional ao consumo de oxigênio e à função antioxidante (Leiner, 2014). ....	15
<b>Figura 5.</b> Descrição das plantas aromáticas e medicinais que constituem as cinco amostras de tisanas estudadas.....	25
<b>Figura 6.</b> Preparação das tisanas. (A) Pesagem das amostras secas; (B) filtração e (C) tisana 4 – T4 após liofilização. ....	26
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos presentes na preparação aquosa da tisana T5 obtido a 280 nm (A) e 370 nm (B).....	50



# CAPÍTULO I





## 1. Introdução

As plantas assim como os animais e outros seres vivos, evoluíram frente às transformações do ambiente e desenvolveram mecanismos químicos de defesa os quais são misturas complexas de substâncias ativas de interesse medicinais. Um em cada quatro medicamentos comercializados é produzido a partir de substâncias extraídas de plantas, ou possuem a estrutura química derivada de vegetais. Em algumas comunidades, as práticas curativas são representadas essencialmente pela incorporação de plantas medicinais e/ou aromáticas e da fitoterapia. A fitoterapia utiliza diversas partes, formas de preparos e misturas de plantas, sendo o mais recorrente a infusão das mesmas, entretanto, muitas das infusões de misturas de plantas aromáticas e medicinais ainda não possuem sua comprovação científica sobre os possíveis efeitos no organismo humano. Algumas vezes podem causar reações adversas importantes, além disso, é necessário alertar a população acerca dos riscos dos desenvolvimentos de co-morbidades associadas ao uso inadequado das plantas aromáticas e medicinais. Dessa forma, torna-se imprescindível a investigação científica da infusões preparadas a partir das plantas aromáticas e medicinais para assegurar a sua correta utilização e contribuir para a autonomia do indivíduo no cuidado a saúde (Eberhardt, 2012).

Não restrito apenas à utilização pela comunidade, há um crescente interesse por parte das empresas de comercialização de plantas pela produção de preparados para infusões contendo misturas de espécies de plantas, de forma a melhorar os parâmetros organolépticos, aumentando assim a aceitação dos produtos pelo consumidor (Roriz, 2014).

Nesse contexto, diante a escassez de estudos a respeito das propriedades bioativas e nutracêuticas de misturas entre duas ou mais espécies de plantas aromáticas e medicinais para infusões, propõem-se estudar os possíveis potenciais bioativos que podem apresentar, como antioxidante, antimicrobiano, citotóxico, anti-tirosinase, antidiabético e anti-inflamatório, bem como caracterizá-las fitoquimicamente, em conteúdo de tocoferóis, ácidos orgânicos e compostos fenólicos.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Tisanas de plantas aromáticas e medicinais**

As plantas aromáticas e medicinais (PAMs) têm vindo a ser utilizadas desde os primórdios da humanidade e existem referências ao uso de plantas, datadas de há mais de sessenta mil anos (Azevedo, 2011). O conceito de PAMs é baseado na sabedoria empírica do Homem quanto à utilização e aplicação destes produtos naturais (Junior, Garcez, Garcez, & Guterres, 2013).

As plantas são consideradas aromáticas quando os seus princípios ativos são formados, total ou parcialmente por essências, e uma planta é considerada medicinal quando possui constituintes terapêuticos benéficos para o tratamento ou prevenção de uma determinada doença. As PAMs possuem a combinação dessas características. Estes tipos de plantas têm sido utilizados não apenas como alimento, mas também para aplicações terapêuticas. Possuem propriedades medicinais com grande potencial de aplicação no tratamento de diversas doenças, já que são fontes naturais de compostos bioativos (Pereira et al., 2015).

Devido à grande diversidade de moléculas bioativas, a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo com grande aceitação pelo consumidor e tem vindo a crescer também na comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido devidamente estudadas, comprovando a sua eficácia e segurança (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Kinghorn, 2001).

Portugal apresenta uma flora extremamente rica em PAMs. Do total de 3800 espécies de plantas que constituem a cobertura vegetal de Portugal (incluindo Açores e Madeira), cerca de 500 são aromáticas e/ou medicinais (Figueiredo, Barroso, & Pedro, 2006). Existem ainda estudos envolvendo a avaliação de efeitos sinérgicos de combinações de plantas que destacam o potencial dessas misturas quando comparadas com a planta isolada (Pereira, Calhelha, Barros, Queiroz, & Ferreira, 2014).

Existem várias formas de transformação, preparação e aplicação das PAMs, variando de acordo com os seus compostos ativos e finalidade de aplicação. Um exemplo tradicionalmente preparado é a infusão das folhas das PAMs (Müller, 2006; Tanaka et al., 2005). As tisanas são infusões de ervas e formulações de plantas aromáticas e medicinais, sendo consumidas de forma intensa e habitual em muitas partes do mundo, devido às suas

propriedades curativas e capacidade de substituir ou complementar medicamentos convencionais (Konieczynski, Wesolowski, Radecka, & Rafalski, 2011).

### **2.1.1. Chás versus tisanas**

O chá e as tisanas são algumas das bebidas mais consumidas a nível mundial, sendo o seu consumo impulsionado pelas suas propriedades medicinais devido à riqueza em compostos com alto potencial bioativo, como os polifenóis (Alcázar et al., 2007; Fu et al., 2011; Piljac-Žegarac, Valek, Stipčević, & Martinez, 2010) e vitaminas (Morais, 2012). Para a grande maioria dos consumidores o conceito de chá e tisana é semelhante, contudo na realidade tratam-se de conceitos distintos (Pereira, 2015). O chá é uma bebida oriunda unicamente das folhas da espécie *Camellia sinensis* (L.) Kuntze pertencente à família Theaceae (Rodrigues et al., 2016). Posteriormente à colheita das folhas frescas de *C. sinensis*, o tipo e extensão do processamento podem gerar quatro tipos de chás: verde, preto, oolong e branco (Ferruzzi, 2010). A diferença entre eles está relacionada com a forma pela qual as folhas são processadas.

O chá é mundialmente consumido pois complementa um sabor agradável a efeitos estimulantes e potencialmente benéficos para a saúde. Esta bebida popular possui um conjunto de fitoquímicos biologicamente ativos como, por exemplo, catequinas e galocatequinas (Pohl et al., 2016). Os benefícios para a saúde dos derivados do chá, particularmente o tipo verde (é o menos processado, com mínima oxidação, o que o torna mais rico em polifenóis bioativos quando comparado a chás mais processados, onde estes compostos são degradados durante o processo), estão bem descritos e incluem a prevenção do cancro, redução de risco de doença cardiovascular, propriedades antidiabéticas e antiobesidade e/ou proteção contra efeitos oxidativos e doenças relacionadas ao *stress* oxidativo (Khan & Mukhtar, 2007; Shahidi, 2000).

Por sua vez, tisana (ou, comumente conhecida como chá de ervas) é uma bebida proveniente de outras plantas além da espécie *C. sinensis*. Os chás de ervas, ou tisanas e formulações de plantas medicinais, também possuem uma infinidade de benefícios para a saúde (Pohl et al., 2016). Estes podem ser consumidos na forma de infusões ou decocções, geralmente não contém cafeína e podem ser preparados a partir de diferentes partes das plantas, flores, frutas, folhas, sementes, cascas e raízes (Azevedo, 2011; Pohl et al., 2016).

Os chás de ervas são específicos conforme a região, como por exemplo o mate, amplamente consumido na América do Sul como tónico e estimulante (Purcaro et al., 2009),

podendo-se também citar as tisanas de flores perfumadas tailandesas consumidas principalmente no Sudeste Asiático (Samakradhamrongthai, Utama-Ang, & Thakeow, 2009).

As tisanas de plantas aromáticas e medicinais são utilizadas tanto pela sua abundância aromática como pelo impacto positivo na saúde e bem-estar dos consumidores (Wills, Bone, & Morgan, 2000). Este tipo de bebida é rico em compostos fenólicos, cujo teor em alguns casos, depende do grau de fermentação ou processamento da própria planta. Os principais compostos descritos são flavonoides, especialmente derivados de catequinas (Del Rio et al., 2010) e o seu consumo é reconhecido por apresentar numerosos benefícios para a saúde, nomeadamente pelas suas propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, diuréticas, anti-inflamatórias, anticancerígenas (Konieczynski et al., 2011; Lemberkovics, Czinner, Szentmihályi, Balázs, & Szőke, 2002; Milani et al., 2015; Nookabkaew, Rangkadilok, & Satayavivad, 2006), efeitos antianémicos, hipoglicémicos e neuroprotetores (Kartika, Shido, Nakamoto, Li, & Iwaoka, 2011; Nookabkaew et al., 2006; Santos Magalhães et al., 2009), estimulantes, relaxantes, desintoxicantes e reguladores metabólicos (Pohl et al., 2016).

O consumo de tisanas no mercado europeu demonstrou um aumento significativo nos anos de 2012 a 2014. Neste período, foram lançados na Europa 538 produtos na categoria das infusões. Na **Tabela 1** é possível verificar o maior número de lançamentos no segundo semestre de 2014, cerca de 30,1% (Pereira, 2015).

**Tabela 1.** Percentagem de tisanas lançadas nos anos de 2012 a 2015 (baseado em Pereira, (2015).

Período	% de tisanas lançadas
2012 – 1º semestre	6,1
2012 – 2º semestre	17,1
2013 – 1º semestre	14,1
2013 – 2º semestre	14,9
2014 – 1º semestre	17,7
2014 – 2º semestre	30,1

A produção e consumo de tisanas vão continuar aumentando pela próxima década, em torno de 2,5% ao ano, segundo um apontamento publicado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação FAO (2018).

O método tradicional para a preparação de tisanas é uma infusão, na qual é geralmente colocada água fervida sobre as partes da planta em questão, deixando-a em infusão por alguns

minutos (Costa et al., 2012), sendo também possível preparar através dos métodos de decocção e maceração (Figueiredo, Barroso, & Pedro, 2014). Na preparação de tisanas são consideradas essenciais cinco parâmetros (Lee, Chambers, & Chambers IV, 2007; Jeehyun Lee & Chambers, 2007; Xia, Shi, & Wan, 2006): i) qualidade da água, ii) qualidade da matéria-prima, iii) temperatura da água, iv) concentração e v) tempo de infusão (Jeehyun Lee & Chambers, 2007; Xia et al., 2006).

A qualidade da água utilizada na preparação de tisanas é um parâmetro fundamental e de grande influência no produto final. É aconselhado o uso de água mineral ou, preferencialmente, água filtrada (Morais, 2012). A utilização de uma matéria-prima com qualidade na preparação de uma tisana tem uma grande influência no resultado final, pois é nesta que se encontram os compostos que compõem o aroma e que conferem o carácter terapêutico à bebida (Proença da Cunha, Roque, & Gaspar, 2011).

Para infusões de tisanas as temperaturas recomendadas são na ordem dos 75-90°C (Infante, Rubio, Contador, & Moreno, 2010). Contudo, o fator concentração tem especial importância quando, à toma de infusões feita por prazer, se acrescenta o carácter terapêutico, e onde a quantidade de cada composto pode ser determinante para que essa vertente seja eficaz (Jäger et al., 2011), sendo usual a indicação terapêutica de 20 g/L. Para assegurar a qualidade da infusão de tisanas considera-se o tempo ideal de infusão no intervalo de 5 a 10 minutos (Infante et al., 2010; Koch, Muller, Joubert, van der Rijst, & Næs, 2012).

### ***2.1.2. Métodos tradicionais e industriais de preparação de tisanas***

A valorização popular das plantas e das suas propriedades aromáticas e conservantes é feita pela extração de óleos ou colocação num azeite aromatizado, preparação de licores ou vinhos tónicos, ou sob a forma de tisanas. São também utilizadas na preparação de tinturas, xaropes ou fármacos vegetais para fins medicinais, de uso interno ou externo, entre outros. Todos estes exemplos constituem as formas mais simples, ou tradicionais, de extração dos princípios ativos das plantas (Figueiredo et al., 2014).

Durante a colheita das PAMs, os seguintes itens devem ser cuidadosamente monitorizados: separação e etiquetagem do material colhido, embalagem em sacos de plástico, transporte do material, pesagem do material húmido, secagem do material, pesagem do material seco, armazenamento, trituração, pesagem do material triturado e obtenção de extratos (Maciel, Pinto, Veiga, Grynberg, & Echevarria, 2002).

Nas espécies aromáticas e medicinais a secagem é uma operação unitária de preparação do material vegetal fundamental para o armazenamento. A secagem a nível industrial pode ser efetuada de forma natural ou através de estufas de ar quente em forma de armário ou fita transportadora ou ainda, por secadores solares (Lopes, 2014). A secagem de forma natural normalmente compreende um secador solar com sombra, de forma a evitar a descoloração da planta (Ekechukwu & Norton, 1999). As estufas de ar quente em forma de armário possuem uma fonte de calor onde o ar percorre os tabuleiros onde estão dispostas as plantas para secagem. Este método é o mais recomendado para grandes quantidades de produto, uma vez que, atualmente, é o mais rápido e mais eficaz (Lopes, 2014). Os secadores solares, por sua vez, são classificados em passivos onde o ar circula naturalmente, ativos com convecção forçada e ainda podem ser classificados pelo tipo de disposição do secador e pela forma de exposição solar, classificando-se em sistema direto, indireto ou misto (Ekechukwu & Norton, 1999; Fudholi, Sopian, Ruslan, Alghoul, & Sulaiman, 2010; Sharma, Chen, & Lan, 2009).

A nível doméstico, a secagem deve ser feita à sombra, para que as propriedades das plantas não sejam alteradas pelo sol. A duração desse processo varia dependendo do tipo de planta (Badke, Budó, da Silva, & Ressel, 2011). O tempo de secagem depende das características climáticas; em zonas secas, não deveriam ultrapassar os quatro a cinco dias, em locais com maior humidade relativa é necessário um período maior. Nos locais mais húmidos é aconselhável que se abra os molhos de forma a realizar o arejamento das plantas. Após completa secagem, deve-se guardar em frascos ao abrigo da luz e local relativamente fresco. A secagem excessiva compromete a estabilidade e concentração dos compostos bioativos das plantas; enquanto que a secagem com humidade excessiva possibilita o processo de contaminação das plantas por microorganismos, comprometendo a sua qualidade (Lourenzani, Lourenzani, & Batalha, 2004).

### ***2.1.3. Importância para a indústria alimentar e saúde do consumidor***

Atualmente, a indústria farmacêutica enfrenta muitos desafios que favorecem o uso de produtos naturais obtidos de plantas, em relação aos atuais compostos artificiais disponíveis para o tratamento de diferentes problemas de saúde. O desenvolvimento de resistências a antimicrobianos, o reaparecimento de doenças infeto-contagiosas (Rojas et al., 2003), altos custos de produção e tempo de vida útil limitado dos agentes terapêuticos (Cowan, 1999), são

fatores importantes que encorajaram o interesse por medicamentos que incluem derivados de extratos vegetais.

O estudo de extratos orgânicos de plantas aromáticas e medicinais para a preparação de tisanas, tem sido uma boa alternativa na busca de mais compostos promissores que apresentem diversas atividades biológicas, uma vez que as doenças infecciosas são uma das principais causas de morte no mundo, sendo importante o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos (Paula et al., 2015).







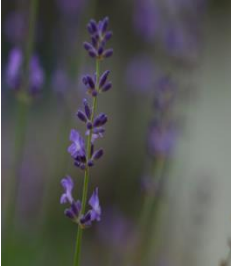

A ação antioxidante dos polifenóis de tisanas tem despertado o interesse na indústria alimentar como possíveis substitutos naturais para os atuais antioxidantes artificiais (Dufresne & Farnworth, 2001). Para além das suas reconhecidas potencialidades bioativas apresentam também a capacidade de inibir as alterações oxidativas que ocorrem nos alimentos. Vários grupos de polifenóis (antocianinas, taninos, flavanonas, isoflavonas, resveratrol e ácido elágico) são atualmente utilizados na indústria como componentes de nutracêuticos e alimentos funcionais (Espín, García-Conesa, & Tomás-Barberán, 2007).

Estudos como o que se propõe com este trabalho são de extrema importância para caracterizar quimicamente as plantas comumente usadas na medicina tradicional, adicionando-lhes valor como fontes de moléculas que poderão ser posteriormente aplicadas a uma vasta gama de setores industriais.









## **2.2. Plantas aromáticas e medicinais usadas na preparação de tisanas**

O uso de ervas medicinais é baseado no conhecimento popular das características únicas. Além do conhecimento empírico, adicionam-se muitos conhecimentos científicos às PAMs. Neste trabalho propõem-se, portanto, estudar propriedades bioativas de algumas PAMs pertencentes às famílias: Poaceae, Labiatae, Amaranthaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Hypericaceae, Lauraceae e Myrtaceae, como ilustrado nas **Tabelas 2 e 3**. Nestas tabelas estão descritas as plantas que irão ser objetivo de estudo no presente trabalho, descrevendo-se os seus usos e costumes, aliados às suas potencialidades e aplicações.

**Tabela 2.** Espécies de plantas aromáticas e medicinais.

<i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf <sup>(1)</sup>	<i>Ocimum basilicum</i> 'Cinnamon' <sup>(2)</sup>	<i>Gomphrena</i> sp. <sup>(3)</sup>	<i>Gomphrena globosa</i> L. <sup>(4)</sup>	<i>Thymus x citriodorus</i> (Pers.) Schreb <sup>(5)</sup>	<i>Thymus mastichina</i> L. <sup>(6)</sup>	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <sup>(7)</sup>	<i>Agastache foeniculum</i> (Pursh) Kuntze <sup>(8)</sup>
Capim-Limão	Manjerição-canela	Amaranto rosa	Perpétua-roxa	Tomilho-limão	Tomilho-vulgar	Lavanda inglesa	Anis hisopo
							
O: <i>Cyperales</i> F: Poaceae	O: <i>Lamiales</i> F: Labiatae	O: <i>Caryophyllales</i> F: Amaranthaceae	O: <i>Caryophyllales</i> F: Amaranthaceae	O: <i>Lamiales</i> F: Lamiaceae	O: <i>Lamiales</i> F: Lamiaceae	O: <i>Lamiales</i> F: Lamiaceae	O: <i>Lamiales</i> F: Lamiaceae
Usos e costumes							
Cosmética, farmacêutica e infusão	Agente aromatizante e óleo essencial	Bioativo Infusão	Infusões	Culinário. Infusão	Culinária, cosmética e infusão	Perfumaria, cosméticos e medicinal	Medicinal
Potencialidade/Aplicação							
Antioxidante, anti-inflamatória intestinal, antitumoral e antidiabético	Antioxidante e antimicrobiano	Antioxidante, antimicrobiano e antitumoral	Antioxidante, anti-inflamatória e antidiabético	Antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante	Antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica	Antimicrobiano, antioxidante, antiviral e citotóxico	Antimicrobiano
O: ordem; F: Família. Referências: (Roriz, 2014) <sup>1</sup> ; (Javanmardi, Stushnoff, Locke, & Vivanco, 2003; Kwee & Niemeyer, 2011; Vieira & Simon, 2006) <sup>2</sup> ; (Liberal et al., 2016) <sup>3</sup> ; (Dinda et al., 2006; Ilyas, Tarnam, & Begum, 2013; Silva et al., 2012) <sup>4</sup> ; (Garay, 2017) <sup>5</sup> ; (Méndez-Tovar, Sponza, Asensio-S-Manzanera, & Novak, 2015) <sup>6</sup> ; (Zhou et al., 2017) <sup>7</sup> ; (Estrada-Reyes et al., 2004; Sourestani, Malekzadeh, & Tava, 2011) <sup>8</sup>							

**Tabela 3.** Espécies de plantas aromáticas e medicinais (cont.).

<i>Mentha x piperita</i> L. <sup>(9)</sup>	<i>Mentha spicata</i> L. <sup>(10)</sup>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <sup>(11)</sup>	<i>Calendula officinalis</i> L. <sup>(12)</sup>	<i>Ocimum basilicum</i> L. <sup>(13)</sup>	<i>Hypericum androsaemum</i> L. <sup>(14)</sup>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume <sup>(15)</sup>	<i>Syzygium aromaticum</i> L. <sup>(16)</sup>
Hortelã-pimenta	Hortelã	Alecrim	Calêndula	Manjeriço	Hiperiço do gerês	Canela	Cravo
							
O: Lamiales F: Lamiaceae	O: Lamiales F: Lamiaceae	O: Lamiales F: Lamiaceae	O: Asterales F: Asteraceae	O: Lamiales F: Lamiaceae	O: Malpighiales F: Hypericaceae	O: Laurales F: Lauraceae	O: Caryophyllales F: Myrtaceae
<b>Usos e costumes</b>							
Infusão e culinária	Alimentar, farmacêutica, perfumaria, confeitaria	Culinário e medicinal	Cosmética, medicinal, alimentar, corante	Culinária	Medicinal	Culinária	Medicinal
<b>Potencialidade/Aplicação</b>							
Antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório	Antioxidante, antimicrobiano e neuroprotetor	Antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatória, antitumoral e antidiabético	Anti-inflamatório, antimicrobiano antitumoral	Anti-inflamatório, neuroprotetor e antimicrobiano	Anti-inflamatórios, antitumorais, antimicrobianos, antioxidantes e antivirais	Antitumoral, antidiabética.	Anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano e antitumoral

O: ordem; F: Família. Referências: (Kapp et al., 2013)<sup>9</sup>; (Chrysargyris, Nikolaidou, Stamatakis, & Tzortzakis, 2017)<sup>10</sup>; (Almeida Gonçalves et al., 2018; Andrade et al., 2018)<sup>11</sup>; (Matić et al., 2013)<sup>12</sup>; (Flanigan & Niemeyer, 2014)<sup>13</sup>; (Jabeur et al., 2016)<sup>14</sup>; (Husain et al., 2018)<sup>15</sup>; (Ryu, Kim, Woo, Choi, & Jang, 2016)<sup>16</sup>

## 2.3. Caracterização fitoquímica de tisanas

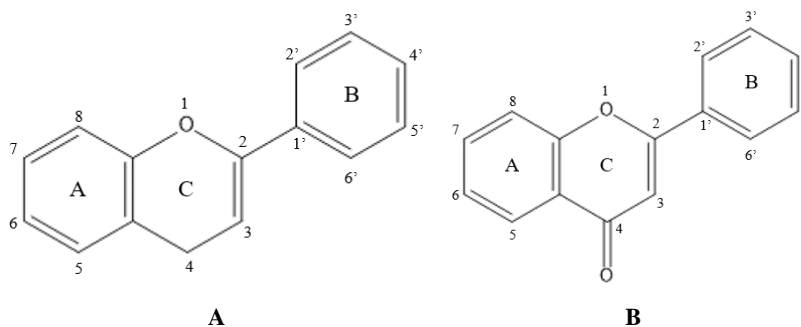
### 2.3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são geralmente produzidos como um mecanismo de defesa das plantas contra um ataque aos seus tecidos, bióticos ou abióticos, como exemplo condições desfavoráveis de temperatura, luz e pH, e ainda ataques de patógenos. São por isso considerados metabolitos secundários, uma vez que não estão diretamente correlacionados com as funções de crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal, e são normalmente encontrados em determinados tecidos e órgãos e em estágios específicos de desenvolvimento da planta (Buchanan, Grissem, & Jones, 2000).

Os efeitos benéficos dos compostos fenólicos estão maioritariamente relacionados com a sua capacidade antioxidante (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002), particularmente com a capacidade de eliminar radicais livres (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Os compostos fenólicos são acumulados como produtos finais resultantes das vias do acetato e do shiquimato, e podem ir desde pequenas e simples moléculas (ácidos fenólicos, fenilpropanóides e flavonoides) até compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas, taninos condensados e hidrolizáveis), sendo que os flavonoides são os compostos mais comuns (Ferreira, Barros, & Abreu, 2009). Os flavonoides, estão divididos em várias classes, como flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonoides, di-hidroflavonóis, calcona, entre outros. A estrutura dos flavonoides é baseada num núcleo que consiste em dois anéis fenólicos denominados A e B, contendo também um anel C (**Figura 1**), que pode ser um pirano heterocíclico no caso de flavanois (catequinas) e antocianidinas, ou uma pirona, no caso dos flavonois, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonilo na posição C-4 do anel C (Huber & Rodriguez-Amaya, 2008). Os flavonoides variam ainda de acordo com o padrão de hidroxilação, conjugação entre os anéis aromáticos, padrão de glucosilação e presença de grupos metoxilo. A polimerização desta estrutura nuclear produz taninos e outras espécies mais complexas que se apresentam em grandes quantidades nas uvas e chá preto (Cook & Samman, 1996).

As propriedades antioxidantes dos flavonoides são resultado dos grupos hidroxilo ligados aos anéis da estrutura, podendo estes atuarem como agentes de redução, doadores de eletrões de hidrogénio, quelantes do oxigénio singleto, captadores de radicais superóxido e até

como quelantes de metais (Carocho et al., 2013). Os flavonoides (exceto as catequinas) são encontrados principalmente na forma glucosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente *O*-glucosilados, ligados ao grupo hidroxilo na posição C3 ou C4 (Erlund, 2004; Huber & Rodriguez-Amaya, 2008).



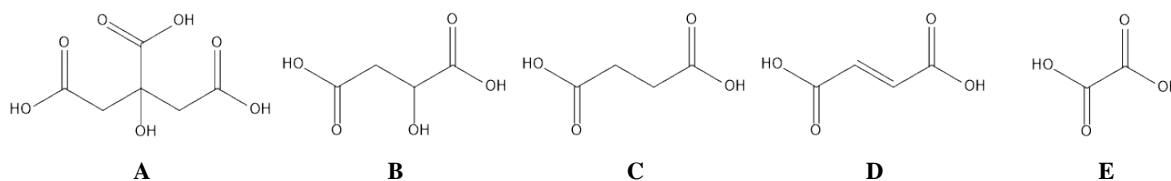
**Figura 1.** Esqueleto básico e numeração de flavonoides: (A) estrutura básica e (B) estrutura básica com um grupo carbonílico no C-4 (Huber & Rodriguez-Amaya, 2008).

Estes compostos são reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e, uma vez que o *stress* oxidativo é uma causa subjacente de várias doenças crônicas, os compostos fenólicos podem ter resultados benéficos na atuação contra doenças como diabetes, distúrbios neurodegenerativos, inflamação e doenças coronárias (Parr & Bolwell, 2000; Sergent, Piront, Meurice, Toussaint, & Schneider, 2010), sendo por isso importante a sua identificação em várias fontes naturais nomeadamente tisanas de plantas aromáticas e medicinais.

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos, a saber: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbónica, constituída por 3 carbonos ligados ao anel. Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sinático são os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Também são encontrados na forma de glucósidos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuico, vanílico, sirínico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos têm apresentado propriedades antioxidantes, geralmente determinadas pelo número de hidroxilos presentes na molécula (Degáspari & Waszczynskyj, 2004).

### 2.3.2. Ácidos orgânicos

Alguns ácidos orgânicos, para além dos mencionados em cima, encontrados em plantas aromáticas e medicinais são (**Figura 3**): os ácidos cítrico, málico, succínico, fumárico e oxálico (Pereira, Barros, Carvalho, & Ferreira, 2013). Acredita-se que alguns ácidos orgânicos podem ter uma atividade biológica, e assim, possuir um impacto significativo na saúde humana (Morales et al., 2014).



**Figura 2.** Estrutura dos ácidos cítrico (A), málico (B), succínico (C), fumárico (D) e oxálico (E).

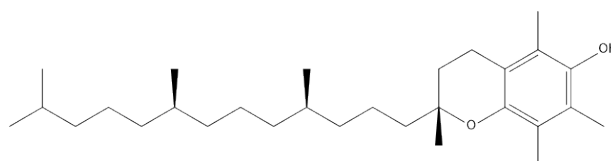
Os ácidos orgânicos apresentam uma reduzida suscetibilidade para sofrer modificações durante o processo de armazenamento, porém, a característica de maior importância dos ácidos orgânicos é o papel protetor que desempenha contra várias doenças em função da sua atividade antioxidante, podendo quelar metais ou deslocar a carga eletrônica proveniente dos radicais livres (Barros, Pereira, & Ferreira, 2013).

Os ácidos orgânicos são também conhecidos pela sua influência nas propriedades organolépticas de alimentos vegetais, e pela sua utilidade na autenticidade e qualidade destas matrizes, incluindo a estabilidade microbiana e consistência do produto. São também largamente utilizados como aditivos alimentares na produção de bebidas, sumos de frutas e vegetais. Os principais ácidos utilizados para enriquecer bebidas são os ácidos cítrico, málico e tartárico, utilizados como acidificantes, e o ácido ascórbico utilizado como antioxidante (Pereira et al., 2013).

### 2.3.3. Vitamina E

A vitamina E, constituída por tocoferóis (**Figura 2**) e tocotrienóis, é também uma vitamina com um alto potencial antioxidante e é extraída essencialmente de plantas, podendo ser também obtida a partir de macrofungos. Esta vitamina desempenha um papel importante na

proteção das membranas celulares e das lipoproteínas plasmáticas contra lesões causadas pelos radicais livres (Conceição, Sampaio, da Silva, & da Silva, 2017). O isómero biologicamente mais ativo é o  $\alpha$ -tocoferol, constituído por um anel cromanol, responsável pela atividade antioxidante em função do grupo hidroxilo. A vitamina E interrompe a peroxidação lipídica através da doação de um hidrogénio ao radicais peroxilo, originando radicais não reativos, denominados como radicais tocoferoxilo (Carocho & Ferreira, 2013; Ferreira et al., 2009).



**Figura 3.** Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol.

## 2.4. Caracterização do potencial bioativo de tisanas

### 2.4.1. Potencial antioxidante

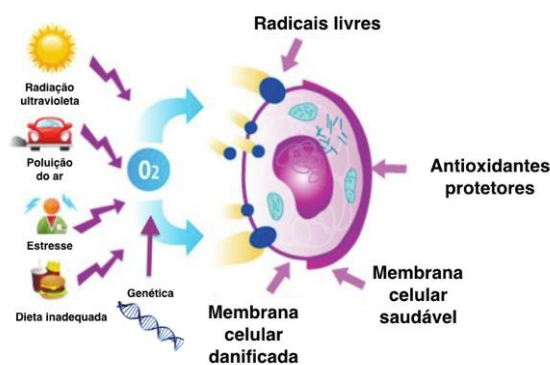
Nos últimos anos, distúrbios relacionados com o *stress* oxidativo ganharam uma atenção especial. Os radicais livres desencadeiam o processo de peroxidação lipídica, que leva à acumulação de moléculas lipídicas com capacidade para danificar uma larga gama de biomoléculas essenciais. Estes compostos induzem o *stress* considerado como fator primário nas doenças neurodegenerativas nomeadamente, Alzheimer e Parkinson, doenças cardiovasculares como a arteriosclerose, causando, ainda, a morte celular e lesões nos tecidos resultantes de enfartes do miocárdio, envelhecimento, processos inflamatórios e cancro. Sabe-se também que as lesões dérmicas provocadas por radiação UV envolvem a geração de ROS (espécies reativas de oxigénio) e RNS (espécies reativas de nitrogénio), provocando alterações estruturais e funcionais no tecido cutâneo (Herrling, Jung, & Fuchs, 2006; Ide et al., 2001; J. Wang, Xiong, Xie, Markesbery, & Lovell, 2005; Q. Wang et al., 2007).

A oxidação é um processo fundamental da vida aeróbia, por fazer parte da via de produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Assim, são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica, os radicais livres. Porém, o organismo humano também é responsável pelo combate desses radicais livres, denominados antioxidantes endógenos (Eberhardt, 2012). A atividade antioxidante é uma propriedade indispensável para a

vida. Muitas das funções biológicas, como antimutagenicidade, anticarcinogenicidade e antienvhecimento, entre outras, têm como base esse processo (Abreu et al., 2011; Ferreira et al., 2009; Pires et al., 2018).

Numerosos estudos têm investigado os fatores desencadeantes do *stress* oxidativo, a fim de compreender os mecanismos de ação dos radicais livres, bem como descobrir substâncias para prevenir e mesmo inverter a ocorrência dos danos por eles provocados (Espín et al., 2007; Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008).

A reatividade das espécies de oxigênio é elevada para o radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) e mais baixa para o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), radicais peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ) e alcóxido ( $\text{RO}\cdot$ ) (De Groot & Rauen, 1998; Diplock et al., 1998; Ferreira et al., 2009; Halliwell, 2011). As ROS podem reagir juntas ou com outras moléculas para formar moléculas mais ou menos reativas. Os radicais livres também podem ser gerados devido a uma dieta inadequada, *stress* físico e oxidativo mediado por poluentes ambientais, químicos, toxinas, radiação entre outros (**Figura 4**) (Nibir, Sumit, Akhand, Ahsan, & Hossain, 2017). As ROS alteram os ácidos gordos polinsaturados da membrana, diminuindo a sua capacidade para proteger o conteúdo celular e as trocas com o meio ambiente (Vendemiale, Grattagliano, & Altomare, 1999), iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com o oxigênio originando radicais peróxido, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos gordos polinsaturados, propagando assim a reação a mais moléculas (Sousa et al., 2007).



**Figura 4.** Produção de radicais livres proporcional ao consumo de oxigênio e à função antioxidante (Leiner, 2014).

Considerando o estilo de vida moderno, os processos desintoxicantes e antioxidantes endógenos dos organismos não são capazes de neutralizar os radicais livres produzidos diariamente (Fardet, Rock, & Rémésy, 2008; Singh, Sharad, & Kapur, 2004). Para além das defesas endógenas, existem outras moléculas naturais ou sintéticas com propriedades antioxidantes e que podem constituir um sistema exógeno de defesa, que se designam fitoquímicos (Ferreira et al., 2009). Os antioxidantes exógenos são obtidos principalmente pela dieta rica em frutas, grãos e vegetais, logo, as tisanas preparadas a partir de plantas aromáticas e medicinais podem constituir boas opções devido ao seu potencial antioxidante.

#### **2.4.2. Potencial citotóxico**

O desenvolvimento de um cancro é um processo complexo e com diferentes estágios de desenvolvimento e propagação (Ide et al., 2001) que pode ser iniciado por erros na molécula de DNA, por exemplo, após exposição a poluentes ambientais, radiação UV ou espécies reativas de oxigénio formadas endogenamente. Estes erros ao nível do DNA podem levar a mutações que quando acumuladas podem levar à transformação de células normais em células tumorais. Um fator de risco adicional para o desenvolvimento de cancro pode ser a presença de inflamação. Estima-se que 20% de todas as doenças humanas estejam ligadas a condições inflamatórias crónicas que podem ser provocadas por fatores ambientais ou induzidas por patógenos microbianos (Multhoff, Molls, & Radons, 2012; Perwez Hussain & Harris, 2007).

Já têm sido realizados muitos estudos *in vitro* com linhas celulares tumorais, mas também com animais e, mais recentemente, humanos. Estes estudos têm sido cada vez mais focados nos mecanismos moleculares envolvidos, de forma a poder entender as causas dos vários cancros e as possíveis funções dos componentes da dieta que poderiam prevenir o aparecimento dos mesmos. Estudos *in vitro* já comprovaram que as catequinas do chá atuam como potentes inibidores desta doença nos três estágios de desenvolvimento do cancro (Dufresne & Farnworth, 2001). Os flavonoides, carotenoides e triterpenos demonstraram inibir a proliferação de células cancerígenas *in vitro* (Dufour et al., 2007). Portanto, os antioxidantes de plantas aromáticas e medicinais podem desempenhar um papel importante na prevenção e controlo do desenvolvimento de células tumorais.

### **2.4.3. Potencial anti-inflamatório**

O objetivo da resposta inflamatória é o combate contra patógenos e outros ataques às células, ativando células imunológicas específicas, como macrófagos e leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) (Grivennikov, Greten, & Karin, 2010). No caso de irradiação inadequada de patógenos ou exposição repetida de partículas, lesão tecidual recorrente, sinalização inflamatória prolongada ou falha de mecanismos anti-inflamatórios, pode ocorrer inflamação crônica, o que leva a danos nas células do hospedeiro (Multhoff et al., 2012). Além disso, numerosos estudos descrevem que a inflamação crônica contribui para o desenvolvimento de cancro (Hanahan & Weinberg, 2000).

O impacto da inflamação no desenvolvimento do cancro pode ser atribuído à libertação de mediadores inflamatórios e vias ativadas relacionadas. ROS e RNS são os principais agentes químicos na carcinogênese induzida por inflamação (Kundu & Surh, 2008). Devido à sua capacidade de se ligar a importantes proteínas celulares e lípidios, a exposição a ROS e RNS tem várias consequências moleculares, incluindo indução de apoptose, reparação da molécula de DNA, influência no ciclo celular e senescência celular (Bartsch & Nair, 2004). Estas consequências se não forem adequadamente reparadas, podem levar a uma carga mutacional aumentada podendo levar à ativação de oncogenes e/ou inativar genes supressores de tumores (Krais et al., 2016).

Os compostos fenólicos, como ácido ferúlico, quercetina, isoramnetina e campferol já foram descritos como contendo propriedades anti-inflamatórias *in vitro* (Hämäläinen, Nieminen, Vuorela, Heinonen, & Moilanen, 2007; Luceri et al., 2004; Ronchetti et al., 2006). Também foi descrito que a rutina e catequinas do chá exibem ações anti-inflamatórias em animais (Dufresne & Farnworth, 2001).

### **2.4.4. Potencial antimicrobiano**

Os compostos antimicrobianos das plantas podem agir de forma diferente para um grupo particular de microrganismos patogênicos alvo. Assim, o tipo de dano observado pode ser diferente entre bactérias, mesmo quando tratadas com a mesma substância antimicrobiana (Shimamura, Zhao, & Hu, 2007).

Devido ao potencial antimicrobiano que apresentam, os extratos obtidos a partir de produtos vegetais têm sido apontados como alternativas promissoras aos conservantes

artificiais existentes. O potencial antimicrobiano destes extratos resulta do facto das plantas serem ricas numa variedade de compostos com atividade antimicrobiana, tais como saponinas, taninos, alcaloides, alcenilfenóis, glicoalcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, lactonas e terpenoides (Lewis & Ausubel, 2006; Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010). Foram já publicados inúmeros estudos sobre as propriedades antimicrobianas de metabolitos vegetais (Bajpai, Rahman, & Kang, 2008; Tajkarimi et al., 2010; Tiwari et al., 2009). Dentro destes, os polifenóis, particularmente os flavonoides, têm demonstrado possuir uma grande atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de microrganismos patogénicos (Cushnie & Lamb, 2005).

Para além de poderem danificar a bicamada fosfolipídica da membrana celular, os compostos antimicrobianos das plantas podem interromper os sistemas enzimáticos celulares e comprometer o material genético de uma célula bacteriana. A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é, em grande parte, devida à capacidade desses compostos penetrarem na membrana celular das bactérias, causando danos na sua estrutura e permeabilidade, alterações do pH intercelular, potencial de membrana e síntese de trifosfato de adenosina (ATP) (Sánchez, García, & Heredia, 2010). Um estudo da atividade antimicrobiana mostrou que o óleo essencial de *C. Citratus* apresenta ação antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Lucena et al., 2015). Várias revisões concentraram-se em estudos recentes do efeito antimicrobiano de especiarias e plantas aromáticas e dos seus óleos essenciais contra bactérias patogénicas características de produtos alimentares (Garay, 2017).

#### **2.4.5. Potencial antidiabético**

Os distúrbios metabólicos, como a hiperglicemia, perfil lipídico alterado e aumento do risco de doença cardiovascular estão associados à *Diabetes mellitus* (Davis & Granner, 2001) e afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Ambos os tipos 1 e 2 de *Diabetes mellitus* apresentam hiperglicemia, microvascular e macrovascular complexos. Quando o nível de ROS está alto e é acompanhado de diabetes, considera-se que a defesa endogéna antioxidante está debilitada; o que leva a acreditar que a doença de diabetes também esteja relacionada com o nível de ROS no organismo (Berryman, Maritim, Sanders, & Watkins III, 2005).

O *Diabetes mellitus* é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crónica, hipoinsulinemia e cetose. Para reduzir os níveis plasmáticos de glicose, a indústria farmacêutica lançam hipoglicemiantes orais e insulina, porém, esses tratamentos podem ser

inefcazes em casos avançados ou até mesmo não serem suficientes para manter a glicemia em níveis normais. As plantas medicinais com propriedades hipoglicemiantes são alternativas utilizadas, tanto de maneira popular como também por profissionais da saúde. Algumas delas já foram comprovadas cientificamente como potenciais antidiabéticos. Existem vias bioquímicas das quais níveis elevados de glicose podem formar níveis significantes de ROS, portanto, há evidências consideráveis na confirmação de que a indução do *stress* oxidativo é um processo fundamental no aparecimento do diabetes (Eberhardt, 2012). Além de espécies reativas de oxigênio, também as RNS têm sido sugeridas como uma das fontes de *stress*. O óxido nítrico (NO•) pode reagir com o superóxido formando peroxinitrito, um oxidante altamente reativo associado a muitos estados de diabetes e inflamatórios (Rodrigues et al., 2016).

Atualmente, medicamentos hipoglicémicos orais e de controle da insulina têm muitas contra-indicações. Ao mesmo tempo, tem-se vindo a verificar que a ação de muitos compostos extraídos de plantas medicinais podem ser substituídos mais seguros e eficazes que os atuais existentes no mercado (Tanko et al., 2008).

### 3. Objetivos

O valor nutricional das plantas aromáticas e medicinais estudadas já foi descrito em 2015 por Pereira, Barros, & Ferreira, portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização dos compostos bioativos assim como a avaliação das propriedades bioativas de cinco misturas de tisanas à base de plantas aromáticas e medicinais

- Tisana 1 (T1): *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Ocimum basilicum* 'Cinnamon' e *Gomphrena* sp.;
- Tisana 2 (T2): *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Thymus mastichina* L., *Lavandula angustifolia* Mill. e *Gomphrena globosa* L.;
- Tisana 3 (T3): *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze, *Mentha x piperita* L. e *Mentha spicata* L.;
- Tisana 4 (T4): *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Calendula officinalis* L. e *Mentha x piperita* L.;
- Tisana 5 (T5): *Hypericum androsaemum* L., *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Syzygium aromaticum* L.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Preparação de extractos aquosos a partir de cinco tisanas à base de plantas aromáticas e medicinais, gentilmente cedidas pela empresa Cantinho das Aromáticas;
- Determinação do perfil fenólico das tisanas por HPLC-DAD/ESI-MS;
- Determinação da composição em vitamina E (tocoferóis) nas misturas secas de tisanas e nas respectivas preparações aquosas por HPLC acoplado a um detetor de fluorescência;
- Determinação da composição em ácidos orgânicos nas misturas secas de tisanas e nas respectivas preparações aquosas por UFLC-DAD;
- Avaliação das propriedades bioativas das preparações aquosas através do seu potencial:
  - i. antioxidante: inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa - OxHLIA;

- ii. citotóxico: avaliado utilizando quatro linhas celulares tumorais humanas através do ensaio da sulfarrodamina B nas linhas MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical), HepG2 (carcinoma de fígado) e uma cultura primária obtida de células de fígado de porco - PLP2;
  - iii. anti-inflamatório: avaliado através da produção de óxido nítrico (NO) na linha celular RAW 264.7 semelhante aos macrófagos de rato;
  - iv. antimicrobiano: usando estirpes de bactérias isoladas clinicamente através do método da microdiluição acoplada ao método colorimétrico rápido com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio- INT;
  - v. anti-tirosinase: através da atividade inibitória enzimática da tirosinase;
  - vi. antidiabética: atividade inibitória enzimática da  $\alpha$ -glucosidase de origem fúngica e animal.
- Correlacionar as propriedades bioativas com a composição em compostos fenólicos das misturas das plantas aromáticas e medicinais.

## CAPÍTULO II





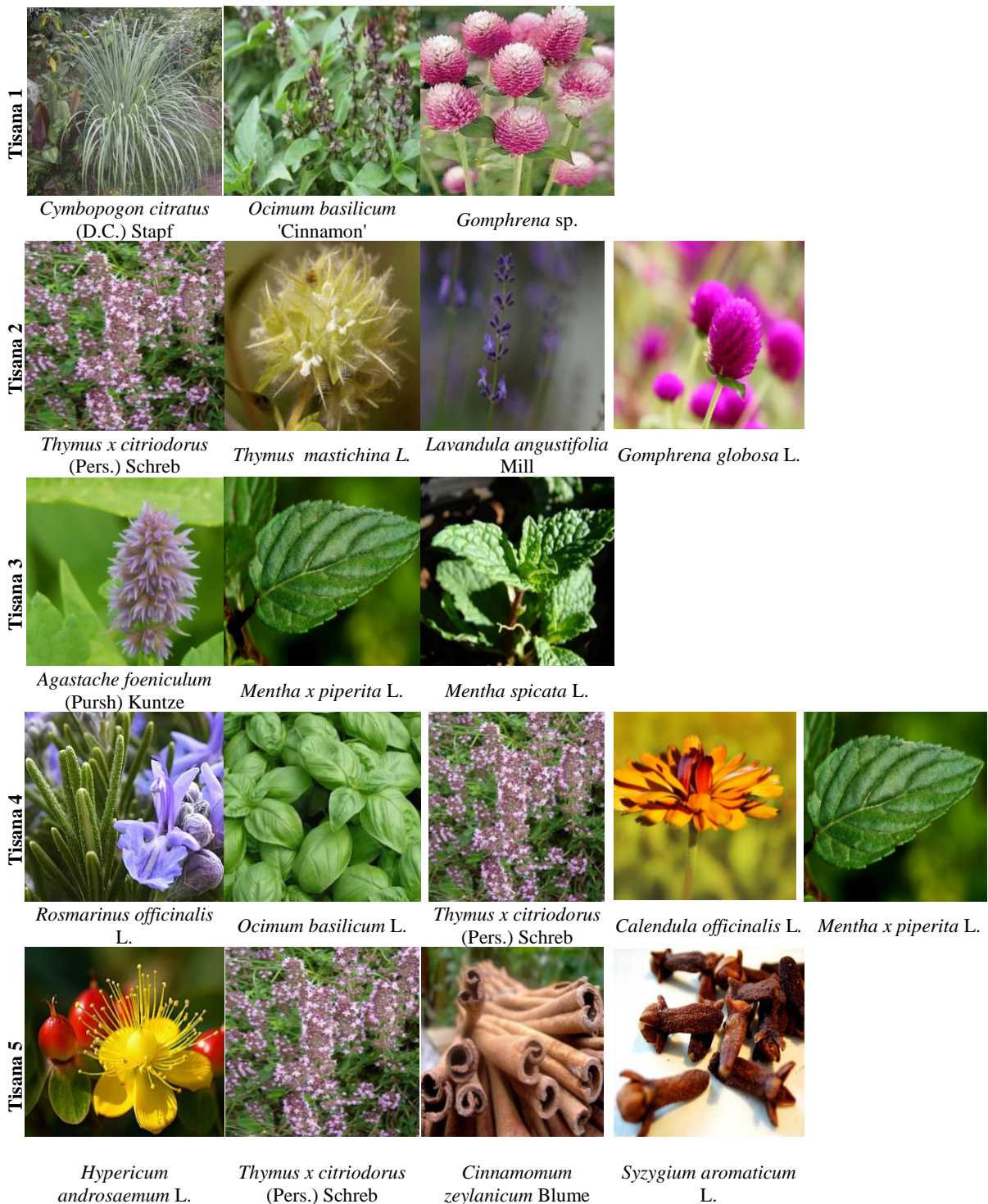
## 4. Material e Métodos

### 4.1. Padrões e reagentes

Para análise de compostos fenólicos, o acetonitrilo (99,99%) de grau HPLC e ácido fórmico foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respectivamente, os padrões de compostos fenólicos (Ácidos cafeíco, cinâmico, clorogénico, ferúlico, *p*-coumarico, rosmarínico e siríngico, e apigenina-6-*C*-glucósido, apigenina-7-*O*-glucósido, catequina, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-rutinosido e naringenina) na Extrasynthèse (Genay, França). Para análise de ácidos orgânicos e tocoferóis, os padrões trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), tocoferol e ácidos orgânicos foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O tocol racémico, 50 mg/ml, foi adquirido na Matreya (Chalfont, PA, EUA). Os solventes *n*-hexano (95%) e acetato de etilo (99,8%) de grau HPLC foram adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). No ensaio de inibição da hemólise oxidativa o reagente dicloro-hidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para os ensaios de citotoxicidade, hepatotoxicidade e anti-inflamatório, foram utilizados soro fetal de bovino (FBS), solução salina balanceada de Hank (HBSS), tripsina, solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL), RPMI-1640 (meio Instituto Memorial Parque Roswell) e meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) adquiridos na Hyclone (Chicago, Illinois, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), dexametasona, lipopolissacarídeo (LPS), Azul de Trypan e Trisaminometano (Tris) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As células RAW 264.7 foram compradas à ECACC (Colecção Europeia de Cultura Celular Animal, DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) e o Kit de Reagentes Griess foi adquirido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA). No ensaio de atividade antimicrobiana foi usado o cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT), adquirido na Panreac Applichem (Barcelona, Espanha), o caldo tripton de soja (TSB) e o Caldo Mueller Hinton (MHB) na Biolab® (São Paulo, Brasil). Para os ensaios de atividade antidiabética e anti-tirosinase, a  $\alpha$ -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* e tirosinase de origem fúngica foram obtidas na Sigma life Science (St. Louis, MO, EUA). A água destilada utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Millipore, model A10, Billerica, MA, USA).

## 4.2. Material vegetal

Cinco amostras de tisanas (**Figura 5**) foram gentilmente cedidas pela Empresa Cantinho das Aromáticas, Canidelo – Vila Nova de Gaia, na sua forma comercial (secas e embaladas em invólucros de plástico).



**Figura 5.** Descrição das plantas aromáticas e medicinais que constituem as cinco amostras de tisanas estudadas.

Todas as plantas aromáticas e medicinais que constituem as tisanas foram produzidas seguindo os princípios da produção biológica (certificada por ECOCERT, Leiria, Portugal). As partes seleccionadas foram somente aquelas consideradas nobres, como folhas (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Mentha x piperita* L., *Mentha spicata* L., *Ocimum basilicum* 'Cinnamon', *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Thymus mastichina* L.), flores (*Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze, *Calendula officinalis* L., *Gomphrena* sp., *Gomphrena globosa* L., *Hypericum androsaemum* L., *Lavandula angustifolia* Mill, *Syzygium aromaticum* L.) e casca (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), não contendo cafeína (informações cedidas pela empresa). A granulometria das amostras cedidas não permitiu a separação individual de cada uma das espécies, não sendo possível saber a percentagem da contribuição de cada planta nas tisanas e respectivos extratos. As amostras secas foram trituradas para obtenção de um pó fino e homogéneo (~20 mesh) e armazenadas em local fresco e seco.

#### 4.3. Preparação das tisanas

As tisanas foram preparadas adicionando 2 g de cada amostra seca a 50 mL de água destilada a ferver (100 °C), deixando repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente filtradas através de um papel filtro em funil de vidro. As tisanas obtidas foram então congeladas e liofilizadas, e em seguida armazenadas em local seco, à temperatura ambiente e protegidas da luz até posterior análise. Algumas etapas da preparação das tisanas estão descritas na **Figura 6**.



**Figura 6.** Preparação das tisanas. (A) Pesagem das amostras secas; (B) filtração e (C) tisana 4 – T4 após liofilização.

#### 4.4. Caracterização fitoquímica

##### 4.4.1. Compostos fenólicos

O perfil fenólico foi determinado nos extratos de tisanas liofilizados e re-dissolvidos em água numa concentração de 5 mg/mL. Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um desgasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A detecção 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 (MS). Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C<sub>18</sub> (4,6 x 150 mm, 3 µm; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min; sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrómetro de massa (MS).

A detecção de MS foi feita utilizando um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), 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® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA). Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas: ácido caféico ( $y = 388345x + 406369$ ,  $R^2 = 0,9939$ , LOD - 8,57 µg/mL e LOQ - 25,57 µg/mL); ácido cinamico ( $y = 1E^{+06}x - 222204$ ,  $R^2 = 0,9993$ , LOD - 0,83 µg/mL e LOQ - 2,51 µg/mL); ácido ferulico ( $y = 633126x - 185462$ ,  $R^2 = 0,999$ , LOD - 1,85 µg/mL e LOQ - 5,61 µg/mL); ácido clorogénico ( $y = 168823x - 161172$ ,  $R^2 = 0,9999$ , LOD - 0,83 µg/mL e LOQ - 2,50 µg/mL); ácido *p*-coumarico ( $y = 301950x + 6966,7$ ,  $R^2 = 0,9999$ , LOD - 1,10 µg/mL e LOQ - 3,32

$\mu\text{g/mL}$ ); ácido rosmarínico ( $y = 191291x - 652903$ ,  $R^2 = 0,999$ , LOD - 3,70  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 11,22  $\mu\text{g/mL}$ ); ácido siríngico ( $y = 376056x + 141329$ ,  $R^2 = 0,9995$ , LOD - 2,37  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 7,18  $\mu\text{g/mL}$ ); apigenina-6-*C*-glucosídeo ( $y = 107025x + 61531$ ,  $R^2 = 0,9989$ , LOD - 4,45  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 13,49  $\mu\text{g/mL}$ ); apigenina-7-*O*-glucósido ( $y = 10683x - 45794$ ,  $R^2 = 0,9906$ , LOD - 13,95  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 41,98  $\mu\text{g/mL}$ ); catequina ( $y = 84950x - 23200$ ,  $R^2 = 1$ , LOD - 0,44  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 1,33  $\mu\text{g/mL}$ ); naringenina ( $y = 18433x + 78903$ ,  $R^2 = 0,9998$ , LOD - 18,66  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 56,55  $\mu\text{g/mL}$ ); quercetina-3-*O*-glucósido ( $y = 34843x - 160173$ ,  $R^2 = 0,9998$ , LOD - 17,01  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 51,54  $\mu\text{g/mL}$ ); quercetina-3-*O*-rutinosídeo ( $y = 13343x + 76751$ ,  $R^2 = 0,9998$ , LOD - 14,71  $\mu\text{g/mL}$  e LOQ - 44,59  $\mu\text{g/mL}$ ), onde LOD é o limite de detecção e LOQ, limite de quantificação; baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respectivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato e mg por 100 mL de preparação aquosa.

#### 4.4.2. Ácidos orgânicos

O conteúdo em ácidos orgânicos foi determinado no extrato de tisanas liofilizado e redissolvido em ácido metafosfórico (4,5%, *v/v*) numa concentração de 10 mg/mL. Para determinação do conteúdo em ácidos orgânicos nas misturas secas de tisanas, pesou-se aproximadamente 1 g de cada mistura seca para um goblé (previamente envolto em papel alumínio) e adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico (4,5% *v/v*). A mistura foi colocada sob agitação durante 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente filtrada para um tubo de ensaio. Para análise cromatográfica ambos os extratos (tisanas liofilizadas e extrato da massa seca) foram filtrados para um vial âmbar (1,5 mL) através de filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  para posterior análise em HPLC acoplado a um detector de díodos (DAD).

A análise cromatográfica foi realizada de um sistema Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation). A separação dos compostos foi efetuada através de uma coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex), termostaticada a 35 °C. A detecção ocorreu através de um detector de díodos (DAD) nos comprimentos de onda de preferências 215 nm e 245 nm. O solvente de eluição utilizado em modo isocrático foi ácido sulfúrico (3,6 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). A identificação dos ácidos orgânicos e a respetiva quantificação foi determinada por comparação dos tempos de retenção, dos espectros com padrões comerciais e respetivas retas de

calibração (retas de cinco níveis). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de tisana seca e em mg por 100 mL de preparação aquosa.

#### 4.4.3. Tocoferóis (Vitamina E)

O conteúdo em tocoferóis foi determinado no extrato de tisanas liofilizado e redissolvido em *n*-hexano numa concentração de 50 mg/mL, à qual se adicionou previamente 200 µL de tocol (padrão interno). A identificação e quantificação de tocoferóis foi também realizada na massa seca de cada uma das misturas, tendo como base o procedimento previamente descrito por Barros, Pereira, Calhelha, et al. (2013). Resumidamente, pesaram-se 500 mg para um tubo de falcon, ao qual se adicionou 100 µL de butil-hidroxitolueno (BHT, 10 mg/mL em hexano), 400 µL de tocol (50 µg/mL em hexano, padrão interno) e 4 mL de metanol. Agitou-se a mistura durante 1 minuto no vórtex. Em seguida, foi adicionado 4 mL de hexano e 2 mL de solução aquosa concentrada de cloreto de sódio (NaCl), agitado novamente no vórtex. Centrifugou-se durante 5 minutos a 4000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um vial de vidro previamente envolvido em papel alumínio e ao qual foi adicionado duas colheres de sulfato de sódio anidro. Repetiu-se a extração com *n*-hexano duas vezes, centrifugou-se e recolheu-se o sobrenadante de cada vez. Em seguida, o extrato de *n*-hexano foi seco em corrente de azoto. Redissolveu-se o extrato em 2 mL de hexano, filtrou-se para um vial âmbar (1,5 mL) através de filtro de nylon de 0,22 µm para posterior análise em HPLC acoplado a um detector de fluorescência.

A análise cromatográfica foi realizada num sistema HPLC integrado com uma bomba quaternária (Smartline 1000, Knauer), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (Jasco) com uma coluna em fase normal de Poliamida II (250 x 4,6 mm, 5 µm, YMC da Waters) a 35 °C (forno 7971 R Grace), sendo que o sistema foi programado para excitação ao comprimento de onda de 290 nm e emissão a 330 nm. A fase móvel consistiu numa mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30 v/v), e um caudal de 1 mL/min. A análise dos resultados foi efetuada através do software Clarity 2.4 (DataApex), a quantificação foi baseada no sinal de fluorescência por comparação cromatográfica com tocol (padrão interno). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de tisana seca e em mg por 100 mL de preparação aquosa.

## 4.5. Avaliação das propriedades bioativas *in vitro*

### 4.5.1. Potencial antioxidante

#### 4.5.1.1. Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para este ensaio usou-se o protocolo descrito anteriormente por Souilem et al. (2017). Os extratos liofilizados das tisanas foram re-dissolvidos em água para obtenção de uma solução stock de 0,3 mg/mL, que foi posteriormente diluído sucessivamente para obtenção de sete concentrações abaixo da solução stock.

Paralelamente, foi preparada uma solução de suspensão de cérebro de porco juntamente com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção de 1:2 (*m/v*), centrifugou-se a mistura a 3500 g durante 10 minutos a uma temperatura de 10 °C para evitar a rancificação da mistura. Em tubos eppendorf foi colocado 200 µL de cada uma das soluções de tisanas às quais se adicionaram 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 µL de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub> – 10 mM) e 100 µL do sobrenadante do homogeneizado de cérebro de porco e incubou-se à 37,5 °C durante 1 hora. Após incubação, foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético (28% *m/v*) para parar a reação e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2% *m/v*, TBA), e foram colocados em banho maria à 80 °C durante 20 minutos, de forma a promover a reação entre o TBA e o malondialdeído (MDA – espécie reativa de oxigénio resultante da peroxidação lipídica que ocorre no tecido cerebral do porco). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3600 rpm durante 5 minutos, para separar os resíduos do sobrenadante. A medição da intensidade da cor do complexo MDA – TBA fez-se a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada através da seguinte fórmula: % inibição da peroxidação lipídica = [(A – B) / A] x 100 %, onde A e B dizem respeito à absorvância do controlo (água) e da solução de extrato, respetivamente. A concentração de extrato que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica (IC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Como controlo positivo foi usado o trolox e os resultados foram expressos em µg/mL.

#### 4.5.1.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

A atividade anti-hemolítica das tisanas foi avaliada através do ensaio de OxHLIA previamente descrito por Lockowandt et al. (2019). Alíquotas de sangue de ovelha foram recolhidas em animais saudáveis e centrifugadas a 1000 g durante 5 min a uma temperatura de 10 °C para obtenção dos eritrócitos (plasma e camada leuco-plaquetária foram descartados). Os eritrócitos recuperados foram lavados uma vez com NaCl (150 mM) e três vezes com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4). O sedimento de eritrócito foi depois ressuspensão em PBS 2,8% (v/v).

Numa placa de 48 poços de fundo plano, 200 µL da solução de eritrócitos foi misturada com 400 µL de solução PBS (controlo negativo), ou com as soluções de extrato de tisanas redissolvidas em PBS (solução stock de 30 µg/mL), ou água para obtenção da hemólise completa. O trolox foi usado como controlo positivo. A placa foi então pré-incubada a 37 °C durante 10 min com agitação, adicionando-se posteriormente dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH, 160 mM em PBS, 200 µL) e incubou-se nas mesmas condições. A densidade ótica foi então medida a 690 nm cada 10 min (Takebayashi, Iwahashi, Ishimi, & Tai, 2012). O cálculo da percentagem de população de eritrócitos que permanece intacta ( $P$ ) foi calculada Segundo a seguinte equação:  $P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$ , onde  $S_t$  e  $S_0$  correspondem a densidade ótica da amostra aos tempos  $t$  e 0 min, respectivamente, e  $CH_0$  é a densidade ótica da hemólise completa a 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise ( $\Delta t$ ), o qual foi calculado de acordo com a seguinte equação:  $\Delta t (\text{min}) = H_{t_{50}} (\text{amostra}) - H_{t_{50}} (\text{controlo})$ , onde  $H_{t_{50}}$  corresponde ao tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra de antioxidante. Os valores de  $\Delta t$  foram posteriormente correlacionados linearmente com as diferentes concentrações de amostra, a partir das quais foi calculada a concentração com capacidade de retardar a hemólise em 120 min ( $IC_{50} (120 \text{ min})$ , µg/mL) e 180 min ( $IC_{50} (180 \text{ min})$ , µg/mL).

#### 4.5.2. Citotoxicidade em células tumorais e hepatotoxicidade em células não tumorais

Para a avaliação do potencial citotóxico e hepatotóxico dos extratos aquosos das tisanas foi realizado o ensaio da sulforrodamina B (SRB) previamente descrito por Mandim et al. (2019). Os extratos foram testados em concentrações de 8 a 0,125 mg/mL, diluído em água.

Quatro linhas celulares tumorais humanas foram testadas: HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HepG2 (carcinoma hepatocelular) obtidas no DSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; e uma linha celular primária obtida a partir de células de fígado de porco (denominada de PLP2). As linhas celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 contendo FBS (10%), inativado pelo calor, suplementado com glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), numa incubadora a 37 °C com ar humidificado e 5% de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono). O desprendimento e desaglomeração das células foi garantido pela adição, prévia aos ensaios, de tripsina (enzima proteolítica) às culturas de células aderentes, que após o desprendimento (5 min) foram centrifugadas durante 5 min a 120 rpm, e ressuspensas em meio RPMI.

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada em microplacas de 96 poços, no qual se misturou 10 µL de cada uma das concentrações dos extratos de tisanas, previamente diluídos, com um alíquota (190 µL) de suspensão celular de cada uma das linhas celulares tumorais (densidade celular de 5x10<sup>4</sup> células/mL) e incubou-se durante 48 h. A elipticina foi usada como controlo positivo. Em seguida ao período de incubação, as células aderentes foram fixadas com a adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA; 10% *m/v*), deixando-se repousar durante 1 h a temperatura de 4 °C. De seguida, as placas foram lavadas três vezes com água desionizada e colocadas na estufa (50 °C) para secagem. Adicionou-se solução de SRB (0,057% em 1% de ácido acético *m/v*; 100 µL) e incubaram-se à temperatura ambiente por 30 min. Para remover o SRB que não aderiu, lavaram-se novamente três vezes as microplacas com ácido acético (1% *v/v*) e deixadas secar ao ar. Por fim a solução de SRB foi solubilizada por adição de 200 µL de solução Tris (10 mM) e leu-se a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm no leitor de microplacas Biotek ELX800.

Para avaliar o efeito hepatotóxico em linhas celulares não tumorais, foi utilizada uma cultura de células preparada a partir de fígado de porco obtido num matadouro local (PLP2). O tecido do fígado foi lavado com solução HBSS (solução salina balanceada de Hank), solução salina contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e posteriormente dividido em explantes que foram colocados em frascos contendo DMEM suplementado com FBS (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Os frascos foram então incubados a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Através de um microscópio de contraste de fase fez-se um acompanhamento do crescimento celular, renovando-se o meio a cada dois dias. As células foram subcultivadas e preparadas à densidade

celular de  $1 \times 10^4$  células/poço, e a análise efectuada para cada uma das diluições do extrato seguindo o ensaio SRB, conforme descrito acima. Para cada linha celular testada foram obtidas curvas de dose-resposta tendo sido calculados os valores de  $GI_{50}$ , correspondentes à concentração de extrato que inibe 50% da proliferação celular (Abreu et al., 2011; Corrêa et al., 2017).

#### **4.5.3. Potencial anti-inflamatório**

O potencial anti-inflamatório foi avaliado através da produção de óxido nítrico formado pelos lipopolissacarídeos da linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7 (Souilem et al., 2017). As concentrações dos extratos aquosos a testar foram preparadas de maneira semelhante à avaliação do potencial citotóxico e hepatotóxico. As culturas de células de macrófagos de rato RAW 264.7 foram preparadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10%), glutamina (1%), aminoácidos não essenciais (2mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e mantidas numa incubadora a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera humidificada. As células foram então separadas do meio através de centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e realizou-se a contagem das células.

As células com crescimento ativo foram raspadas e ajustadas a uma densidade celular de  $5 \times 10^5$  células/mL, com uma proporção de células mortas inferior a 5%, conforme teste de exclusão de Azul de Tripano. Colocou-se uma alíquota da suspensão celular de macrófagos (300 µL) em microplacas de 96 poços, de modo que a quantidade de células por poço fosse de  $1,5 \times 10^5$  e deixadas a aderir e multiplicar por 24 h, incubando à temperatura 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram tratadas com 15 µL dos diferentes extratos e novamente incubadas durante 1 h. Foi adicionado 30 µL de lipossacarídeo (LPS, 1 µg/mL) e incubou-se por mais 24 h. Os controlos negativos foram preparados sem adição de LPS para observação de possível indução destes nas alterações dos níveis basais de óxido nítrico (NO). Para o controlo positivo foi utilizada dexametasona (50 µM).

A quantificação de óxido nítrico foi realizada através da utilização de um Kit de reagentes de Griess (sulfanilamida, hidrócloro de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas). O sobrenadante da solução de células (100 µL) foi transferido para uma microplaca juntamente com sulfanilamida e solução NED, e foram misturados por 5 a 10 min cada, à temperatura ambiente. Numa microplaca de 96 poços foi preparada a curva de calibração de nitrito de sódio (100 mM a 1,6 mM,  $y=0,0063x+0,1368$ ,  $R^2=0,9989$ ). O óxido nítrico

produzido foi determinado através da leitura das absorvâncias a 540 nm (leitor de microplacas Biotek ELX800) e pela comparação com a reta de calibração do padrão. Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico *versus* a concentração de amostra, e expressos relativamente à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição, em 50%, da produção de óxido nítrico - IC<sub>50</sub> (µg/mL).

#### **4.5.4. Potencial antimicrobiano**

Os microrganismos usados foram isolados clínicos de doentes hospitalizados em vários departamentos das Unidades de Saúde Local de Bragança e Hospital de Trás-os-Montes e Alto-Douro, Vila Real, Nordeste de Portugal. Foram testadas cinco bactérias Gram-negativas, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e três bactérias Gram-positivas, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina – MRSA. Todos os microrganismos foram mantidos incubados a 37 °C em meio fresco durante 24 h, para manter a fase exponencial de crescimento (Pires, Dias, Barros, Alves, et al., 2018).

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) em todas as bactérias anteriormente citadas, foram realizadas através do teste colorimétrico rápido de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) descrito por Kuete et al. (2011) com algumas modificações. 100 mg de cada extrato aquoso liofilizado foi dissolvido em 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 95% de Mueller-Hinton Broth (MHB) ou de caldo triptona de soja (TSB) de modo a obter uma concentração stock de 20 mg/mL. O meio MHB foi utilizado para as Gram-negativas, e TSB para as Gram-positivas. Numa microplaca de 96 poços, foi adicionado na primeira linha da placa 190 µL da solução stock, e nas restantes 90 µL de MHB ou TSB de acordo com a estirpe a testar. Em seguida, os extratos foram diluídos em série para obtenção de uma gama de concentrações de 20 a 0,15 mg/mL. Em todos os poços, foi adicionado 10 µL de inóculo (padronizado em 1,5x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias/mL – UFC/mL, valor correspondente à leitura da densidade ótica com base na escala de McFarland). Foram preparados dois controlos negativos (um com o meio TSB ou MHB e outro com a solução stock de cada extrato testado), e um positivo (meio TSB ou MHB e cada um dos inóculos). As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 18 h. A CMI dos extratos foi determinada após a adição de 40 µL de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT - 0,2 mg/mL) e incubação a 37 °C por 30 min. Definiu-se a CMI como a menor concentração de extrato que inibe o crescimento

bacteriano visível, determinado pela mudança da coloração amarelo para a cor rosa. Os antibióticos ampicilina e imipenem foram como controlos para todas as bactérias Gram-negativos testadas. Para as Gram-positivos, foram utilizados os antibióticos ampicilina e a vancomicina.

#### **4.5.5. Potencial anti-tirosinase**

A atividade inibitória da tirosinase de cada extrato liofilizado de tisana foi determinada pelo método previamente descrito por Zengin et al. (2016) usando o leitor de Microplacas SPECTROstar Nano Multi-Detection e placas de 96 poços (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Os extratos liofilizados foram dissolvidos em água contendo 5% de DMSO (8 mg/mL); para cada amostra quatro poços foram designados como A, B, C e D, cada um contendo uma mistura de reação distinta; (A) 120 µL de solução Tampão Fosfato (66 mM, pH=6,8, PBS), 40 µL de tirosinase de fungo em PBS (46 U/mL, Tyr); (B) 160 µL PBS, (C) 80 µL PBS, 40 µL Tyr, 40 µL de extrato; e (D) 120 µL PBS, 40 µL de extrato. A placa foi posteriormente incubada à temperatura ambiente por 10 min. Após incubação, 40 µL de Levodopa (2.5 mM, L-DOPA) em solução de PBS foi adicionado a cada poço e a mistura foi novamente incubada à temperatura ambiente durante 20 min. A absorvância foi medida a 475 nm, e os resultados são expressos como IC<sub>50</sub> ou percentagem de inibição (quando a amostra não é suficientemente ativa para calcular um valor de IC<sub>50</sub> para a concentração testada de 8 mg/mL), usando a seguinte fórmula de cálculo:  $\% I = ((A-B)-(C-D))/((A-B)) \times 100$ . A solução ácida de kojic (0,10 mg/mL) foi usada como controlo positivo.

#### **4.5.6. Potencial antidiabético**

O ensaio da inibição da  $\alpha$ -glicosidase foi realizado em microplacas de 96 poços, e baseada nos protocolos previamente descritos por Les et al. (2017) e Spínola & Castilho (2017) com algumas modificações. Resumidamente, 50 µL do extrato diluído (8 mg/mL) em 50 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 6,8) foi colocada no poço da microplaca e misturado com 50 µL de  $\alpha$ -glucosidase de levedura (2 U/mL na mesma solução tampão) por 10 min, onde já tinham sido adicionados 50 µL de substrato (5 mM, *p*-nitrophenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo preparado na mesma solução tampão). A libertação de *p*-nitrophenol foi medida espectralmente a

405 nm 20 min antes da incubação com o substrato. Brancos individuais para os extratos foram preparados, e a acarbose foi utilizada como controlo positivo. Os resultados foram expressos como IC<sub>50</sub> ou percentagem de inibição (quando a amostra não é suficientemente ativa para calcular um valor de IC<sub>50</sub> para a concentração testada de 8 mg/mL), usando a seguinte fórmula de cálculo: Inibição (%) =  $[(Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{extrato}}) / Abs_{\text{controlo}}] \times 100$ .

#### 4.6. Análise estatística

Para cada extrato e respectiva infusão, todos os ensaios foram realizados em triplicado, sendo que os resultados foram expressos como valores médios e desvio padrão (DP). As diferenças significativas entre amostras foram analisadas através da análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste HSD de Tukey com  $p = 0,05$  (excepto para a análise dos resultados da atividade anti-inflamatória, no qual foi usado um Teste  $t$  de Student, com  $\alpha = 0,05$ ) utilizando o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA). Posteriormente, foi também realizada uma análise de correlação de Pearson com 95% de nível de confiança entre as bioatividades e a soma dos conteúdos totais das famílias de compostos fenólicos identificados em todas as amostras (ácidos fenólicos totais, isoflavonas totais, flavononas totais, flavonóis/flavonas totais, flavan-3-óis totais e compostos fenólicos totais) e outros compostos totais.



## CAPÍTULO III





## 5. Resultados e Discussões

Para mais fácil compreensão e leitura dos resultados, foi codificada cada tisana estudada (como previamente descrito na secção dos objetivos), da seguinte forma: Tisana 1 (T1 - *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Ocimum basilicum* 'Cinnamon' e *Gomphrena* sp.); Tisana 2 (T2 - *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Thymus mastichina* L., *Lavandula angustifolia* Mill. e *Gomphrena globosa* L.); Tisana 3 (T3 - *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze, *Mentha x piperita* L. e *Mentha spicata* L.); Tisana 4 (T4 - *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Calendula officinalis* L. e *Mentha x piperita* L.) e Tisana 5 (T5 - *Hypericum androsaemum* L., *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb, *Cinnamomum zeylanicum* Blume e *Syzygium aromaticum* L.).

### 5.1. Compostos fenólicos

O rendimento de extração para cada tisana nos extratos aquosos foi calculado, tendo sido obtido os seguintes valores: 28,38% (T1), 22,81% (T2), 20,71% (T3), 19,54% (T4) e 15,03% (T5). O baixo rendimento de extração de T5 pode ser explicado pela sua maior concentração em plantas lenhosas, como é o caso do tomilho-limão, canela e cravo.

Os dados cromatográficos (tempo de retenção – Tr,  $\lambda_{\max}$  na região do visível, ião molecular e principais fragmentos MS<sup>2</sup>), tentativa de identificação e quantificação (mg/g de extrato e mg/100 mL) obtidos por HPLC-DAD-ESI/MS das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 são apresentados nas **Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8**, respectivamente. O perfil cromatográfico dos compostos fenólicos presentes na preparação aquosa da tisana T5 (amostra que se revelou mais promissora pela quantidade de ácidos fenólicos presente) está representado na **Figura 7**.

As cinco tisanas apresentaram um perfil em compostos fenólicos bastante distinto, assim como relativamente à sua quantificação. Foi, no entanto, possível agrupar os compostos fenólicos identificados em cinco famílias diferentes: ácidos fenólicos, isoflavonas, flavononas, flavonóis/flavonas e flavan-3-óis. Foi também possível a identificação de outros tipos de compostos não fenólicos, nos quais para um deles (derivado do ácido oleanóico) não foi possível fazer a quantificação, uma vez que não havia uma reta de calibração disponível. Treze ácidos fenólicos (ácido caftárico, coutárico, ferúlico, cafeico, chicórico, rosmarínico e seus derivados) e duas flavonóis/flavonas (derivados glicosilados de quercetina) foram

tentativamente identificados na tisana T1. Na tisana T2 foram tentativamente identificados sete ácidos fenólicos (derivados do ácido siríngico, *p*-coumárico e rosmarínico), uma flavonona (derivado glicosilado de eriodictiol), sete flavonóis/flavonas (derivados glicosilados de apigenina, kaempferol, quercetina e luteolina) e um outro composto não fenólico (medioresinol, composto lignano). Na tisana T3 foram tentativamente identificados oito ácidos fenólicos (derivados do ácido clorogénico, caféico e rosmarínico), cinco isoflavonas (calicosin e seus derivados), uma flavonona (derivado glicosilado de eriodictiol), oito flavonóis/flavonas (derivados glicosilados de luteolina, apigenina e diosmetina) e um composto não fenólico (caffeatato de medioresinol, composto lignano), foram também descritos dois compostos desconhecidos, pois pelas características cromatográficas e de espectrometria de massa não foi possível a identificação. Onze ácidos fenólicos (ácido *p*-coumárico, chicórico e rosmarínico e seus derivados), três flavononas (derivados glicosilados de eriodictiol) e nove flavonóis/flavonas (derivados glicosilados de apigenina, luteolina e quercetina) foram identificados na tisana T4. Finalmente, na tisana T5 foram tentativamente identificados nove ácidos fenólicos (derivados do ácido clorogénico e rosmarínico), uma flavonona (derivado glicosilado de eriodictiol), cinco flavonóis/flavonas (derivados glicosilados de apigenina, quercetina e luteolina), dois flavan-3-óis (derivados de (epi)-catequina) e um composto não fenólico (derivado do ácido oleanólico).

A tentativa de identificação dos compostos fenólicos e não fenólicos foi realizada comparando a  $\lambda_{\max}$ ,  $m/z$  molecular e padrão de fragmentação, com dados disponíveis na literatura (referências bibliográficas disponibilizadas nas **Tabelas 4-8**). Foi feito o esforço de tentar conciliar as referências com as matrizes vegetais individuais presentes em cada tisana, no entanto, para muitos dos compostos não foi possível. As referências bibliográficas que possuem matrizes vegetais em comum às estudadas no presente trabalho foram Miguel et al. (2016) e Pires et al. (2018), que estudaram as flores da calêndula; Rita, Pereira, Barros, & Ferreira, (2018) e Roriz, Barros, Carvalho, Santos-Buelga, & Ferreira, (2015) ambos apresentaram o perfil fenólico do capim-limão, tomilho-limão (Rita et al., 2018) e perpétua-roxa (Roriz et al., 2015); Pereira et al. (2017) apresentaram o perfil fenólico para hortelã-pimenta e Ribeiro et al. (2017) para o alecrim.

Os compostos correspondentes aos picos 16<sup>T3</sup> (apigenina-*O*-malonilhexósido), 17<sup>T3</sup> (diosmetina-*O*-malonilhexósido), 20<sup>T3</sup> (diosmetina-*O*-malonil-metilhexósido), 11<sup>T4</sup> (isorhamnetina-*O*-di-desoxihexósido-hexósido) e 21<sup>T4</sup>/23<sup>T4</sup> (luteolina-*O*-malonilpentósido) foram tentativamente identificados pelas suas características cromatográficas de DAD e MS

(não foi possível encontrar referências bibliográficas que suportem a identificação destes compostos).

Relativamente às concentrações das várias famílias de compostos em cada tisana, verificou-se no que se refere aos flavonóis/flavonas, a grande maioria dos compostos foram derivados glicosilados de luteolina (picos 11<sup>T2</sup>, 12<sup>T2</sup>, 16<sup>T2</sup>, 4<sup>T3</sup>, 7<sup>T3</sup>, 8<sup>T3</sup>, 12<sup>T3</sup>, 7<sup>T4</sup>, 12<sup>T4</sup>, 13<sup>T4</sup>, 18<sup>T4</sup>, 23<sup>T4</sup>, 12<sup>T5</sup> e 13<sup>T5</sup>), precedidos de derivados glicosilados de quercetina (picos 10<sup>T1</sup>, 14<sup>T1</sup>, 8<sup>T2</sup>, 9<sup>T2</sup>, 12<sup>T4</sup> e 11<sup>T5</sup>), exceto na tisana T3. A maior concentração de derivados glicosilados de luteolina e quercetina foram verificados nas amostras T2/T4 (picos 11<sup>T2</sup>/14<sup>T4</sup>, luteolina-*O*-hexósido, 7,9 mg/100 mL) e T2 (pico 9<sup>T2</sup>, quercetina-*O*-hexósido, 4,2 mg/100 mL), respectivamente. Os derivados glicosilados de kaempferol foram apenas identificados nas tisanas T2 e T3 (picos 7<sup>T2</sup> e 14<sup>T3</sup>, kaempferol-*O*-diglucurónido e kaempferol-*O*-hexósido, respectivamente), sendo que na amostra T2 foi somente encontrado em forma vestigial. Relativamente ao derivado glicosilado de isorhamnetina foi exclusivamente identificado na amostra T4 (pico 11<sup>T4</sup>, isorhamnetina-*O*-di-desoxihexósido-hexósido). São várias as referências às propriedades bioativas desta família de compostos fenólicos, sendo que as mais relevantes são as suas propriedades anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante (Manthey & Guthrie, 2002). Os derivados glicosilados de eriodictiol foram as únicas flavononas tentativamente identificadas nas amostras de tisanas (exceto na amostra T1, onde não foram identificados flavononas). A maior concentração de flavononas totais foi verificado para a amostra T4 (6,2 mg/100 mL), devido à presença dos picos 3<sup>T4</sup>, 9<sup>T4</sup> e 10<sup>T4</sup>. A capacidade anti-proliferativa desta família de compostos foi também descrita por autores (Manthey & Guthrie, 2002; Pires et al., 2018). Uma das famílias de compostos fenólicos de menor expressão nas cinco amostras de tisanas foram as isoflavonas, tendo sido apenas identificadas na amostra T3, o calicosin e seus derivados, numa concentração total de 14,8 mg/100 mL, representando 16% dos compostos fenólicos totais desta amostra. Este tipo de compostos foram previamente identificados em várias partes fenológicas de *Agastache rugosa* Kuntze (Banga) por Desta et al. (2016). Os flavan-3-óis foram outra família com baixa expressão nas tisanas, uma vez que foram detectados exclusivamente na amostra T5, correspondendo aos picos 7<sup>T5</sup> e 8<sup>T5</sup> (ambos trímeros tipo B de (epi)-catequina), representando apenas 3,5% dos compostos fenólicos totais desta amostra. No entanto, a presença destes compostos em tisanas tem sido abundantemente relatada e correlacionada com as propriedades bioativas, mesmo em baixas concentrações (Del Rio et al., 2010).

**Tabela 4.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na tisana T1 (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{max}$	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação	
						mg/g de extrato	mg/100 mL
1 <sup>T1</sup>	4,75	263/325	311	179(22),149(100),135(5)	Ácido caftárico	0,407 $\pm$ 0,007	0,46 $\pm$ 0,01
2 <sup>T1</sup>	5,81	312	295	163(100),149(5),119(5)	Ácido coutárico	0,143 $\pm$ 0,001	0,1630 $\pm$ 0,0002
3 <sup>T1</sup>	6,67	290/321	325	193(100),149(5),134(5)	Ácido ferúlico	0,172 $\pm$ 0,002	0,195 $\pm$ 0,002
4 <sup>T1</sup>	10,05	322	179	135(100)	Ácido cafeico	0,130 $\pm$ 0,001	0,148 $\pm$ 0,0003
5 <sup>T1</sup>	12,22	327	473	311(100),293(98),179(61),149(80),135(5)	Ácido <i>cis</i> -chicórico	2,70 $\pm$ 0,05	3,1 $\pm$ 0,1
6 <sup>T1</sup>	13,70	327	473	311(100),293(95),179(50),149(55),135(5)	Ácido <i>trans</i> -chicórico	0,83 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,02
7 <sup>T1</sup>	14,35	278/321	555	537(100),493(12),359(10),179(5),161(5)	Ácido salvianólico K	2,33 $\pm$ 0,01	2,65 $\pm$ 0,01
10 <sup>T1</sup>	17,74	330	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	0,230 $\pm$ 0,003	0,261 $\pm$ 0,003
11 <sup>T1</sup>	18,57	280	717	519(100),475(20),339(7),321(5)	Ácido salvianólico B	0,61 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,01
12 <sup>T1</sup>	18,96	281/327	487	325(90),307(51),293(100),193(5),179(12)	Feruloil-cafeoil de ácido tartárico	0,107 $\pm$ 0,004	0,12 $\pm$ 0,01
13 <sup>T1</sup>	19,29	282/323	719	539(24),521(17),339(100),197(10),179(5),161(5),135(5)	Ácido sangerínico	0,83 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,01
14 <sup>T1</sup>	20,17	340	549	505(100),301(10)	Quercetina- <i>O</i> -malonilhexósido	1,19 $\pm$ 0,06	1,4 $\pm$ 0,1
15 <sup>T1</sup>	21,92	330	359	197(29),179(36),161(100),135(5)	Ácido rosmarínico	10,8 $\pm$ 0,1	12,3 $\pm$ 0,2
16 <sup>T1</sup>	25,97	324	537	493(100),359(10),313(6),295(6),269(5),197(5),179(5)	Ácido litospérmico A	6,84 $\pm$ 0,09	7,8 $\pm$ 0,1
19 <sup>T1</sup>	30,48	280/339	493	359(100),313(15),295(9),269(7),197(5),179(5)	Ácido salvianólico A	2,59 $\pm$ 0,03	2,94 $\pm$ 0,04
<b>Ácidos fenólicos totais</b>						28,5 $\pm$ 0,3	32,4 $\pm$ 0,3
<b>Isoflavonas totais</b>						nd	nd
<b>Flavononas totais</b>						nd	nd
<b>Flavonóis/flavonas totais</b>						1,42 $\pm$ 0,05	1,6 $\pm$ 0,1
<b>Flavan-3-óis totais</b>						nd	nd
<b>Outros compostos totais</b>						nd	nd
<b>Compostos fenólicos totais</b>						29,9 $\pm$ 0,3	33,9 $\pm$ 0,4

nd – não detetado. Ccurvas de calibração: ácido caféico (picos, 1<sup>T1</sup>, 4<sup>T1</sup>, 5<sup>T1</sup>, 6<sup>T1</sup>), ácido cinâmico (pico 2<sup>T1</sup>), ácido ferúlico (picos 3<sup>T1</sup> e 12<sup>T1</sup>), ácido rosmarínico (picos 7<sup>T1</sup>, 11<sup>T1</sup>, 13<sup>T1</sup>, 15<sup>T1</sup>, 16<sup>T1</sup>, 19<sup>T1</sup>) e quercetina-3-*O*-rutinósido (picos 10<sup>T1</sup> e 14<sup>T1</sup>). Referência bibliográfica: picos 1<sup>T1</sup> e 2<sup>T1</sup> (Khoza, Gbashi, Steenkamp, Njobeh, & Madala, 2016), pico 3<sup>T1</sup> (Barros et al., 2012), picos 4<sup>T1</sup>, 15<sup>T1</sup> e 16<sup>T1</sup> (Rita et al., 2018), picos 5<sup>T1</sup> e 6<sup>T1</sup> (Carocho et al., 2015), pico 7<sup>T1</sup> (Ziani et al., 2019), pico 10<sup>T1</sup> (Roriz, et al., 2015), picos 11<sup>T1</sup> e 19<sup>T1</sup> (Pereira et al., 2017), pico 12<sup>T1</sup> (Jaiswal, Kiprotich, & Kuhnert, 2011), pico 13<sup>T1</sup> (Ribeiro et al., 2017) e pico 14<sup>T1</sup> (Ribeiro et al., 2017).

**Tabela 5.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos e outros compostos na tisana T2 (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{max}$	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação	
						mg/g de extrato	mg/100 mL
1 <sup>T2</sup>	5,5	280	359	197(100),153(8),113(5)	Hexósido de ácido siríngico	0,163 $\pm$ 0,002	0,148 $\pm$ 0,002
2 <sup>T2</sup>	6,31	264	325	163(100),119(18)	Hexósido de ácido <i>p</i> -coumárico	0,86 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,01
3 <sup>T2</sup>	6,91	282	611	449(100),287(12)	Eriodictiol- <i>O</i> -dihexósido	0,086 $\pm$ 0,004	0,079 $\pm$ 0,004
4 <sup>T2</sup>	8,41	281	387	369(25),207(100),163(41),119(5)	Medioresinol	0,215 $\pm$ 0,004	0,196 $\pm$ 0,003
5 <sup>T2</sup>	9,97	326	593	473(100),383(13),353(21),325(5)	Apigenina-6,8- <i>C</i> -dihexósido	1,016 $\pm$ 0,003	0,927 $\pm$ 0,003
6 <sup>T2</sup>	11,44	279	325	163(100),145(5),119(8)	Hexósido de ácido <i>p</i> -coumárico	1,07 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,02
7 <sup>T2</sup>	12,59	324	637	461(100),285(15)	Kaempferol- <i>O</i> -diglucuronido	vg	vg
8 <sup>T2</sup>	15,18	341	477	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -glucuronido	1,52 $\pm$ 0,03	1,39 $\pm$ 0,02
9 <sup>T2</sup>	15,8	344	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	4,6 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,2
10 <sup>T2</sup>	17,37	322	521	359(100),197(45),179(40),161(15),135(5)	Hexósido de ácido rosmarínico	1,991 $\pm$ 0,008	1,82 $\pm$ 0,01
11 <sup>T2</sup>	18,38	347	461	285(100)	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido	8,7 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1
12 <sup>T2</sup>	18,93	347	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -hexósido	3,17 $\pm$ 0,04	2,89 $\pm$ 0,04
13 <sup>T2</sup>	19,2	347	521	359(100),197(44),179(38),161(14),135(5)	Hexósido de ácido rosmarínico	6,1 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,1
14 <sup>T2</sup>	21,83	327	359	223(22),197(32),179(45),161(100),135(5)	Ácido rosmarínico	20,8 $\pm$ 0,3	18,9 $\pm$ 0,3
15 <sup>T2</sup>	22,25	325	555	537(5),511(8),493(45),311(100),197(5),179(5),161(5),135(5)	Ácido salvianólico K	9,6 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,4
16 <sup>T2</sup>	25,51	335	475	299(100),285(5)	Metil-luteolina- <i>O</i> -hexuronido	0,68 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01
<b>Ácidos fenólicos totais</b>						40,6 $\pm$ 0,1	37,1 $\pm$ 0,1
<b>Isoflavonas totais</b>						nd	nd
<b>Flavononas totais</b>						0,086 $\pm$ 0,004	0,079 $\pm$ 0,004
<b>Flavonóis/flavonas totais</b>						19,7 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,3
<b>Flavan-3-óis totais</b>						nd	nd
<b>Outros compostos totais</b>						0,215 $\pm$ 0,004	0,196 $\pm$ 0,003
<b>Compostos fenólicos totais</b>						60,4 $\pm$ 0,4	55,1 $\pm$ 0,4

nd – não detetado. vg – vestigial. Ccurvas de calibração: ácido cinâmico (picos 4<sup>T2</sup>), ácido *p*-coumarico (pico 2<sup>T2</sup>, 6<sup>T2</sup>), ácido rosmarínico (picos 10<sup>T2</sup>, 13<sup>T2</sup>, 14<sup>T2</sup>, 15<sup>T2</sup>), ácido siríngico (picos, 1<sup>T2</sup>), apigenina-6-*C*-glucósido (pico 5<sup>T2</sup>), quercetina-3-*O*-glucósido (picos 8<sup>T2</sup>, 9<sup>T2</sup>, 11<sup>T2</sup> e 12<sup>T2</sup>), quercetina-3-*O*-rutinosido (picos 7<sup>T2</sup> e 16<sup>T2</sup>) e naringenina (pico 3<sup>T2</sup>). Referência bibliográfica: pico 1<sup>T2</sup> (Barros, Dueñas, Pinela, et al., 2012), picos 2<sup>T2</sup>, 3<sup>T2</sup>, 6<sup>T2</sup>, 11<sup>T2</sup> e 12<sup>T2</sup> (Pires et al., 2018), pico 4<sup>T2</sup> (Ozarowski et al., 2013; Pacifico et al., 2018), picos 5<sup>T2</sup> e 15<sup>T2</sup> (Ziani et al., 2019), pico 7<sup>T2</sup> (Graça et al., 2017), picos 8<sup>T2</sup> e 9<sup>T2</sup> (Roriz, et al., 2015), picos 10<sup>T2</sup> e 13<sup>T2</sup> (Miguel et al., 2016), pico 14<sup>T2</sup> (Rita et al., 2018) e pico 16<sup>T2</sup> (Grzegorzczak-Karolak & Kiss, 2018).

**Tabela 6.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos e outros compostos na tisana T3 (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{max}$	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação	
						mg/g de extrato	mg/100 mL
1 <sup>T3</sup>	6,47	320	353	191(12),179(52),173(100),161(5),135(5)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,69 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,02
2 <sup>T3</sup>	6,95	320	353	191(100),179(9),173(8),161(5),135(5)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	1,20 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,02
3 <sup>T3</sup>	10,08	321	179	161(5),135(100)	Ácido cafeico	0,149 $\pm$ 0,005	0,124 $\pm$ 0,004
4 <sup>T3</sup>	13,51	344	637	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -diglucurónido	2,47 $\pm$ 0,04	2,04 $\pm$ 0,03
5 <sup>T3</sup>	14,50	285/325	537	493(),359(),313(),295(),269(),197(),179()	Ácido litospermico A	0,747 $\pm$ 0,004	0,619 $\pm$ 0,004
6 <sup>T3</sup>	15,18	285	595	287(100)	Eriodictiol-7- <i>O</i> -neohesperidósido	6,5 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2
7 <sup>T3</sup>	18,02	346	593	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -rutinósido	5,91 $\pm$ 0,02	4,90 $\pm$ 0,02
8 <sup>T3</sup>	18,47	346	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -glucurónido	7,1 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,1
9 <sup>T3</sup>	19,21	343	521	359(50),223(21),197(35),179(40),161(100),135(5)	Hexósido de ácido rosmarínico	1,23 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,02
10 <sup>T3</sup>	19,85	337	717	537(40),519(100),493(5),359(10),339(5),321(5),295(5),197(5),179(5)	Ácido salvianólico B isómero I	1,71 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,1
11 <sup>T3</sup>	21,86	333	359	223(22),197(28),179(39),161(100)	Ácido rosmarínico	22,7 $\pm$ 0,3	18,8 $\pm$ 0,3
12 <sup>T3</sup>	23,92	340	533	489(100),285(10)	Luteolina- <i>O</i> -malonilhexósido	0,278 $\pm$ 0,005	0,231 $\pm$ 0,004
13 <sup>T3</sup>	24,05	341	549	387(100),369(21),207(50),163(41),119(5)	Caffeato de medioresinol	3,16 $\pm$ 0,02	2,62 $\pm$ 0,02
14 <sup>T3</sup>	24,74	335	461	285(100)	Kaempferol- <i>O</i> -glucurónido	1,19 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,03
15 <sup>T3</sup>	25,85	331	717	537(10),519(100),493(5),359(5),339(21),321(50),295(9),197(5),179(5)	Ácido salvianólico B isómero II	3,34 $\pm$ 0,02	2,77 $\pm$ 0,02
16 <sup>T3</sup>	28,17	330	517	473(20),269(100)	Apigenina- <i>O</i> -malonilhexósido	1,03 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,01
17 <sup>T3</sup>	29,71	341	547	503(50),299(100)	Diosmetina- <i>O</i> -malonilhexósido	36,04 $\pm$ 0,05	29,86 $\pm$ 0,04
18 <sup>T3</sup>	33	268/331	677	659(30),451(23),367(5),225(5)	Desconhecido	nq	nq
19 <sup>T3</sup>	35,77	268/333	1063	771(65),283(5),269(5)	Desconhecido	nq	nq
20 <sup>T3</sup>	36,87	268/338	589	545(100),299(5)	Diosmetina- <i>O</i> -malonil-metilhexósido	0,026 $\pm$ 0,001	0,022 $\pm$ 0,001
21 <sup>T3</sup>	38,08	269/329	283	269(100)	Calicosin	1,07 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,05
22 <sup>T3</sup>	40,01	269/329	573	283(100)	Derivado de calicosin	0,250 $\pm$ 0,009	0,21 $\pm$ 0,01
23 <sup>T3</sup>	40,36	268/329	533	283(100)	Derivado de calicosin	7,3 $\pm$ 0,1	6,03 $\pm$ 0,10
24 <sup>T3</sup>	41,83	268/330	573	283(100)	Derivado de calicosin	9,2 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,2

<b>Ácidos fenólicos totais</b>	31,7±0,3	26,3±0,2
<b>Isoflavonas totais</b>	1,07±0,06	14,8±0,1
<b>Flavononas totais</b>	6,5±0,2	5,4±0,2
<b>Flavonóis/flavonas totais</b>	53,99±0,08	44,7±0,1
<b>Flavan-3-óis totais</b>	nd	nd
<b>Outros compostos totais</b>	3,16±0,02	2,62±0,02
<b>Compostos fenólicos totais</b>	110,0±0,7	91,2±0,6

nq - não quantificável, nd - não detectado. Curvas de calibração: ácido clorogénico (picos 1<sup>T3</sup> e 2<sup>T3</sup>), ácido cafeico (pico 3<sup>T3</sup>), Ácido rosmarínico (picos 5<sup>T3</sup>, 9<sup>T3</sup>, 10<sup>T3</sup>, 11<sup>T3</sup> e 15<sup>T3</sup>), Apigenina-7-*O*-glucosídeo (pico 16<sup>T3</sup>), Quercetina-3-*O*-rutinosídeo (picos 4<sup>T3</sup>, 7<sup>T3</sup>, 8<sup>T3</sup>, 12<sup>T3</sup>, 14<sup>T3</sup>, 17<sup>T3</sup> e 20<sup>T3</sup>) e Naringenina (picos 6<sup>T3</sup>, 13<sup>T3</sup>, 21<sup>T3</sup>, 22<sup>T3</sup>, 23<sup>T3</sup> e 24<sup>T3</sup>). Referência bibliográfica: picos 1<sup>T3</sup> e 2<sup>T3</sup> (Clifford, Johnston, Knight, & Kuhnert, 2003; Clifford, Knight, & Kuhnert, 2005; Clifford, Wu, Kirkpatrick, & Kuhnert, 2007; Clifford, Zheng, & Kuhnert, 2006), picos 3<sup>T3</sup>, 5<sup>T3</sup> e 11<sup>T3</sup> (Rita et al., 2018), picos 4<sup>T3</sup>, 7<sup>T3</sup>, 10<sup>T3</sup> e 15<sup>T3</sup> (Martins et al., 2015), pico 6<sup>T3</sup> (Brito, Ramirez, Areche, Sepúlveda, & Simirgiotis, 2014), picos 8<sup>T3</sup> e 14<sup>T3</sup> (Pires et al., 2018), pico 9<sup>T3</sup> (Miguel et al., 2016), pico 12<sup>T3</sup> (Dias et al., 2018), pico 13<sup>T3</sup> (Ozarowski et al., 2013), picos 16<sup>T3</sup>, 17<sup>T3</sup> e 20<sup>T3</sup> DAD/MS, picos 21<sup>T3</sup>, 22<sup>T3</sup>, 23<sup>T3</sup> e 24<sup>T3</sup> (Desta et al., 2016).

**Tabela 7.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na tisana T4 (média  $\pm$  DP).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{max}$	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação	
						mg/g de extrato	mg/100 mL
1 <sup>T4</sup>	5.92	311	295	163(100),119(5)	Ácido coutárico	0,151 $\pm$ 0,002	0,118 $\pm$ 0,001
2 <sup>T4</sup>	6.37	310	325	163(100),119(10)	Hexósido de ácido <i>p</i> -coumárico	0,292 $\pm$ 0,008	0,23 $\pm$ 0,01
3 <sup>T4</sup>	7.06	285	611	449(100),287(13)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido- <i>O</i> -hexósido	0,115 $\pm$ 0,004	0,090 $\pm$ 0,003
4 <sup>T4</sup>	9.95	325	593	473(100),383(13),353(21),325(5)	Apigenina-6,8- <i>C</i> -dihexósido	0,607 $\pm$ 0,002	0,474 $\pm$ 0,002
5 <sup>T4</sup>	12.18	327	473	311(100),293(95),179(5),149(5),135(5)	Ácido <i>cis</i> -chicórico	0,263 $\pm$ 0,004	0,205 $\pm$ 0,003
6 <sup>T4</sup>	12.54	324	473	311(100),293(94),179(5),179(5),149(5),135(5)	Ácido <i>trans</i> -chicórico	0,494 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02
7 <sup>T4</sup>	13.46	346	637	351(100),285(21)	Luteolina- <i>O</i> -diglucurônido	2,27 $\pm$ 0,08	1,77 $\pm$ 0,06
8 <sup>T4</sup>	14.47	330	555	537(100),493(12),359(10),179(5),161(5)	Ácido salvianólico K	1,295 $\pm$ 0,007	1,01 $\pm$ 0,01
9 <sup>T4</sup>	15.16	284	595	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -deoxihexósido-hexósido	5,8 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1
10 <sup>T4</sup>	15.99	282	463	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -glucurônido	1,996 $\pm$ 0,003	1,560 $\pm$ 0,002
11 <sup>T4</sup>	16.96	342	769	315(55)	Isorhamnetina- <i>O</i> -di-desoxihexósido-hexósido	1,19 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,01
12 <sup>T4</sup>	17.69	343	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	1,60 $\pm$ 0,01	1,25 $\pm$ 0,01
13 <sup>T4</sup>	17.98	345	593	285(100)	Luteolina-7- <i>O</i> -rutinósido	3,533 $\pm$ 0,003	2,761 $\pm$ 0,002
14 <sup>T4</sup>	18.42	346	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -glucurônido	10,1 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,2
15 <sup>T4</sup>	19.22	327	719	539(100),521(17),359(26),197(5),179(5),161(5),135(5)	Ácido sangerínico	1,84 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,04
16 <sup>T4</sup>	20.11	280	717	519(100),475(20),339(7),321(5)	Ácido salvianólico B isómero I	1,80 $\pm$ 0,01	1,41 $\pm$ 0,01
17 <sup>T4</sup>	21.8	324	359	197(29),179(36),161(100),135(5)	Ácido rosmarínico	20,7 $\pm$ 0,3	16,1 $\pm$ 0,2
18 <sup>T4</sup>	24.71	333	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -glucurônido	0,82 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,02
19 <sup>T4</sup>	25.35	327	537	493(100),313(5),295(5)	Ácido litospérmico A isómero 1	1,14 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,02
20 <sup>T4</sup>	25.89	329	717	537(1),519(100),493(1),339(1),321(1),295(1)	Ácido litospérmico B	5,5 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2
21 <sup>T4</sup>	29.02	331	503	399(25),285(100)	Luteolina- <i>O</i> -malonilpentósido	0,40 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,01
22 <sup>T4</sup>	30.17	284/329	537	493(100),439(51),197(24),179(6),359(20)	Ácido litospérmico A isómero 2	0,948 $\pm$ 0,008	0,74 $\pm$ 0,01
23 <sup>T4</sup>	30.84	330	503	443(100),285(32)	Luteolina- <i>O</i> -malonilpentósido	0,0804 $\pm$ 0,001	0,063 $\pm$ 0,001
<b>Ácidos fenólicos totais</b>						34,3 $\pm$ 0,1	26,9 $\pm$ 0,1
<b>Isoflavonas totais</b>						nd	nd
<b>Flavononas totais</b>						7,9 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,1

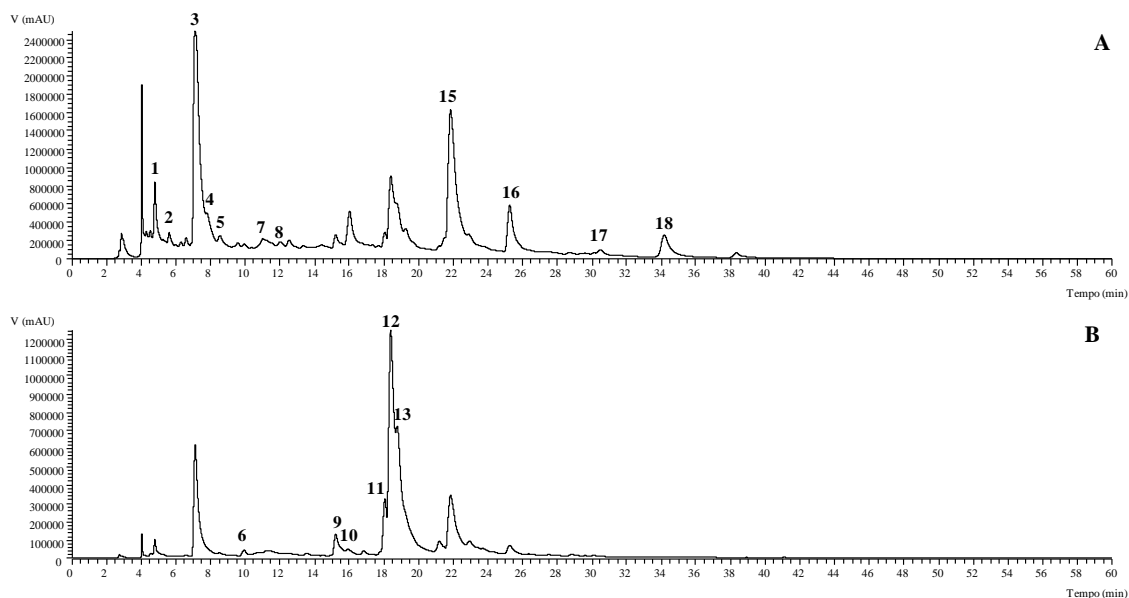
<b>Flavonóis/flavonas totais</b>	20,6±0,2	16,1±0,2
<b>Flavan-3-óis totais</b>	nd	nd
<b>Outros compostos totais</b>	nd	nd
<b>Compostos fenólicos totais</b>	62,8±0,4	49,1±0,3

nd – não detetado. Curvas de calibração: ácido cafeico (picos 5<sup>T3</sup> e 6<sup>T3</sup>), ácido p-coumarico (picos 1<sup>T3</sup> e 2<sup>T3</sup>), ácido rosmarínico (picos 8<sup>T4</sup>, 15<sup>T4</sup>, 16<sup>T4</sup>, 17<sup>T4</sup>, 19<sup>T4</sup>, 20<sup>T4</sup> e 21<sup>T4</sup>), apigenina-6-C-glucosídeo (pico 4<sup>T4</sup>), quercetina-3-O-rutinósido (picos 7<sup>T4</sup>, 11<sup>T4</sup>, 12<sup>T4</sup>, 13<sup>T4</sup>, 14<sup>T4</sup>, 18<sup>T4</sup>, 21<sup>T4</sup> e 23<sup>T4</sup>). Referência bibliográfica: pico 1<sup>T4</sup> (Pereira et al., 2017), picos 2<sup>T4</sup>, 3<sup>T4</sup>, 9<sup>T4</sup>, 10<sup>T4</sup>, 14<sup>T4</sup> e 18<sup>T4</sup> (Pires et al., 2018), picos 4<sup>T4</sup> e 8<sup>T4</sup> (Ziani et al., 2019), picos 5<sup>T4</sup> e 6<sup>T4</sup> (Ziani et al., 2019), picos 7<sup>T4</sup> e 16<sup>T4</sup> (Martins et al., 2015), picos 11<sup>T4</sup>, 13<sup>T4</sup>, 21<sup>T4</sup> e 23<sup>T4</sup> DAD/MS, pico 12<sup>T4</sup> (Roriz, et al., 2015), pico 15<sup>T4</sup> (Ribeiro et al., 2017), picos 17<sup>T4</sup> e 22<sup>T4</sup> (Rita et al., 2018), picos 19<sup>T4</sup> e 20<sup>T4</sup> (Zeng, Xiao, Liu, & Liang, 2006).

**Tabela 8.** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos na tisana T5 (média  $\pm$  DP).

Pico	Rt (min)	$\lambda_{max}$	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação	
						mg/g de extrato	mg/100 mL
1 <sup>T5</sup>	4.79	324	353	191(100),179(49),173(10),135(12)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	3,1 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1
2 <sup>T5</sup>	6.62	324	353	191(80),179(9),173(100),135(5)	Ácido <i>cis</i> 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,63 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,02
3 <sup>T5</sup>	7.11	324	353	191(78),179(5),173(100),135(5)	Ácido <i>trans</i> 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	31 $\pm$ 1	18,6 $\pm$ 0,7
4 <sup>T5</sup>	7.87	325	353	191(100),179(9),173(5),135(5)	Ácido <i>cis</i> 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	3,659 $\pm$ 0,007	2,203 $\pm$ 0,004
5 <sup>T5</sup>	8.54	321	353	191(100),179(12),173(5),135(5)	Ácido <i>trans</i> 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	2,07 $\pm$ 0,06	1,243 $\pm$ 0,034
6 <sup>T5</sup>	9.94	327	593	473(100),383(12),353(22)	Apigenina-6,8- <i>C</i> -dihexósido	0,442 $\pm$ 0,001	0,2658 $\pm$ 0,003
7 <sup>T5</sup>	11.1	281	865	739(83),713(50),695(100),577(77),425(12),407(10),289(5),287(12)	Trímero tipo B de (epi)-catequina	1,66 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,02
8 <sup>T5</sup>	12.12	283	1153	865(37),577(12),561(5),289(5),287(5)	Trímero tipo B de (epi)-catequina	1,98 $\pm$ 0,07	1,19 $\pm$ 0,04
9 <sup>T5</sup>	15.23	341	477	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -glucuronido	0,90 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01
10 <sup>T5</sup>	16.03	284	463	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -glucuronido	3,17 $\pm$ 0,07	1,91 $\pm$ 0,04
11 <sup>T5</sup>	18.07	348	477	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -glucuronido	2,30 $\pm$ 0,01	1,38 $\pm$ 0,01
12 <sup>T5</sup>	18.41	350	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -glucuronido	15,9 $\pm$ 0,3	9,6 $\pm$ 0,2
13 <sup>T5</sup>	18.78	347	461	285(100)	Luteolina- <i>O</i> -glucuronido	8,1 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,2
14 <sup>T5</sup>	21.22	327	719	539(100),521(17),359(26),197(5),179(5),161(5),135(5)	Ácido sagerínico	1,55 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,04
15 <sup>T5</sup>	21.86	324	359	197(29),179(36),161(100),135(5)	Ácido rosmarínico	19,9 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 0,1
16 <sup>T5</sup>	25.27	324	537	493(100),359(10),313(6),295(6),269(5),197(5),179(5)	Ácido litospérmico A	5,6 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,1
17 <sup>T5</sup>	30.49	285/323	493	359(100),313(10),295(5)	Ácido salvianólico A	0,873 $\pm$ 0,008	0,53 $\pm$ 0,01
18 <sup>T5</sup>	34.19	290	791	773(100),678(11),546(2),451(35),337(2),225(11)	Derivado de ácido oleanólico	nq	nq
<b>Ácidos fenólicos totais</b>						68,3 $\pm$ 0,8	41,1 $\pm$ 0,5
<b>Isoflavonas totais</b>						nd	nd
<b>Flavononas totais</b>						3,17 $\pm$ 0,07	1,91 $\pm$ 0,04
<b>Flavonóis/flavonas totais</b>						27,66 $\pm$ 0,08	16,65 $\pm$ 0,05
<b>Flavan-3-óis totais</b>						3,64 $\pm$ 0,04	2,19 $\pm$ 0,03
<b>Outros compostos totais</b>						nd	nd
<b>Compostos fenólicos totais</b>						102,8 $\pm$ 0,8	61,9 $\pm$ 0,5

nd-não detetado. nq-não quantificável. Curvas de calibração: ácido clorogénico(picos 1<sup>T5</sup>,2<sup>T5</sup>, 3<sup>T5</sup>, 4<sup>T5</sup> e 5<sup>T5</sup>),ácido rosmarínico(picos 14<sup>T5</sup>, 15<sup>T5</sup>, 16<sup>T5</sup> e 17<sup>T5</sup>),apigenina-6-*C*-glucosídeo (pico 6<sup>T5</sup>),catequina (pico 7<sup>T5</sup> e 8<sup>T5</sup>), quercetina-3-*O*-rutinosídeo(picos 9<sup>T5</sup>, 11<sup>T5</sup>, 12<sup>T5</sup>e 13<sup>T5</sup>) e naringenina (pico 10<sup>T5</sup>). Referência bibliográfica: picos 1<sup>T5</sup>, 2<sup>T5</sup>, 3<sup>T5</sup>, 4<sup>T5</sup>e 5<sup>T5</sup> (Clifford et al., 2003, 2005, 2007, 2006), pico 6<sup>T5</sup>(Ziani et al., 2019), picos 7<sup>T5</sup> e 8<sup>T5</sup> (Mandim et al., 2019), picos 9<sup>T5</sup> e 11<sup>T5</sup> (Roriz, et al., 2015), picos 10<sup>T5</sup>, 12<sup>T5</sup> e 13<sup>T5</sup> (Pires et al., 2018), pico 14<sup>T5</sup> (Ribeiro et al., 2017), picos 15<sup>T5</sup> e 16<sup>T5</sup> (Rita et al., 2018), pico 17<sup>T5</sup> (Pereira et al., 2017), pico 18<sup>T5</sup> (Xu, Zhao, Tian, Qian, & Yu, 2016).



**Figura 7.** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos presentes na preparação aquosa da tisana T5 obtido a 280 nm (A) e 370 nm (B).

Finalmente, a família que revelou maior concentração em todas as amostras de tisanas foram os ácidos fenólicos, sendo que foi na amostra T5 que se obteve uma maior concentração (41,1 mg/100 mL), representado 66% dos compostos fenólicos totais nesta amostra, devido sobretudo à presença dos derivados do ácido clorogénico (*O*-caffeoilquínicos, picos 1<sup>T5</sup>, 2<sup>T5</sup>, 3<sup>T5</sup>, 4<sup>T5</sup> e 5<sup>T5</sup>), que apresentam, por sua vez, efeitos biológicos muito interessantes, como sendo atividades antioxidante e antitumoral (Pires et al., 2018). As restantes tisanas apresentaram também concentrações significativas de ácidos fenólicos seguindo a seguinte ordem T2>T1>T4>T3. Na amostra T3 obteve-se uma maior concentração de flavonóis/flavonas, comparativamente aos ácidos fenólicos. O ácido rosmarínico foi identificado em concentrações significativas em todas as amostras de tisanas (picos 15<sup>T1</sup>, 14<sup>T2</sup>, 11<sup>T3</sup>, 17<sup>T4</sup>, 15<sup>T5</sup>), ao qual já foi correlacionado uma série de propriedades bioativas, tais como, antidiabética, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antioxidante (Gonçalves et al., 2019). No geral, a tisana que apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais foi a amostra T3 (93,8 mg/100 mL), precedida pela amostra T5, T2, T4 e T1 (61,9; 55,31; 49,1 e 33,9 mg/100 mL, respectivamente).

Foram também identificados outros tipos de compostos não fenólicos, como o medioresinol (4<sup>T2</sup>) e o caffeató de medioresinol (13<sup>T3</sup>), compostos lignanos que podem apresentar atividade anticarcinogénica (Adlercreutz, 2007). O derivado do ácido oleanólico foi também tentativamente identificado na amostra T5 (18<sup>T5</sup>), não sendo possível realizar a sua quantificação, como previamente explicado. Este tipo de composto é um triterpenóide

pentacíclico, ao qual foram já foi correlacionado grandes propriedades biológicas, como hepatoprotetora, quimioterápica e outros efeitos farmacológicos, por exemplo, proteção cardiovascular (Liu, 2005).

## 5.2. Caracterização de ácidos orgânicos e tocoferóis

Os dados relativos aos resultados obtidos na caracterização em ácidos orgânicos e tocoferóis nas misturas de tisanas secas e nas preparações aquosas de tisanas (g ou mg/100 g de massa seca e mg/100 mL de preparação aquosa) estão apresentados na **Tabela 9**. O conteúdo e a composição em ácidos orgânicos e tocoferóis variam consoante a tipologia dos diferentes tecidos vegetais, uma vez que a produção destes compostos depende das condições edafoclimáticas de crescimento das plantas, nomeadamente luz, salinidade e temperatura (Fritsche, Wang, & Jung, 2017; López-Bucio, Nieto-Jacobo, Ramírez-Rodríguez, & Herrera-Estrella, 2000).

**Tabela 9.** Composição em ácidos orgânicos e tocoferóis nos extratos secos e nas preparações aquosas de tisanas das amostras T1, T2, T3, T4 e T5.

	Tisana seca					Preparações aquosas				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Ácidos orgânicos</b>	<b>(g/100 g massa seca)</b>					<b>(mg/100 mL)</b>				
Ácido oxálico	2,47±0,01 <sup>a</sup>	0,38±0,002 <sup>d</sup>	1,30±0,02 <sup>b</sup>	0,79±0,01 <sup>c</sup>	vg	98±1 <sup>a</sup>	6,9±0,1 <sup>d</sup>	16,8±0,3 <sup>c</sup>	21,1±0,5 <sup>b</sup>	vg
Ácido quínico	1,65±0,07 <sup>a</sup>	0,10±0,04 <sup>d</sup>	1,00±0,08 <sup>c</sup>	1,33±0,09 <sup>b</sup>	nd	69±1 <sup>a</sup>	2,8±0,1 <sup>d</sup>	28±1 <sup>c</sup>	33±1 <sup>b</sup>	nd
Ácido málico	0,48±0,03 <sup>a</sup>	0,36±0,02 <sup>d</sup>	0,41±0,01 <sup>c</sup>	0,43±0,01 <sup>b</sup>	vg	68±1 <sup>a</sup>	11,5±0,3 <sup>b</sup>	11±1 <sup>b</sup>	10,5±0,1 <sup>c</sup>	vg
Ácido fumárico	nd	nd	nd	nd	vg	nd	nd	nd	nd	vg
Total	4,59±0,09 <sup>a</sup>	0,83±0,07 <sup>d</sup>	2,71±0,08 <sup>b</sup>	2,54±0,09 <sup>c</sup>	vg	234±3 <sup>a</sup>	21,2±0,4 <sup>d</sup>	56±2 <sup>c</sup>	65±1 <sup>b</sup>	vg
<b>Tocoferóis</b>	<b>(mg/100 g massa seca)</b>					<b>(mg/100 mL)</b>				
$\alpha$ -Tocoferol	12,2±0,9 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,87±0,01 <sup>e</sup>	3,5±0,2 <sup>b</sup>	2,3±0,1 <sup>d</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
$\gamma$ -Tocoferol	35,8±0,4 <sup>b</sup>	nd	4,71±0,01 <sup>d</sup>	11,2±0,3 <sup>c</sup>	109±5 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd
Total	48,0±0,6 <sup>b</sup>	3,3±0,3 <sup>e</sup>	5,58±0,01 <sup>d</sup>	14,7±0,3 <sup>c</sup>	112±5 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd

nd – não detetado. vg – vestígios. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras distintas na mesma linha correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Relativamente ao conteúdo em ácidos orgânicos é de notar que a composição é muito semelhante em todas as amostras de tisanas, quer nos extratos secos, como nas preparações aquosas, tendo sido identificados os ácidos oxálico, quínico, málico e fumárico. No entanto, a amostra T1 (extrato seco e preparação aquosa) apresentou as maiores concentrações destes compostos (4,59 g/100 g de planta seca e 234 mg/100 mL, respectivamente), principalmente devido à presença de ácido oxálico. A amostra T5 apresentou os níveis mais baixos de ácidos orgânicos, todos eles sob a forma vestigial. O ácido fumárico apresentou-se com a menor expressão de todos os ácidos orgânicos identificados, tendo sido somente detectado de forma vestigial na amostra T5.

Em *C. citratus* foram já descritos os ácidos oxálico, málico, ascórbico, succínico e fumárico por Roriz (2014), porém na amostra de tisana onde esta planta está presente, os ácidos ascórbico, succínico e fumárico não foram detectados, possivelmente pela competitividade diante das outras duas PAMs que compõem a tisana T1 (*O. basilicum* 'Cinnamon' e *Gomphrena* sp). Os ácidos oxálico e málico foram também já previamente descritos em *Gomphrena* sp. por Liberal et al. (2016).

O ácido oxálico foi o composto identificado na grande maioria dos extratos e preparações aquosas (exceptuando o extrato da tisana T4 e preparação aquosa de T3 e T4). Este ácido orgânico tem a capacidade de inibir a enzima lípase e, conseqüentemente, reduzir a ocorrência de problemas fisiológicos como a diabetes tipo II (Liu et al., 2018). Por outro lado, o ácido quínico é considerado um antioxidante poderoso, tendo uma atuação mais forte do que o antioxidante sintético BHT (hidroxil tolueno butilado) (Hung et al., 2006). Relativamente ao ácido málico, este participa do ciclo de Krebs e por isso tem um papel essencial no metabolismo humano, tendo sido comprovado também o seu efeito bactericida (Carocho et al., 2013; Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, & Martín-Belloso, 2009).

O uso dos ácidos orgânicos na indústria alimentar é uma alternativa sustentável e natural, podendo ser usado como conservante, antioxidante, aromatizante e acidificante (Raybaudi-Massilia et al., 2009), sendo que a sua presença em tisanas de plantas aromáticas e medicinais pode conferir as propriedades bioativas numa ingestão de base diária.

Relativamente à composição em tocoferóis (**Tabela 9**), como era expectável, só foram identificadas estas moléculas nos extratos secos, não tendo sido detectados quaisquer isoformas nas preparações aquosas. Estas moléculas são lipossolúveis e a sua extração com água é pouco eficiente, tendo uma baixa afinidade com este tipo de solvente de extração (Ferreira et al.,

2009). Por isso, pode-se afirmar que as tisanas provenientes dos extratos das misturas de plantas aromáticas e medicinais estudadas não são fontes de tocoferóis (vitamina E).

No que toca aos extratos secos, foram somente detectados duas isoformas ( $\alpha$  e  $\gamma$ ), sendo a isoforma  $\gamma$ -tocoferol a que se destacou. O conteúdo total de tocoferóis variou significativamente entre todas as amostras de tisanas, sendo que o extrato T1 apresentou maior quantidade de  $\alpha$ -tocoferol (12,2 mg/100 g de planta seca), e o extrato T5 apresentou maior quantidade de  $\gamma$ -tocoferol (109 mg/100 g de planta seca), quantidade esta que afectou significativamente o seu conteúdo total e consequentemente a tisana T5 revelou a maior concentração de tocoferóis totais (112 mg/100 g de planta seca).

Duas das plantas que compõem a tisana T1 foram já estudadas de maneira individual relativamente à sua composição em tocoferóis. Em 2014, Roriz, relatou a presença das isoformas  $\alpha$  e  $\gamma$  tocoferol em *C. citratus*, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a isoforma presente em maior concentração. Por sua vez, Liberal et al. (2016) identificou as mesmas isoformas para *Gomphrena* sp, sendo  $\gamma$ -tocopherol a isoforma em maior abundância. Sobre a terceira planta que compõe a tisana T1 (*O. basilicum* ‘Cinnamon’) não há dados relativamente à composição em tocoferóis. Entretanto, Fernandes (2010) caracterizou os tocoferóis em extratos de plantas da ordem *Lamiales* e relatou que as isoformas  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol foram também encontradas em maior abundância quando comparadas com as isoformas  $\beta$  e  $\delta$ . No estudo realizado por Roriz (2014) foram descritos efeitos antagonistas em misturas de plantas aromáticas e medicinais, como sendo os responsáveis pela diferenciação no conteúdo em compostos bioativos, nomeadamente, tocoferóis e ácidos orgânicos, dependendo da concentração das plantas. O que poderá explicar as diferenças relativamente à planta *C. citratus*, uma vez que a sua concentração na tisana T1 possivelmente pode ser pouco significativa e por isso não obteve-se a mesma composição e conteúdo em tocoferóis e ácidos orgânicos quando comparados com a literatura.

Relativamente à tisana T5, Ramadan, Asker, & Tadros (2013) identificaram as quatro isoformas de tocoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) no óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo) em quantidades expressivas, sendo a isoforma  $\alpha$ - a predominante. Em 2015, Alizadeh, Mahdavi, Rahmani, & Jahanian relataram um aumento nos teores de  $\alpha$ -tocoferol na gema de ovo quando lhe era adicionado pó suplementar do broto da planta do *S. aromaticum*, indicando, portanto, a grande contribuição da isoforma nesta espécie. Para o *H. androsaemum*, não foi possível encontrar dados publicados relacionados com o conteúdo em tocoferóis; no entanto, Hosni, Msaâda, Taârit, & Marzouk (2017), relataram as isoformas  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol em quatro espécies

pertencentes ao género *Hypericum* e identificaram que a isoforma em maior abundância é a  $\delta$ -tocoferol, porém a quantidade da mesma apresentou grande variação dependendo da espécie.

Também não foi possível encontrar dados relativos ao conteúdo em tocoferóis em *T. citrodorus*, porém, esta planta também pertence à ordem *Lamiales* que apresenta predominantemente as isoformas  $\alpha$  e  $\gamma$ , como referido anteriormente. Segundo a referência nacional da composição de alimentos, o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge (INSA, 2006), a canela (*Cinnamomum zeylanicum*) possui 0,1 g de tocoferol total para cada 100 g de parte edível.

A vitamina E é composta por quatro isoformas ( $\alpha$  – alfa,  $\beta$  – beta,  $\gamma$  – gama, e  $\delta$  – delta), sendo a sua isoforma biologicamente mais ativa o  $\alpha$ -tocoferol, portanto, a mais necessária na dieta humana. A isoforma  $\alpha$  é responsável por 50% da ação antioxidante atribuída, enquanto que, a isoforma  $\beta$  possui 25-50% e as isoformas  $\gamma$  e  $\delta$  entre 10-35% (Ramadan et al., 2013). Desta forma, os extratos secos da mistura de plantas de cada tisana podem ser consideradas fontes deste tipo de compostos bioativos e conseqüentemente, podem ser usadas em várias aplicações, nomeadamente, nutracêuticas.

### 5.3. Bioatividades

#### 5.3.1. Atividade antioxidante

Numerosos ensaios já foram desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas. No entanto, não existe um método universal que possa medir a capacidade antioxidante de todas as amostras de forma precisa e quantitativa. Os métodos de avaliação da capacidade antioxidante dividem-se em duas grandes categorias: inibição de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008; Prior, Wu, & Schaich, 2005). Neste trabalho propôs-se assim a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* através da inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos isolados do sangue de ovelha (OxHLIA). Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante estão descritos na **Tabela 10** e são expressos em IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ), no qual se obtém a concentração de tisana capaz de inibir 50% da peroxidação lipídica no tecido lipídico do cérebro de porco e a concentração de tisana necessária para proteger 50%

da população de eritrócitos (provenientes de sangue de ovelha) da ação hemolítica causada pelo agente oxidante. Quanto mais baixos os valores de IC<sub>50</sub>, maior a capacidade anti-hemolítica e de inibição da formação de TBARS das tisanas. No ensaio OxHLIA, os valores de IC<sub>50</sub> foram dados em dois intervalos de tempo ( $\Delta t$ ), pois os extratos naturais contêm diferentes moléculas antioxidantes capazes de interagir entre si e favorecer a proteção das membranas celulares em diferentes períodos de tempo.

**Tabela 10.** Atividade antioxidante (IC<sub>50</sub> em  $\mu\text{g/mL}$ ) medida pelos ensaios de TBARS e OxHLIA nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média $\pm$ DP).

	TBARS	OxHLIA	
		$\Delta t = 120$	$\Delta t = 180$
T1	13,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	27,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	45,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
T2	7,4 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	17,8 $\pm$ 0,2 <sup>e</sup>	30,3 $\pm$ 0,3 <sup>e</sup>
T3	9,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	22,0 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	36,5 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
T4	9,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	25,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	37,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
T5	5,07 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	23,4 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	34,4 $\pm$ 0,7 <sup>d</sup>

Valores de IC<sub>50</sub> para o trolox (controlo positivo): 5,8 $\pm$ 0,6  $\mu\text{g/mL}$  (TBARS), 41 $\pm$ 3  $\mu\text{g/mL}$  (OxHLIA 120 min) e 64 $\pm$ 2  $\mu\text{g/mL}$  (OxHLIA 180 min). Letras diferentes na mesma coluna significam que as médias apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ).

As cinco amostras de tisanas testadas revelaram capacidade antioxidante para ambos os ensaios realizados. Todas com diferenças sigificativas entre si, exceto as tisanas T3 e T4 para o ensaio TBARS, provavelmente por possuírem uma planta em comum (*Mentha x piperita* L.) na composição de seus respectivos extratos e com contribuição para essa atividade, como descrito por Pereira et al. (2015). Para o ensaio OxHLIA, a tisana que apresentou a melhor atividade antioxidante, consequentemente a melhor ação anti-hemolítica, foi a amostra T2, em 120 e 180 minutos, com um IC<sub>50</sub> de 17,8  $\mu\text{g/mL}$  e de 30,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Este resultado sugere que os compostos presentes na tisana T2 são capazes de reduzir a ação hemolítica em 50% no tempo decorrido de 120 minutos e os mesmos se estendem por mais 60 minutos. Já para o TBARS, a tisana com maior atividade foi a amostra T5 com IC<sub>50</sub> de 5,07  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja, a concentração mínima capaz de inibir 50% da peroxidação lipídica. Em ambos os ensaios realizados, a tisana com menor atividade foi a T1. O IC<sub>50</sub> obtido para ambos os ensaios é inferior ao apresentado pelos padrões utilizados, tal como se encontra referido na **Tabela 10**, tornando estas tisanas fontes promissoras de compostos com capacidade antioxidante.

Foram observados resultados semelhantes para as tisanas que possuem plantas em comum, como é o caso das tisanas T2, T5 e T3 que possuem tomilho-limão (*T. citriodorus*).

No ensaio de OxHLIA, a atividade antioxidante encontra-se na seguinte ordem T2>T3>T5 em 120 minutos e T2>T5>T3 em 180 minutos. A inversão da bioatividade apresentada entre T3 e T5 para os tempos de 120 e 180 minutos, deve-se provavelmente por estas duas tisanas possuírem diferentes moléculas antioxidantes em função das outras plantas que compõem a mistura das tisanas (na T3 com anis e mentas, e na T5 com hipericão, canela e cravo). No ensaio de TBARS ordenaram-se os resultados de atividade antioxidante da seguinte forma T5>T2>T3=T4, uma vez que T3 e T4 apresentam uma planta em comum (hortelã-pimenta).

A peroxidação lipídica é uma consequência do *stress* oxidativo e está associada a perda progressiva do potencial de membrana, aumento da permeabilidade da mesma e, portanto, a morte celular (Barros, Heleno, Carvalho, & Ferreira, 2010). Este fenómeno pode desencadear uma série de processos patológicos graves como cancro, doenças cardiovasculares (aterosclerose e AVC), distúrbios neurológicos, renais, hepáticos, hipertensão, entre outras (Carocho & Ferreira, 2013; Lespade, 2013; Pisoschi & Pop, 2015). A formação de TBARS em homogeneizados de cérebro é uma consequência da peroxidação lipídica. De fato, o cérebro é altamente sensível aos danos oxidativos, pois necessita de uma quantidade significativa de oxigénio e não possui mecanismos antioxidantes, entretanto, é rico em substratos oxidáveis, como ácidos gordos poliinsaturados e catecolaminas (Barros et al., 2010; Chong, Li, & Maiese, 2005).

O ensaio OxHLIA baseia-se na inibição de danos nas membranas induzidas por radicais peroxila gerados a partir do AAPH adicionado, que atacam as biomembranas dos eritrócitos e eventualmente causam a hemólise. As vantagens deste ensaio são duas: primeira, a utilização de radicais peroxila como pró-oxidantes e eritrócitos como alvos oxidáveis, de modo que os resultados refletem atividade de eliminação de radicais biologicamente relevantes, quando comparados com outros métodos *in vitro* que usam radicais não naturais e a segunda, é a microlocalização de antioxidantes às biomembranas dos eritrócitos. Os eritrócitos são suscetíveis à oxidação devido ao seu alto conteúdo lipídico e alto aporte de oxigénio para a respiração celular e metais de transição, como ferro e cobre (Takebayashi et al., 2012).

Acredita-se que os mecanismos da atividade antioxidante relacionada às células são através da captura de radicais livres e pela alteração das propriedades da membrana celular, muitas vezes em função de compostos fenólicos, em destaque, flavonoides. Alguns destes compostos podem incorporar no núcleo hidrofóbico da bicamada da membrana, causando uma redução na fluidez e estabilidade da membrana. A redução da fluidez pode limitar a difusão de radicais livres e melhorar a eficácia antioxidante dos flavonoides, entretanto, como a

solubilidade desses compostos afeta a estabilidade da membrana celular permanece incerto (Chen & Deuster, 2009).

Diante do exposto, reforça-se a convicção da atividade antioxidante de matrizes vegetais relacionada com a composição e quantidade de compostos fenólicos. A presença de ácidos fenólicos confere capacidade para inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco (TBARS), pois exibem uma atividade antioxidante alta, sendo agrupados em ácidos benzóicos (como exemplo: ácido siríngico, *p*-hidrobenzóico e gálico) e ácidos cinâmicos (como exemplo: ácido *p*-cumárico, ferúlico e cafeico), e ainda se podem ligar entre si ou com outros compostos para formarem estruturas potenciais, como ácido clorogénico (combinação entre ácido caféico e ácido quínico). O potencial antioxidante dos compostos fenólicos é fortemente correlacionado com o número de grupos hidroxil ligados aos anéis aromáticos. Além disso, os grupos hidroxil na posição *orto* e *para* aumentam a atividade anti-oxidativa e anti-radical dos ácidos fenólicos (Bogucka-Kocka, Zidorn, Kasprzycka, Szymczak, & Szewczyk, 2018; Soares, 2002).

### 5.3.2. Atividade citotóxica e hepatotóxica

Os resultados obtidos para as quatro linhas celulares tumorais humanas e para a cultura primária de células não tumorais de porco encontram-se descritos na **Tabela 11** e estão expressos em valores de GI<sub>50</sub> (µg/mL, concentração de tisana responsável por inibir 50% do crescimento celular).

Relativamente às linhas celulares tumorais, a maior capacidade citotóxica de uma forma geral foi observada para a linha celular tumoral de carcinoma do pulmão (NCI H460). A tisana T4 apresentou-se como a tisana de maior capacidade citotóxica, uma vez que, foram observados os menores valores de GI<sub>50</sub> para três das quatro linhas celulares tumorais testadas, carcinoma do pulmão (248 µg/mL), adenocarcinoma do cérvix (HeLa, 253 µg/mL) e carcinoma hepatocelular (HepG2, 264 µg/mL), respectivamente. Para a linha celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), a tisana com maior citotoxicidade foi a T5 com valores de GI<sub>50</sub> = 285 µg/mL.

A tisana T2 não apresentou potencial citotóxico para nenhuma das linhas celulares tumorais testadas, apesar de possuir na sua composição tomilho-limão (*T. citriodorus*), que também está presente nos extratos T4 e T5, portanto, reforça-se a importante necessidade de estudos científicos a respeito dos efeitos sinérgicos e antagonistas em misturas de plantas

aromáticas e medicinais em preparados de tisanas comercializadas. Não houve diferença significativa entre T1 e T5 para a linha celular tumoral do carcinoma hepatocelular. A tisana T3 não demonstrou ser muito promissora, uma vez que só foi observada citotoxicidade para o carcinoma hepatocelular. Entre as tisanas estudadas a T4 foi a que demonstrou ser a mais citotóxica e nenhuma apresentou hepatotoxicidade na linha celular não tumoral.

**Tabela 11.** Citotoxicidade e hepatotoxicidade (GI<sub>50</sub>, µg/mL) nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média±DP).

	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Citotoxicidade</b>					
HepG2	311±9 <sup>a</sup>	>400	299±9 <sup>b</sup>	264±15 <sup>c</sup>	316±13 <sup>a</sup>
NCI H460	257±9 <sup>b</sup>	>400	>400	248±10 <sup>c</sup>	317±8 <sup>a</sup>
HeLa	294±14 <sup>b</sup>	>400	>400	253±8 <sup>c</sup>	313±5 <sup>a</sup>
MCF-7	320±3 <sup>a</sup>	>400	>400	308±13 <sup>b</sup>	285±10 <sup>c</sup>
<b>Hepatotoxicidade</b>					
PLP2	>400	>400	>400	>400	>400

Valores GI<sub>50</sub> correspondem à concentração que provoca 50% de inibição da proliferação celular. HepG2 – carcinoma hepatocelular; NCI-H460 – carcinoma de pulmão humano; HeLa – adenocarcinoma de cérvix humano; MCF-7 – adenocarcinoma de mama humano; PLP2 – cultura primária de células não tumorais de fígado de porco. Valores de GI<sub>50</sub> para a elipticina (controlo positivo): 0,91±0,04 µg/mL (MCF-7), 1,03±0,09 µg/mL (NCI-H460), 1,91±0,06 µg/mL (HeLa), 1,1±0,2 µg/mL (HepG2) e 3,2±0,7 µg/mL (PLP2). Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05).

Na literatura está descrito a citotoxicidade das plantas individuais presentes na tisana T4. Pereira et al. (2017) observou efeitos promissores no extrato metanólico de hortelã-pimenta (*M. piperita*) para as mesmas linhas celulares tumorais. Para a amostra de calêndula (*C. officinalis*) foi descrito por Miguel et al. (2016), que esta apresenta atividade citotóxica para as mesmas linhas com valores superiores a 250 µg/mL. O extrato aquoso de alecrim (*R. officinalis*) não apresentou efeitos antiproliferativos contra as linhas celulares tumorais quando estudados por Gonçalves et al. (2019), expondo que os efeitos anticancerígenos atribuídos a essa planta são provenientes de diterpenos (Petiwala & Johnson, 2015), os quais não foram identificados na tisana T4. No entanto, a capacidade citotóxica apresentada por esta tisana poderá estar relacionado com as outras plantas pertencentes à mistura.

### 5.3.3. Atividade anti-inflamatória

Os valores obtidos através da análise da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de rato (RAW 264.7) encontram-se descritos na **Tabela 12** e os

resultados estão expressos em valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL, concentração capaz de inibir 50% da formação do óxido nítrico).

O estímulo de macrófagos com lipopolissacáridos (LPS) induz a produção de mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico (NO), que por sua vez, está associado a estados inflamatórios crônicos. A diminuição da produção de NO perante a pré-incubação com um extrato é, portanto, recorrentemente utilizado para calcular o efeito anti-inflamatório do mesmo (Rodrigues et al., 2016).

Apenas duas tisanas apresentaram ação anti-inflamatória, nomeadamente T5 e T4, sendo que, a primeira revelou maior atividade com um IC<sub>50</sub> de 345 µg/mL (**Tabela 12**). As outras três tisanas (T1, T2 e T3) apresentaram concentrações superiores a 400 µg/mL, não revelando propriedades anti-inflamatórias. Já está descrito na literatura que as plantas individuais que compõem as misturas das tisanas possuem atividade anti-inflamatória, como é o caso de *C. citratus* (Roriz, 2014), *G. globosa* (Dinda et al., 2006; Ilyas et al., 2013; Silva et al., 2012), *T. mastichina* (Méndez-Tovar et al., 2015), *Mentha x piperita* (Kapp et al., 2013), *R. officinalis* (Almeida Gonçalves et al., 2018; Andrade et al., 2018), *O. basilicum* (Flanigan & Niemeyer, 2014), *C. officinalis* (Matić et al., 2013), *H. androsaemum* (Jabeur et al., 2016) e *Syzygium aromaticum* (Ryu et al., 2016). No entanto, na maioria dos casos os extratos são obtidos utilizando solventes orgânicos. Mandim et al. (2019) relataram a atividade anti-inflamatória de extratos das inflorescências da *Calluna vulgaris* (Hull) com diferentes solventes e observou que, esta atividade aumenta à medida que a polaridade do solvente de extração da planta diminui, sugerindo que os compostos responsáveis pela ação anti-inflamatória se associam com compostos com um grau de polaridade baixo, o que está de acordo com o presente estudo, uma vez que os valores para a inibição de 50% de óxido nítrico se apresentaram altos (próximos do que se considera relevante para a ausência do potencial), comparativamente com valores obtidos utilizando extratos orgânicos. Oueslati et al. (2012) também descreveu a atividade anti-inflamatória dos extratos de hexano, metanol e aquoso de *Suaeda fruticosa* Forssk, sendo que o extrato metanólico demonstrou ser o mais promissor, seguido de hexano e por fim, o extrato aquoso. Portanto, estes factos demonstram que extratos obtidos utilizando diferentes solventes orgânicos apresentam uma melhor atividade anti-inflamatória comparativamente a extratos aquosos.

No entanto, os compostos fenólicos estão descritos como uma alternativa promissora para o tratamento de doenças inflamatórias (Sergent et al., 2010), como por exemplo a apigenina que foi já descrita como tendo capacidade inibitória de NO em células de RAW 264.7

induzidas por LPS. Os ácidos ferúlico e coumárico demonstraram atividades anti-inflamatórias *in vivo* em modelos de ratos e camundongos (Pragasam, Venkatesan, & Rasool, 2013; Zhu et al., 2014), sendo que a presença de quercetina também confere atividade anti-inflamatória (Rodrigues et al., 2016).

**Tabela 12.** Atividade anti-inflamatória (IC<sub>50</sub>, µg/mL) nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média±DP).

Atividade anti-inflamatória	
T1	>400
T2	>400
T3	>400
T4	354±6*
T5	345±9*

Valores de IC<sub>50</sub> para a Dexametasona (controle positivo): 16±1 µg/mL. \*significa diferenças significativas entre as amostras determinadas por um teste de *t*-student.

Jabeur et al. (2016) relataram a inibição da produção do óxido nítrico pelo extrato hidroetanólico de *H. androsaemum* (planta presente na tisana T5), com um IC<sub>50</sub> de 178,78 µg/mL apontando uma ação anti-inflamatória para o mesmo ensaio realizado no presente estudo e correlacionaram com a quantidade significativa de derivados de ácidos clorogênicos presentes no extrato. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos neste estudo, pois em T5 foram identificadas as formas *trans* do ácido neoclorogênico (3-*O*-cafeoilquínico), *cis* e *trans* criptoclorogênico (4-*O*-cafeoilquínico) e *cis* e *trans* do ácido clorogênico (5-*O*-cafeoilquínico) em quantidades significativas.

Há outros compostos presentes na tisana T5, os quais também se atribuem a propriedade bioativa em questão, como a luteolina. Segundo Sung & Lee (2015), este flavonoide também exibe propriedades anti-inflamatórias, através da supressão da produção de óxido nítrico.

Em relação à amostra T4 foram identificados apigenina, luteolina, ácido coumárico e quercetina, compostos potencialmente anti-inflamatórios, referido acima.

Apesar das amostras T2 e T3 apresentarem alguns desses compostos como, ácido clorogênico, luteolina e apigenina, estas tisanas não se apresentaram como fontes promissoras de atividade anti-inflamatória, possivelmente pela ocorrência de reações sinérgicas entre os diversos compostos identificados e pela concentração baixa dos compostos referenciados como potenciais anti-inflamatórios, quando comparados com as tisanas T4 e T5. Portanto, as misturas de plantas aromáticas e medicinais presentes em T4 e T5 apresentam efeitos positivos contra doenças inflamatórias, embora sejam necessárias concentrações relativamente altas.

### 5.3.4. Atividade antimicrobiana

Oito estirpes bacterianas foram usadas para testar a capacidade antibacteriana das preparações aquosas das amostras de tisanas. Os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas bactericidas (CMB) associados às diferentes tisanas encontram-se descritos na **Tabela 13** e estão expressos em mg/mL. A atividade antimicrobiana associada a cada uma das tisanas é maior quanto menor o valor das concentrações mínimas inibitórias (CMI).

**Tabela 13.** Atividade antimicrobiana (CMI e CMB, mg/mL) nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média±DP).

	T1		T2		T3		T4		T5	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b>Atividade antimicrobiana</b>										
<b>Bactérias Gram-negativos</b>										
<i>Escherichia coli</i>	20	>20	20	>20	>20	>20	>20	>20	20	>20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	>20	20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>Morganella morganii</i>	>20	>20	20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<b>Bactérias Gram-positivos</b>										
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	>20	20	>20	5	>20	10	>20	>20	>20
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	>20	>20	>20	5	>20	20	>20	>20	>20
MRSA	10	>20	2,5	>20	10	>20	5	>20	10	>20

Valores de CMI e CMB para os controles positivos: Amoxicilina/Ácido clavulânico (*E. Coli* - ≤8/4, S; *K. pneumoniae* - ≤8/4, S; *M. morganii* - >16/8, R); Vancomicina (*E. faecalis* e *MRSA* - ≤2, S); Ampicilina (*L. monocytogenes* - ≤0.2, S). S- Suscetível; I- Intermédio; R- Resistente; esta classificação foi feita de acordo com os pontos interpretativos do Instituto de Qualidade Clínica e Laboratorial (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*) e Comité Europeu de teste para a Susceptibilidade antimicrobiana (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST*). CMI- concentração mínima inibitória; CMB - concentração mínima bactericida; MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

De modo geral, todas as tisanas revelaram potencial contra a maioria das estirpes bacterianas testadas, sendo que as bactérias Gram-positivos apresentaram menores valores de CMI, portanto, uma maior sensibilidade perante as bactérias Gram-negativos. As bactérias Gram-negativos são mais resistentes aos compostos antimicrobianos de origem vegetal devido à sua membrana externa lipopolissacarídica, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos (Burt et al., 2007), sugerindo que extratos orgânicos podem apresentar maior potencial de inibição ao crescimento microbiano quando comparados com extratos aquosos. Além disso, os compostos antimicrobianos das plantas podem agir de forma diferente para um grupo particular de microrganismos patogénicos alvo (Shimamura et al., 2007), portanto, o tipo de inibição

constatado pode ser diferente entre as bactérias, mesmo quando tratadas com a mesma substância.

A tisana com maior potencial antimicrobiano para as bactérias Gram-positivos foi a amostra T3 (valores de 5 a 10 mg/mL para inibição mínima), com exceção da *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) para a qual a tisana mais ativa foi a amostra T2. De modo geral, a tisana T2 foi a única que apresentou uma concentração mínima inibitória de 20 mg/mL para as bactérias Gram-negativos, enquanto que, para as outras tisanas (T1, T3, T4 e T5) seriam necessárias concentrações mais altas que 20 mg/mL para inibir o crescimento deste tipo de bactéria. A tisana T5 revelou-se como a tisana de menor potencial, pois exibiu os maiores valores para CMI e CMB. Todas as tisanas inibem o crescimento bacteriano de algumas das bactérias testadas, porém nenhuma apresenta atividade bactericida.

A atividade antimicrobiana de extratos aquosos é promissor, uma vez que extratos orgânicos podem apresentar citotoxicidade para o organismo humano, entretanto, a concentração necessária para a atividade apresentada pelas tisanas testadas no presente estudo, ainda é relativamente alta quando comparada aos mesmos extratos orgânicos (Garay, 2017; Tajkarimi et al., 2010).

Cushnie & Lamb (2005) descreveu sobre a capacidade antimicrobiana dos flavonóis/flavonas (apigenina, naringenina, luteolina, isoflavonas, flavononas, quercetinas e seus derivados glicosilados), pois estes tipos de moléculas apresentam atividade contra um grande número de estirpes bacterianas. Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que a amostra de tisana T3 revelou maior capacidade antibacteriana para bactérias Gram-positivos e, por sua vez, maior concentração de flavonóis/flavonas.

### **5.3.5. Atividade anti-tirosinase**

Os resultados do ensaio de atividade anti-tirosinase baseado na inibição da enzima tirosinase proveniente de cogumelos estão descritos na **Tabela 14**. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da ação da enzima numa concentração máxima de 8 mg/mL (máxima concentração testada). Todas as amostras de tisanas (T1, T2, T3, T4 e T5) não apresentaram capacidade de inibição da enzima tirosinase na concentração máxima testada de 8 mg/mL.

**Tabela 14.** Atividade anti-tirosinase nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média±DP).

Atividade anti-tirosinase (inibição da tirosinase de cogumelo)	
(Porcentagem de inibição a 8 mg/mL)	
T1	>8
T2	>8
T3	>8
T4	>8
T5	>8

Valor de IC<sub>50</sub> para o ácido kójico (controlo positivo): 0,078±0,001 mg/mL.

Conclui-se, portanto, que estas amostras de tisanas não têm capacidade de inibir especificamente esta enzima proveniente de cogumelos. A tirosinase é uma enzima que contém cobre e é amplamente distribuída em microorganismos, animais e plantas. Atualmente, a tirosinase proveniente de cogumelos tornou-se popular porque está amplamente disponível (Seo, Sharma, & Sharma, 2003) e é capaz de inibir a formação do neuromelanina associado ao desenvolvimento de Parkinson (DP) (Sevim et al., 2013). A inibição desta enzima é uma das principais estratégias para o tratamento da hiperpigmentação, uma vez que, vários distúrbios dermatológicos, como melasma, manchas de idade e danos actínicos decorrem da acumulação de um nível excessivo de pigmentação epidérmica, e, por isso, compostos potencialmente inibidores da tirosinase têm se tornado cada vez mais importante para serem incorporados em produtos cosméticos (Miyazawa, Oshima, Koshio, Itsuzaki, & Anzai, 2003; Nerya, Musa, Khatib, Tamir, & Vaya, 2004; Seo et al., 2003). Atualmente procuram-se novas fontes, preferencialmente naturais, capazes de inibir a tirosinase, pois os compostos inibidores mais usados pela indústria têm muitas limitações, como a baixa atividade e alta citotoxicidade (Nerya et al., 2004).

### 5.3.6. Atividade antidiabética

Os resultados do ensaio de atividade antidiabética baseado na inibição da  $\alpha$ -glucosidase de origem fúngica e animal estão descritos na **Tabela 15**. Os valores estão expressos em IC<sub>50</sub> (mg/mL), concentração de amostra necessária para inibir 50% da ação enzimática da  $\alpha$ -glucosidase ou quando a tisana não foi suficientemente ativa, calculou-se a percentagem de inibição da ação da enzima numa concentração máxima de 8 mg/mL.

**Tabela 15.** Atividade antidiabética (IC<sub>50</sub>, mg/mL) baseado na inibição da  $\alpha$ -glucosidase em origem fúngica e vegetal nas preparações aquosas das tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 (média±DP).

Atividade antidiabética (inibição da $\alpha$ -glucosidase)		
(IC <sub>50</sub> , valores em mg/mL ou percentagem de inibição a 8 mg/mL)		
	Origem fúngica	Origem animal
<b>T1</b>	41%±4%	>8
<b>T2</b>	1,19±0,02	>8
<b>T3</b>	43%±3%	>8
<b>T4</b>	6,9±0,4	>8
<b>T5</b>	0,054±0,003	37±6

Valor de IC<sub>50</sub> para a acarbose (controlo positivo): 0,83±0,02 mg/mL (origem fúngica) e 0,86±0,01 mg/mL (origem animal).

As estratégias de gestão de alguns distúrbios diabéticos e neurológicos são temas centrais nas áreas científicas e medicinais. A inibição de enzimas chaves pode ser uma técnica valiosa para o tratamento dessas doenças, particularmente com uso de produtos derivados de fontes naturais (Etxeberria, Garza, Campión, Martínez, & Milagro, 2012; Kim & Uyama, 2005). Os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase constituem uma classe importante de fármacos antidiabéticos que impedem o aumento súbito da hiperglicemia pós-prandial (Kumar, Ghosh, & Pal, 2013).

As tisanas T1 e T3 não apresentaram concentração mínima para inibição de 50% da  $\alpha$ -glucosidase de origem fúngica, portanto, calculou-se a percentagem de inibição como referido anteriormente e demonstraram a capacidade de inibir 41 e 43%, respectivamente, a ação da  $\alpha$ -glucosidase. A tisana T5 foi a que revelou melhor atividade antidiabética para a origem fúngica e a única que apresentou concentração satisfatória para inibição de 50% da enzima de origem animal. As restantes tisanas não se apresentaram suficientemente ativas para a atividade em origem animal na concentração máxima testada de 8 mg/mL.

Não foram encontrados dados para atividade antidiabética para as plantas que compõem a tisana T5, no entanto, Adisakwattana et al. (2010) descreveu a atividade inibitória da  $\alpha$ -glucosidase potente para *Orthosiphon aristatus*, pertencente a família *Lamiaceae*, que corresponde à mesma família de *T. citriodorus* (tomilho-limão) presente na tisana T5. Em 2013, Asgar et al. compilou alguns compostos de origem vegetal potencialmente antidiabéticos, destacando os flavonóis/flavonas e taninos condensados. Do mesmo modo, entre os polifenóis, o ácido clorogénico tem recebido muita atenção por inúmeras atividades biológicas que incluem excelente atividade anti-inflamatória em células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeos (Hwang, Kim, Park, Lee, & Kim, 2014), melhoria do metabolismo lipídico de camundongos obesos induzidos por uma dieta hiperlipídica (Cho et al., 2010) e inibição da

$\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase ligada à diabetes tipo II (Oboh, Agunloye, Adefegha, Akinyemi, & Ademiluyi, 2015). Fato que vai de encontro com o presente estudo, uma vez que, na amostra T5 os compostos mais abundantes são ácidos clorogénico (CGA) e derivados. É importante ressaltar que foi a única tisana que mostrou uma concentração suficientemente capaz de inibir a produção da  $\alpha$ -glucosidase de origem animal e para a  $\alpha$ -glucosidase de origem fúngica, o IC<sub>50</sub> obtido é inferior ao apresentado pelo controlo positivo (**Tabela 15**), tornando-a assim a tisana mais promissora como fonte de compostos com capacidade antidiabética.

#### **5.4. Correlações entre composição fenólica e ensaios de bioatividades realizados**

A **Tabela 16** ilustra as correlações estabelecidas entre as famílias de compostos fenólicos identificados nas tisanas T1, T2, T3, T4 e T5 com as atividades bioativas testadas (antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-tirosinase e antidiabética).

**Tabela 16.** Correlação ( $R^2$ ) das atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-tirosinase e antidiabética das cinco amostras de tisanas estudadas com as famílias de compostos fenólicos identificadas nas mesmas.

		Fator de correlação $R^2$						
		AFT	iFlaT	FlaT	FFT	F3OT	OCT	CFT
<b>Atividade antioxidante</b>								
Inibição de TBARS		-0,704	f/n	f/n	f/n	-0,733	f/n	f/n
OxHLIA	120 min	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	m
	180 min	m	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	m
<b>Atividade Citotóxica</b>								
HepG2 (carcinoma hepatocelular)		f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n
NCI-H460 (carcinoma do pulmão humano)		f/n	m	f/n	m	m	m	m
HeLa (adenocarcinoma do cérvix humano)		f/n	m	f/n	-0,700	f/n	m	m
MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano)		f/n	m	f/n	-0,717	f/n	m	m
PLP2 (cultura primária não tumoral)		-	-	-	-	-	-	-
<b>Atividade anti-inflamatória</b>								
Produção de NO		f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n
<b>Atividade Antimicrobiana</b>								
<b>Bactérias gram-negativos</b>								
<i>Escherichia coli</i>		f/n	m	-0,960	m	f/n	m	m
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		f/n	f/n	-0,836	m	f/n	f/n	m
<i>Morganella morganii</i>		f/n	f/n	m	f/n	f/n	f/n	f/n
<i>Proteus mirabilis</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		f/n	f/n	m	f/n	f/n	f/n	f/n
<b>Bacterias gram-positivos</b>								
<i>Enterococcus faecalis</i>		f/n	f/n	f/n	f/n	m	f/n	f/n
<i>Listeria monocytogenes</i>		f/n	f/n	0,719	f/n	f/n	f/n	f/n
MRSA		f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n	f/n
<b>Atividade anti-tirosinase</b>								
Inibição de tirosinase		-	-	-	-	-	-	-
<b>Atividade antidiabética</b>								
Inibição da $\alpha$ -glucosidase de origem fúngica		m	m	f/n	f/n	f/n	m	f/n
Inibição da $\alpha$ -glucosidase de origem animal		m	f/n	f/n	f/n	0,999	f/n	f/n

Dados mostrados de fator de correlação apenas para aqueles considerados correlacionados fortes ou muito fortes (0,7-0,9 e >0,9, respectivamente), m – correlação moderada (0,5-0,7), f/n – correlação fraca ou negativa (0,3-0,5 e 0-0,3, respectivamente). AFT – ácidos fenólicos totais, iFlaT – isoflavanonas totais, FlaT – flavononas totais, FFT – flavonóis/flavonas totais, F3OT – flavan-3-ol totais, OCT – outros compostos totais e CFT – compostos fenólicos totais.

Para a atividade antioxidante relativamente à inibição da peroxidação lipídica, os valores de IC<sub>50</sub> estão fortemente e inversamente correlacionados (correlação negativa) com o teor de ácidos fenólicos (AFT, -0,704) e com os flavan-3-óis totais (F3OT, -0,733), ou seja, quanto maior a concentração de AFT e/ou de F3OT presentes nas tisanas, menor será a concentração necessária (de tisana) para a inibição de 50% da peroxidação lipídica. O que é muito promissor, uma vez que, atribui-se maior atividade para menores valores de IC<sub>50</sub>. A tisana T5 foi a única onde se identificou compostos pertencentes à família flavan-3-ol (2,19 mg/100mL – nomeadamente o trímero tipo B de (epi)catequina, **Tabela 8**), e também apresentou a maior concentração de ácidos fenólicos totais (41,1 mg/100 mL, **Tabela 8**), seguida da tisana T2 (37,06 mg/100 mL, **Tabela 5**). Os ácidos fenólicos totais correlacionaram-se moderadamente com a atividade anti-hemolítica (atividade antioxidante – OxHLIA) após 180 minutos, sugerindo que a inibição de 50% da hemólise oxidativa está correlacionada com a concentração de AFT. Referentemente aos 120 minutos decorridos, os compostos fenólicos totais (CFT) estão correlacionados moderadamente. O potencial antioxidante de ácidos fenólicos está bem descrito por Bogucka-Kocka, Zidorn, Kasprzycka, Szymczak, & Szewczyk (2018) e Soares (2002).

Em relação a atividade citotóxica em células tumorais, os compostos fenólicos individuais bem como os totais não se correlacionam fortemente com a linha celular tumoral HepG2 (carcinoma hepatocelular). Para o carcinoma do pulmão humano (NCI-H460) as isoflavononas, flavonóis/flavonas, flavan-3-óis e outros compostos fenólicos correlacionam-se moderadamente com a atividade citotóxica apresentada para esta linha celular. Já para as linhas HeLa (adenocarcinoma do cérvix humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), o grupo de composto fenólico com maior correlação (consideradas fortes e inversamente proporcionais) foram os flavonóis/flavonas, com valores -0,7 e -0,717, respectivamente. Portanto, a maior concentração deste grupo de moléculas, confere que será necessária uma menor concentração das tisanas testadas de forma a inibir 50% destas linhas celulares *in vitro*. As tisanas que apresentaram melhores resultados de inibição da proliferação nas linhas celulares estudadas (T4 e T5, **Tabela 11**), detêm quantidades de flavonóis/flavonas semelhantes (ambas com aproximadamente 16 mg/100 mL de tisana), que ao não serem as amostras de tisanas com maiores concentrações de flavonóis/flavonas, a correlação obtida poderá estar relacionada com o tipo de composto e não com a concentração destas mesmas moléculas. Para a linha primária celular não tumoral (PLP2) não se estabeleceram correlações, visto que, as tisanas testadas não apresentaram citotoxicidade para a mesma. Pereira et al. (2017) correlacionaram os compostos

fenólicos de hortelã-pimenta com a citotoxicidade para as mesmas linhas tumorais e obtiveram correlações estatisticamente significantes, para as linhas HepG2 e MCF-7 a melhor correlação foi observada para a família de flavonóis/flavonas totais. Descreveu também que a linha NCI-H460 estava altamente correlacionada com a presença do ácido fenólico 3-*O*-cafeoilquínico. Miguel et al. (2016) estudaram a composição fenólica da tisana de *C. officinalis* e não correlacionaram a composição fenólica com a atividade citotóxica (também proposta no estudo deles), entretanto, os compostos maioritários foram flavonóis/flavonas, sugerindo a atribuição da atividade citotóxica a esses compostos.

A atividade anti-inflamatória mostrou ser fraca e negativamente correlacionada com os compostos identificados nas tisanas, sugerindo que os compostos responsáveis pela ação anti-inflamatória se associam com compostos com um grau de polaridade baixo, não extraídos aquando da preparação aquosa da tisana.

As maiores correlações observadas na atividade antimicrobiana deram-se entre as bactérias Gram-positivos e as flavononas, sendo que a melhor correlação apresentada foi para a estirpe *E. coli* (-0,960), seguida da *K. pneumoniae* (-0,836), e com uma correlação moderada para *M. morgani* e *P. aeruginosa*; sem correlação entre *Proteus mirabilis* e os compostos fenólicos individuais e totais. O grupo de flavononas também se correlacionou com a bactéria Gram-negativa *L. monocytogenes*, porém de forma positiva, ou seja, quanto maior a concentração de flavononas, maior a concentração necessária para a concentração mínima inibitória para este microorganismo. Para as outras duas estirpes Gram-negativos estudadas não houve correlações apreciáveis.

A atividade antidiabética ( $\alpha$ -glucosidase de origem animal) está fortemente correlacionada de forma positiva com o teor de flavan-3-ol, o que significa que, quanto maior a ocorrência desta família de compostos fenólicos, maior será a inibição de 50% da enzima  $\alpha$ -glucosidase de origem animal. Uma vez que a tisana T5 foi a única que apresentou este tipo de composto fenólico e, também a que apresentou resultados para a atividade antidiabética, que poderá significar que são estes os compostos que estão envolvidos nesta bioatividade.

Também é possível observar uma correlação moderada entre os ácidos fenólicos e a atividade antidiabética (fúngica e animal). Um dos compostos que poderá estar correlacionado com esta bioatividade é precisamente o ácido rosmarínico (Gonçalves et al., 2019), tendo sido identificado em quantidades significativas em todas as amostras de tisanas.

## CAPÍTULO IV





## 6. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química de cinco tisanas relativamente ao seu conteúdo fenólico e composição em ácidos orgânicos e tocoferóis. Pretendeu-se também a avaliação das suas propriedades bioativas, nomeadamente antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-tirosinase e antidiabética, com a finalidade de as correlacionar com o conteúdo fenólico previamente avaliado, pois estes compostos são os que se encontram em maior abundância no extrato caracterizado.

Este trabalho abordou, portanto, a temática do uso de misturas de plantas aromáticas e medicinais como um meio para a obtenção de compostos de alto valor agregado com vista à sua aplicação em diferentes áreas, como o sector agro-alimentar e nutracêutico.

De uma forma geral, os objetivos propostos foram cumpridos e os resultados obtidos suportam o potencial uso das tisanas em diferentes áreas industriais, com diferentes e interessantes perfis fitoquímicos.

Relativamente à composição fenólica das amostras de tisanas, os ácidos fenólicos foram a família de compostos que mais se destacaram (estando em maiores concentrações na amostra de tisana T5), devido sobretudo à presença de ácido clorogénico e ácido rosmarínico e seus derivados, quer a nível qualitativo e quantitativo (à excepção da amostra de tisana T3 na qual se verificaram maiores níveis de flavonóis/flavonas). Por sua vez, a família dos flavonóis/flavonas também se destacou em todas as amostras, devido à presença de derivados glicosilados de apigenina, kaempferol, quercetina, luteolina, diosmetina e calicosin. Foi também possível a identificação de flavononas (derivados glicosilados de eriodictiol), flavan-3-óis (derivados de (epi)catequina) e ainda outros tipos de compostos não fenólicos (dois lignanos e um triterpenóide pentacíclico).

Com o estudo da composição em ácidos orgânicos e tocoferóis, verificou-se que o ácido oxálico se encontra em níveis mais elevados para todas as amostras e é a amostra de tisana T1 que revelou o maior teor total de ácidos orgânicos no extrato seco e preparação aquosa. Relativamente aos tocoferóis verificou-se que na preparação aquosa das tisanas não foi detectada qualquer isoforma, devido ao carácter lipídico desta molécula e que a isoforma  $\gamma$ -tocoferol foi a mais abundante no extrato seco, principalmente da amostra de tisana T5.

Relativamente aos resultados obtidos para as várias bioatividades estudadas, é novamente a amostra de tisana T5 que se destaca, revelando a mais alta capacidade para a inibição da peroxidação lipídica no ensaio de TBARS, melhor potencial citotóxico contra a

linha celular MCF-7, mais alta atividade anti-inflamatória e atividade antidiabética com a inibição de  $\alpha$ -glucosidase de origem fúngica e animal (tendo sido a única a revelar atividade para a enzima de origem animal). Para o ensaio de inibição da hemólise oxidativa é a amostra de tisana T2 que se destaca, revelando os valores de  $IC_{50}$  mais baixos para 120 e 180 minutos. No entanto, a amostra de tisana T4 é aquela que revelou maior potencial citotóxico para três linhas celulares, uma vez que apresentou valores de  $GI_{50}$  mais baixos. Relativamente à atividade antimicrobiana, a amostra de tisana T3 revelou os valores de CMI mais baixos para as bactérias Gram-positivos. De salientar que nenhuma amostra revelou hepatotoxicidade contra a linha não tumoral de células de fígado de porco.

Mais ainda, nenhuma amostra revelou atividade anti-tirosinase à máxima concentração testada de 8 mg/mL e para as bactérias Gram-negativos a grande maioria das tisanas não apresentaram resultados muito promissores, pois apresentaram CMI e CMB superiores à máxima concentração testada (20 mg/mL).

A presença de tomilho-limão em várias das misturas de plantas aromáticas e medicinais nas tisanas poderá potenciar os resultados mais promissores para as atividades bioativas, uma vez que está presente nas tisanas com as melhores propriedades biológicas avaliadas. As três tisanas em que o tomilho-limão compõe a mistura são: T2, T4 e T5, que como verificado são precisamente aquelas que mais se destacam nas propriedades biológicas.

Com o estudo de correlação foi possível verificar a existência de uma correlação estatisticamente significativa e negativa em algumas bioatividades e famílias de compostos fenólicos, o que significa que quanto maior a quantidade de um determinado composto poderá elevar um determinado potencial bioativo benéfico para a saúde do consumidor. É perceptível a competitividade dos compostos nessas misturas, e por isso, para perspectivas futuras deste trabalho, propõe-se um estudo de sinergismo entre as várias plantas para avaliar e otimizar as diferentes proporções de plantas em cada mistura, para além de um estudo de correlação individual dos compostos fenólicos para melhor avaliar qual o composto específico que está relacionado com as diferentes bioatividades.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abreu, R. M., Ferreira, I. C., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., ... Queiroz, M.-J. R. (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.
- Adisakwattana, S., Jiphimai, P., Prutanopajai, P., Chanathong, B., Sapwarobol, S., & Ariyapitipan, T. (2010). Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(3), 295–305. <https://doi.org/10.3109/09637480903455963>
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 44(5–6), 483–525.
- Alcázar, A., Ballesteros, O., Jurado, J. M., Pablos, F., Martín, M. J., Vilches, J. L., & Navalón, A. (2007). Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-erh Teas According to Their Free Amino Acids Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 5960–5965. <https://doi.org/10.1021/jf070601a>
- Alizadeh, M. R., Mahdavi, A. H., Rahmani, H. R., & Jahanian, E. (2015). Effects of different levels of clove bud (*Syzygium aromaticum*) on yolk biochemical parameters and fatty acids profile, yolk oxidative stability, and ovarian follicle numbers of laying hens receiving different n-6 to n-3 ratios. *Animal Feed Science and Technology*, 206, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.05.007>
- Almeida Gonçalves, G., de Sá-Nakanishi, A. B., Comar, J. F., Bracht, L., Dias, M. I., Barros, L., ... Bracht, A. (2018). Water soluble compounds of *Rosmarinus officinalis* L.

- improve the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Food & function*, 9(4), 2328–2340.
- Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future science OA*, 4(4), FSO283.
- Asgar, M. A. (2013). Anti-Diabetic Potential of Phenolic Compounds: A Review. *International Journal of Food Properties*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864>
- Azevedo, P. A. P. de. (2011). *Produção de Plantas Aromáticas e Medicinais (Plano de Negócios)* (Mestrado). Universidade do Minho, Portugal.
- Badke, M. R., Budó, M. de L. D., da Silva, F. M., & Ressel, L. B. (2011). Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Anna Nery Revista de Enfermagem*, 15(1), 132–139.
- Bajpai, V. K., Rahman, A., & Kang, S. C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 117–122.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, 132(2), 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.048>
- Barros, L., Dueñas, M., Pinela, J., Carvalho, A. M., Buelga, C. S., & Ferreira, I. C. (2012). Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato

- (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens. *Plant foods for human nutrition*, 67(3), 229–234.
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.024>
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9443-1>
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Bartsch, H., & Nair, J. (2004). Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*, 28(6), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.cdp.2004.07.004>
- Berryman, A. M., Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins III, J. B. (2005). Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol,  $\beta$ -carotene, and  $\alpha$ -lipoic acid on parameters of oxidative stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 18(6), 345–352.
- Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., Kasprzycka, M., Szymczak, G., & Szewczyk, K. (2018). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.037>

- Brito, A., Ramirez, J., Areche, C., Sepúlveda, B., & Simirgiotis, M. (2014). HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules*, *19*(11), 17400–17421.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants* (Vol. 40). American Society of Plant Physiologists Rockville, MD.
- Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., & Gaastra, W. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, *73*(14), 4484–4490.
- Carocho, M., Barros, L., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Bento, A., Kaluska, I., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Analysis of organic acids in electron beam irradiated chestnuts (*Castanea sativa* Mill.): Effects of radiation dose and storage time. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 348–352. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.031>
- Carocho, M., Barros, L., Calhella, R. C., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., ... Ferreira, I. C. (2015). *Melissa officinalis* L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. *Food & function*, *6*(7), 2240–2248.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, *51*, 15–25.
- Cechinel Filho, V., & Yunes, R. A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, *21*(1), 99–105.
- Chen, Y., & Deuster, P. (2009). Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chemico-Biological Interactions*, *182*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.007>

- Cho, A.-S., Jeon, S.-M., Kim, M.-J., Yeo, J., Seo, K.-I., Choi, M.-S., & Lee, M.-K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>
- Chong, Z. Z., Li, F., & Maiese, K. (2005). Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 75(3), 207–246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.004>
- Chrysargyris, A., Nikolaidou, E., Stamatakis, A., & Tzortzakis, N. (2017). Vegetative, physiological, nutritional and antioxidant behavior of spearmint (*Mentha spicata* L.) in response to different nitrogen supply in hydroponics. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 52–61.
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2900–2911.
- Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS n. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3821–3832.
- Clifford, M. N., Wu, W., Kirkpatrick, J., & Kuhnert, N. (2007). Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal Chrysanthemum by LC– MS n. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 929–936.
- Clifford, M. N., Zheng, W., & Kuhnert, N. (2006). Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC–MS. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 17(6), 384–393.

- Conceição, K. N., Sampaio, F. A. S. A., da Silva, V. F., & da Silva, A. O. (2017). Poder antioxidante de carotenoides, flavonóides e vitamina E na prevenção da arteriosclerose. *Revista Ciência & Saberes-Facema*, 2(4), 320–324.
- Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66–76. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
- Corrêa, R. C. G., Haminiuk, C. W. I., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Kato, C. G., ... Ferreira, I. C. F. R. (2017). Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods*, 36, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.030>
- Costa, A. S. G., Nunes, M. A., Almeida, I. M. C., Carvalho, M. R., Barroso, M. F., Alves, R. C., & Oliveira, M. (2012). Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 324–328.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
- Cunha, A. P. da, Roque, O. R., & Gaspar, N. (2011). *Cultura e utilização das plantas medicinais e aromáticas* (1º ed). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343–356.
- Davis, S. N., & Granner, D. K. (2001). Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th ed. McGraw-Hill, New York*.

- De Groot, H., & Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 12(3), 249–255.
- Degáspari, C. H., & Waszczynskyj, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão acadêmica*, 5(1).
- Del Rio, D., Calani, L., Scazzina, F., Jechiu, L., Cordero, C., & Brighenti, F. (2010). Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea. *Nutrition*, 26(5), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.013>
- Desta, K. T., Kim, G.-S., Kim, Y.-H., Lee, W. S., Lee, S. J., Jin, J. S., ... Shin, S. C. (2016). The polyphenolic profiles and antioxidant effects of *Agastache rugosa* Kuntze (Banga) flower, leaf, stem and root. *Biomedical Chromatography*, 30(2), 225–231. <https://doi.org/10.1002/bmc.3539>
- Dias, M. I., Barros, L., Barreira, J. C. M., Alves, M. J., Barracosa, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Phenolic profile and bioactivity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) inflorescence parts: Selecting the best genotype for food applications. *Food Chemistry*, 268, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.081>
- Dinda, B., Ghosh, B., Achari, B., Arima, S., Sato, N., & Harigaya, Y. (2006). Chemical constituents of *Gomphrena globosa*. II. *Natural Product Sciences*, 12(2), 89–93.
- Diplock, A. T., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., ... Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British journal of nutrition*, 80(S1), S77–S112.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.-E., Lavoie, S., Longtin, A., ... Legault, J. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.021>

- Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). Review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(7), 404–421. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00155-3)
- Eberhardt, G. N. (2012). Atividade antioxidante, antidiabética e antimicrobiana de *Senna rugosa* (G.Don) HS Irwin & Barneby (1982) e *Senna velutina* (Vogel) HS Irwin & Barneby (1982) (Mestrado). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.
- Ekechukwu, O. V., & Norton, B. (1999). Review of solar-energy drying systems II: an overview of solar drying technology. *Energy conversion and management*, 40(6), 615–655.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851–874.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22), 2986–3008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.014>
- Estrada-Reyes, R., Aguirre Hernández, E., García-Argáez, A., Soto Hernández, M., Linares, E., Bye, R., ... Martínez-Vázquez, M. (2004). Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(7), 685–694. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.01.005>
- Etxeberria, U., Garza, A. L. de la, Campión, J., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. (2012). Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(3), 269–297. <https://doi.org/10.1517/14728222.2012.664134>
- FAO. (2018). *Consumo de chá aumenta no mundo, graças à demanda da Índia e da China*.

- Fardet, A., Rock, E., & Rémésy, C. (2008). Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *Journal of Cereal Science*, 48(2), 258–276. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.01.002>
- Fernandes, Â. (2010). *Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano* (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança, Portugal.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From *in vitro* Results to *in vivo* Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649–671. <https://doi.org/10.1080/10408390701761845>
- Ferreira, I. C., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–1560.
- Ferruzzi, M. G. (2010). The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior*, 100(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.01.035>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2006). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais, Curso Teórico-Prático*, 1–18.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2014). Extractos de PAM. *Guia para a produção de plantas aromáticas e medicinais: uma recolha de informação e boas práticas para a produção de plantas aromáticas e medicinais em Portugal*. Coord. J. Cunha, *Ficha*, 1–9.

- Flanigan, P. M., & Niemeyer, E. D. (2014). Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chemistry*, *164*, 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.061>
- Fritsche, S., Wang, X., & Jung, C. (2017). Recent Advances in our Understanding of Tocopherol Biosynthesis in Plants: An Overview of Key Genes, Functions, and Breeding of Vitamin E Improved Crops. *Antioxidants*, *6*(4), 99. <https://doi.org/10.3390/antiox6040099>
- Fu, L., Xu, B.-T., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xu, X.-R., Xia, E.-Q., ... Li, H.-B. (2011). Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Herbal and Tea Infusions. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(4), 2112–2124. <https://doi.org/10.3390/ijms12042112>
- Fudholi, A., Sopian, K., Ruslan, M. H., Alghoul, M. A., & Sulaiman, M. Y. (2010). Review of solar dryers for agricultural and marine products. *Renewable and sustainable energy reviews*, *14*(1), 1–30.
- Garay, E. L. R. (2017). *Avaliação da Bioacessibilidade de Compostos Antioxidantes de Plantas Aromáticas: Orégãos e Tomilho limão* (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar). Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Gonçalves, G. A., Corrêa, R. C. G., Barros, L., Dias, M. I., Calhella, R. C., Correa, V. G., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation on a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extract rich in rosmarinic acid. *Food Chemistry*, *271*, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.132>
- Graça, V. C., Barros, L., Calhella, R. C., Dias, M. I., Ferreira, I. C., & Santos, P. F. (2017). Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. *Industrial Crops and Products*, *108*, 543–552.

- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grzegorzczak-Karolak, I., & Kiss, A. (2018). Determination of the phenolic profile and antioxidant properties of *Salvia viridis* L. shoots: a comparison of aqueous and hydroethanolic extracts. *Molecules*, *23*(6), 1468.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends in pharmacological sciences*, *32*(3), 125–130.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, *2007*.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Herrling, T., Jung, K., & Fuchs, J. (2006). Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *63*(4), 840–845.
- Hosni, K., Msaâda, K., Taârit, M. B., & Marzouk, B. (2017). Fatty acid composition and tocopherol content in four Tunisian *Hypericum* species: *Hypericum perforatum*, *Hypericum tomentosum*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum ericoides* Ssp. *Roberti*.

*Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2736–S2741.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.019>

Huber, L. S., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2008). Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 19(1), 97–108.

Hung, T. M., Na, M., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D., Song, K. S., ... Bae, K. (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 188–192.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.029>

Husain, I., Ahmad, R., Chandra, A., Raza, S. T., Shukla, Y., & Mahdi, F. (2018). Phytochemical characterization and biological activity evaluation of ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 110–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.001>

Hwang, S. J., Kim, Y.-W., Park, Y., Lee, H.-J., & Kim, K.-W. (2014). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, 63(1), 81–90.

Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., ... Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*, 88(5), 529–535.

Ilyas, M., Tarnam, A., & Begum, N. (2013). Biological potential and phytopharmacological screening of *Gomphrena* Species. *Global Journal of Pharmacology*, 7(4), 457–464.

Infante, R., Rubio, P., Contador, L., & Moreno, V. (2010). Effect of drying process on lemon verbena (*Lippia citrodora* Kunth) aroma and infusion sensory quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(1), 75–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02105.x>

- INSA, I. N. Dr. R. J. (2006). *Inquérito Nacional de Saúde* (Vol. 1). Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhella, R. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.040>
- Jäger, S., Beffert, M., Hoppe, K., Nadberezny, D., Frank, B., & Scheffler, A. (2011). Preparation of Herbal Tea as Infusion or by Maceration at Room Temperature Using Mistletoe Tea as an Example. *Scientia Pharmaceutica*, 79(1), 145–155. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1006-06>
- Jaiswal, R., Kiprotich, J., & Kuhnert, N. (2011). Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the *Asteraceae* family. *Phytochemistry*, 72(8), 781–790.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83(4), 547–550. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00151-1)
- Junior, A., Garcez, F. R., Garcez, W. S., & Garcez, W. S. (2013). Pregnanos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). 36(4), 519–523. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400006>
- Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., ... Raal, A. (2013). Commercial peppermint (*Mentha×piperita* L.) teas: Antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food Research International*, 53(2), 758–766. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.015>
- Kartika, H., Shido, J., Nakamoto, S. T., Li, Q. X., & Iwaoka, W. T. (2011). Nutrient and mineral composition of dried mamaki leaves (*Pipturus albidus*) and infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.027>

- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life sciences*, *81*(7), 519–533. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.06.011>
- Khoza, B. S., Gbashi, S., Steenkamp, P. A., Njobeh, P. B., & Madala, N. E. (2016). Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *South African Journal of Botany*, *103*, 95–100.
- Kim, Y.-J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *62*(15), 1707–1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>
- Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *53*(2), 135–148.
- Koch, I. S., Muller, M., Joubert, E., van der Rijst, M., & Næs, T. (2012). Sensory characterization of rooibos tea and the development of a rooibos sensory wheel and lexicon. *Food Research International*, *46*(1), 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.028>
- Konieczynski, P., Wesolowski, M., Radecka, I., & Rafalski, P. (2011). Bioavailable inorganic forms of essential elements in medicinal plants from Northern Poland. *Chemical Speciation & Bioavailability*, *23*(2), 61–70. <https://doi.org/10.3184/095422911X13026925862779>
- Krais, A. M., Speksnijder, E. N., Melis, J. P. M., Indra, R., Moserova, M., Godschalk, R. W., ... Arlt, V. M. (2016). The impact of p53 on DNA damage and metabolic activation of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene: effects in Trp53(+/+), Trp53(+/-) and Trp53(-/-) mice. *Archives of Toxicology*, *90*(4), 839–851. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1531-8>
- Kuete, V., Ango, P. Y., Fotso, G. W., Kapche, G. D. W. F., Dzoyem, J. P., Wouking, A. G., ... Abegaz, B. M. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds

- from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-42>
- Kumar, D., Ghosh, R., & Pal, B. C. (2013).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory terpenoids from *Potentilla fulgens* and their quantitative estimation by validated HPLC method. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1135–1141. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.03.010>
- Kundu, J. K., & Surh, Y.-J. (2008). Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1), 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.002>
- Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128(4), 1044–1050. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.011>
- Lee, J., Chambers, D. H., & Chambers IV, E. (2007). Green tea flavor description: a focus on differences in green and brown flavor notes. *products and assessors*, 72.
- Lee, Jeehyun, & Chambers, D. H. (2007). A lexicon for flavor descriptive analysis of green tea. *Journal of Sensory Studies*, 22(3), 256–272.
- Leiner, G. (2014). Nutrição e Suplementação: Antioxidantes e radicais livres. Recuperado de Nutrição e Suplementação website: <http://suplementacaonutricao.blogspot.com/2014/05/antioxidantes-e-radicaais-livres.html>
- Lemberkovics, É., Czinner, E., Szentmihályi, K., Balázs, A., & Szőke, É. (2002). Comparative evaluation of *Helichrysi flos* herbal extracts as dietary sources of plant polyphenols, and macro- and microelements. *Food Chemistry*, 78(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00204-2)
- Les, F., Venditti, A., Cásedas, G., Frezza, C., Guiso, M., Sciubba, F., ... López, V. (2017). Everlasting flower (*Helichrysum stoechas* Moench) as a potential source of bioactive

- molecules with antiproliferative, antioxidant, antidiabetic and neuroprotective properties. *Industrial crops and products*, 108, 295–302.
- Lespade, L. (2013). Theoretical design of new very potent free radical scavengers. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1009, 108–114.
- Lewis, K., & Ausubel, F. M. (2006). Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24(12), 1504.
- Liberal, Â., Calhella, R. C., Pereira, C., Adegá, F., Barros, L., Dueñas, M., ... Ferreira, I. C. (2016). A comparison of the bioactivity and phytochemical profile of three different cultivars of globe amaranth: red, white, and pink. *Food & function*, 7(2), 679–688.
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1–2), 92–94.
- Liu, T.-T., He, X.-R., Xu, R.-X., Wu, X.-B., Qi, Y.-X., Huang, J.-Z., ... Chen, Q.-X. (2018). Inhibitory mechanism and molecular analysis of furoic acid and oxalic acid on lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1925–1934. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.150>
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhella, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503.
- Lopes, J. F. D. (2014). *Cultivo e processamento de plantas aromáticas* (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramírez-Rodríguez, V., & Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00347-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00347-2)

- Lourenzani, A., Lourenzani, W. L., & Batalha, M. O. (2004). Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. *Informações Econômicas*, 34(3), 15–25.
- Lucena, B. F., Tintino, S. R., Figueredo, F. G., Oliveira, C. D., Aguiar, J. J., Cardoso, E., ... Matias, E. F. (2015). Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1).
- Luceri, C., Guglielmi, F., Lodovici, M., Giannini, L., Messerini, L., & Dolara, P. (2004). Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 39(11), 1128–1133.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga, jr V., Grynberg, N. F., & Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, 25(3), 429–438.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1–19.
- Mandim, F., Barros, L., Heleno, S. A., Pires, T. C., Dias, M. I., Alves, M. J., ... Ferreira, I. C. (2019). Phenolic profile and effects of acetone fractions obtained from the inflorescences of *Calluna vulgaris* (L.) Hull on vaginal pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Food & function*.
- Manthey, J. A., & Guthrie, N. (2002). Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5837–5843.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts

- prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378–385.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.096>
- Matić, I. Z., Juranić, Z., Šavikin, K., Zdunić, G., Nađvinski, N., & Gođevac, D. (2013). Chamomile and marigold tea: Chemical characterization and evaluation of anticancer activity. *Phytotherapy research*, 27(6), 852–858.
- Méndez-Tovar, I., Sponza, S., Asensio-S-Manzanera, M. C., & Novak, J. (2015). Contribution of the main polyphenols of *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* to its antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 66, 291–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.029>
- Miguel, M., Barros, L., Pereira, C., Calhelha, R. C., Garcia, P. A., Castro, M. Á., ... Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food & Function*, 7(5), 2223–2232. <https://doi.org/10.1039/C6FO00398B>
- Milani, R. F., Morgano, M. A., Saron, E. S., Silva, F. F., Cadore, S., Milani, R. F., ... Cadore, S. (2015). Evaluation of Direct Analysis for Trace Elements in Tea and Herbal Beverages by ICP-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(6), 1211–1217.  
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150085>
- Miyazawa, M., Oshima, T., Koshio, K., Itsuzaki, Y., & Anzai, J. (2003). Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 6953–6956. <https://doi.org/10.1021/jf030388s>
- Morais, A. L. F. (2012). *Propriedades antioxidantes de bebidas e chás preparados a partir de diferentes formulações* (Mestrado em Controlo e Qualidade). Universidade do Porto, Porto.
- Morales, P., Ferreira, I. C., Carvalho, A. M., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., ... Tardío, J. (2014). Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary

- sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 389–396.
- Müller, J. de B. (2006). Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martius (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
- Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J. (2012). Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in immunology*, 2, 98.
- Nerya, O., Musa, R., Khatib, S., Tamir, S., & Vaya, J. (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65(10), 1389–1395. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.016>
- Nibir, Y. M., Sumit, A. F., Akhand, A. A., Ahsan, N., & Hossain, M. S. (2017). Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(4), 352–357.
- Nookabkaew, S., Rangkadilok, N., & Satayavivad, J. (2006). Determination of Trace Elements in Herbal Tea Products and Their Infusions Consumed in Thailand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6939–6944. <https://doi.org/10.1021/jf060571w>
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J., & Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2), 165–170.
- Oueslati, S., Ksouri, R., Falleh, H., Pichette, A., Abdelly, C., & Legault, J. (2012). Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chemistry*, 132(2), 943–947. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.072>

- Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynislieberty, J., ... Kujawski, R. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, *91*, 261–271.
- Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S.-P., Nocera, P., ... Monaco, P. (2018). Winter wild fennel leaves as a source of anti-inflammatory and antioxidant polyphenols. *Arabian journal of chemistry*, *11*(4), 513–524.
- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 985–1012.
- Paula, J. C. de, Desoti, V. C., Sampiron, E. G., Martins, S. C., Ueda-Nakamura, T., Ribeiro, S. M., ... Nakamura, C. V. (2015). Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *25*(6), 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.011>
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2013). Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty-five species of food and medicinal plants. *Food Analytical Methods*, *6*(5), 1337–1344.
- Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). A Comparison of the Nutritional Contribution of Thirty-nine Aromatic Plants used as Condiments and/or Herbal Infusions. *Plant Foods for Human Nutrition*, *70*(2), 176–183. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0476-7>
- Pereira, C., Calhella, R. C., Barros, L., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Synergisms in antioxidant and anti-hepatocellular carcinoma activities of artichoke, milk thistle and borututu syrups. *Industrial Crops and Products*, *52*, 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.050>

- Pereira, D. C. da S. (2015). *Estudo comparativo de metodologias de perfil emocional: Aplicação à avaliação de infusões Premium* (Mestrado em Ciência do Consumo e Nutrição). Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Pereira, E., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Barros, L., Bento, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Gamma irradiation as a practical alternative to preserve the chemical and bioactive wholesomeness of widely used aromatic plants. *Food Research International*, 67, 338–348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.047>
- Pereira, E., Pimenta, A. I., Calhella, R. C., Antonio, A. L., Barros, L., Santos-Buelga, C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2017). Infusions of gamma irradiated *Aloysia citrodora* L. and *Mentha x piperita* L.: Effects on phenolic composition, cytotoxicity, antibacterial and virucidal activities. *Industrial Crops and Products*, 97, 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.007>
- Perwez Hussain, S., & Harris, C. C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International journal of cancer*, 121(11), 2373–2380.
- Petiwala, S. M., & Johnson, J. J. (2015). Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Letters*, 367(2), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.005>
- Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, T., & Martinez, S. (2010). Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, 121(3), 820–825. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.090>
- Pires, T. C., Dias, M. I., Barros, L., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (*Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe). *Food Chemistry*, 240, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.010>

- Pires, T. C., Dias, M. I., Barros, L., Calhella, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., ...  
Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with  
bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580–588.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.014>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress:  
A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55–74.
- Pohl, P., Dzimitrowicz, A., Jedryczko, D., Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., & Jamroz, P.  
(2016). The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations  
and their tisanes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 326–335.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.042>
- Pragasam, S. J., Venkatesan, V., & Rasool, M. (2013). Immunomodulatory and Anti-  
inflammatory Effect of *p*-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on  
Experimental Inflammation in Rats. *Inflammation*, 36(1), 169–176.  
<https://doi.org/10.1007/s10753-012-9532-8>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of  
antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of  
agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Purcaro, G., Tranchida, P. Q., Jacques, R. A., Caramão, E. B., Moret, S., Conte, L., ...  
Mondello, L. (2009). Characterization of the yerba mate (*Ilex paraguariensis*) volatile  
fraction using solid-phase microextraction-comprehensive 2-D GC-MS. *Journal of  
Separation Science*, 32(21), 3755–3763. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900343>
- Ramadan, M. F., Asker, M. M. S., & Tadros, M. (2013). Lipid profile, antiradical power and  
antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. *Grasas y Aceites*, 64(5), 509–520.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2009). Antimicrobial  
activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and

- Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*, 20(2), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.009>
- Ribeiro, A., Caleja, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. (2017). Chemical characterization of the *Rosmarinus officinalis* L. aqueous and hydroethanolic extracts in terms of phenolic compounds. *Revista de Ciências Agrárias (Portugal)*, 40(Especial), 147–150.
- Rita, I., Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Exploring reserve lots of *Cymbopogon citratus*, *Aloysia citrodora* and *Thymus × citriodorus* as improved sources of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 257, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.006>
- Rodrigues, M. J., Neves, V., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., ... Custódio, L. (2016). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 200, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.048>
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Fernández, I., Albán, J., & Lock, O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 88(2–3), 199–204.
- Ronchetti, D., Impagnatiello, F., Guzzetta, M., Gasparini, L., Borgatti, M., Gambari, R., & Ongini, E. (2006). Modulation of iNOS expression by a nitric oxide-releasing derivative of the natural antioxidant ferulic acid in activated RAW 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 532(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.034>
- Roriz, C. L. (2014). *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, *Gomphrena globosa* L. e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: fitoquímica e bioatividade das espécies individuais e

- sinergismos resultantes do uso combinado (Mestrado). Instituto Politécnico de Bragança e Universidade de Salamanca, Portugal.
- Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, *185*, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.136>
- Ryu, B., Kim, H. M., Woo, J.-H., Choi, J.-H., & Jang, D. S. (2016). A new acetophenone glycoside from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (cloves). *Fitoterapia*, *115*, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.021>
- Samakradhamrongthai, R., Utama-Ang, N., & Thakeow, P. (2009). Identification of volatile compounds released from dry scented Thai flowers and their potential application in flower-mixed tea. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, *2*(4), 525–534.
- Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(20), 6888–6894.
- Santos Magalhães, I. R., de Oliveira Soares, A., Araújo, L. M., da Costa, P. R. C., de Araújo Roland, I., & Borrás, M. R. L. (2009). Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the leaves and tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) Verl. *Biological trace element research*, *132*(1–3), 239.
- Seo, S.-Y., Sharma, V. K., & Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(10), 2837–2853.
- Sergent, T., Piront, N., Meurice, J., Toussaint, O., & Schneider, Y.-J. (2010). Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed

- human intestinal epithelium. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 659–667.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.08.007>
- Sevim, D., Senol, F. S., Gulpinar, A. R., Orhan, I. E., Kaya, E., Kartal, M., & Sener, B. (2013). Discovery of potent in vitro neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L. (peony) taxa and their fatty acid composition. *Industrial Crops and Products*, 49, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.001>
- Shahidi, F. (2000). Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. *BioFactors*, 13(1–4), 179–185. <https://doi.org/10.1002/biof.5520130129>
- Sharma, A., Chen, C. R., & Lan, N. V. (2009). Solar-energy drying systems: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 13(6–7), 1185–1210.
- Shimamura, T., Zhao, W.-H., & Hu, Z.-Q. (2007). Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an antiinfective agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)*, 6(1), 57–62.
- Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., ... Andrade, P. B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135(2), 756–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.015>
- Singh, R. P., Sharad, S., & Kapur, S. (2004). Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *J Indian Acad Clin Med*, 5(3), 218–225.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1), 71–81.  
<https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>
- Souilem, F., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Barreira, J. C. M., Barros, L., Skhiri, F., ... Ferreira, I. C. F. R. (2017). Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive

- compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chemistry*, 230, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.026>
- Sourestani, M. M., Malekzadeh, M., & Tava, A. (2011). The effect of drying temperature, storage and distillation times on the essential oil content and composition of anis hyssop (*Agastache foeniculum*). *Planta Medica*, 77(12), PE10.
- Sousa, C. de M., Silva, H. R., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. da, Araújo, D. S., ... Brandão, M. S. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 30(2), 351–355.
- Spínola, V., & Castilho, P. C. (2017). Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (*in vitro*). *Phytochemistry*, 143, 29–35.
- Sung, J., & Lee, J. (2015). Anti-Inflammatory Activity of Butein and Luteolin Through Suppression of NFκB Activation and Induction of Heme Oxygenase-1. *Journal of Medicinal Food*, 18(5), 557–564. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3262>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199–1218.
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.086>
- Tanaka, J. C. A., Silva, C. C. da, Filho, D., Prado, B., Nakamura, C. V., Carvalho, J. E. de, & Foglio, M. A. (2005). Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*, 28(5), 834–837. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500020>

- Tanko, Y., Yerima, M., Mahdi, M. A., Yaro, A. H., Musa, K. Y., & Mohammed, A. (2008). Hypoglycemic activity of methanolic stem bark of *adansonia digitata* extract on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1(2), 32–36.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 5987–6000.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., & Altomare, E. (1999). An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 29(2), 49. <https://doi.org/10.1007/s005990050063>
- Vieira, R. F., & Simon, J. E. (2006). Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) based on volatile oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(2), 214–221. <https://doi.org/10.1002/ffj.1513>
- Wang, J., Xiong, S., Xie, C., Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (2005). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 93(4), 953–962.
- Wang, Q., Han, P.-H., Zhang, M.-W., Xia, M., Zhu, H.-L., Ma, J., ... Ling, W.-H. (2007). Supplementation of black rice pigment fraction improves antioxidant and anti-inflammatory status in patients with coronary heart disease. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16(S1), 295–301.
- Wills, R. B. H., Bone, K., & Morgan, M. (2000). Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutrition Research Reviews*, 13(1), 47–77. <https://doi.org/10.1079/095442200108729007>

- Xia, T., Shi, S., & Wan, X. (2006). Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 557–560.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.043>
- Xu, H., Zhao, C. F., Tian, G. G., Qian, L. R., & Yu, L. J. (2016). Characterization of active constituents in *Pyracantha fortuneana* fruit extract and their effects on hyperlipidaemia, obesity, and oxidative stress in rodents. *Journal of Functional Foods*, 22, 278–290.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.028>
- 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(3), 499–506.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.2332>
- Zengin, G., Menghini, L., Malatesta, L., De Luca, E., Bellagamba, G., Uysal, S., ... Locatelli, M. (2016). Comparative study of biological activities and multicomponent pattern of two wild Turkish species: *Asphodeline anatolica* and *Potentilla speciosa*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(sup1), 203–208.
- Zhou, M., Xing, H.-H., Ma, H.-Y., Zhou, L., Yang, Y., Li, G.-P., ... Hu, Q.-F. (2017). Three new isobenzofurans from *Lavandula angustifolia* and their bioactivities. *Phytochemistry letters*, 19, 156–159.
- Zhu, H., Liang, Q.-H., Xiong, X.-G., Chen, J., Wu, D., Wang, Y., ... Huang, X. (2014). Anti-inflammatory effects of the bioactive compound ferulic acid contained in *Oldenlandia diffusa* on collagen-induced arthritis in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Ziani, B. E., Heleno, S. A., Bachari, K., Dias, M. I., Alves, M. J., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> and bioactive

properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*, 116, 312–319.