



Interreg
España - Portugal

Programa Operativo de Desenvolupamento Regional



RELATÓRIO ENTREGÁVEL

Estudos da atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais e extratos vegetais para avaliação enquanto potencial ingrediente conservante de produtos cosméticos

ACRONIMO DO PROJETO

COOP4PAM

TÍTULO DO PROJETO

Cooperar para crescer no setor das plantas aromáticas e medicinais

CÓDIGO DO PROJETO

0665_COO4PAM_4_P

Nome e número do entregável: Ação A2. Agronomia e processos / Estudos da atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais e extratos vegetais para avaliação enquanto potencial ingrediente conservante de produtos cosméticos

Atividade: ATIVIDADE 1 - Identificação de Potencialidades PAM na Euroace

Nome do parceiro: Labfit – Health Products Research and Development

HISTÓRICO DO DOCUMENTO

versão	Data	Conteúdo e Edições	Editado
	30-12-2022	Primeira Versão do documento	



Interreg
Espanha - Portugal

Programa Operacional de Espanha e Portugal
Iniciativa de Cooperação Interregional



REGIÃO ALGARVE
REGIÃO DE LISBOA



ÍNDICE

I) Ensaios realizados nos extratos de <i>Lavandula luisieri</i> e <i>Lavandula pedunculata</i>	8
Atividade antioxidante	8
Reagentes.....	9
Substâncias de referência	9
Equipamento.....	10
Resultados	10
Discussão dos resultados e conclusão	13
Concentração mínima inibitória	14
Meios de cultura.....	15
Soluções e reagentes	15
Equipamento.....	16
Resultados	17
Discussão dos resultados e conclusão	19
II) Ensaios realizados nos extratos de <i>Thymus masticina</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Aloysia citrodora</i>	20
Identificação dos compostos químicos nos óleos essenciais e nos hidrolatos por GC-MS. 20	
Atividade antimicrobiana.....	21
Atividade anti-oxidante	21
Atividade anti-inflamatória	22
Determinação do potencial efeito mutagénico/genotóxico	23
Determinação do potencial irritante ocular.....	23
Determinação do potencial irritante dérmico.....	23
Determinação da toxicidade em culturas de células.....	24
Ensaios de toxicidade aguda com invertebrados aquáticos (<i>Daphnia magna</i>).....	24

IMAGENS

Figura 1.Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo extracto aquoso da <i>L. luisieri</i> . (n=4).....	10
Figura 2.Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo extracto aquoso da <i>L. pedunculata</i> . (n=3).	11

Figura 3.Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo hidrolato da <i>L. luisieri</i> . (n=3).....	11
Figura 4.Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo hidrolato da <i>L. pedunculata</i> . (n=4).	12
Figura 5.Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo óleo essencial da <i>L. luisieri</i> . (n=1).....	12
Figura 6.Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo óleo essencial da <i>L. pedunculata</i> . (n=1).	13

TABELAS

Tabela 1.Concentração das amostras utilizadas no teste de DPPH.	9
Tabela 2. Classificação da atividade antioxidante segundo o índice de atividade antioxidante (AAI).	13
Tabela 3. Cálculo os EC ₅₀ das amostras testadas segundo os ensaios de DPPH	13
Tabela 4. Resultados obtidos para o valor da concentração mínima inibitória (MIC, % v/v) e o valor da concentração mínima letal (MLC, % v/v) para os hidrolatos da <i>L. pedunculata</i> e da <i>L. luisieri</i> .	17
Tabela 5.Resultados obtidos para o valor da concentração mínima inibitória (MIC, mg/mL) e o valor da concentração mínima letal (MLC, mg/mL) para os extratos aquosos da <i>L. pedunculata</i> e da <i>L. luisieri</i> .	18
Tabela 6. Resultados obtidos para o valor da concentração mínima inibitória (MIC, µL/mL) e o valor da concentração mínima letal (MLC, µL/mL) para os óleos essenciais da <i>L. pedunculata</i> e da <i>L. luisieri</i> .	18
Tabela 7.Controlos de crescimento e esterilidade incluídos no estudo. O controlo de crescimento foi realizado para cada microorganismo nas condições experimentais do ensaio e o teste de esterilidade foi realizado para cada substância de teste e o meio de cultura incluído nos testes. Os resultados são relatados como: - nenhum crescimento observável; + crescimento observável.	19
Tabela 8. Lista de extratos analisados por GC-MS e compostos maioritários identificados	20
Tabela 9. Resultados dos MICs visuais determinados para os óleos essenciais para as bactérias que fazem parte do Challenge test.	21
Tabela 10. Resultados dos MICs visuais para a <i>C. acnes</i> às 72h e o MLC às 72h.	21
Tabela 11. Resultados dos MICs visuais para o <i>A. brasiliensis</i> às 48h e o MLC às 24h.	21
Tabela 12. Resultados dos MICs visuais para a <i>C. albicans</i> às 48h e o MLC às 24h.	21
Tabela 13. Índice de atividade anti-oxidante determinado pelo método de redução do DPPH dos óleos essenciais.	21
Tabela 14 Comparação entre o potencial anti-inflamatório dos extratos em estudo. IC50 - concentração estimada capaz de inibir 50% da viabilidade celular. E50 - concentração estimada capaz de inibir 50% da produção de óxido nítrico.	22
Tabela 15 Potencial mutagénico dos extratos em estudo através capacidade de mutação reversa (Teste de Ames). M.R.: mutation ratio.	23

Tabela 16. Resultados obtidos para cada planta na determinação do potencial irritante ocular 23

Tabela 17. Resultados obtidos para cada planta na determinação do potencial irritante dérmico. 24

Tabela 18 Resultados de citotoxicidade dos extratos (IC50 para fibroblastos de ratinho) 24

Tabela 19. Plantas, tipo de extratos e concentrações testadas nos ensaios de toxicidade aguda com o organismo D. magna. 25

Tabela 20. Toxicidade aguda (48h) dos diferentes tipos de extratos para o organismo modelo D. magna, com indicação do EC50 e respetiva classificação com base no sistema GHS (Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals) proposto pelas Nações Unidas. 25

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

<i>DPPH</i>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, CAS# 1898-66-4 (TCI)
<i>AAI</i>	índice de atividade antioxidante
<i>MIC</i>	concentração mínima inibitória
<i>MLC</i>	concentração mínima letal

Sumário executivo

No âmbito desta atividade foram realizados ensaios para determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana para extractos aquosos, hidrolatos e óleos essenciais das plantas *Lavandula luisieri* e *Lavandula pedunculata*.

Foram ainda realizados ensaios de Identificação dos compostos químicos nos óleos essenciais e nos hidrolatos por GC-MS, bioatividade (atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante), determinação do potencial efeito mutagénico/genotóxico, determinação do potencial irritante ocular e dérmico, determinação da toxicidade em culturas de células e ensaios de toxicidade aguda com invertebrados aquáticos (*Daphnia magna*), em extratos de *Thymus masticina*, *Eucalyptus globulus*, *Aloysia citrodora*.

A seleção dos extratos e ensaios a realizar foi realizada com base na avaliação do seu potencial PAM e da quantidade de extrato disponível para a realização dos ensaios.

1) Ensaios realizados nos extratos de *Lavandula luisieri* e *Lavandula pedunculata*

Atividade antioxidante

Este método visa determinar a atividade antioxidante de um produto através da utilização de um radical livre estável, α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH), através da medição da capacidade de absorção de DPPH dos produtos.

Quando a molécula de DPPH é misturada com uma molécula que pode doar um átomo de hidrogénio, aparece a forma reduzida da molécula, caracterizada pela perda gradual da cor violeta e o aparecimento da cor amarela.

Neste estudo foi realizado o ensaio de determinação da atividade antioxidante nas seguintes amostras: *Lavandula luisieri* (extracto aquoso), *Lavandula luisieri* (hidrolato), *Lavandula luisieri* (óleo essencial), *Lavandula pedunculata* (extracto aquoso), *Lavandula pedunculata* (hidrolato) e *Lavandula pedunculata* (óleo essencial). Cada uma das amostras foi primeiro testada para determinar a última concentração na qual o DPPH é reduzido. A Tabela 1 determina as concentrações obtidas para cada uma das amostras no pré-teste, definindo qual a concentração a ser usada no teste

Tabela 1. Concentração das amostras utilizadas no teste de DPPH.

	Amostras	Concentração a ser utilizada no teste
<i>L. luisieri</i>	extrato aquoso (25 mg/mL)	0.2 %
	hidrolato	100 %
	óleo essencial	100 %
<i>L. pedunculata</i>	extrato aquoso (25 mg/mL)	0.2 %
	hidrolato	100 %
	óleo essencial	100 %

Após a obtenção das concentrações de cada amostra, foram preparadas soluções de trabalho de DPPH e de ácido ascórbico à concentração de 0.05 mg/mL a partir de soluções de stock a 1 mg/mL. O ácido ascórbico é considerado como uma substância de referência e é, portanto, usado como controlo do ensaio.

Foram preparadas 8 placas de 96 poços: uma para a curva de calibração de DPPH, uma para a percentagem de redução de DPPH pelo ácido ascórbico e as restantes para a percentagem de redução de DPPH pelas substâncias em estudo. Em seguida, as placas foram incubadas durante 30 minutos de forma a permitir a redução de DPPH no escuro à temperatura ambiente. As absorvâncias foram medidas a 490 nm utilizando um espectrofotómetro de microplacas. Um total de três ensaios independentes foram realizados em três dias diferentes.

A amostra do estudo só poderá ser considerada como tendo capacidade antioxidante se for capaz de reduzir 50 % das moléculas de DPPH (EC₅₀). O EC₅₀ é calculado graficamente usando uma curva de calibração na gama linear, traçando o efeito de absorção (% de redução de DPPH) versus a concentração da amostra.

Reagentes

DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, CAS# 1898-66-4 (TCI)
Metanol	HPLC grade, CAS# 67-56-1 (Fischer)

Substâncias de referência

Ácido ascórbico	L(+)- Ascorbic Acid, CAS# 50-81-7 (VWR)
-----------------	---

Equipamento

Balança analítica	Kern, 770-15
Micropipetas	P1000, VWR, Modelo VE1000 P200, Modelo VE200 P20, Modelo VE20 Multichannel P300, VWR, Modelo ME300
Pipetas	P5000, VWR, Model VE5000
Câmara de fluxo laminar	Tipo 2, Telstar
Leitor de microplacas	Promega, Modelo GloMax® Explorer System
Equipamento	Material de laboratório

Resultados

Todas as curvas de redução do DPPH tiveram um coeficiente de correlação acima de 0.95. As Figura 1 à Figura 6 representam as curvas obtidas para os ensaios independentes por amostra.

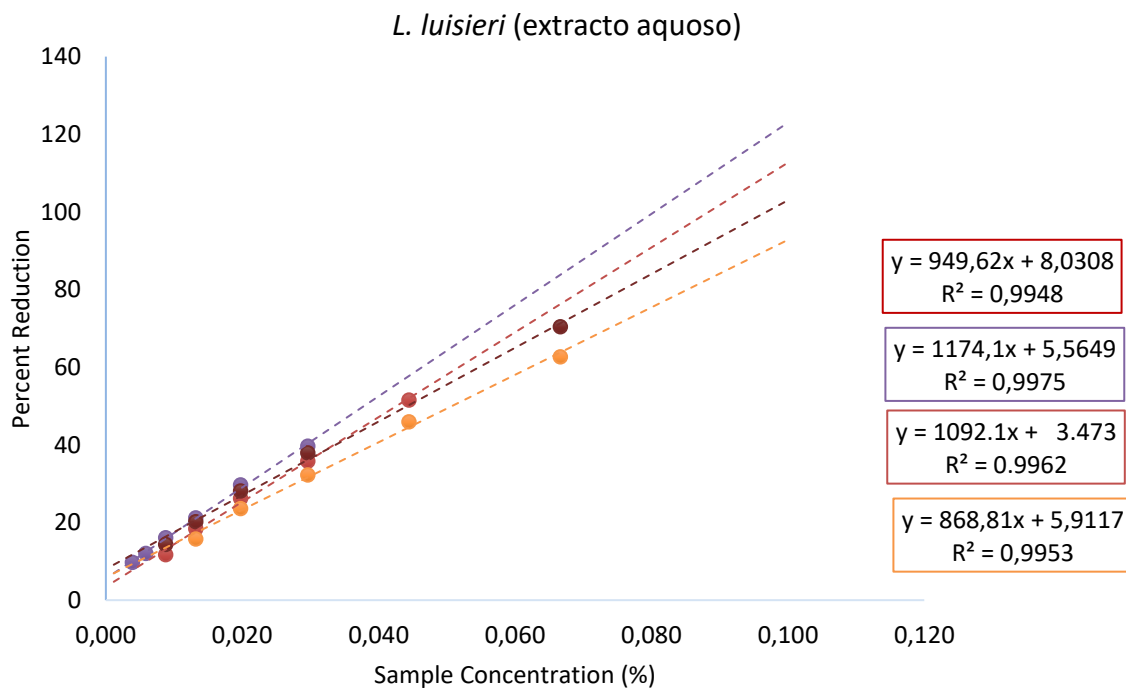


Figura 1. Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo extracto aquoso da *L. luisieri*. (n=4).

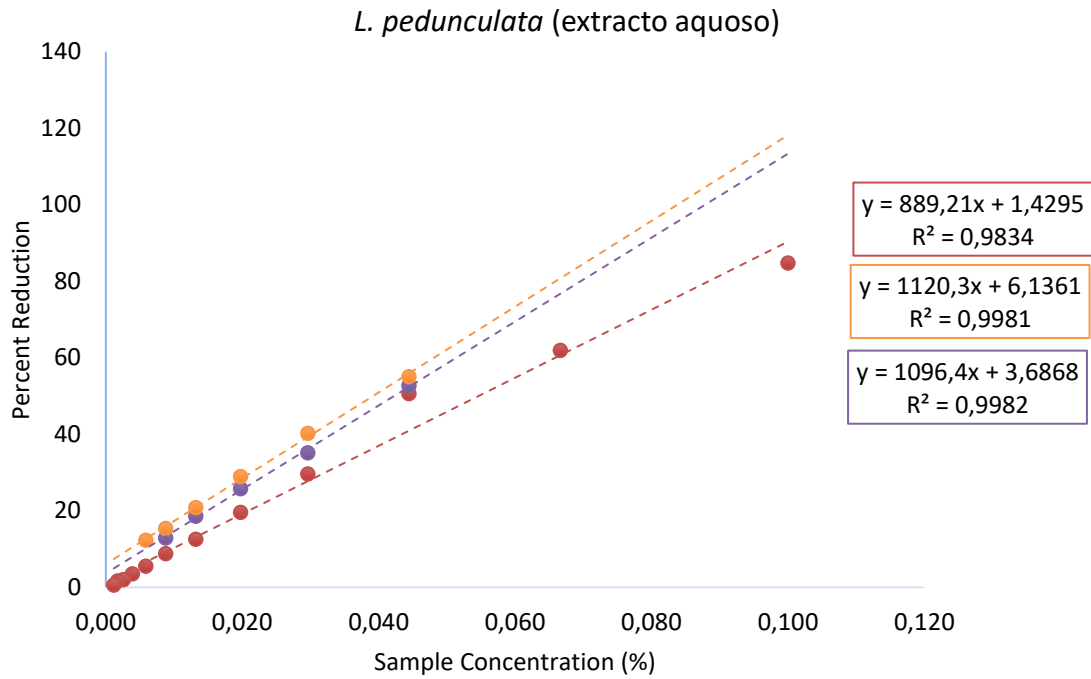


Figura 2. Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo extracto aquoso da *L. pedunculata*. (n=3).

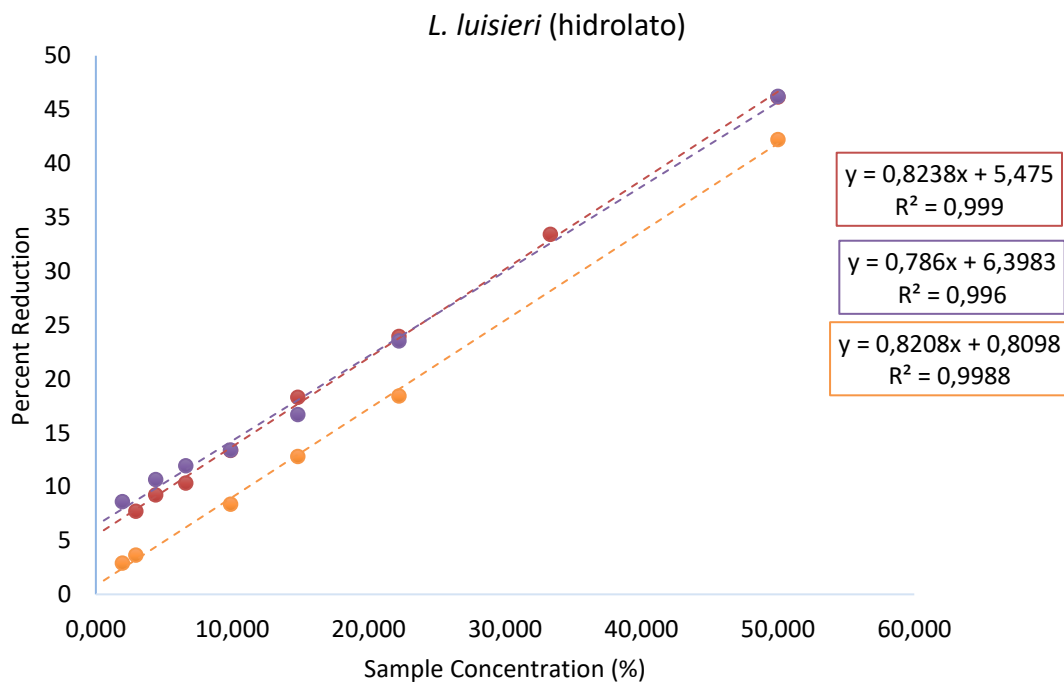


Figura 3. Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo hidrolato da *L. luisieri*. (n=3).

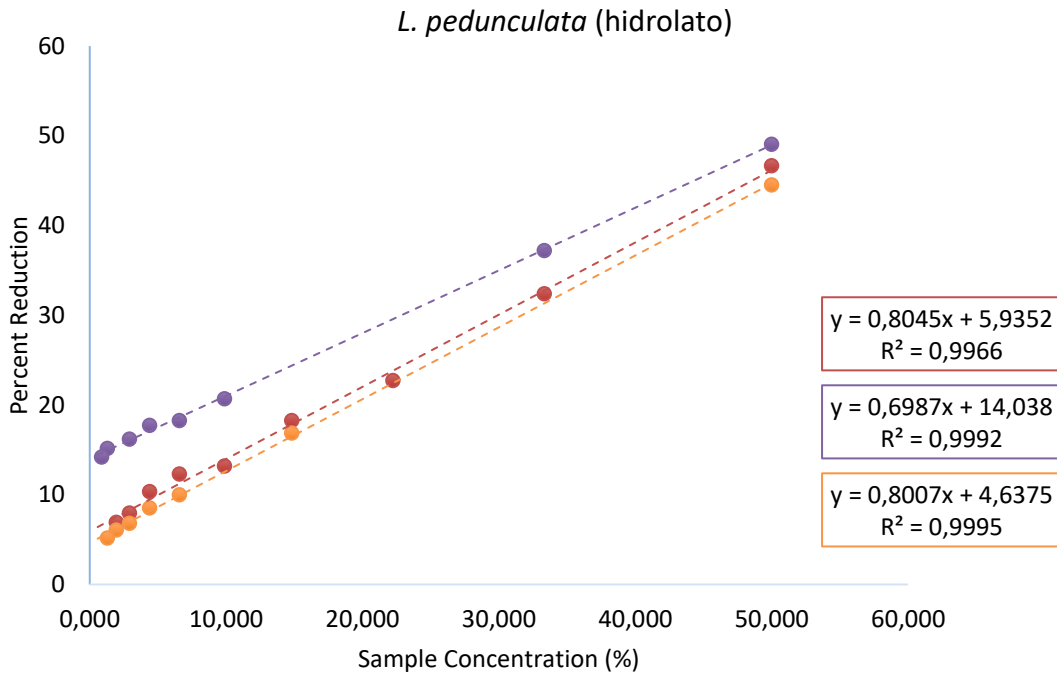


Figura 4. Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo hidrolato da *L. pedunculata*. (n=4).

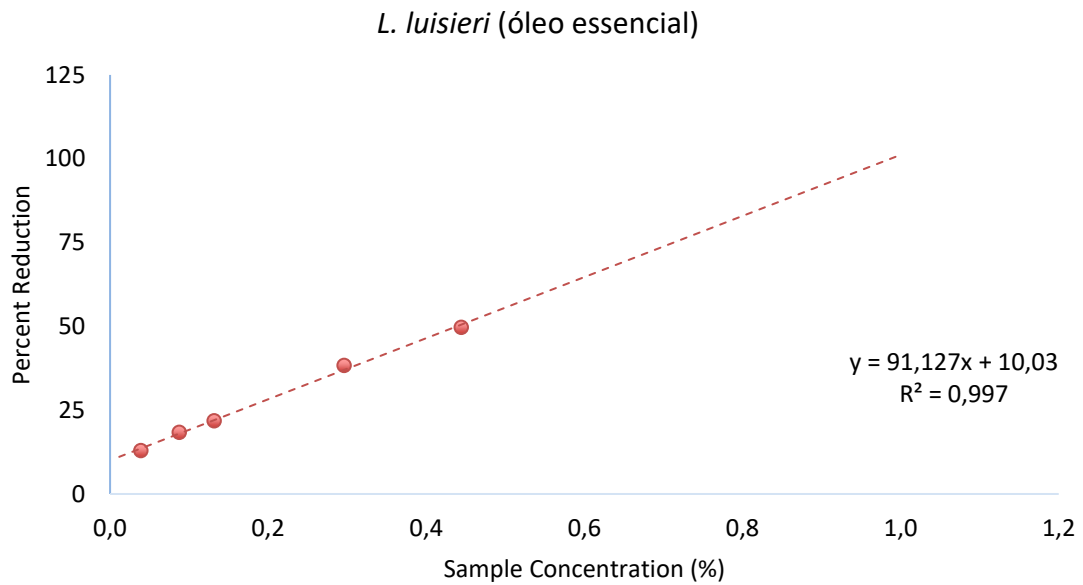


Figura 5. Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo óleo essencial da *L. luisieri*. (n=1).

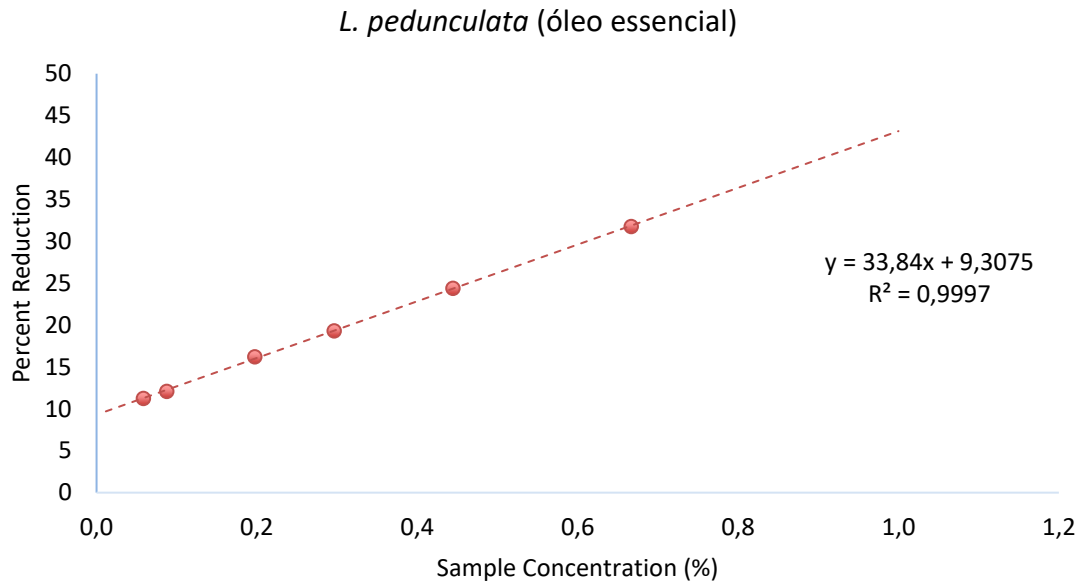


Figura 6. Representação gráfica da percentagem de redução de DPPH pelo óleo essencial da *L. pedunculata*. (n=1).

Discussão dos resultados e conclusão

Os índices de atividade antioxidante (AAI) foram calculados através da seguinte fórmula:

$$AAI = \frac{\text{concentração final de DPPH } (\mu\text{g/mL})}{EC_{50} (\mu\text{g/mL})}$$

Este índice é posteriormente classificado de acordo com os níveis de atividade antioxidante, como descrito na seguinte tabela:

Tabela 2. Classificação da atividade antioxidante segundo o índice de atividade antioxidante (AAI).

Níveis Atividade Antioxidante			
AAI < 0,5	0,5 < AAI < 1	1 < AAI < 2	AAI > 2
Baixa	Moderada	Forte	Muito forte

Para cada uma das amostras foram obtidos os EC₅₀ e determinado a sua classificação AAI (Tabela 3). Todos os ensaios tiveram pelo menos um n=3, excepto os ensaios dos óleos essenciais de ambas as plantas em que foi apenas realizado um ensaio independente. Isto deveu-se ao facto de que, segundo os ensaios pré-teste, estas amostras teriam que ser realizadas puras (concentração 100 %), não havendo quantidade suficiente de óleo essencial para a realização desses ensaios.

Tabela 3. Cálculo os EC₅₀ das amostras testadas segundo os ensaios de DPPH

Substância em estudo	<i>L. luisieri</i>			<i>L. pedunculata</i>		
	extracto aquoso	hidrolato	óleo essencial	extracto aquoso	hidrolato	óleo essencial
EC ₅₀ (%)	0.044	56.484	0.439	0.045	54.300	1.202
Classificação AAI	Moderado	Baixo	Baixo	Moderado	Baixo	Baixo

Segundo a Tabela 3, os extratos aquosos das plantas *L. luisieri* e *L. pedunculata* apresentam uma atividade antioxidante moderada (EC_{50} 0.044 % e 0.045 %, respectivamente). Os restantes extratos apresentam uma atividade antioxidante baixa, tanto para os hidrolatos (EC_{50} 56.484 % para a *L. luisieri* e 54.300 % para a *L. pedunculata*) como para os óleos essenciais (EC_{50} 0.439 % para a *L. luisieri* e 1.202 % para a *L. pedunculata*).

Concentração mínima inibitória

O ensaio visa determinar a atividade antimicrobiana das substâncias em estudo (*Lavandula luisieri* (extracto aquoso), *Lavandula luisieri* (hidrolato), *Lavandula luisieri* (óleo essencial), *Lavandula pedunculata* (extracto aquoso), *Lavandula pedunculata* (hidrolato) e *Lavandula pedunculata* (óleo essencial)) em cinco microrganismos (*S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *C.albicans*, *A.brasiliensis*). A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada de acordo com o método descrito na norma ISO20776-1 para bactérias aeróbicas e seguindo as directrizes EUCAST (EUCAST E.DEF 7.3.2 para as leveduras e EUCAST E.DEF 9.3.2 para os fungos). O método utilizado foi baseado na modificação do método de micro-diluição descrito nestas normas. O teste foi considerado válido quando o crescimento do microorganismo teste foi visível (observação da turbidez no controlo de crescimento positivo), quando não houve crescimento no controlo negativo e quando a pureza e concentração do número de células do inóculo foram confirmadas de acordo com o estabelecido na norma. Foram também incluídos controlos de esterilidade dos meios de cultura e do produto testado.

A amostra de ensaio foi pipetada em duplicado para a placa de 96 poços, e foram feitas 9 diluições. Subsequentemente, a suspensão do microrganismo foi adicionada ao mesmo volume da amostra, e foi realizada uma homogeneização eficaz. Após incubação (18 - 24h, $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ para bactérias; 24h, $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ para *C. albicans* ATCC10231; e 48h - 72h, $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ para *A. brasiliensis* ATCC16404), os poços da placa foram observados macroscopicamente. A fim de validar o teste, foram realizados três controlos negativos (controlo de esterilidade dos meios de cultura; amostra com meios de cultura, e emulsionante com meios de cultura) e dois controlos positivos (controlo de crescimento para cada microrganismo em estudo utilizando meios de cultura e controlo de crescimento para cada microrganismo em estudo utilizando emulsionante com meios de cultura). Os resultados finais correspondem a dois ensaios independentes.

Meios de cultura

Meio de cultura	Crescimento e manutenção de microrganismos	Marca	Instruções de preparação e definição da composição
Tryptic soy agar (TSA)	<i>S.aureus</i> ATCC6538 <i>P.aeruginosa</i> ATCC9027 <i>E.coli</i> ATCC8739	VWR	De acordo com o fornecedor
Mueller-Hinton (MH)	<i>S.aureus</i> ATCC6538 <i>P.aeruginosa</i> ATCC9027 <i>E.coli</i> ATCC8739	VWR	De acordo com o fornecedor
RPMI 1640 suplementado com glucosa com concentração final de 2% (RPMI 2% G)	<i>C. albicans</i> ATCC10231 <i>A.brasiliensis</i> ATCC16404	Não aplicável	- 20g/L RPMI1640 (Biowest) - 69.06g/L MOPS (Fisher) - 20g/L D(+)-Glucose anhydrous (VWR)
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	<i>Candida albicans</i> ATCC10231	VWR Prolabo Chemicals	De acordo com o fornecedor
Potato dextrose agar (PDA)	<i>A.brasiliensis</i> ATCC16404	VWR	De acordo com o fornecedor

Soluções e reagentes

Diluyente Água peptonada tamponada (VWR) para a preparação da suspensão de microrganismos

Emulsionante Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Honeywell)

Microorganismos incluídos no estudo e condições e incubação

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	37° C ± 1°C, 18-24h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	37° C ± 1°C, 18-24h
<i>E.coli</i> ATCC10231	37° C ± 1°C, 18-24h
<i>C.albicans</i> ATCC10231	37° C ± 1°C, 18-24h
<i>A.brasiliensis</i> ATCC16404	37° C ± 1°C, 2 – 5 dias

Equipamento

Balança analítica	KERN, 770-15
Autoclave	A.J. Costa, LDA, Uniclave 88
Contador de colónias	Stuart, SC6 Plus
Datalogger	EBI logger
Densitómetro	Grant, DEN-1
Bico de Bunsen electrico	Electrothermal, BA6101
Frigorífico	Electronia, HS-121LN Zanussi, ZRA40401WA
Incubadora 37°C	VWR INCU-LINE, IL-53
Agitador magnético	Heidolph, MR Hei-Standard
Micropipetas	VWR, VE10; VE10000; ME300 VWR, Ergonomic High VWR, EHP Pipettor
Microondas	Becken, AC 930 MAS
Leitor pH	Testo, 206-pH1 Testo, 206-pH2
Balança de precisão	VWR, LPC-503i VWR, SE 1202
Sistema de purificação de água	Merck, Direct Q @3UV Aquawin
Ultra-freezer	Infrico Medcare, ULF50086
Vortex	Velp Scientifica, TX4 Digital IR Vortex Mixer
Banho de água	VWR, 462-0355
Equipamento	Equipamento usual de laboratório



Interreg
Espanña - Portugal

Programa Operativo Regional de Espanha e Portugal
2014-2020, co-financiado pelo Regional



EUROPEAN UNION
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND



Resultados

Os resultados apresentados correspondem a dois ensaios independentes realizados sob as mesmas condições de teste. O MIC foi determinado por inspeção visual do meio de cultura líquido e definido como a primeira diluição (concentração mais baixa) do composto de ensaio que exibia a ausência de turbidez no meio de cultura.

Tabela 4. Resultados obtidos para o valor da concentração mínima inibitória (MIC, % v/v) e o valor da concentração mínima letal (MLC, % v/v) para os hidrolatos da *L. pedunculata* e da *L. luisieri*.

Microorganismos	Resultados								Resultado MIC a reportar		
	<i>Lavandula pedunculata</i>				<i>Lavandula luisieri</i>				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. luisieri</i>	
	MIC		MLC		MIC		MLC				
Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2				
<i>S. aureus</i> ATCC6538	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)
<i>E. coli</i> ATCC8739	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	50.00	50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)	50.00%(v/v)
<i>A. brasiliensis</i> ATCC16404	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	> 50.00	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)	Nada a reportar (> 50.00 %v/v)

Tabela 5. Resultados obtidos para o valor da concentração mínima inibitória (MIC, mg/mL) e o valor da concentração mínima letal (MLC, mg/mL) para os extratos aquosos da *L. pedunculata* e da *L. luisieri*.

Microorganismos	Resultados								Resultado MIC a reportar	
	<i>Lavandula pedunculata</i>				<i>Lavandula luisieri</i>				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. luisieri</i>
	MIC		MLC		MIC		MLC			
Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2			
<i>S. aureus</i> ATCC6538	1.56	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56 mg/mL	3.13 mg/mL
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC8739	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)
<i>A. brasiliensis</i> ATCC16404	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	> 12.50	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)	Nada a reportar (> 12.50 mg/mL)

Tabela 6. Resultados obtidos para o valor da concentração mínima inibitória (MIC, µL/mL) e o valor da concentração mínima letal (MLC, µL/mL) para os óleos essenciais da *L. pedunculata* e da *L. luisieri*.

Microorganismos	Resultados								Resultado MIC a reportar	
	<i>Lavandula pedunculata</i>				<i>Lavandula luisieri</i>				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. luisieri</i>
	MIC		MLC		MIC		MLC			
Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2			
<i>S. aureus</i> ATCC6538	5.00	5.00	10.00	10.00	5.00	5.00	10.00	10.00	5.00	5.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	20.00	20.00	20.00	20.00	> 20.00	> 20.00	> 20.00	> 20.00	20.00	Nada a reportar (> 20.00 µL/mL)
<i>E. coli</i> ATCC8739	10.00	10.00	> 10.00	> 10.00	> 20.00	> 20.00	> 20.00	> 20.00	10.00	Nada a reportar (> 20.00 µL/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	5.00	5.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	5.00	10.00
<i>A. brasiliensis</i> ATCC16404	2.50	5.00	> 10.00	> 10.00	2.50	5.00	> 10.00	> 10.00	5.00	5.00

Tabela 7. Controlos de crescimento e esterilidade incluídos no estudo. O controlo de crescimento foi realizado para cada microorganismo nas condições experimentais do ensaio e o teste de esterilidade foi realizado para cada substância de teste e o meio de cultura incluído nos testes. Os resultados são relatados como: - nenhum crescimento observável; + crescimento observável.

Condições experimentais	Resultados	
	Controlo	Controlo com amostra
<i>S. aureus</i> ATCC6538	+	Não aplicável
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	+	Não aplicável
<i>E. coli</i> ATCC10231	+	Não aplicável
<i>C. albicans</i> ATCC10231	+	Não aplicável
<i>A. brasiliensis</i> ATCC16404	+	Não aplicável
Mueller-Hinton	-	-
RPMI com 2% Glucose	-	-
Mueller-Hinton com emulsionante	-	-
RPMI com 2% Glucose with emulsifier	-	-

Discussão dos resultados e conclusão

Todos os controlos de crescimento foram validados para o microorganismo testado nas condições do ensaio. O estudo mostrou que o emulsionante utilizado (DMSO) não influenciou o crescimento dos microrganismos em estudo. O valor do MIC foi determinado com base na inspeção visual da placa de 96 poços. É de notar que os valores MIC e MLC correspondem a efeitos estáticos e cidas, respectivamente.

Com base nos resultados (Tabela 4 à Tabela 6), foi possível verificar que enquanto que o hidrolato da *L. pedunculata* não demonstrou atividade antimicrobiana para os microrganismos testados, o hidrolato da *L. luisieri* demonstrou ter atividade bacteriostática apenas contra o microorganismo *C. albicans* na concentração 50 % (v/v), não apresentando atividade contra os restantes microorganismos testados.

Em relação aos extratos aquosos das duas plantas em estudo, estes apenas demonstraram atividade antimicrobiana para o microorganismo *S. aureus*, tendo sido possível determinar os valores de MIC e MLC. Para a *L. pedunculata* os valores de MIC e MLC para *S. aureus* são respetivamente 1.56 mg/mL e 3.13 mg/mL. Para a *L. luisieri* os valores de MIC e MLC para *S. aureus* correspondem à concentração de 3.13 mg/mL.

Relativamente aos óleos essenciais das plantas testadas, para a *L. pedunculata* foi possível determinar MIC para todos os microrganismos em estudo (efeito bacteriostático para o *S. aureus*, *C. albicans* e *A. brasiliensis* com MIC de 5 µL/mL; efeito bactericida para a *P. aeruginosa* com MIC a 20 µL/mL; e efeito bacteriostático para a *E. coli* com MIC a 10 µL/mL). O óleo essencial da *L. luisieri* não demonstrou atividade antimicrobiana para os microrganismos *P. aeruginosa* e *E. coli* às concentrações testadas. Este extracto demonstrou atividade bacteriostática a 5 µM/mL (valor de MIC) para *S. aureus* e *A. brasiliensis* e atividade bactericida a 10 µL/mL para *C. albicans* (valor de MIC e de MLC).

II) Ensaio realizados nos extratos de *Thymus mastichina*, *Eucalyptus globulus*, *Aloysia citrodora*.

Identificação dos compostos químicos nos óleos essenciais e nos hidrolatos por GC-MS

A determinação do perfil químico dos extratos foi determinada por análise da composição de cada extrato utilizando o método da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Foram estudados os extratos de *Thymus mastichina*, tendo-se identificado os compostos maioritários (Tabela 8). A identificação dos compostos maioritários é fundamental para a interpretação do estudo das bioatividades dos extratos e do seu perfil de segurança.

Os extratos foram analisados em triplicado através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1 mL/min. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se três métodos analíticos distintos: comparação dos espetros de massa obtidos com os espetros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra; alguns dos compostos nomeadamente, o α-pineno, o β-pineno, o β-myrcene, o eucaliptol, o γ-terpinene e o linalool foram ainda confirmados através da comparação com padrões (Sigma-Aldrich) injetados no mesmo método cromatográfico que a análise das amostras.

Tabela 8. Lista de extratos analisados por GC-MS e compostos maioritários identificados

Espécie	Tipo de Extrato selecionado	Compostos maioritários identificados
<i>Thymus mastichina</i>	Óleo essencial,	Eucalyptol 1,8-Cineole
	Hidrolato	Eucalyptol α-Terpineol

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de *T. mastichina* e *E. globulus* foi determinada para um conjunto de microrganismos relevantes para as infeções dermatológicas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*, *C. acnes*). Observou-se que para extratos do tipo hidrolato a atividade antimicrobiana não foi tão relevante quando comparada com a de óleos essenciais.

Tabela 9. Resultados dos MICs visuais determinados para os óleos essenciais para as bactérias que fazem parte do Challenge test.

Extrato		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>T. mastichina</i>	EO	2	2	>2%

Tabela 10. Resultados dos MICs visuais para a *C. acnes* às 72h e o MLC às 72h.

		MIC72	MLC
<i>Eucalyptus globulus</i>	EO	0.5%	>2%
<i>Thymus mastichina</i>	EO	1%	2%
	Hidrolato	50	-

Tabela 11. Resultados dos MICs visuais para o *A. brasiliensis* às 48h e o MLC às 24h.

		MIC48	MLC
<i>Thymus mastichina</i>	EO	2%	-
<i>Thymus mastichina</i>	Hidrolato	-	-

Tabela 12. Resultados dos MICs visuais para a *C. albicans* às 48h e o MLC às 24h.

		MIC48	MLC
<i>Thymus mastichina</i>	EO	2%	-
<i>Thymus mastichina</i>	Hidrolato	-	-

Atividade anti-oxidante

A capacidade antioxidante está diretamente relacionada com os compostos maioritários presentes em cada extrato (Tabela 13) que tenham capacidade anti-oxidante. Pelas suas características, os óleos essenciais conservam os compostos mais anti-oxidantes (compostos fenólicos) e por isso apresentam uma maior atividade anti-oxidante. De seguida apresentam-se os resultados da atividade antioxidante determinada para o *Thymus mastichina*.

Tabela 13. Índice de atividade anti-oxidante determinado pelo método de redução do DPPH dos óleos essenciais.

Planta	Índice de atividade antioxidante	Avaliação qualitativa
<i>Thymus mastichina</i>	0,003	Atividade pouco relevante

Atividade anti-inflamatória

No âmbito da determinação da atividade anti-inflamatória, foi determinada inicialmente a compatibilidade celular dos diferentes extratos com a linha celular utilizada (macrófagos de ratinho Raw 264.7) e posteriormente, a determinação da quantidade relativa de óxido nítrico produzido, sendo este um mediador pró-inflamatório. Foram determinadas a concentração inibitória média (IC50), e a concentração efetiva média EC50, que correspondem às concentrações estimadas de extrato capaz de inibir 50% da viabilidade celular e 50% da produção de óxido nítrico (NO), respetivamente. Estes valores estão presentes na Tabela 14 e permitem a comparação da diferente capacidade anti-inflamatória dos extratos testados. Quanto maior for o valor de IC50, maior será a biocompatibilidade do extrato. De outro modo, quanto menor for o EC50, maior a capacidade anti-inflamatória do extrato. Extratos que apresentem uma grande diferença entre estes dois valores apresentam um maior potencial anti-inflamatório, pois permitem uma diminuição da produção de óxido nítrico, em concentrações com maior biocompatibilidade.

Dos hidrolatos testados, o hidrolato de *Thymus mastichina* apresentam-se como o mais interessante do ponto de vista desta bioatividade pois permite uma redução marcada dos valores de óxido nítrico para valores basais, e apresenta uma elevada biocompatibilidade, para esta linha celular.

Relativamente aos óleos essenciais, na sua maioria, todos apresentaram uma capacidade relevante em diminuir a produção de NO, utilizando este modelo. Esta redução elevada poderá estar relacionada com o elevado teor de compostos da família dos terpenos, presentes nos diferentes óleos essenciais. Contudo, na sua maioria estes também se apresentaram bastante citotóxicos para a linha celular utilizada. De todos os óleos essenciais em estudo o de *Thymus mastichina* assume-se como o mais promissor relativamente ao seu potencial anti inflamatório, devido a apresentaram uma maior diferença entre os valores de IC50 e EC50, conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 Comparação entre o potencial anti-inflamatório dos extratos em estudo. IC50 - concentração estimada capaz de inibir 50% da viabilidade celular. E50 - concentração estimada capaz de inibir 50% da produção de óxido nítrico.

Extrato em estudo	IC50 para a citotoxicidade de macrófagos de ratinho	EC50 para a produção de óxido nítrico
Hidrolato de <i>Thymus mastichina</i>	33,38	3,35
Óleo essencial <i>Eucalyptus globulus</i>	0,078	0,051
Óleo essencial <i>Thymus mastichina</i>	0,09	0,006

Determinação do potencial efeito mutagénico/genotóxico

Foi determinado o potencial efeito mutagénico dos extratos de *Thymus mastichina* através da determinação do teste de Ames sem ativação metabólica, contemplando 4 estirpes *Salmonella thyphimurium* e 1 estirpe *Escherichia coli*. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 Potencial mutagénico dos extratos em estudo através capacidade de mutação reversa (Teste de Ames). M.R.: mutation ratio.

Planta	Extrato	Resultado	Interpretação
<i>Thymus mastichina</i>	OE	M.R.>2.0 para TA100; M.R. > 2.0 para a TA1535 e TA1537, na maior concentração testada (5%) M.R.<2.0 nas restantes condições de ensaio	Possivelmente mutagénica por substituição de bases e frameshift
<i>Thymus mastichina</i>	Hidrolato	M.R.<2.0 em todas as condições de ensaio	Não mutagénica

Determinação do potencial irritante ocular

O potencial irritante ocular foi já determinado para algumas plantas de forma a avaliar a sua utilização em formulações de aplicação facial. O método utilizado para a determinação da irritabilidade ocular *in vitro* foi através das membranas corioalantónicas do ovo, Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).

Os resultados obtidos quanto ao potencial de irritante ocular apresentam-se de seguida na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados obtidos para cada planta na determinação do potencial irritante ocular

Planta	Resultado
Aloysia citrodora - hidrolato	Não irritante severo
<i>E. globulus</i> – óleo essencial (folhas)	Irritante severo

Determinação do potencial irritante dérmico

O potencial irritante dérmico foi já determinado para alguns extratos de plantas, tendo-se verificado que alguns dos extratos não se mostraram irritantes (Tabela 17).

O método utilizado foi segundo a OECD 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.

Tabela 17. Resultados obtidos para cada planta na determinação do potencial irritante dérmico.

Planta	Resultados
E. globulus – óleo essencial 2% (folhas)	Não irritante
T. mastichina – óleo essencial	Irritante (Cat 2)
T. mastichina – hidrolato	Não irritante

Determinação da toxicidade em culturas de células

A toxicidade em culturas de células foi determinada com o objetivo prever a margem de segurança a partir da qual os extratos não terão atividade citotóxica relevante, podendo ser incluídos em gama de concentração definida em formulações de aplicação tópica. Sendo ensaios em modelo de cultura celular, são considerados resultados indicadores da biocompatibilidade dos extratos.

Os resultados revelam o hidrolato de *Thymus mastichina* apresenta uma maior biocompatibilidade para a linha celular em estudo, e os óleos essenciais apresenta uma citotoxicidade relevante. Na Tabela 18 encontram-se representados através da concentração inibitória média (IC50), que correspondem à concentração estimada, capaz de inibir 50% da viabilidade celular.

Tabela 18 Resultados de citotoxicidade dos extratos (IC50 para fibroblastos de ratinho)

Extrato em estudo	IC50 para fibroblastos de ratinho
Hidrolato de <i>Thymus mastichina</i>	17.02%*
Óleo essencial <i>Eucalyptus globulus</i>	0.049%
Óleo essencial <i>Thymus mastichina</i>	0.042%*

*Ensaio realizado com linha celular de fibroblastos de ratinho L929

Ensaio de toxicidade aguda com invertebrados aquáticos (*Daphnia magna*)

O organismo *Daphnia magna*, um pequeno crustáceo planctónico, vulgarmente conhecido como pulga-de-água, é um organismo modelo utilizado em ensaios de ecotoxicidade e de avaliação da segurança ambiental.

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com o protocolo OECD 202 Guideline for Testing of Chemicals - *Daphnia* sp., Acute Immobilisation test. Este teste de toxicidade aguda é recomendado pelas principais agências reguladoras internacionais para avaliar a ecotoxicidade de novas substâncias ou misturas de substâncias.

Os ensaios foram realizados através da exposição de neonatos de *D. magna* às soluções teste por um período de 48h. No final do teste foi avaliada a imobilização dos indivíduos, sendo, sempre que possível calculado o valor de EC₅₀, i.e., a concentração responsável pela imobilização de 50% dos organismos. Para cada ensaio foram testadas no mínimo 5

concentrações das soluções teste, um controlo de meio de cultura e um controlo de solvente caso tenha sido utilizado um solvente para a preparação das soluções a testar. Foram utilizados 5 organismos por réplica e um mínimo de 5 réplicas por ensaio.

Numa 1ª fase e uma vez que o efeito deste extrato no organismo teste *D. magna* era desconhecido, foi necessário realizar ensaios preliminares para avaliar qual a gama de concentrações a testar. Na Tabela 19 encontra-se descritas as gamas de concentração.

Tabela 19. Plantas, tipo de extratos e concentrações testadas nos ensaios de toxicidade aguda com o organismo *D. magna*.

Planta	Extrato	Concentrações testadas (mg.L ⁻¹)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Óleo essencial	50; 100; 200; 400; 800

Com base dos resultados de EC₅₀ obtidos, os extratos foram classificados em termos de toxicidade com base no sistema GHS (*Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals*) proposto pelas Nações Unidas (Tabela 20).

Tabela 20. Toxicidade aguda (48h) dos diferentes tipos de extratos para o organismo modelo *D. magna*, com indicação do EC₅₀ e respetiva classificação com base no sistema GHS (*Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals*) proposto pelas Nações Unidas.

Planta	Extrato	EC ₅₀ (48h) mg.L ⁻¹	Classificação GHS
<i>Eucalyptus globulus</i>	Óleo essencial	82,90	Agudo 3

O óleo essencial de *E. globulus* pode causar efeitos agudos adversos em sistemas aquáticos, particularmente em organismos do mesmo nível trófico que *D. magna* e precauções devem ser tomadas de forma a evitar contaminações acidentais ou intencionais de sistemas aquáticos.

Estes resultados serão fundamentais para proceder ao registo do REACH de novos produtos que possam vir a ser desenvolvidos, gerando assim dados de elevado interesse para a indústria e para os reguladores.