

**Caracterização e valorização de compostos  
bioativos de plantas silvestres e  
micropropagadas de *Lavandula stoechas*  
subsp. *luisieri* e *Pterospartum tridentatum*  
na conservação pós-colheita de frutos**

**Joana Lopes Domingues**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Bioquímica**  
(3<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves  
Co-orientadora: Prof. Doutora Ana Paula Coelho Duarte  
Co-orientadora: Prof. Doutora Fernanda Maria Grácio Delgado Ferreira de Sousa

Júri:

Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida  
Prof. Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro da Silva Couto  
Prof. Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva  
Prof. Doutora Ana Cristina da Silva Figueiredo  
Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz  
Prof. Doutor Jorge Manuel Canhoto  
Prof. Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves

3 de julho de 2024



## Declaração de Integridade

Eu, Joana Lopes Domingues, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição D1754 do 3º ciclo de estudos em Bioquímica da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 30/07/2024



(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)



# Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha querida avó, quem sempre me ensinou a priorizar valores como a simplicidade e a gratidão.



# Agradecimentos

A terminar esta etapa não poderia concluir sem agradecer àqueles que me acompanharam e apoiaram nesta caminhada, àqueles que me inspiraram para continuar nela, e sobretudo àqueles que não me deixaram desistir.

Em primeiro lugar quero agradecer de coração e com a mais profunda gratidão ao meu orientador Professor Doutor José Carlos Gonçalves, agradeço por me ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela disponibilidade em resolver problemas que foram surgindo, pelos ensinamentos transmitidos e pelo rigor científico com o qual sempre me acompanhou.

À minha coorientadora Professora Doutora Fernanda Delgado quero agradecer de coração e com a mais profunda gratidão por desde o início ter-me acolhido sempre com um sorriso e com motivação para continuar, pelo dinamismo nos trabalhos, pelos ensinamentos transmitidos e pela sua amizade.

À minha coorientadora Professora Doutora Ana Paula Duarte quero agradecer de coração e com a mais profunda gratidão pela sua disponibilidade em orientar neste trabalho e ajudar nos problemas que foram surgindo.

Gostaria também de agradecer à Professora Doutora Cristina Santos Pintado, que desde sempre me apoiou, motivou e orientou nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de microbiologia da ESA-IPCB, agradeço por toda a sua disponibilidade em ajudar, pelos conhecimentos transmitidos e rigor científico, pela motivação na conclusão desta tese e pela sua amizade.

Agradeço à Professora Doutora Maria Teresa Coelho, por desde sempre me motivar e apoiar na conclusão desta tese, pelos conhecimentos transmitidos e acima de tudo pela sua amizade.

Agradeço à Professora Doutora Fátima Peres, por desde sempre me apoiar e motivar e pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço às Professoras Doutora Margarida Ataíde e Doutora Ofélia Anjos pelos conhecimentos transmitidos em alguns trabalhos realizados em conjunto.

Às Técnicas dos Laboratórios de Microbiologia, Biologia, Química e SIG/CAD da ESA-IPCB, agradeço a colaboração prestada em partes do trabalho experimental nomeadamente à Manuela Goulão, Graça Diogo, Cecília Gouveia, Conceição Vitorino, Conceição Amaro e Natália Roque.

Aos colaboradores que foram passando pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, nomeadamente ao Dr. Clayton Debiasi pela orientação nos trabalhos com os biorreatores e aos colegas que tive o privilégio de conhecer e trabalhar ao longos destes anos, um grande Bem-Haja!

Um agradecimento especial à Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade em ajudar e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço à equipa do Laboratório de Toxicologia do CICS-UBI, à Prof. Doutora Eugénia Gallardo e ao Prof. Doutor Luís Passarinha pela imediata disponibilidade e ajuda na realização de trabalhos no HPLC. Agradecer ao Tiago Rosado, à Margarida Gonçalves e à Joana Gonçalves pela ajuda em algumas partes experimentais do trabalho no CICS-UBI.

Agradeço à equipa da Micoteca da Universidade do Minho, ao Professor Doutor Nelson Lima, à Dra. Célia Soares e à Dra. Carla Santos, pela sua pronta disponibilidade na colaboração e ajuda no trabalho de identificação de fungos.

Agradeço ao Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco por ter permitido a realização das análises no texturómetro.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus queridos pais, irmã e ao meu namorado, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, por serem casa, por todo o amor e carinho, e pela força dada nos momentos mais difíceis. À minha querida sobrinha Mafalda por me dar força para continuar e pela sua fonte de energia que contagia.

Agradeço aos meus amigos de coração, o apoio e motivação que me foram transmitindo ao longo desta caminhada, pela amizade e carinho.

Um enorme obrigada a todos quantos, aqui não mencionados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*



# Lista de Publicações e Comunicações

## Artigos

**Joana Domingues**, Manuela Goulão, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Joana Gonçalves and Cristina Santos Pintado. 2023. Essential oils of two Portuguese endemic species of *Lavandula* as a source of antifungal and antibacterial agents. *Processes*, 11, 1165. <https://doi.org/10.3390/pr11041165>

**Joana Domingues**, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Mónica Zuzarte, Ana Paula Duarte. 2023. Mediterranean lavenders from section *Stoechas*: an undervalued source of secondary metabolites with pharmacological potential. *Metabolites*, 13, 337. <https://doi.org/10.3390/metabo13030337>

**Joana Domingues**, Celina Barroca, Fernanda Delgado, Teresa Coelho, Catarina Lourenço, José Carlos Gonçalves. 2022. *Lavandula* spp. secção *Stoechas*: contribuição para a sua identificação na região da Beira Baixa. Atas Portuguesas de Horticultura, nº 37. III Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais. Associação Portuguesa de Horticultura (APH), Lisboa. ISBN: 978-972-8936-44-0.

**Joana Domingues**, Manuela Goulão, Maria Teresa Coelho, José Carlos Gonçalves, Cristina Santos Pintado. 2022. Different postharvest storage conditions of *Arbutus unedo* L. fruits and their physicochemical and microbiological characterization. *International Food Research Journal*, 29 (1). <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.1.04>

**Joana Domingues**, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Cristina Santos Pintado. 2021. Essential oils of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* as antifungal agent against fungi from strawberry tree fruit. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 98-106. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2021.03.002>

## Comunicações orais

Farm to Fork Congress, 16 a 18 de novembro de 2023, **Joana Domingues**, Sílvia Ribeiro, Maria Teresa Coelho, Celina Barroca, Cristina Canavarro, José Carlos Gonçalves, Natália Roque, Fernanda Delgado, “*Lavandula* section *Stoechas* from Beira Interior: chemical and morphological approaches”

XII Encontro Internacional de Fitossociologia, 6 a 8 de setembro de 2022, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Joana Domingues, Sílvia Ribeiro, Maria Teresa Coelho, Celina Barroca, Cristina Canavarro, José Carlos Gonçalves, Natália Roque, Fernanda Delgado, “Environmental and morphological traits in three sympatric *Lavandula* section *Stoechas*”.

Congresso Internacional de Microbiologia em Língua Portuguesa, 17 a 19 de outubro de 2022, Webconference, Joana Domingues, Carla Santos, Célia Soares, Nelson Lima, José Carlos Gonçalves e Cristina Santos Pintado, “Identificação da microbiota isolada de medronho (*Arbutus unedo* L.)”, Livro de Resumos.

11º Congresso Nacional de Cromatografia, 9 a 11 de dezembro de 2019, Caparica, Lisboa, Joana Domingues, Daniela Coutinho, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Ofélia Anjos, “Discrimination of *Lavandula* essential oil growing in Castelo Branco region by GC-MS and FTIR-ATR”, Livro de Resumos, ISBN: 978-989-8124-29-6.

## Comunicações em Paineis

SIPAM-6, Sixth International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 18 a 21 de março de 2023, Tunísia, Joana Domingues, Maria Teresa Coelho, José Carlos Gonçalves, Fernanda Delgado, “Conservation and valorization of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* in the face of climate change”, Book of Abstracts, pág.112.

III Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, 24 a 26 de março de 2022, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Joana Domingues, Celina Barroca, Fernanda Delgado, Teresa Coelho, Catarina Lourenço, José Carlos Gonçalves, “*Lavandula* spp. secção *Stoechas*: contribuição para a sua identificação na região da Beira Baixa”, Atas Portuguesas de Horticultura, nº 37, pág.64-72, ISBN: 978-972-8936-44-0.

Congress of Microbiology and Biotechnology, 23 a 26 de novembro de 2021, Universidade Nova de Lisboa, Webconference, Joana Domingues, Ecalina Alves, Manuela Goulão, Fernanda Delgado and Cristina Santos Pintado, “Antimicrobial screening of *Lavandula* spp. hydrodistillation products against potentially pathogenic bacteria”.

Congress of Microbiology and Biotechnology, 23 a 26 de novembro de 2021, Universidade Nova de Lisboa, Webconference, Joana Domingues, Manuela Goulão, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves and Cristina Santos Pintado, “Coatings of chitosan and chitosan with essential oil of *L. stoechas* subsp. *luisieri* for the control of spoilage microorganisms in post-harvest conservation of *Prunus avium* fruits”.

XV Encontro de Química dos Alimentos: Estratégias para a Excelência, Autenticidade, Segurança e Sustentabilidade Alimentar, 5 a 8 de setembro de 2021, Funchal, **Joana Domingues**, Marciana Baptista, Manuela Goulão, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Cristina Santos Pintado, “Potential antifungal of two *Lavandula* sp. essential oils and bioactive coatings against fungi isolated from *Arbutus unedo* L. fruits”, Livro de Resumos, pág.285.

50<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, 9 a 11 de setembro de 2019, Viena, Áustria, **Joana Domingues**, **Fernanda Delgado**, Cristina Santos Pintado, José Carlos Gonçalves, “Antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* essential oils against strains of fungi isolated from strawberry tree”, Book of abstracts, pág.58, ISSN: 2148-9637.

50<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, 9 a 11 de setembro de 2019, Viena, Áustria, **Joana Domingues**, David Frazão, Joana Raimundo, Cristina Santos Pintado, Manuela Goulão, Inês J. Seabra, **Fernanda Delgado**, “Essential oil of *Lavandula pedunculata* from Portugal: chemical profile and biological activities”, Book of abstracts, pág.112, ISSN: 2148-9637.

II CIBIA - Congresso Iberoamericano de Engenharia Alimentar, 1 a 4 de julho de 2019, Universidade do Algarve, Faro, **Joana Domingues**, Daniela Coutinho, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, **Cristina Santos Pintado**, “Products of autochthonous plants as bioactive ingredients in chitosan-based coatings for preservation of *Arbutus unedo* L. fruits”. E-Book of abstracts, pág.42, ISBN: 978-989-8859-75-4.

11<sup>o</sup> National meeting on Chromatography, 9 a 11 de dezembro de 2019, Caparica, Lisboa, **Joana Domingues**, Daniela Coutinho, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Ofélia Anjos, “Discrimination of *Lavandula* essential oil growing in Castelo Branco region by GC-MS and FTIR-ATR”, Book of abstracts, pág.59, ISBN: 978-989-8124-29-6.

II Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias, 16 a 18 de novembro de 2017, Elvas, **Joana Domingues**, David Frazão, Joana Raimundo, Fernanda Delgado, Manuela Goulão, Maria Martins, Cristina Pintado, “Atividade antimicrobiana de produtos de hidrodestilação de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira”.

I Congresso Luso-Brasileiro de Horticultura, 1 a 4 de novembro de 2017, Lisboa, **Joana Domingues**, José Carlos Gonçalves, Clayton Debiasi, “Influence of light on micropropagation of *Pterispartum tridentatum* ecotypes: Malcata, Gardunha and Orvalho”, Actas Portuguesas de Horticultura, nº 29, pág.566, ISBN: 978-972-8936-28-0.

I Congresso Luso-Brasileiro de Horticultura, 1 a 4 de novembro de 2017, Lisboa, **Joana Domingues**, José Carlos Gonçalves, Maria Teresa Coelho, Ana Paula Duarte, Marcos Nopper

Alves, “*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. da Serra da Malcata (Portugal): uma fonte potencial de fenóis com atividade antioxidante”, Actas Portuguesas de Horticultura, nº 29, ISBN: 978-972-8936-28-0.

## Capítulo de Livro

Fernanda Delgado, Cristina Santos Pintado, Manuela Goulão, Joana Domingues e Maria Helena Silva. 2020. Prospecção de ação antimicrobiana de óleos essenciais, extratos e hidrolatos de plantas no controlo de microrganismos associados a produtos agroalimentares. In: Marta Henriques e Carlos Dias Pereira. Investigação aplicada no Politécnico de Coimbra: Coletânea de estudos, ISBN: 978-989-54520-4-0.

## Prémios

Participação premiada no programa MIRRI/IS\_MIRRI21 2nd TNA call. 2022, Joana Domingues, “FungiArbunedo - Didymellaceae fungi isolated from *Arbutus unedo* L. fruits”, Acesso On-site Service at Westerdijk Institute - KNAW.

Prémio Microbiologia 2022, Melhor Apresentação Consolidada no tema Microbiologia Alimentar atribuído no Congresso Internacional de Microbiologia em Língua Portuguesa, 17 a 19 de outubro de 2022, Webconference, Joana Domingues, Carla Santos, Célia Soares, Nelson Lima, José Carlos Gonçalves e Cristina Santos Pintado, “Identificação da microbiota isolada de medronho (*Arbutus unedo* L.)”, Livro de Resumos.

Prémio de Melhor Poster atribuído no 11º National meeting on Chromatography, 9 a 11 de dezembro de 2019, Caparica, Lisboa, Joana Domingues, Daniela Coutinho, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Ofélia Anjos, “Discrimination of *Lavandula* essential oil growing in Castelo Branco region by GC-MS and FTIR-ATR”, Book of abstracts, pág.59, ISBN: 978-989-8124-29-6.

## Resumo

A crescente valorização de produtos naturais na alimentação tem ganho importância na comunidade científica, cada vez mais a investigação se tem direcionado para o desenvolvimento de conceitos inovadores sustentáveis ao nível alimentar e não só. Esta tendência generalizada pela sociedade de procurar, usar e consumir o que é natural deve-se não só à partilha do conhecimento científico para a sociedade, como também à urgente preocupação em mudarmos os nossos hábitos a nível alimentar, mas também à sustentabilidade dos processos industriais. As plantas aromáticas e medicinais (PAM) têm ganho especial atenção, a importância dos seus usos tradicionais tem vindo a ser confirmada, na maioria das vezes, em estudos de caracterização das propriedades biológicas. Os extratos e óleos essenciais (OEs) de PAM têm apresentado bons resultados em termos de atividades antioxidante e antimicrobiana, sendo a sua potencial aplicação na conservação de alimentos perecíveis, como é o caso de frutas e vegetais frescos, apresentando resultados promissores na substituição de conservantes químicos sintéticos e na redução do desperdício alimentar, devido à extensão de conservação dos alimentos.

A *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira (Lsl) e a *Pterospartum tridentatum* L. Willk (Pt) são dois endemismos da flora portuguesa, sendo bastante referenciados em estudos etnobotânicos. Os seus extratos e OEs têm revelado resultados importantes na caracterização das suas propriedades biológicas.

O presente estudo procura desenvolver protocolos de propagação *in vitro* destas espécies por sistemas de biorreatores de imersão temporária (BIT) e caracterizar os compostos fenólicos e voláteis dos extratos de plantas silvestres, recolhidas nas diferentes fases fenológicas e com origem em BIT. Nestes subprodutos, pretende-se avaliar as suas propriedades biológicas, nomeadamente a atividade antioxidante, antimicrobiana e a citotoxicidade. Foram realizados ensaios de conservação pós-colheita de medronho e cereja, onde, neste último, em cerejas, foram também elaboradas e caracterizadas formulações de revestimentos edíveis com incorporação de OE de Lsl.

Os resultados dos ensaios de micropropagação de Lsl e Pt revelaram boas propriedades biométricas e morfológicas, obtendo taxas de multiplicação próximas ou superiores às obtidas no sistema convencional. A caracterização de extratos aquosos de Lsl revelou a presença maioritária de ácido rosmarínico em todas as fases fenológicas da planta, sendo que no extrato de BIT os compostos maioritários foram os ácidos cafeico e

rosmarínico. Nos extratos aquosos de Pt os compostos fenólicos maioritários foram a rutina e quercetina, enquanto o extrato de BIT foi caracterizado por ácido elágico e rutina como compostos maioritários. Os resultados dos constituintes voláteis dos OEs de Lsl permitiram observar uma variação no perfil volátil nas diferentes fases fenológicas, sendo a fase da floração caracterizada por possuir maior teor de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo, nomeadamente no OE das folhas. Neste trabalho foi possível obter OE com origem em plantas no tratamento de BIT, sendo que o perfil volátil do OE apresentou como composto maioritário o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo, revelando alguns constituintes com maior teor comparativamente às plantas silvestres, como o  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, a cânfora, o acetato de lavandulilo e o viridiflorol.

Os resultados permitiram concluir que os extratos aquosos e OE de Lsl e o extrato aquoso de Pt apresentaram atividade antioxidante pelos métodos testados, conferindo-lhes propriedades de potencial de aplicação como conservante. O OE de Lsl revelou potencial citotóxico em todas as concentrações testadas, enquanto nas concentrações mais baixas testadas o extrato aquoso de Pt não revelou citotoxicidade em células de fibroblastos. A atividade antimicrobiana foi confirmada no OE de Lsl, apresentando um largo espectro de ação antibacteriano e antifúngico. Foram isolados leveduras e fungos filamentosos de medronho no ensaio de conservação, permitindo a identificação de 57% dos isolados ao nível do género e espécie, destacando os géneros mais representativos como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* e *Sacchettoecium*. No ensaio de conservação de cereja as formulações de revestimentos à base de quitosano e OE de Lsl apresentaram propriedades mecânicas adequadas, assim como a sua aplicação em frutos permitiu reduzir a carga microbiana inicial, contribuindo para a sua conservação e tempo de vida útil.

Em suma, os extratos e OE das plantas estudadas revelaram propriedades interessantes para possível aplicação como agentes conservantes em formulações alimentares e/ou como componentes de embalagens, no entanto, validações futuras serão necessárias de forma a complementar estes resultados para o desenvolvimento de produtos bioativos na conservação de alimentos.

## Palavras-chave

Atividade antimicrobiana; Atividade antioxidante; Carqueja; Extratos aquosos; Óleo essencial; Micropropagação; Revestimentos edíveis; Rosmaninho-menor.

# Abstract

The scientific community has come to recognize the increased importance of natural products in food, and an increasing amount of research is being focused on creating innovative and sustainable food concepts and beyond. This widespread tendency in society to look for, use, and consume natural products is caused by the dissemination of scientific knowledge and an urgent desire to modify our eating patterns and the sustainability of industrial processes. Aromatic and medicinal plants (AMP) have received particular attention, and studies characterizing their biological properties have confirmed the significance of their traditional uses. AMP essential oils (EOs) and extracts have demonstrated promising outcomes regarding their antimicrobial and antioxidant properties.

*Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira (Lsl) and *Pterospartum tridentatum* L. Willk (Pt) are two endemisms of the Portuguese flora that are frequently mentioned in ethnobotanical studies. Its extracts and EOs have revealed significant results in characterizing its biological properties.

The present study aimed to develop protocols for the *in vitro* propagation of these species by temporary immersion bioreactor systems (TIB) and to characterize the phenolic and volatile compounds of extracts of wild plants collected in the different phenological phases and obtained by TIB. These by-products are intended to evaluate their biological properties, namely antioxidant and antimicrobial activities, and cytotoxicity. Post-harvest conservation trials were carried out on the strawberry tree and sweet cherry, where, in the last one, formulations of edible coatings with the incorporation of EOs of Lsl were developed and characterized.

Concerning the results, the Lsl and Pt micropropagation in the TIB system showed good biometric and morphological properties, with multiplication rates equal to or higher than those of the conventional system. Characterization of aqueous extracts of Lsl revealed the presence of rosmarinic acid in all phenological phases of the plant, and the main phenolic compounds in the extract of TIB were caffeic and rosmarinic acids. In Pt aqueous extracts, rutin and quercetin were the main phenolics, whereas their TIB extract was characterized by ellagic acid and rutin. The results of the volatile constituents of the EOs allowed us to observe a variation in the volatility profile of the Lsl EOs in the different phenological phases, with the flowering phase being characterized by having a higher content of *trans*- $\alpha$ -necrotyl acetate, particularly in the EO of the leaves. In this work, it was possible to obtain EO from plants obtained

by TIB, with the volatile profile of this EO presented as the majority compound *trans*- $\alpha$ -necrolyl acetate, revealing some constituents with a higher content compared to wild plants, such as  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, camphor, lavandulyl acetate, and viridiflorol. The results allow us to conclude that the aqueous extracts and EO of Lsl, as well as the aqueous extract of Pt, exhibited antioxidant activity using the tested methods, making them suitable for use as a preservative. EO of Lsl exhibited cytotoxic potential in all concentrations tested in fibroblasts, whereas aqueous extracts of Pt did not exhibit cytotoxicity in fibroblasts cells at lower concentrations tested. Lsl EO has also shown antimicrobial activity with a broad spectrum of antibacterial and antifungal properties. In the strawberry tree conservation assay, the main representative yeasts and filamentous fungi were isolated, allowing 57% of the isolates to be identified at the genus and species level, highlighting *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* e *Saccharothecium*. The coating formulations demonstrated adequate mechanical properties in the cherry conservation assay, and their application on fruits reduced the initial microbial load, contributing to their conservation and shelf life.

In summary, the extracts and EO of the plants studied revealed interesting properties for potential use as preservatives in food formulations. However, future validations to complement these findings should be considered to develop bioactive products in food conservation.

## Keywords

Antimicrobial activity; Antioxidant activity; Aqueous extracts; Edible coatings; Essential oil; *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*; Micropropagation; *Pterospartum tridentatum*.

# Índice

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Lista de Publicações e Comunicações	xi
Resumo	xv
Abstract	xvii
Lista de Figuras	xxiii
Lista de Tabelas	xxvii
Lista de Acrónimos e Abreviaturas	xxix
Introdução e objetivos	3
Capítulo 1 - Revisão bibliográfica	7
1. Compostos bioativos e atividades biológicas	9
1.1. Óleos essenciais	9
1.2. Compostos não voláteis	10
1.3. Extração de compostos bioativos	13
1.4. Atividade antioxidante	15
1.5. Atividade antimicrobiana	17
1.6. Atividade citotóxica	18
2. <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	19
2.1. Taxonomia	19
2.2. Morfologia e distribuição	20
2.3. Metabolitos secundários	23
2.3.1. Óleos essenciais	23
2.3.2. Compostos não-voláteis	25
2.4. Atividades biológicas	26
2.4.1. Atividade antioxidante	26
2.4.2. Atividade antimicrobiana	27
2.4.3. Atividade citotóxica	29
2.4.4. Outras atividades biológicas	30
3. <i>Pterospartum tridentatum</i>	32
3.1. Taxonomia	32
3.2. Morfologia e distribuição	33
3.3. Metabolitos secundários	34
3.4. Atividades biológicas	37
3.4.1. Atividade antioxidante	38
3.4.2. Atividade antimicrobiana	39
3.4.3. Atividade citotóxica	39
3.4.4. Outras atividades biológicas	40
4. Importância da conservação de espécies vegetais	40

4.1. Propagação <i>in vitro</i> para obtenção de compostos bioativos	42
4.2. Biorreatores de imersão temporária	44
5. Conservação pós-colheita de frutos regionais	48
5.1. A cereja	48
5.2. O medronho	49
5.3. Estratégias de conservação	51
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	55
1. Propagação <i>in vitro</i> das espécies em biorreatores de imersão temporária	57
1.1. Material vegetal	57
1.2. Estabelecimento e multiplicação	57
1.3. Biorreatores de imersão temporária	58
1.3.1. <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	59
1.3.2. <i>P. tridentatum</i>	61
2. Obtenção e extração de compostos bioativos	63
3. Determinação dos compostos fenólicos e voláteis	66
3.1. Fenóis totais e flavonóides	66
3.1.1. Fenóis totais	66
3.1.2. Flavonóides	67
3.2. Identificação e quantificação do perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD	67
3.2.1. Reagentes e condições cromatográficas	68
3.2.2. Validação do procedimento analítico	69
3.3. Identificação e quantificação de compostos voláteis nos óleos essenciais	73
4. Determinação das atividades biológicas	75
4.1. Atividade antioxidante	75
4.1.1. DPPH	75
4.1.2. FRAP	76
4.1.3. Sistema $\beta$ -Caroteno/ácido linoleico	76
4.2. Atividade antimicrobiana	77
4.2.1. Ensaio prévios	78
4.2.2. Preparação do inóculo e condições de incubação	78
4.2.3. Método da microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória	79
4.2.4. Avaliação da concentração mínima bactericida e fungicida	81
4.3. Atividade citotóxica	81
5. Ensaio de conservação de frutos endógenos da Beira Interior	82
5.1. Cereja	82
5.1.1. Seleção da formulação de revestimento	82
5.1.2. Avaliação das propriedades mecânicas e higroscópicas dos filmes	83
5.1.3. Aplicação das formulações de revestimentos nos frutos	86
5.1.4. Avaliação da microbiota	87

5.2. Medronho	88
5.2.1. Avaliação da microbiota	89
5.2.2. Seleção da micobiota predominante nos frutos	89
5.2.3. Identificação molecular da micobiota do medronho	90
6. Análise estatística	92
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	93
1. Propagação <i>in vitro</i> das espécies em biorreatores de imersão temporária	95
1.1. Estabelecimento de material <i>in vitro</i>	95
1.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária	96
1.2.1. <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	96
1.2.2. <i>Pterospartum tridentatum</i>	102
2. Caracterização dos extratos e óleos essenciais	105
2.1. Rendimento de extração	105
2.2. Caracterização dos compostos fenólicos e voláteis	109
2.2.1. Fenóis totais e flavonóides	109
2.2.2. Perfil fenólico dos extratos aquosos	113
2.2.3. Perfil volátil dos óleos essenciais	118
2.3. Caracterização das atividades biológicas	129
2.3.1. Atividade antioxidante	129
2.3.2. Atividade antimicrobiana	133
2.3.3. Atividade citotóxica	137
3. Ensaio de conservação de frutos endógenos da Beira Interior	138
3.1. Ensaio de conservação em cereja	139
3.2. Ensaio de conservação em medronho	145
Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras	156
Capítulo 5 - Referências bibliográficas	162
Capítulo 6 - Apêndices	190
Apêndice 1	192
Apêndice 2	194
Apêndice 3	196
Apêndice 4	198
Apêndice 5	200



# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema das vias de biossíntese dos metabolitos secundários.	10
<b>Figura 2.</b> Principais estruturas químicas e compostos das diferentes classes de compostos bioativos presentes nas plantas.	12
<b>Figura 3.</b> Aspectos morfológicos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	21
<b>Figura 4.</b> Distribuição geográfica de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> na Península Ibérica.	22
<b>Figura 5.</b> Atividade citotóxica dos óleos essenciais (marcador amarelo) e dos extratos das espécies de <i>Lavandula</i> da secção <i>Stoechas</i> em células normais (cor verde) e células tumorais (cor cinzento).	30
<b>Figura 6.</b> Aspectos morfológicos de <i>P. tridentatum</i> .	33
<b>Figura 7.</b> Distribuição geográfica de <i>P. tridentatum</i> na Península Ibérica.	34
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo das etapas de funcionamento de um biorreator de imersão temporária em modelo SETIS.	46
<b>Figura 9.</b> Esquema simplificado de etapas de estabelecimento de rebentos jovens de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	57
<b>Figura 10.</b> Disposição dos biorreatores de imersão temporária instalados na sala de cultura.	59
<b>Figura 11.</b> Explantes de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> representativos da escala de referência de cor.	60
<b>Figura 12.</b> Escalas de referência definidas para a cor das folhas (A: verde-escuro, verde-claro e castanho), vitrificação (B: ausente, parcial e total) e a cor do calo (C: castanho-escuro, castanho e castanho-claro) de <i>P. tridentatum</i> .	63
<b>Figura 13.</b> Distribuição geográfica dos locais de recolha de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>Pterospartum tridentatum</i> na região da Beira Interior.	64
<b>Figura 14.</b> Desenho experimental da microplaca para a determinação da concentração mínima inibitória.	80
<b>Figura 15.</b> Delineamento experimental das quatro formulações e formação de filmes.	82
<b>Figura 16.</b> Esquema experimental utilizado para medir a permeabilidade ao vapor de água.	85
<b>Figura 17.</b> Delineamento do ensaio de conservação de cerejas com aplicação de revestimento.	86
<b>Figura 18.</b> Efeito da concentração e exposição ao hipoclorito de sódio na etapa de desinfeção de explantes de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	95
<b>Figura 19.</b> Percentagem de hiperhidricidade total e parcial nos explantes do ensaio A de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	98
<b>Figura 20.</b> Aspecto visual dos explantes de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> produzidos nos diferentes tratamentos do ensaio A.	100
<b>Figura 21.</b> Aspecto visual dos explantes de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> produzidos nos diferentes tratamentos do ensaio B.	102

<b>Figura 22.</b> Aspetto visual dos explantes de <i>P. tridentatum</i> produzidos nos diferentes tratamentos do ensaio A.	103
<b>Figura 23.</b> Aspetto visual dos explantes de <i>P. tridentatum</i> produzidos nos diferentes tratamentos no ensaio B	105
<b>Figura 24.</b> Rendimento de extração dos extratos aquosos e óleo essencial de plantas silvestres de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e de <i>P. tridentatum</i> .	106
<b>Figura 25.</b> Rendimento de extração dos extratos aquosos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> micropropagada.	107
<b>Figura 26.</b> Rendimento de extração dos extratos aquosos de <i>P. tridentatum</i> micropropagada.	108
<b>Figura 27.</b> Teor de fenóis totais em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	109
<b>Figura 28.</b> Teor de flavonóides em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	110
<b>Figura 29.</b> Teor de fenóis totais em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de <i>P. tridentatum</i> .	112
<b>Figura 30.</b> Teor de flavonóides em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de <i>P. tridentatum</i> .	112
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas (322 nm) do perfil fenólico de extratos aquosos de plantas silvestres (A: repouso; B: pré-floração; C: floração) e de BIT (D) de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	114
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas (255/280 nm) do perfil fenólico de extratos aquosos de plantas silvestres (A: repouso; B: pré-floração; C: floração) e de BIT (D) de <i>P. tridentatum</i> .	117
<b>Figura 33.</b> Percentagem de acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo nos óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> dos diferentes locais estudados.	128
<b>Figura 34.</b> Análise de componentes principais, <i>biplot</i> com as variáveis bioclimáticas dos locais estudados.	128
<b>Figura 35.</b> Atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> , <i>P. tridentatum</i> e do padrão BHT através do método do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.	132
<b>Figura 36.</b> Viabilidade celular de células de fibroblastos sob efeito do óleo essencial de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> (A) e de extrato aquoso de <i>P. tridentatum</i> (B).	138
<b>Figura 37.</b> Avaliação dos parâmetros de cor (L*, a*, b*) nos filmes.	141
<b>Figura 38.</b> Perda de massa em cerejas ao longo do ensaio de conservação e em diferentes temperaturas.	142
<b>Figura 39.</b> Percentagem dos diferentes géneros de microrganismos isolados de medronho.	148
<b>Figura 40.</b> Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género <i>Alternaria</i> .	148

<b>Figura 41.</b> Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género <i>Cladosporium</i> .	149
<b>Figura 42.</b> Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género <i>Penicillium</i> .	150
<b>Figura 43.</b> Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género <i>Aspergillus</i> .	151
<b>Figura 44.</b> Árvore filogenética do isolado de medronho correspondente ao género <i>Rhizopus</i> .	151
<b>Figura 45.</b> Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes aos géneros <i>Aureobasidium</i> e <i>Sacrothecium</i> .	152
<b>Figura 46.</b> Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género <i>Hanseniaspora</i> .	153
<b>Figura 47.</b> Árvore filogenética do isolado de medronho correspondente ao género <i>Meyerozyma</i> .	153
<b>Figura 48.</b> Curva de calibração do ácido gálico.	196
<b>Figura 49.</b> Curva de calibração da quercetina.	196
<b>Figura 50.</b> Curva de calibração do sulfato ferroso.	197



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Compostos voláteis presentes no óleo essencial de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	24
<b>Tabela 2.</b> Teor de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante de subprodutos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	27
<b>Tabela 3.</b> Atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> em diferentes grupos de microrganismos.	28
<b>Tabela 4.</b> Compostos fenólicos presentes em extratos de <i>P. tridentatum</i> .	35
<b>Tabela 5.</b> Modalidades de desinfecção testadas no estabelecimento de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	58
<b>Tabela 6.</b> Modalidades e condições do ensaio A de BIT em <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	60
<b>Tabela 7.</b> Modalidades e condições do ensaio B de BIT em <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	61
<b>Tabela 8.</b> Modalidades e condições do ensaio A de BIT em <i>P. tridentatum</i> .	62
<b>Tabela 9.</b> Modalidades e condições do ensaio B de BIT em <i>P. tridentatum</i> .	63
<b>Tabela 10.</b> Identificação dos locais de recolha de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>P. tridentatum</i> na região da Beira Interior.	64
<b>Tabela 11.</b> Padrões de compostos fenólicos, tempos de retenção e comprimento de onda de absorvância máxima.	68
<b>Tabela 12.</b> Dados relativos à linearidade dos padrões em estudo.	70
<b>Tabela 13.</b> Resultados da quantificação a partir de calibradores padrão.	71
<b>Tabela 14.</b> Identificação e descrição das culturas bacterianas testadas neste trabalho.	78
<b>Tabela 15.</b> Métodos de conservação e tempos de análise aplicados no ensaio de conservação de medronho para avaliação da sua microbiota.	88
<b>Tabela 16.</b> Condições e reagentes do ciclo da PCR.	91
<b>Tabela 17.</b> Efeito dos diferentes tratamentos no número de novos rebentos (NnR), no comprimento do maior rebento (CmR), na taxa de multiplicação (Tm), no peso fresco (Pf) e no peso seco (Ps) no ensaio A de explantes de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	97
<b>Tabela 18.</b> Efeito dos diferentes tratamentos no número de novos rebentos (NnR), no comprimento do maior rebento (CmR), na taxa de multiplicação (Tm), no peso fresco (Pf, g), hiperhidricidade (%) e mortalidade (%) no ensaio B de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	101
<b>Tabela 19.</b> Efeito dos tratamentos do ensaio A no peso fresco e seco em <i>P. tridentatum</i> .	103
<b>Tabela 20.</b> Efeito dos diferentes tratamentos no número de novos rebentos (NnR), no comprimento do maior rebento (CmR), na taxa de multiplicação (Tm), no peso fresco (Pf) e a hiperhidricidade (%) no ensaio B em <i>P. tridentatum</i> .	104
<b>Tabela 21.</b> Identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>P. tridentatum</i> de plantas silvestres e micropropagadas.	116

<b>Tabela 22.</b> Compostos voláteis (%) do óleo essencial de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> nas diferentes fases fenológicas.	120
<b>Tabela 23.</b> Compostos voláteis (%) dos óleos essenciais de <i>Lavandula</i> spp. recolhidas nos diferentes locais da Beira Interior.	125
<b>Tabela 24.</b> Atividade antioxidante de extratos aquosos e óleos essenciais de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>P. tridentatum</i> .	130
<b>Tabela 25.</b> Concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas bactericidas (CMB) do óleo essencial de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	134
<b>Tabela 26.</b> Concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas fungicidas (CMF) do óleo essencial de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> .	136
<b>Tabela 27.</b> Propriedades mecânicas e higroscópicas dos filmes elaborados.	140
<b>Tabela 28.</b> Contagem microbiológica (log UFC/g) de grupos de microrganismos em cereja ao longo do ensaio de conservação.	143
<b>Tabela 29.</b> Contagem microbiológica (log UFC/g) de grupos de microrganismos em medronho ao longo do ensaio de conservação.	146
<b>Tabela 30.</b> Identificação de microrganismos isolados de medronho.	147
<b>Tabela 31.</b> Formulação e constituintes do meio Murashige e Skoog (MS) usado na fase de multiplicação de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>P. tridentatum</i> .	192
<b>Tabela 32.</b> Caracterização das variáveis bioclimáticas selecionadas.	194
<b>Tabela 33.</b> <i>Screening</i> da atividade antimicrobiana inibitória de extratos e OE de <i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e <i>P. tridentatum</i> .	198
<b>Tabela 34.</b> Identificação e correspondência dos microrganismos isolados de medronho com a referência ESA-IPCB e número MUM.	200

## Lista de Acrónimos e Abreviaturas

ACP	Análise de Componentes Principais
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIB	Ácido 3-indol butírico
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAP	6-Benzilaminopurina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BIT	Biorreator de imersão temporária
CH	Quitosano
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CML	Concentração Mínima Letal
CUPRAC	Capacidade antioxidante redutora do ião cobre ( <i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i> )
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	<i>2,2-difenil-1-picril-hidrazil</i>
DPPH-H	<i>2,2-difenil-1-picril-hidrazina</i>
DRBC	<i>Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar</i>
E%	Alongamento na rutura
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EAA	Equivalente de Ácido Ascórbico
EC	Equivalente de Catequina
EQ	Equivalente de Quercetina
ER	Equivalente de Rutina
ERM	Erro médio relativo
ESA-IPCB	Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação ( <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
GC-FID	Cromatografia Gasosa acoplada a Detetores de Ionização de Chama

GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa ( <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> )
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano sulfónico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Precisão acoplada a um Detetor de Díodos
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50%
IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Índice de retenção
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer marker</i>
LLOQ	Limite Mínimo de Quantificação ( <i>Lower Limit of Quantification</i> )
Lsl	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>
MEP	Metileritritol
MHA	<i>Müller-Hinton Agar</i>
MHB	<i>Müller-Hinton Broth</i>
MS	Meio de Murashige e Skoog
mT	meta-Topolin
MTS	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MUM	Micoteca da Universidade do Minho
MVA	Ácido mevalónico
MY	Módulo de Young
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHDF	Células fibroblastos ( <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i> )
NL	<i>Nodulin-like marker</i>
NO	Óxido nítrico ( <i>Nitric oxide</i> )
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
ORAC	Capacidade de absorvância do radical oxigénio ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> )
PAL	Fenilalanina amónia-liase ( <i>Phenylalanine ammonia lyase</i> )
PAM	Plantas Aromáticas e Medicinais
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>
ppm	Partes por milhão

Pt	<i>P. tridentatum</i>
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
RNS	Espécies Reativas de Azoto ( <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TAH	Transferência de átomos de hidrogénio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> )
TE	Transferência de eletrões
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente trolox ( <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> )
TPTZ	Complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina
TRAP	Poder antioxidante redutor férrico ( <i>Total Radical Trapping Parameter</i> )
TS	Tensão máxima de rutura
TSYEA	<i>Tryptone Soy Yeast Extract Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UICN	União Internacional para a Conservação da Natureza
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Luz visível
VRBG	<i>Violet Red Bile Glucose</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
XTT	<i>3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate</i>
YGP	<i>Yeast Glucose Peptone</i>



# Introdução e objetivos

---



# Introdução e objetivos

A região do Mediterrâneo é conhecida pela sua diversidade em plantas endémicas dado que o seu clima característico contribui significativamente para a ocorrência natural de espécies com elevado valor económico, desde a indústria farmacêutica e cosmética, à indústria alimentar, e química, muitas destas espécies integram o grupo de Plantas Aromáticas e Medicinais (PAM). A importância do conhecimento de espécies autóctones em Portugal, e muitas vezes em regiões rurais e desfavorecidas, é crucial para o desenvolvimento económico dessas populações, contribuindo para a valorização da economia regional e nacional, assim como para o avanço científico sobre a vegetação autóctone do país.

O setor das PAM em Portugal é relativamente recente e ainda se encontra em desenvolvimento, tendo tido um impulso em número de produtores no início do século XXI, resultado das evidências científicas, dos trabalhos de investigação com as espécies endémicas e produzidas em Portugal. A diversificação dos estudos nas espécies autóctones ou endémicas portuguesas pode contribuir para acelerar a consolidação deste setor.

As Farmacopeias são referenciais bastante importantes em diversas áreas científicas, pois contribuem para o reconhecimento da utilização de PAM e as suas características biológicas, nomeadamente na área farmacêutica/terapêutica. A contribuição de estudos sobre plantas medicinais é fundamental para a realização destes referenciais, isto é, para que uma espécie possa estar incluída nas Farmacopeias são necessários bastantes estudos e conhecimento da planta em causa.

No sentido de preservar e conservar as espécies, a sua cultura em sistemas de propagação *in vitro* tem um papel importante, pois assegura de forma responsável a manutenção do património vegetal natural. A conservação dos recursos genéticos das espécies vegetais é de extrema importância para a manutenção da biodiversidade. Infelizmente com as alterações climáticas que presenciamos e com a ameaça constante de incêndios, é urgente que sejam conservados exemplares das espécies autóctones. Na região interior de Portugal crescem espontaneamente endemismos valiosos, nomeadamente espécies como *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (conhecida pelo nome vulgar de rosmaninho-menor) e *Pterospartum tridentatum* (comumente conhecida como carqueja), ambas muito usadas na medicina tradicional [1]. As referidas espécies são consideradas PAM devido ao potencial terapêutico que apresentam através da produção de metabolitos secundários. Ambas as espécies são descritas na medicina tradicional, a *L. stoechas* subsp. *luisieri* usada no tratamento de

## Introdução e objetivos

---

problemas de circulação sanguínea, problemas de pele, azia, enjoo, como descongestionante nasal e sedativo [1]; no caso da *P. tridentatum* era usada no tratamento de problemas de digestão e nervosismo, como diurético e tônico [2]. Sabe-se hoje que os produtos do metabolismo secundário das plantas são compostos com um poder biológico muito importante em diversas áreas de aplicação, nomeadamente ao nível terapêutico e alimentar, contribuindo para uma alimentação saudável, com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas [3]. De entre os compostos bioativos produzidos no metabolismo secundário das plantas, a classe dos compostos fenólicos e terpenos são os mais estudados devido ao seu potencial biológico [4, 5].

A região da Beira Interior também pode ser considerada como um “hotspot” de biodiversidade, quer ao nível de endemismos de PAM, quer ao nível de produção frutícola. Esta região é conhecida pela sua peculiar produção em cereja, assim como a presença abundante e espontânea de medronheiros, sendo o medronho também bastante valorizado. A cereja é um fruto com elevada procura temporal, devido não só às suas qualidades nutricionais, mas também devido ao seu sabor característico. No entanto, é um fruto perecível que teria uma maior valorização se possuísse melhores possibilidades de conservação pós-colheita.

A crescente preocupação com a poluição e desperdício alimentar leva a que sejam desenvolvidas alternativas para esta problemática. Na tentativa de colmatar a perecibilidade de alguns alimentos, nos últimos anos, têm vindo a ser desenvolvidos revestimentos/filmes edíveis para prolongar o tempo de vida útil, nomeadamente de frutas. Adicionalmente, à proteção mecânica e física que os revestimentos à base de biopolímeros conferem nos alimentos, a adição de compostos bioativos presentes em extratos/óleos essenciais de plantas contribui com propriedades antioxidante e antimicrobiana [6].

O aumento do desperdício alimentar tem vindo a ser noticiado nos últimos anos, devido não só à preocupação geral em relação ao combate da fome no mundo, mas também ao impacto na segurança e qualidade alimentar, no desenvolvimento económico e no meio ambiente. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), aproximadamente um terço das partes comestíveis dos alimentos produzidos para consumo humano se perde ou é desperdiçado globalmente, o que se traduz em cerca de 1,3 bilhões de toneladas por ano [7]. As causas do desperdício alimentar podem ter diversas origens, desde a produção, processamento, distribuição e armazenamento, até às práticas adotadas pelos consumidores dos diferentes países.

## Introdução e objetivos

---

De acordo com a mesma publicação da FAO, as perdas na produção agrícola devem-se em grande parte à classificação pós-colheita de frutas e hortaliças causada pelos padrões de qualidade estabelecidos pelos retalhistas, no entanto, o desperdício causado pelos consumidores também é substancial com 15 a 30% das compras [7]. Independentemente do nível de desenvolvimento económico e consciencialização dos consumidores, o desperdício alimentar deve ser reduzido. Com os alertas de poluição e desperdício de recursos na produção torna-se importante desenvolver medidas que contribuam para a redução de desperdício em qualquer parte da cadeia de abastecimento alimentar.

Com este trabalho pretende-se efetuar a caracterização e valorização das espécies *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *P. tridentatum* de plantas silvestres e do seu material vegetal *in vitro*. Para a realização de um estudo mais completo das espécies referidas, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a propagação *in vitro* em sistemas convencionais e em biorreatores de imersão temporária;
- Estudar a variação da composição química, nomeadamente o perfil fenólico de extratos e o perfil volátil dos óleos essenciais ao longo do ciclo vegetativo das espécies silvestres;
- Avaliar as atividades biológicas, em termos de atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e óleo essencial, assim como a avaliação da citotoxicidade;
- Desenvolver e caracterizar revestimentos bioativos com incorporação de extratos e óleo essencial;
- Estudar a aplicação de revestimentos bioativos na conservação de frutos frescos.



# Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

---



## 1. Compostos bioativos e atividades biológicas

### 1.1. Óleos essenciais

Segundo a definição da Farmacopeia Europeia [8], o óleo essencial (OE) é definido como um produto natural, odorífero, de composição complexa, obtido a partir de material vegetal por hidrodestilação, destilação por arraste a vapor ou por um processo mecânico sem aplicação de calor, neste último caso aplicado a frutos do género *Citrus*. Esta definição exclui todos os produtos obtidos de métodos que não os referidos, como a extração com solventes e extração com fluídos supercríticos. Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos voláteis, predominando a classe dos terpenos. Não é regra, mas geralmente, são caracterizados por possuírem um a três compostos majoritários (20 a 70%), comparativamente aos restantes compostos que poderão estar presentes em quantidades vestigiais [9]. Como compostos voláteis que são, os OEs são insolúveis em água, e solúveis em diversos solventes apolares e normalmente são incolores ou amarelados. No caso do OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* possui um tom amarelado.

Os componentes dos OEs são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, sendo armazenados em estruturas epidérmicas secretoras especializadas. De entre as estruturas de armazenamento de OEs, os tricomas glandulares ou secretores estão distribuídos em diferentes órgãos aéreos da planta. Na família Lamiaceae os tricomas glandulares podem ser de dois tipos, peltados ou capitados, diferenciando-se entre si na estrutura e na forma de secreção [10, 11]. Os metabolitos secundários produzidos pelas plantas não são essenciais ao seu próprio crescimento e desenvolvimento. Na planta os metabolitos secundários estão relacionados com o mecanismo de defesa e comunicação da planta como resposta a condições de stresse, ataques de herbívoros e/ou a agentes patogénicos, assim como em funções de atração de insetos que favorecem a dispersão de sementes e de pólen, e interações alelopáticas [9, 12]. Guitton *et al.* (2018) estudaram alguns compostos que estão diretamente envolvidos na atração de polinizadores e repelentes de insetos como o linalol e o acetato de linalilo; a cânfora e 1,8-cineol demonstraram intervir na defesa da planta contra agentes de stresse; ou compostos de necrodol como repelente para insetos [13]. São diversos os fatores que influenciam o metabolismo secundário, e podem dividir-se em fatores abióticos e bióticos. Os fatores bióticos referem-se a características intrínsecas à planta, tais como fatores genéticos e ontogenéticos, mas também a componentes vivos do ecossistema, como ataques de herbívoros e patogénicos ou simbioses com organismos micorrízicos. Os fatores abióticos relacionam-se com as condições

ambientais e ecológicas, como a altitude, pluviosidade, temperatura, assim como as características fitossociológicas [14]. Para além do seu papel fundamental na planta, os OEs têm diversas aplicações em diferentes áreas, tais como ao nível farmacêutico, cosmético, sanitário, perfumaria e alimentar. A maioria dos constituintes dos OEs pertencem à classe dos terpenos. O OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* é caracterizado por apresentar elevadas concentrações de monoterpenos e sesquiterpenos nas suas formas de hidrocarbonetos e/ou oxigenados. Os terpenos caracterizam-se por unidades de isopreno ( $C_5$ ) e são sintetizados por duas vias (Figura 1): a do ácido mevalónico (MVA) e a do metileritritol (MEP) [15].

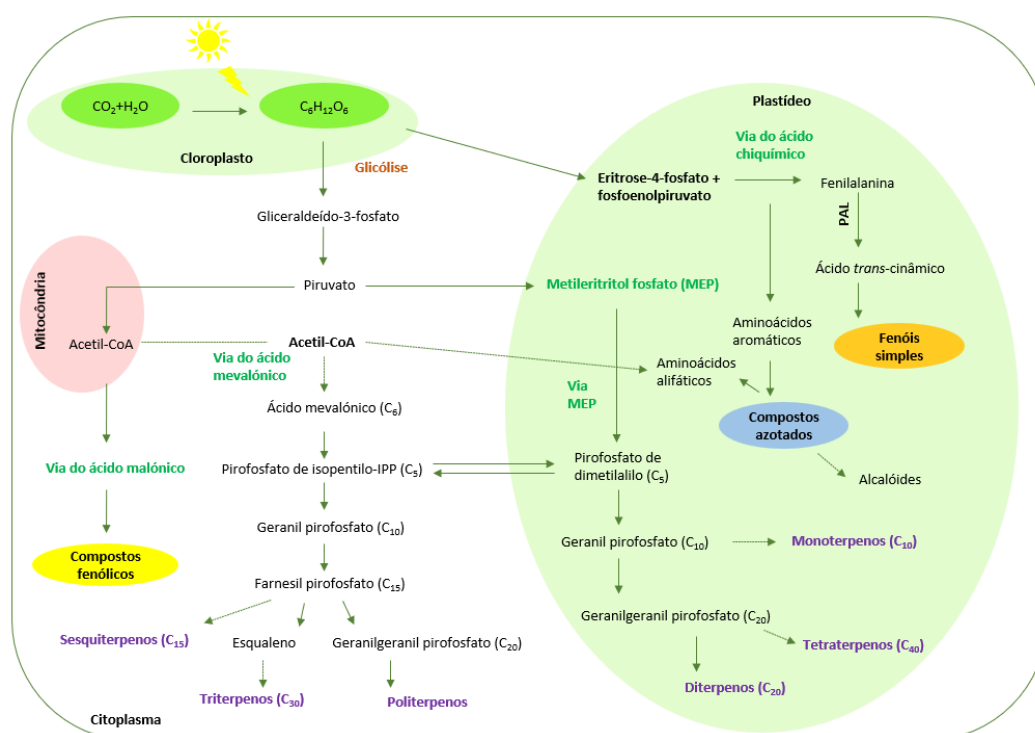


Figura 1. Esquema das vias de biossíntese dos metabolitos secundários (Adaptado de Mahajan et al. 2020 [15]).

## 1.2. Compostos não voláteis

Para além do importante papel que o OE tem na própria planta e os seus valiosos constituintes, as PAM também produzem outras classes de compostos, entre eles os compostos fenólicos, desde os ácidos fenólicos aos flavonóides. Normalmente este tipo de compostos são encontrados em extratos da planta obtidos com solventes de diferentes polaridades. Os extratos obtidos em água denominam-se de extratos aquosos, podem, porém, ser obtidos pela combinação em diferentes proporções de água e outros solventes polares, ou a extração exclusivamente com o uso de solventes.

A maceração do material vegetal com o líquido de extração é a mais usual, no entanto a aplicação de outras metodologias usando por exemplo os ultrassons, micro-ondas ou a extração por fluídos supercríticos também têm vindo a ser reportados na extração de compostos fenólicos [16-18]. Os parâmetros analíticos são fatores importantes para a eficácia da extração, tais como o solvente de extração, a aplicação de temperatura, e o tempo, influenciando por isso a concentração e tipo de compostos extraídos.

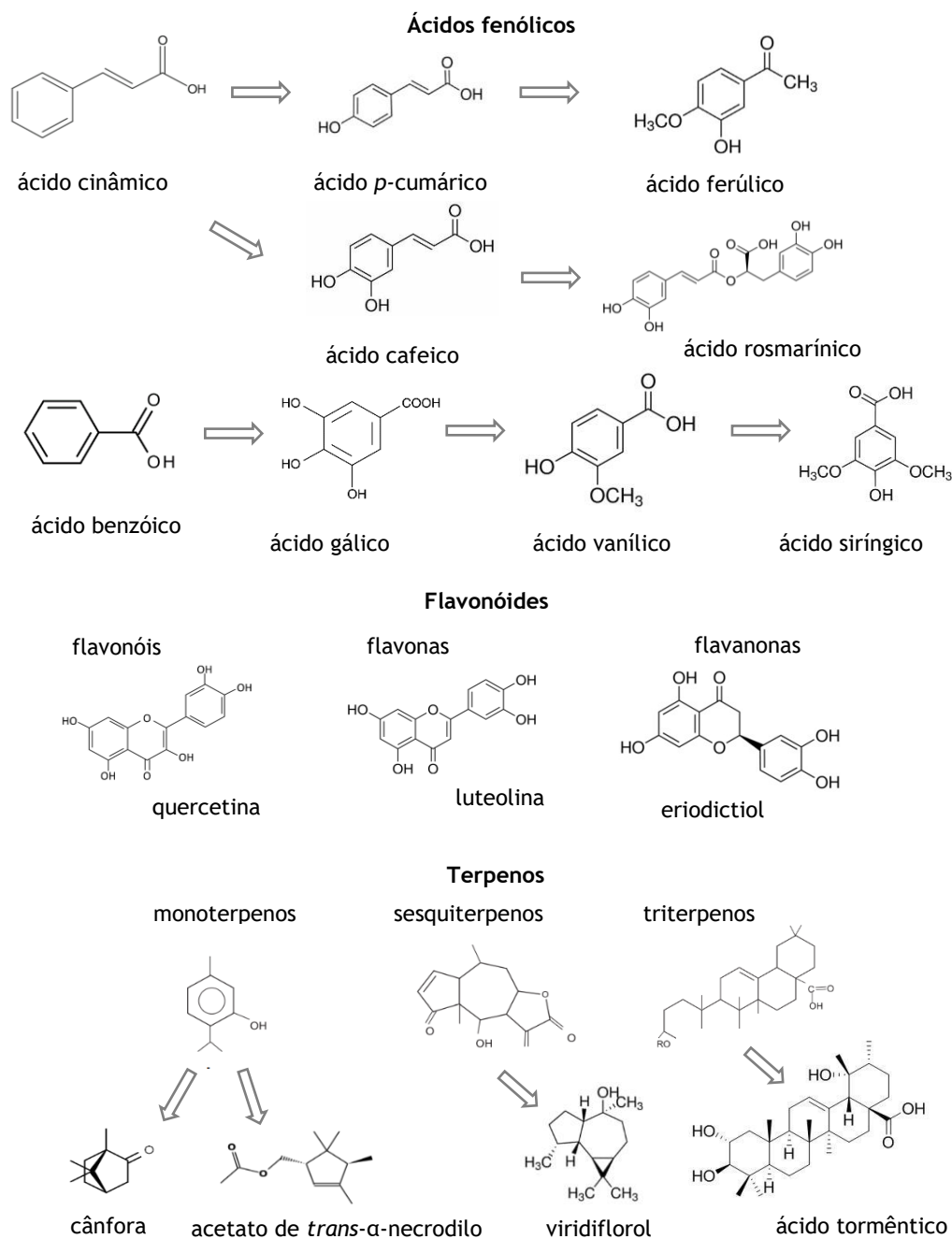
Na planta, os compostos fenólicos estão distribuídos na maioria dos tecidos vegetais, nos frutos, sementes, flores, folhas, caules e raízes e são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo [19]. De acordo com o número de anéis aromáticos e com outros elementos estruturais de ligação, os compostos fenólicos podem ser classificados em ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, estilbenos, lignanos e taninos [20]. Na natureza os compostos fenólicos podem estar presentes na sua forma livre, no entanto, encontram-se muitas vezes associados a açúcares ou proteínas. As vias de síntese (Figura 1) do ácido chiquímico e do ácido malónico são as principais responsáveis pela biossíntese dos precursores dos compostos fenólicos [15]. Estes compostos são produzidos durante o crescimento da planta e/ou sob condições de stresse como infeções, feridas ou exposição elevada a raios UV [21, 22].

Ao longo dos últimos anos o potencial biológico destes compostos tem vindo a ser confirmado, nomeadamente em propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias [23]. A determinação do teor de fenóis através do método do reagente de Folin-Ciocalteu é descrita na Farmacopeia Europeia. As reações colorimétricas em espectrofotómetro de UV/VIS são comumente usadas para a quantificação de compostos fenólicos, nos extratos de plantas estes compostos reagem com reagentes redox, como é o caso do reagente de Folin-Ciocalteu. Este reagente é constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico (de cor amarela) os quais na presença de agentes redutores (compostos fenólicos) e em meio alcalino formam um complexo azulado (complexo fosfotungsténio-fosfomolibdénio) que pode ser quantificado por espectrofotometria [24]. Para além das vantagens do método, rapidez, aplicável na rotina do laboratório e económico, possui algumas desvantagens como por exemplo o facto de não ser seletivo para os compostos fenólicos, mas outros constituintes da matriz de natureza não fenólica, como açúcares redutores ou o ácido ascórbico, podem contribuir para a capacidade redutora da reação.

Os ácidos fenólicos (Figura 2) são produzidos na planta através das vias do ácido malónico e do ácido chiquímico, sendo que nesta última têm como precursores a

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

fenilalanina ou tirosina e podem ser divididos em dois grupos: derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico [25].



**Figura 2.** Principais estruturas químicas e compostos das diferentes classes de compostos bioativos presentes nas plantas.

O ácido hidroxibenzóico (C6-C1) é derivado do ácido benzóico e é encontrado conjugado com açúcares ou ácidos orgânicos, enquanto o ácido hidroxicinâmico (C6-C3) é derivado do ácido cinâmico e produzido como éster simples conjugado com açúcares ou ácidos hidroxicarboxílicos [26]. Os ácidos gálico, vanílico, siríngico e salicílico são alguns exemplos de ácidos hidroxibenzóicos presentes nas plantas. Por

outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos surgem de forma mais abrangente nas plantas, como os ácidos cafeico, coumárico, ferúlico e rosmarínico [20, 26].

Para além dos ácidos fenólicos, o grupo dos flavonóides (Figura 2) também é bastante relevante nas plantas, estando identificados mais de 4500 compostos [27]. Na planta estes compostos traduzem-se em pigmentos, nomeadamente responsáveis pelas cores das flores. São moléculas de baixo peso molecular e estruturalmente caracterizam-se por possuírem 15 carbonos, com arranjo C6-C3-C6 com diversas substituições e insaturações, originando diferentes subclasses. Tendo em conta os possíveis rearranjos, os flavonóides podem ser classificados como flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas e chalconas. À semelhança dos ácidos fenólicos, os flavonóides podem ser biossintetizados pela via do ácido chiquímico e do ácido malónico. Os flavonóides podem apresentar-se na sua forma livre (forma aglicona) ou como glicósidos (*O*-heterósidos ou *C*-heterósidos) [28].

### 1.3. Extração de compostos bioativos

Ao longo dos últimos anos tem-se assistido à crescente investigação de constituintes químicos naturais e das suas potenciais atividades ao nível terapêutico, alimentar, cosmético e agrícola. A procura por produtos naturais tornou-se quase uma exigência por grande parte dos consumidores, assim como os conceitos de redução do desperdício alimentar, a eficiência nos processos industriais e produtivos tem vindo a ter grandes impactos no direcionamento de investigações científicas e no desenvolvimento destas áreas. A primeira etapa baseia-se na recolha de material vegetal que pode ser silvestre (recolhido na natureza), produzido *ex situ* ou *in vitro*. A recolha das plantas na natureza deve seguir as Boas Práticas Agrícolas e de Recolha recomendadas pela WHO (2003), onde a principal preocupação prende-se com a preservação da espécie. Após colheita ou recolha, as plantas podem ser armazenadas em condições de congelação ou secas sob condições de ventilação, sem humidade do ar e sem exposição à luz. O armazenamento das plantas até à sua utilização deve ser realizado em condições adequadas de modo a evitar perdas nos seus constituintes ou contaminações fúngicas ou de insetos [29].

O estudo dos compostos bioativos de uma determinada planta inicia-se com o processo de extração, sendo este uma etapa crucial para a obtenção de compostos. O solvente de extração irá influenciar o tipo de compostos que se obtém no extrato final, pois a utilização de solventes polares, como a água, etanol e metanol irão extrair compostos hidrofílicos, enquanto a utilização de solventes orgânicos apolares, como o hexano ou diclorometano, irá ter um poder de extração de compostos hidrofóbicos. Adequa-se a

extração de compostos fenólicos com solventes polares, o uso de uma mistura de água com solvente orgânico (metanol, etanol, entre outros) é frequentemente reportado e tem apresentado bons resultados [26]. Por outro lado, quando o objetivo é a extração de compostos de polaridade reduzida, o uso isolado de solventes como o hexano, diclorometano, clorofórmio, entre outros, é muitas vezes aplicado. Contudo, de acordo com o objetivo final de aplicação ou de estudo, assim deve ser a seleção dos solventes de extração. A utilização de extratos a nível alimentar deve ser rigorosa no uso de solventes orgânicos devido à sua toxicidade, mesmo após a etapa de evaporação do solvente de extração, a confirmação da ausência de solventes tóxicos deve ser assegurada.

Para além da seleção do solvente, a metodologia usada na extração também poderá influenciar a eficiência do processo, sendo as mais usuais a maceração, a decocção, a hidrodestilação e a extração em *Soxhlet*. Apesar destas metodologias convencionais continuarem a ser aplicadas, algumas desvantagens são conhecidas como os elevados tempos de extração, a decomposição térmica de compostos termolábeis e a baixa seletividade dos compostos extraídos. Neste sentido, na tentativa de superar estes inconvenientes, novas metodologias ou chamadas de metodologias “verdes”, têm vindo a ser reportadas na extração de compostos como a aplicação de ultrassons, micro-ondas, campos elétricos e a extração por fluidos supercríticos [30]. A aplicação de ultrassons e micro-ondas pode reduzir o tempo de extração, reduz o consumo de solvente, assim como, o consumo de energia comparativamente a um método convencional, no entanto, a deterioração de compostos devido à exposição de radiações não está completamente ultrapassada nestas metodologias [31, 32]. A extração por fluido supercrítico é das metodologias mais emergentes no campo da extração de compostos bioativos, consistindo na extração destes metabolitos por um solvente num estado supercrítico, atingido através da combinação de baixas pressões e temperatura. Um fluido no estado supercrítico tem a vantagem de possuir a solubilidade semelhante à de um líquido e a difusividade semelhante à de um gás, podendo dissolver uma vasta gama de compostos naturais [33]. O princípio de extração baseia-se na passagem do fluido supercrítico pela matriz sólida (material vegetal seco e/ou triturado) dissolvendo os compostos extraídos e transportados sob difusão para o separador do equipamento, sendo o fluido separado dos compostos extraídos pela diminuição de pressão, aumento de temperatura ou a combinação de ambas [34]. O solvente mais usual é o dióxido de carbono, por se tratar de uma substância não tóxica nas concentrações usadas, abundante e de baixo custo, não inflamável e inerte do ponto de vista químico. O dióxido de carbono no estado supercrítico é considerado um

solvente não polar, possuindo seletividade e potencialidade na extração de compostos termolábeis. Apesar da baixa polaridade e tamanho das moléculas extraídas, as moléculas de tamanho maior ou de natureza polar podem ter de ser extraídas com a ajuda de um co-solvente, aumentando o rendimento da extração [35].

### 1.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante traduz-se no potencial que uma substância apresenta para captar ou neutralizar radicais livres no meio. Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões com um ou mais eletrões desemparelhados, que os tornam muito instáveis e capazes de reagir com outras moléculas [36]. Os radicais livres e as suas espécies reativas são resultados de diversos processos biológicos das células, como a produção do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o óxido nítrico (NO), nomeadamente nas mitocôndrias durante a fosforilação oxidativa, no citocromo P450 por enzimas oxidantes, em processos de inflamação, na eliminação de células cancerígenas por linfócitos e macrófagos citotóxicos, assim como na apoptose de células. Por outro lado, fatores externos podem promover a produção de radicais livres, como as radiações ionizantes (UV, raios-X e raios- $\gamma$ ), poluentes atmosféricos, fumo de tabaco, pesticidas, entre outros [37]. No organismo humano os radicais livres e as Espécies Reativas de Oxigénio e Azoto (ROS e RNS) estão na origem de diversas doenças, tais como aterosclerose, diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas e alguns tipos de cancro [38, 39]. A correspondência entre os radicais livres e o estado de doença pode ser explicada pelo stresse oxidativo, que resulta do desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a produção de moléculas pró-oxidantes. Esse desequilíbrio pode levar a danos em diversas biomoléculas, como o ADN, ARN, proteínas, lípidos, hidratos de carbono e enzimas, contribuindo para o desencadeamento de patologias [39]. A atividade antioxidante pode ocorrer de forma enzimática, através das enzimas endógenas (superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase), ou através de moléculas não enzimáticas, como os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e carotenóides), vitaminas e minerais. Os antioxidantes podem atuar por diversos mecanismos: pela decomposição de peróxidos, sequestrando radicais e/ou quelantes de iões metálicos [36]. Consequentemente, a atividade antioxidante deve ser medida através de diferentes mecanismos de ação antioxidante. Com base no mecanismo de inativação envolvido, os principais métodos de avaliação da capacidade antioxidante são divididos em duas categorias: pela reação da transferência de átomos de hidrogénio (TAH) e pela transferência de eletrões (TE). Contudo, ambos os mecanismos podem ocorrer em simultâneo, o que por vezes torna difícil a sua diferenciação [38].

Entre os métodos mais utilizados, o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (poder antioxidante redutor férrico), CUPRAC (capacidade antioxidante redutora do íon cobre) e o TEAC (capacidade antioxidante equivalente trolox) são considerados métodos de TE, apesar de alguns autores considerarem ser métodos que utilizam ambos os mecanismos de ação (TE e TAH). Os métodos considerados pela sua reação de TAH são o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, ORAC (capacidade de absorvância do radical oxigênio), TRAP (poder antioxidante redutor férrico) e o TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) [38, 40].

Os métodos de avaliação da atividade antioxidante testados neste trabalho foram o DPPH, o FRAP e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. O método do DPPH é amplamente usado devido a ser um método cuja reação ocorre de forma rápida e simples. O princípio do método consiste na captura do radical DPPH, radical estável e de coloração púrpura (com um máximo de absorção a 515-517 nm), através de antioxidantes presentes na solução. Com a ação dos antioxidantes o DPPH é reduzido a DPPH-H (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), uma hidrazina incolor que conseqüentemente origina um decréscimo na absorção, passando de cor violeta forte para amarelo. As absorvâncias são lidas após 30 minutos de iniciada a reação. A percentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória 50% ( $IC_{50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $IC_{50}$ , e maior a sua atividade antioxidante [41].

O método FRAP baseia-se na capacidade dos antioxidantes reduzirem o complexo amarelado  $Fe^{3+}$ -(TPTZ) $_2^{3+}$  (complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina) ao complexo de coloração azul  $Fe^{2+}$ -(TPTZ) $_2^{2+}$ , através da medição da absorvância a 595 nm [38]. Esta alteração de cor na presença de antioxidantes (redutores) é comparada com uma solução padrão de íons ferrosos (sulfato ferroso), sendo os resultados expressos em equivalentes da solução padrão usada.

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico baseia-se na reação de transferência de átomos de hidrogênio e consiste na avaliação da inibição da peroxidação lipídica mediada por radicais livres [42]. Especificamente, o método avalia a atividade antioxidante a partir da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno, de cor amarela-laranja, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (radicais peróxido do ácido linoleico) que oxidam o  $\beta$ -caroteno presente na emulsão. Durante o teste, o ácido linoleico sofre a oxidação induzida termicamente a 50°C, os radicais livres gerados atacam o cromóforo do  $\beta$ -caroteno, resultando numa descoloração da solução. Na

presença de antioxidantes, estes previnem a degradação do  $\beta$ -caroteno, competindo com este pelos radicais livres, mantendo assim a sua cor característica. A manutenção da cor pode ser monitorizada espectrofotometricamente a 470 nm após 2 h do início da reação [43].

### 1.5. Atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, o uso de produtos naturais como antimicrobianos tem vindo a ser investigado, não só na área clínica, devido à crescente preocupação com a multirresistência de bactérias aos antibióticos, mas também na área alimentar, com o objetivo de assegurar a segurança alimentar e contribuir para a redução do desperdício alimentar. Segundo a FAO, em 2022 o desperdício alimentar após colheita e antes de chegar aos supermercados estava estimado em 13,3% [44]. Na área alimentar têm sido reportados estudos com a aplicação em produtos alimentares e/ou embalagens ativas, baseados em diferentes formas de aplicação dos OEs e/ou extratos de plantas. A estes subprodutos é reconhecido o seu potencial de inibir microrganismos patogénicos ou de deterioração de alimentos, nomeadamente os OE são os mais estudados pelo seu elevado poder antimicrobiano [5]. O potencial antimicrobiano traduz-se na capacidade de uma substância inibir e/ou matar um microrganismo.

Por forma a padronizar as metodologias de análise da atividade antimicrobiana, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) definiu protocolos normalizados para os métodos de diluição em agar e de microdiluição. Os métodos mais utilizados são a difusão em disco, difusão em agar e diluição em caldo [45]. Apesar da padronização dos métodos, estes podem ser afetados por alguns fatores como a concentração e volume do inóculo, a fase de crescimento do microrganismo a testar, a composição do meio de cultura, o tempo e temperatura de incubação, assim como a concentração e volume do agente antimicrobiano a avaliar [46]. Inicialmente, os testes preliminares de atividade antimicrobiana baseiam-se em métodos de difusão em disco ou em agar, caso o agente antimicrobiano apresente ação contra o microrganismo em estudo, é determinada a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima letal (CML). Estes parâmetros podem ser determinados por métodos de macro- ou microdiluição em agar ou meio líquido. A CMI é definida como a menor concentração em estudo que inibe o microrganismo, enquanto a CML é a menor concentração do agente antimicrobiano que mata a maioria do inóculo (99,9%) [45, 46]. A hidrofobicidade dos constituintes dos OEs permite-lhes misturarem-se com os lípidos da membrana celular destruindo a sua permeabilidade seletiva. Uma vez no interior da célula, a presença do OE induz a danos no citoplasma e organelos celulares, resultando no desequilíbrio da pressão osmótica intracelular, podendo levar à morte

da célula [47]. Considerando a complexidade de diferentes grupos de compostos químicos presente nos OEs, acredita-se que não exista apenas um mecanismo específico de ação, mas sim vários alvos na célula ou estes ocorrerem de forma sequencial [46]. Outro aspeto importante na ação antimicrobiana de OEs é que não está sempre associada aos constituintes majoritários, mas muitas vezes ao efeito sinérgico entre os constituintes. A conjugação destes fatores atribui aos OEs a ausência, relatada até à data, de resistência ou adaptação dos microrganismos [9, 48].

### 1.6. Atividade citotóxica

Os OEs e extratos de plantas são considerados produtos naturais e estão em muitos contextos associados aos efeitos terapêuticos. No entanto, devido ao crescente aumento de estudos, sabe-se que em alguns casos a sua composição e, principalmente, a sua concentração pode ter um efeito tóxico no organismo humano [9]. A citotoxicidade de uma determinada molécula pode ser avaliada através da viabilidade e proliferação celular. A viabilidade celular é definida como o número de células saudáveis numa população após o contacto com o OE, sendo importante conhecer a sua densidade celular, isto é, o número de células. A proliferação celular é um indicador determinante para a compreensão dos mecanismos de ação de determinados genes, proteínas e/ou vias envolvidas na sobrevivência ou morte celular após exposição a agentes tóxicos [49]. A citotoxicidade de uma determinada substância pode referir-se ao seu efeito tóxico e, por isso, ter capacidade de matar as células, ou ter efeitos citostáticos, que se traduzem na inibição do crescimento celular. Alguns autores propuseram que o modo de ação dos OEs/extratos sob a proliferação celular está relacionado com a capacidade de ligação às proteínas da membrana das células. No entanto, a variação na atividade citotóxica do mesmo OE/extrato em diferentes linhas celulares sugere uma ação tóxica inespecífica, sendo o seu modo de ação inconclusivo e dependente da célula alvo [50].

Geralmente, os métodos usados para determinar a viabilidade celular são também comuns para a deteção da proliferação celular. Existem diversos métodos baseados nas funções celulares, como a permeabilidade da membrana celular, atividade enzimática, adesão celular, produção de coenzimas, produção de ATP e atividade de captação de nucleótidos. Estes métodos podem ser classificados em diferentes categorias, sendo os de exclusão de corantes, que se baseiam na coloração de células mortas (MTT, MTS, Alamar Blue, XTT), os mais comumente usados [49]. A seleção do ensaio de viabilidade deve ter em consideração alguns fatores como o tipo de célula, as condições de cultura, o custo do método e a duração da exposição das células ao agente tóxico.

Apesar dos testes da avaliação citotóxica *in vitro* indicarem o potencial citotóxico que um determinado OE ou extrato apresenta sobre a linha celular em causa, outros fatores biológicos devem ser considerados na aplicação *in vivo*, como o transporte dos compostos ativos, a biotransformação, a reabsorção, entre outros fatores biológicos que não são considerados nos ensaios *in vitro*.

Neste trabalho foi usado o teste MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), este baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente ativas converterem a solução aquosa de cor amarela do substrato MTT num sal formazano, formado por cristais com uma coloração azul-escuro/roxo e insolúveis em água. A produção do sal formazano é proporcional ao número de células viáveis [50, 51]. O teste do MTT tem vindo a ser usado em diversas linhas celulares, a utilização deste teste para a avaliação do crescimento e sobrevivência celular confere algumas vantagens pelo baixo custo, rapidez, simplicidade e segurança que lhe estão associados [52].

## 2. *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*

### 2.1. Taxonomia

A *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira pertence à família Lamiaceae (=Labiatae), género e subgénero *Lavandula*, secção *Stoechas* Ging. No género *Lavandula* reconhecem-se cerca de 41 espécies amplamente distribuídas pela região do Mediterrâneo e Macaronésia e, menos frequente, no Norte de África e sul da Ásia [53]. Este género apresenta uma taxonomia controversa, tendo ao longo dos anos diversos autores considerado diferentes espécies e subespécies e com isso adotado diferentes *taxa*.

A *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl) identificada e descrita pela primeira vez por Rozeira (1949) como *Lavandula luisieri* e como uma variedade de *L. stoechas*. Mais tarde, em 1964, foi identificada pela mesma entidade como subespécie, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* [53]. Em 1979, foi classificada como espécie por Rivas-Martínez, tratamento também adotado por Franco (1984), na *Nova Flora de Portugal* [54]. Segundo este referencial, em Portugal, nomeadamente na região da Beira Interior dominam o rosmaninho-maior (*Lavandula pedunculata*) e o rosmaninho-menor (*Lavandula luisieri*). No entanto, de acordo com o último referencial morfológico e taxonómico publicado, a *Flora Iberica* (2010), nesta região apenas são referenciadas as espécies de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* [55]. Em

2004, Upton and Andrews, na sua publicação “The genus *Lavandula*” [53], corroboram a tese de Franco (1984) pelo que referem que a subespécie existente nesta região é *Lsl*, atribuindo a ocorrência de *L. stoechas* subsp. *stoechas* apenas ao sul do país. O *taxon Lavandula luisieri* é atualmente classificado como um nome sinónimo de *L. stoechas* subsp. *luisieri* (The plant list [Lavandula luisieri \(Rozeira\) Rivas Mart. – The Plant List](#), acessado a 24/11/22). Neste trabalho adotou-se a nomenclatura baseada no último referencial morfológico e taxonómico publicado, a *Flora Iberica* [55].

Por ordem cronológica, seguem-se os *taxa* utilizados por diferentes autores para designar esta espécie:

- † *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira) [56];
- † *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martínez [54];
- † *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira) [57];
- † *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira) [55].

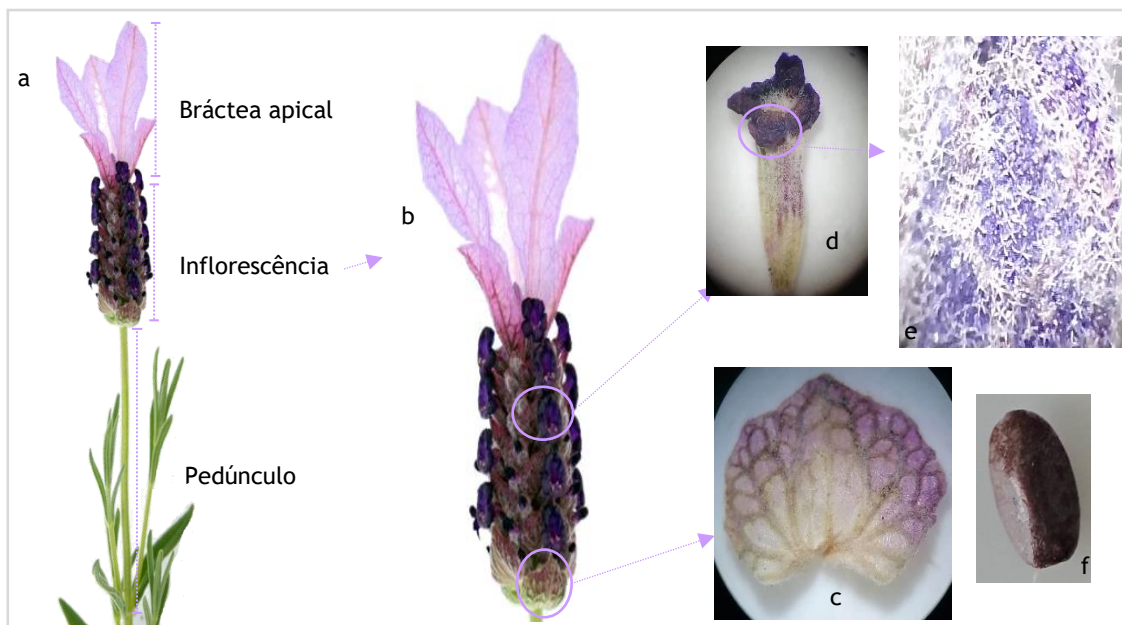
As espécies do género *Lavandula* são consideradas plantas aromáticas e medicinais devido não só à produção de óleos essenciais, mas também às suas propriedades terapêuticas reportadas na medicina tradicional. A infusão das partes aéreas desta espécie era usada na medicina tradicional no tratamento de problemas de circulação sanguínea, de pele, no tratamento da azia e enjoo, e como descongestionante nasal e sedativo [1]. Ao longo dos últimos anos a taxonomia de algumas destas espécies tem vindo a ser atualizada tendo em conta o aumento dos estudos quer ao nível químico e quer ao nível genético, os quais permitiram desvendar diferenças entre (sub)espécies. Paralelamente a estes conceitos, a estrutura morfológica é de extrema relevância pois é a primeira característica visível aquando da identificação silvestre. Devido ao elevado polimorfismo que é característico deste género e capacidade de hibridação entre as espécies, é importante que sejam preservados e caracterizados todos os aspetos morfológicos de cada (sub)espécie.

### 2.2. Morfologia e distribuição

A morfologia no género *Lavandula* é bastante variável, esta variação é congruente ao nível da classificação seccional e também ao nível geográfico das espécies, contribuindo para uma significância taxonómica. As particularidades morfológicas da família Lamiaceae estão bem representadas no género *Lavandula*, podendo-se salientar as hastes quadradas, folhas opostas e as flores que possuem dois lábios com cinco pétalas, atribuindo a este aspeto morfológico a designação vulgar da família das labiadas [55]. Os parâmetros morfológicos são cruciais para a identificação de

espécies, contudo deve-se ter em consideração o efeito das condições geográficas, climáticas ou de cultivo. Condições de stresse também podem afetar alguns parâmetros morfológicos, tais como o tamanho da planta, das folhas, das inflorescências, o indumento, assim como a produção de óleo essencial [53].

As espécies do género *Lavandula* caracterizam-se por serem pequenos arbustos, podendo a sua altura variar entre 25 e 150 cm. As folhas de *Lsl* são de formato linear a elípticas com as margens revolutas, verde-acinzentadas, de 2-3 x 0,3-0,5 cm, com indumento denso com pelos branco-acinzentado curtos e ramificados. A distância entre o pedúnculo e a inflorescência (Figura 3a) pode variar de (0)-2 a 6 cm, sendo este um parâmetro que pode suscitar dúvidas na distinção desta subespécie e a *L. stoechas* subsp. *stoechas* (1-3 cm) e/ou a *L. pedunculata* (5-30 cm), devido à proximidade dos limites máximos e mínimos definidos nas diferentes floras morfológicas [53-55].



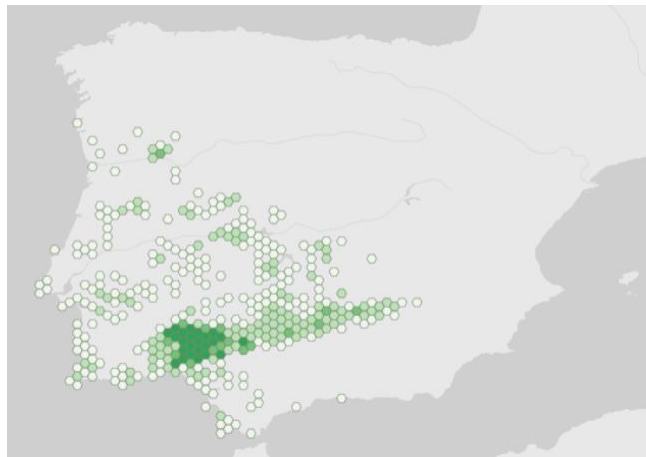
**Figura 3.** Aspectos morfológicos de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Segmento floral (a); inflorescência (b); bráctea fértil (c); cálice e corola (d); indumento com pelos estrelados (e); núcula (f).

As espigas ou inflorescências principais (Figura 3b) são cilíndricas, com dimensões 3-5(-6) x 1-1,5 cm, as espigas secundárias são mais pequenas (1,5-2 cm). No ápice da espiga, encontram-se as brácteas apicais ou brácteas inférteis, normalmente 4 (podendo ser de 2 a 6), de forma elíptica a espatulada, com dimensões de 2,5-3,5 x 0,6-0,8 cm, muitas vezes de cor violeta a púrpura. As brácteas férteis (Figura 3c) apresentam uma dimensão de 6-10 x 7-10 mm, de formato ovado, com ápice agudo a acuminado, ligeiramente mais comprida do que o cálice, de indumento aveludado com pelos curtos e ramificados, apresentam veios proeminentes, com glândulas sésseis,

quase sempre de cor violeta-púrpura. O cálice (Figura 3d) apresenta quatro lóbulos triangulares, por vezes a sua margem apresenta um indumento muito denso, a esparso nos cálices mais maduros, com pelos brancos e curtos, com muitas glândulas sésseis [55].

A corola ou flor (Figura 3d) bilabiada apresenta uma cor azulada-violeta escura e forte indumento na garganta, de pelos estrelados (Figura 3e). As flores são hermafroditas e com simetria zigomórfica. As núculas ou sementes (Figura 3f) incluídas dentro do cálice apresentam uma dimensão de 1,6-1,8 x 1,1-1,3 mm, de forma elipsóide, subtrigonais por vezes achatadas, com a superfície lisa por vezes aplanada e convexa, de cor castanha, brilhante e por vezes papilosa no ápice [53, 55].

A *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* é uma espécie endémica do sudoeste da Península Ibérica (Figura 4), sendo considerada uma espécie autóctone em Portugal, juntamente com a *L. pedunculata*, pelo que muitas vezes crescem na mesma área.



**Figura 4.** Distribuição geográfica de *L. stoechas* subsp. *luisieri* na Península Ibérica.

(Fonte: <https://www.gbif.org/species/7660687>, acesso a: 09/01/2023).

Ocorre em solos arenosos, xistosos e ácidos, pode surgir entre 20 e 900 m de altitude e quase sempre em associação com espécies de *Quercus* e/ou *Cistus* [53]. Segundo Rivas-Martínez *et al.* (2002), a *Lsl* é ainda classificada como pertencente à classe *Cisto-Lavanduletea*, composta por espécies dos géneros *Cistus* e *Lavandula* caracterizada por produzirem compostos aromáticos, que crescem em matos do oeste mediterrâneo nos andares termo a supramediterrâneo seco e semiárido a sub-húmido [58]. Esta espécie reproduz-se por semente e é uma das espécies pioneiras em zonas após incêndio, sendo referenciada com estatuto de conservação de “*Least Concerning*” (pouco preocupante), frequente e por vezes localmente comum [53].

### 2.3. Metabolitos secundários

#### 2.3.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são metabolitos secundários bastante conhecidos na família Lamiaceae. Dado à sua ocorrência essencialmente na Península Ibérica, os estudos do perfil químico/volátil do OE de Lsl têm vindo a ser publicados apenas de plantas recolhidas em Portugal e Espanha. Na Tabela 1 estão apresentados os compostos voláteis presentes no OE de Lsl em estudos desde 2004, com os teores mínimo e máximo encontrados na bibliografia. A composição química do OE de Lsl destaca-se das demais espécies de *Lavandula*, pois é a única espécie do género que produz um tipo de monoterpenóides irregulares com estrutura ciclopenténica, chamados de necrodanos [59, 60]. Os derivados de necrodano foram pela primeira vez identificados numa secreção defensiva de um escaravelho, o *Necrodes surinamensis* [61]. No reino vegetal, para além do OE da espécie Lsl apenas foi reportado o composto *cis*- $\alpha$ -necrodol no OE de *Evolvulus alsinoides* L. [62]. Por ser um composto exclusivo de Lsl no género *Lavandula*, muitos autores consideram os derivados de necrodano como marcadores quimiotaxonómicos desta subespécie [60, 63, 64]. Atualmente, ainda não foi totalmente esclarecida qual a via biossintética pela qual são produzidos. Figadère *et al.* (2007) sugeriram que a estrutura deste composto pode ser gerada a partir da ciclização do difosfato de geranil na ligação 1'-4 do difosfato de dimetilalilo (DMAPP) e do isopentenil pirofosfato (IPP) via isocanfano; ou a partir da ciclização de duas unidades isoprenóides 2'-3'-2-4 [65]. Por outro lado, Vacas *et al.* (2019), sugerem a formação de necrodano via o catião de lavandulilo, seguida da ciclização e rearranjo metilo [66].

Relativamente aos compostos presentes no OE de Lsl (Tabela 1) destacam-se os derivados de necrodano, como o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (1,8-48,2%) e *trans*- $\alpha$ -necrodol (1,3-13%), a cânfora (1,1-74,4%), o 2,3,4,4-tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona (2-38%), a fenchona (0,1-22%) e o 1,8-cineol (1,3-21%) [17, 63, 64, 67-79]. O perfil volátil do OE de Lsl com origem em Portugal possui como composto maioritário o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo, seguido de 1,8-cineol, fenchona ou cânfora [17, 64, 69-72, 74-79]. Na família Lamiaceae é comum encontrarem-se estudos do perfil volátil dos OEs que na mesma espécie possam apresentar significantes variações nos constituintes maioritários. Zuzarte *et al.* (2012) encontraram diferenças no perfil volátil de Lsl de plantas recolhidas no sul e centro de Portugal. Em plantas recolhidas no centro do país o composto maioritário foi o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (17%), seguido de *trans*- $\alpha$ -necrodol (7%) e 1,8-cineol (6%), contrastando com o perfil encontrado em plantas do sul do país, revelando como compostos maioritários 1,8-ci-

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

Tabela 1. Compostos voláteis presentes no óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

	IR	% área relativa
<b>Monoterpenos</b>		
$\alpha$ -Pino	936	0,2-4,3
Canfeno	950	0,1-0,8
$\beta$ -Pino	978	0,1-4,5
$\delta$ -3-Careno	1003	0,1-1,8
<i>p</i> -Cimeno	1024	0,1-4,5
Limoneno	1030	0,1-0,8
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1037	0,1-1,0
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		
1,8-Cineol	1031	1,3-20,6
Óxido de <i>cis</i> -linalol	1075	0,3-1,6
Fenchona	1088	0,1-22
Linalol	1099	0,2-6,2
<i>trans</i> - $\alpha$ -Necrodol	1130	1,3-13
<i>trans</i> -Pinocarveol	1140	0,2-1,02
Cânfora	1143	1,1-74,4
<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1167	0,2-2,3
Lavandulol	1168	0,3-11,7
Óxido de <i>trans</i> -linalol	1171	0,1-3,2
Terpineno-4-ol	1177	0,5
$\alpha$ -Terpineol	1189	0,1-0,4
Mirtenal	1192	0,2-0,4
Verbenona	1206	0,1-2
Eucarvona	1222	1,9
Acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo	1265	1,8-48,2
Acetato de <i>cis</i> - $\alpha$ -necrodilo	1281	1,2-5,9
Acetato de bornilo	1283	0,5-1,6
Acetato de lavandulilo	1289	0,8-7,6
Acetato de mirtenilo	1328	0,6-2,7
Acetato de nerilo	1362	0,6-1,1
<b>Sesquiterpenos</b>		
$\alpha$ -Gurjuneno	1408	1,4
Cariofileno	1420	0,6
$\beta$ -Selineno	1486	0,3-12,8
$\alpha$ -Selineno	1493	1,0
$\gamma$ -Cadineno	1513	0,7-0,8
$\delta$ -Cadineno	1523	0,5-1,5
Selina-3,7(11)-dieno	1540	1,4
Ledol	1566	0,9-2,9
Viridiflorol	1590	0,2-12,1
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		
<i>epi</i> -Cubebol	1488	0,2-0,6
Óxido de cariofileno	1580	0,5-1,3

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

T-Muurolol	1642	0,1-2
$\alpha$ -Cadinol	1651	0,5-5,4
<b>Outros</b>		
3,5-Dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno	924 <sup>a</sup>	2,5-5,8
1-Octeno-3-ol	980	0,2
2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona	1054 <sup>b</sup>	0,2-5,1
3,4,4-Trimetil-2-ciclohexanona	1055 <sup>c</sup>	0,4-3,1
2,3,5,5-Tetrametil-4-metil-2-ciclopentenona	1152	0,4-11,4
1,1,2,3-Tetrametil-4-hidroximetil-2-ciclopentona	1155 <sup>b</sup>	0,1-0,6
2,3,4,4-Tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona	1160 <sup>c</sup>	2-38,3
2-Metoxi-4-vinilfenol	-	2-3,1
<hr/>		
Monoterpenos		2,6-6,4
Monoterpenos oxigenados		33-73
Sesquiterpenos		1,4-9,3
Sesquiterpenos oxigenados		2,3-12,4
Outros		2,4-5,1

IR: Índice de retenção numa coluna não polar: DIMS5P-dimetilsilicone com 5% de grupos fenil consultados em Babushok *et al.* (2011) [80]. Fontes da composição do OE: [17, 63, 64, 67-73, 75-79]. <sup>a</sup>IR consultado em Baldovini *et al.* (2005) [60]; <sup>b</sup>IR consultado em Videira *et al.* (2013) [76]; <sup>c</sup>IR consultado em Zuzarte *et al.* (2012) [64].

-neol (34%) e fenchona (18%), com pequenas quantidades (abaixo dos 3%) de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo [64]. Domingues *et al.* (2021) reportaram diferenças no OE em diferentes estados fenológicos, em floração os compostos maioritários foram o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (27%), *trans*- $\alpha$ -necrodol (13%), acetato de lavandulilo (7%) e o linalol (6%). Enquanto na fase de repouso os compostos maioritários foram o 2,3,4,4-tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona (11%), fenchona (6%), 1,8-cineol (5%) e a cânfora (3%) [79].

### 2.3.2. Compostos não-voláteis

O estudo de compostos fenólicos em espécies de *Lavandula*, nomeadamente em Lsl é escasso. Julio *et al.* (2014) analisaram em HPLC-MS o perfil fenólico de extratos etanólicos de Lsl, onde a presença de ácido rosmarínico (7 mg/g) foi confirmada [17]. No extrato aquoso de *L. pedunculata* também foi reportada uma concentração de ácido rosmarínico de 550 mg/g, comparativamente aos 39 mg/g no extrato hidroetanólico. Outros compostos, nomeadamente triterpenos, como os ácidos tormêntico (14 mg/g), ursólico (12 mg/g) e oleanólico (3,5 mg/g) foram reportados no extrato alcoólico em concentrações significativas [18]. Nunes *et al.* (2017) identificaram o ácido rosmarínico em extratos de Lsl em concentrações de 3,02 mg/g, seguido dos ácidos ferúlico (0,17 mg/g), clorogénico (0,13 mg/g), cafeico (0,04 mg/g) e vanílico (0,01 mg/g) [81].

Na família Lamiaceae o tipo de flavonóides mais comuns são os derivados de flavonas 7-O-monoglicosídeo. Dentro do género *Lavandula*, as flavonas di-O-glicosídeo são produzidas exclusivamente por espécies da secção *Stoechas*, o que poderão ser considerados marcadores químicos desta secção [53]. Contreras *et al.* (2018) corroborou a ausência de flavonas C-glicosídeo em *L. stoechas*, contrastando com a presença deste tipo de flavonas em *L. dentata* (secção *Dentatae*) [82]. Flavonóides como a luteolina, a metiluteolina e o eriodictiol foram os mais representativos encontrados em espécies da secção *Stoechas*, mais precisamente em *L. pedunculata*, *L. stoechas* subsp. *stoechas* e *L. viridis* [18, 83-86]. Em extratos etanólicos de *L. viridis* foi também reportada a presença de pinocembrina, uma flavanona comumente presente em espécies de *Pinus*, *Euphorbia* e *Eucalyptus* e em propólis [87, 88]. Esta flavanona tem vindo a ser estudada apresentando um potencial de terapêutico como anti-inflamatório e neuroprotetivo, nomeadamente no tratamento de fenómenos de isquémia [89].

### 2.4. Atividades biológicas

A utilização de PAM e dos seus OEs é descrita não só na medicina tradicional como em usos domésticos, inseticida, culinária e em cosmética. Desde a antiguidade que as espécies de *Lavandula* têm sido utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de muitas doenças, o que indica que as PAM desempenham um papel importante na saúde humana, devido às suas propriedades biológicas. Estudos etnobotânicos revelam alguns usos na medicina tradicional de Lsl, salientando a sua ação sedativa, no tratamento de problemas de pele, descongestionante nasal, para a circulação sanguínea e para a azia [1]. Os metabolitos secundários como os terpenos, ácidos fenólicos e flavonóides estão presentes, e são descritos como os principais constituintes químicos nos extratos de *Lavandula*, incluindo OEs e extratos. Estas substâncias fitoquímicas são responsáveis pela maioria das atividades biológicas reportadas. Atualmente, diversos estudos suportam cientificamente as aplicações tradicionais de Lsl como terapêutica em diversas patologias e confirmadas as suas ações antioxidante [72, 90], antimicrobiana [70, 71, 90, 91], anti-inflamatória [77, 78] e antineurodegenerativa [76].

#### 2.4.1. Atividade antioxidante

Para além dos compostos voláteis presentes no OE, os compostos fenólicos também apresentam um papel determinante na atividade antioxidante. Alguns estudos indicam uma correlação positiva entre o teor de fenóis e flavonóides e o potencial antioxidante

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

de espécies de *Lavandula* [90, 92, 93]. Na Tabela 2 estão apresentados os teores de compostos fenólicos e flavonóides reportados na bibliografia, assim como a sua ação antioxidante abordada por diferentes métodos de análise.

**Tabela 2.** Teor de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante de subprodutos de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

	Óleo essencial	Extrato não-polar	Extrato polar
Teor fenólico (mg EAG/g)	≈200-1612	67-1778	277-1689
Teor de flavonóides (mg ER/g)	8-<50	196-392	451-459
<sup>a</sup> (mg EQ/g)	33 <sup>a</sup>	7,2-28 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>
DPPH (IC <sub>50</sub> ) (µg/mL)	8830	123-1323	26
% de inibição DPPH (50 µg/mL)	67 -69	57-64	69-72
Inibição da peroxidação lipídica (IC <sub>50</sub> ) (µg/ml)	1530	-	-
% de inibição da peroxidação lipídica (0,2 mg/mL)	15 <sup>b</sup>	≈25 <sup>b</sup>	≈49 <sup>b</sup>
<sup>c</sup> (0,3 mg/mL)	≈17 <sup>c</sup>	≈25 <sup>c</sup>	≈40 <sup>c</sup>
FRAP (mg ET/g)	-	52	80
Poder redutor (IC <sub>50</sub> ) (mg ET/g)		52	36

EAG: equivalente de ácido gálico; ER: equivalente de rutina; EQ: equivalente de quercetina; IC<sub>50</sub>: corresponde à concentração que inibe 50% do radical livre; ET: equivalente de trolox; ≈: valores aproximados consultados na bibliografia. Fontes: [78, 79, 81, 90, 93].

Pereira *et al.* (2015) estudaram o teor de fenóis e flavonóides em diferentes tipos de extratos de Lsl, desde o OE até ao extrato aquoso, verificando um maior teor de fenóis (1654 mg EAG/mL) e de flavonóides (451 mg ER/mL) no extrato aquoso, comparativamente com os diferentes solventes usados e no OE [93]. Por outro lado, Nunes *et al.* (2017) reportaram que apesar do teor de fenóis ser superior em extratos etanólicos, comparando-os com os extratos aquosos, o mesmo não se verificou no teor de flavonóides. Os mesmos autores reportam uma atividade antioxidante mais elevada nos extratos aquosos [81]. Em extratos metanólicos de Lsl, Baptista *et al.* (2015) verificaram uma forte ação antioxidante da subespécie comparativamente com os mesmos extratos em *L. pedunculata* [90]. Matos *et al.* (2009) estudaram a atividade antioxidante de várias espécies de *Lavandula*, onde o potencial antioxidante de Lsl se destacou das demais espécies em estudo (*L. viridis* e *L. pedunculata*) [72].

### 2.4.2. Atividade antimicrobiana

Uma das propriedades mais conhecidas dos OEs e extratos é o seu potencial para inibir e/ou matar microrganismos. Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

demonstrado a ação antibacteriana e antifúngica do OE e extratos de Lsl (Tabela 3) [60, 64, 69-71, 73, 78, 79, 81, 90, 91].

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos de *L. stoechas* subsp. *luisieri* em diferentes grupos de microrganismos.

	Microrganismos	Óleo essencial	Extrato não-polar	Extrato polar
Gram -	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	
	<i>Escherichia coli</i>	22-1000	+	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	125	
	<i>Morganella morganii</i>	500		
	<i>Proteus mirabilis</i>	250		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	+	250
	<i>Salmonella enterica</i>	750		
	<i>Salmonella</i> spp.	22/22		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	750	+	
	<i>Serratia marcescens</i>	+	+	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>			3250
Gram +	<i>Bacillus cereus</i>	+	7670	
	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	6500
	<i>Enterococcus faecalis</i>	125	62	
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>		125	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	11-250	62	125/3250
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	125	125	
	<i>Streptococcus hirae</i>	+	+	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+		
Leveduras	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,3/2,3*		
	<i>Candida albicans</i>	250; 1,3/2,5*	62,5	
	<i>Candida guilliermondii</i>	62,5; 1,3/1,3*		
	<i>Candida krusei</i>	125; 2,5/2,5*		
	<i>Candida parapsilopsis</i>	125; 2,5/2,5*		
	<i>Candida tropicalis</i>	2,5/2,5*		
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	15,5; 0,6/0,6*	31	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31		
Fungos filamentosos	<i>Sacothecium rubi</i>	0,3/1,2*		
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	0,3/9,3*		
	<i>Aspergillus flavus</i>	1,3*		
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,6/10*		
	<i>Aspergillus niger</i>	15,5; 0,3/20*	7,5	
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,2/0,2*		
	<i>Geotrichum klebahnii</i>	125		
	<i>Microsporium canis</i>	0,2/0,2*		
	<i>Microsporium gypseum</i>	0,3/0,3*		
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	0,3/2,3*		
	<i>Penicillium roqueforti</i>	0,1/0,6*		
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,1/4,7*		
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	200; 0,3/0,3*		
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	0,2/0,3*		
<i>Trichophyton rubrum</i>	200; 0,2/0,3*			
<i>Trichophyton verrucosum</i>	0,3/0,3*			
<i>Trichosporon cutaneum</i>	31			

Os valores CMI e CMI/CML estão apresentados em µg/mL ou µL/mL\*; / : significa a separação entre o valor de CMI e CML; + significa inibição do microrganismo. Fontes: [60, 64, 69-71, 73, 78, 79, 81, 90, 91].

A complexa composição de compostos hidrofóbicos do OE torna-o diferenciador dos clássicos agentes antimicrobianos, assim como o efeito sinérgico entre os

constituintes. Alguns dos constituintes majoritários em espécies do género *Lavandula*, como o linalol, cânfora e 1,8-cineol, revelaram um poder antimicrobiano inferior quando isolados [10, 94, 95]. A atividade antimicrobiana de plantas recolhidas em Portugal, *L. pedunculata* e Lsl, foi verificada em extratos de diferentes polaridades e OEs. Nos OEs verificou-se que a Lsl demonstrou igual ou maior poder antimicrobiano comparando com a *L. pedunculata* em leveduras e fungos filamentosos [90]. Em relação à influência da polaridade dos extratos, verificou-se uma tendência onde os extratos mais apolares apresentaram um maior efeito antimicrobiano do que os extratos mais polares [18, 81, 90, 91]. No que diz respeito às bactérias, sabe-se que as bactérias Gram-negativas apresentam menor suscetibilidade do que as Gram-positivas, devido à constituição da sua membrana celular por uma camada de lipoproteínas e lipopolissacarídeos que restringem a difusão de compostos hidrofóbicos através da membrana celular [46, 96, 97].

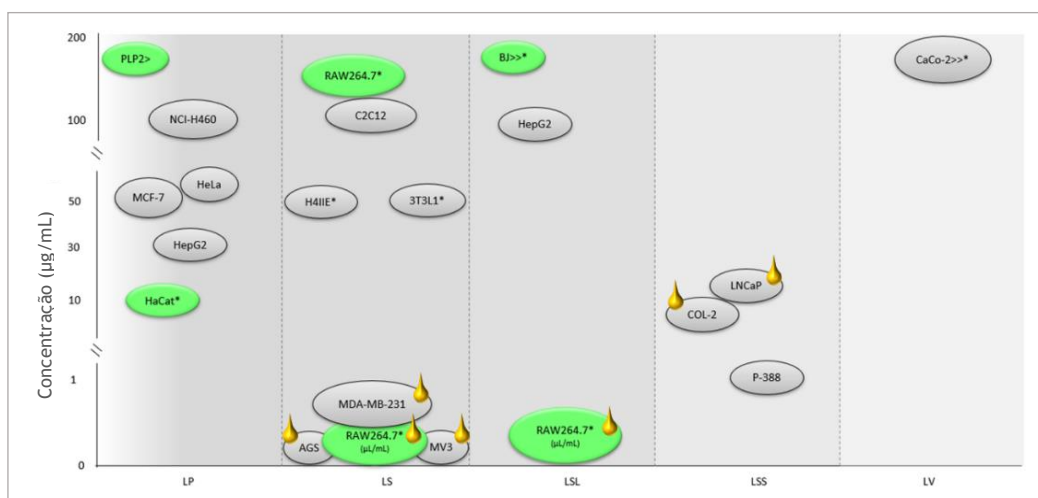
De forma geral, os OEs e extratos não-polares apresentam valores de CMI ou CML inferiores aos dos extratos polares, podendo atribuir um maior poder antimicrobiano à classe dos terpenos [90]. A Tabela 3 apresenta a atividade antimicrobiana de Lsl entre os microrganismos patogénicos testados, onde se destaca a suscetibilidade de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa*. O OE e extrato de Lsl demonstraram ação inibitória contra *Candida albicans*, em algumas estirpes de dermatófitos como *Aspergillus* spp., em espécies consideradas de rápida deterioração de alimentos como o *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium* spp., assim como em fungos filamentosos patogénicos de plantas (*Aspergillus* spp.). Nos fungos, também foi demonstrado uma maior sensibilidade à ação dos OEs e extratos na divisão Basidiomycota comparativamente à divisão Ascomycota [90].

### 2.4.3. Atividade citotóxica

Os estudos de citotoxicidade são amplamente aplicados em ensaios *in vitro* e são geralmente realizados em linhas celulares normais ou tumorais. Na Figura 5 encontra-se esquematizada a citotoxicidade de OEs e extratos das espécies da secção *Stoechas* do género *Lavandula* em diferentes linhas celulares, cancerígenas e normais [18, 64, 81, 93, 98-102]. Em Lsl o efeito citotóxico de extratos hidroetanólicos e do OE foram testados em linhas celulares de fibroblastos e de macrófagos (Raw264.7), no entanto, em concentrações inferiores a 2,2 mg/mL e a 0,08 µL/mL, respetivamente, não afetaram a viabilidade celular em ambas as linhas celulares [64, 81]. Por outro lado, o efeito citotóxico de extratos de Lsl foi verificado em linhas celulares tumorais do

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

carcinoma hepatocelular (HepG2), mesmo na concentração mais baixa testada (0,2 mg/mL) [81].



**Figura 5.** Atividade citotóxica dos óleos essenciais (marcador amarelo) e dos extratos das espécies de *Lavandula* da secção *Stoechas* em células normais (cor verde) e células tumorais (cor cinzento). Células com \* correspondem a valores máximos de viabilidade celular. LP: *L. pedunculata*; LS: *L. stoechas*; LSL: *L. stoechas* subsp. *luisieri*; LSS: *L. stoechas* subsp. *stoechas*; LV: *L. viridis*. Fontes: [18, 64, 81, 93, 98-102].

Para que uma determinada substância/extrato possa ser considerado para uso clínico, como anticancerígena, ou na área alimentar, não deve exercer efeitos tóxicos sob células normais. Diversos estudos reportam alguma seletividade da toxicidade dos OEs/extratos em células tumorais em detrimento das células normais. Nos mesmos estudos e utilizando as mesmas concentrações, as células tumorais parecem ser mais suscetíveis à ação destes compostos do que as células normais [50, 103, 104]. Em extratos de Lsl, Nunes *et al.* (2017) demonstraram que, nas mesmas concentrações de extrato, as células tumorais (HepG2) apresentaram maior suscetibilidade ao extrato do que as células normais (fibroblastos) [81]. Alguns autores explicam este facto com a existência de algum tipo de mecanismo defensivo nas células normais, que as permite protegerem-se destes compostos e que em células cancerígenas este mecanismo encontra-se modificado ou anulado [50].

### 2.4.4. Outras atividades biológicas

As plantas medicinais têm sido bastante referenciadas como potenciadores de memória e na terapia de problemas de demência, devido ao potencial de inibição de algumas enzimas responsáveis pelo desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. As doenças neurodegenerativas envolvem a perda de neurónios colinérgicos, provocando o aumento da atividade das enzimas, como a  $\beta$ -secretase, acetilcolinesterase e a

butirilcolinesterase. Estas enzimas são responsáveis pela rápida hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas [105]. Outra característica patológica das doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, é a acumulação de placas amilóides produzidas por  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase [106]. Assim, os novos tratamentos para distúrbios neurodegenerativos incluem a inibição desses tipos de enzimas. Devido ao baixo peso molecular e alta hidrofobicidade dos terpenóides, estes têm capacidade de atravessar as membranas celulares e a barreira hematoencefálica. Os componentes do óleo essencial e compostos derivados de necrodano presentes no OE de Lsl revelaram um efeito promissor no tratamento da doença de Alzheimer. O OE (90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o composto 2,3,4,4-tetrametil-5-metileno-ciclopenten-2-enona (45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inibiram a atividade de  $\beta$ -secretase por ensaios via enzimática e celular [76].

A atividade anti-inflamatória tem sido reportada em OE e extratos de diversas plantas medicinais, nomeadamente no género *Lavandula*. A inflamação define-se como um processo fisiopatológico dos tecidos vasculares como reação a um dano celular. Geralmente, resulta da resposta imune a uma infeção por microrganismos (bactérias, fungos ou vírus). A inflamação pode também ser desencadeada como resposta em processos como cancro, isquémia, traumas ou cirurgias [107]. Existem vários métodos para determinação da atividade anti-inflamatória de extratos vegetais, que variam de acordo com o que se pretende inibir ao nível da cascata inflamatória, pois durante a inflamação são geradas grandes quantidades de espécies reativas de oxigénio (ROS). Estudos *in vitro* visam principalmente avaliar a inibição da atividade de enzimas e/ou mediadores da inflamação, como o óxido nítrico e lipoxigenases. O OE de Lsl (200 mg/kg) apresentou atividade anti-inflamatória através da inibição do edema no membro inferior de ratos induzido por carragenina (83%), assim como efeitos analgésicos (67%), com ação mais forte em comparação com o controlo positivo [78]. Rufino *et al.* (2015) revelaram que o OE de Lsl (numa concentração até 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inibiu de forma significativa os marcadores inflamatórios do óxido nítrico (81%) na linha celular do cancro colorretal (C2Bbe1) e em condrócitos [77].

Outra área de aplicação dos OEs relaciona-se com o uso intensivo de pesticidas na agricultura, que tem vindo a revelar-se um problema ao nível da toxicidade nos alimentos, mas também ao nível ambiental, com a infiltração e contaminação de solos e linhas de água. Por isso, a tentativa de desenvolver novos produtos de origem natural com efeito inseticida é reconhecida pelo aumento de estudos em OEs e extratos. No OE e extrato metanólico de Lsl foi confirmada a atividade inseticida através da ação fago-inibidora em *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum padi*, tanto em plantas silvestres como em plantas cultivadas. Neste

estudo, foi revelado que o OE e os seus compostos maioritários (acetato de *trans*- e *cis*- $\alpha$ -necrodilo) e extratos apresentaram uma ação fago-inibidora nos insetos em estudo [17, 68, 75]. Para além dos insetos apresentarem grande capacidade de devastar grandes áreas de culturas agrícolas, contribuindo para o desperdício de recursos naturais, também parasitas vegetais e de animais como o caso dos nemátodos (filo Nematoda) têm vindo a ser reportados como causadores de doenças. Julio *et al.* (2016) reportaram a ação nematicida de compostos necrodanos presentes em Lsl [108], assim como a ação ixodicida em *Hyalomma lusitanicum* também foi confirmada nos seus extratos e OE [109].

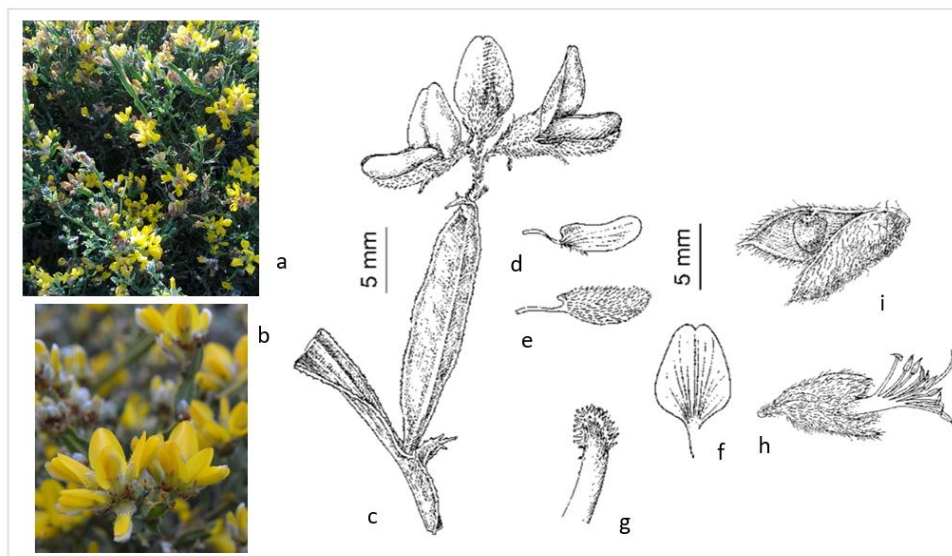
### 3. *Pterospartum tridentatum*

#### 3.1. Taxonomia

A *Pterospartum tridentatum* L. Willk in Willk. & Lange (1877), sinonímia de *Genista tridentata* L., pertence à família Leguminosae (=Fabaceae), subfamília Papilionoideae. A família Leguminosae está dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae; esta última subfamília é a mais diversificada e, por isso, a taxonomia de algumas espécies nem sempre foi clarificada pela dificuldade encontrada em definir parâmetros taxonómicos distintivos. *Genista* é um dos mais importantes géneros desta subfamília e, durante um longo período, as espécies foram incluídas nos géneros *Pterospartum* (Spach) Koch. e *Echinopartum* (Spach) Rothm. O género *Pterospartum* foi descrito pela primeira vez por Koch (1853), recuperando o nome proposto por Spach como um subgénero de *Genista*. Em 1968, Gibbs ponderou a sinonímia dos géneros *Pterospartum* e *Chamaespartium*. Na Flora de Portugal, Coutinho (1939) considerou o género *Pterospartum*, mas Franco (1971), baseado no trabalho de Gibbs, recuperou o género *Chamaespartium* rejeitando o *Pterospartum*. Mais tarde, Talavera e Castroviejo (1999) reestabeleceram o género *Pterospartum* considerando-o um *taxon* monotípico distinto de *Chamaespartium* [110]. Devido a esta inconclusiva separação de género, pensa-se que até 2004, *P. tridentatum* e *C. tridentatum* eram consideradas a mesma espécie. Nesse ano, os autores Teixeira e Pereira verificaram alguns parâmetros morfológicos distintivos entre as espécies e concluíram que eram espécies de géneros diferentes. A *Pterospartum tridentatum* pode ainda ser dividida em três subespécies, *tridentatum*, *cantabricum* e *lasianthum* [111]. *P. tridentatum* é vulgarmente conhecida por carqueja ou carqueija e, menos comum, designada por flor-de-carqueja e querqueijeira.

### 3.2. Morfologia e distribuição

A *Pterospartum tridentatum* (Pt) é um arbusto perene de porte eréctil e por vezes prostrado (Figura 6), podendo atingir os 100 cm de altura. Apresenta caules coriáceos alados e alternos, desempenhando a função fotossintética. As folhas são muito reduzidas, por vezes quase inexistentes, unifoliadas, e as estípulas em forma de tridente pontiagudas. O limbo foliar (3-7 x 1,5-6 mm) é triangular, reto ou curvo, semelhante às estípulas e unido a estas, conferindo uma aparência de folha tridentada. As inflorescências são formadas de 3 a 10 flores, de brácteas ovadas (3-4 x 2,5-5,5 mm) e bractéolas espatuladas (2,5-4,5 x 0,3-1 mm), ambas cartáceas, seríceas no dorso e brilhantes a glabras no verso. A corola é de cor amarela e o estandarte ovado. O fruto é uma vagem pubescente com dimensões de 8,5-14 x 3,2-4 mm. As sementes apresentam uma dimensão de 1,8-2,3 x 1,5-2,1 mm, possuem um estrofiolo branco de 0,5-0,7 x 0,8-1 mm [110].



**Figura 6.** Aspectos morfológicos de *P. tridentatum*. Vista aérea da planta (a), vista lateral das flores (b), caule floral ilustrado (c), ala (d), quilha (e), estandarte (f), estigma (g), flor sem corola (h), fruto com semente (i). (Adaptado de Talavera e Castroviejo, 1999 [110]).

Neste trabalho, as plantas de carqueja foram identificadas pela *Flora Ibérica*, sendo as plantas provenientes da Serra da Malcata identificadas como *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. subsp. *cantabricum* (Spach) Talavera & P.E. Gibbs. A subespécie *tridentatum* apresenta uma distribuição geográfica maioritariamente no litoral português (0-140 m de altitude), a subespécie *lasianthum* ocorre nas montanhas e planaltos interiores de clima mediterrânico (0-1700 m de altitude) e a subespécie *cantabricum* é frequente nas montanhas de clima temperado (400-1800 m de altitude) [110]. Em termos morfológicos podem-se destacar algumas diferenças entre a

subespécie *lasianthum* e a subespécie *cantabricum*, em que na primeira o dorso do estandarte é seríceo, a inflorescência possui 6-10 flores com pedicelos até 3 mm e na subespécie *cantabricum* o estandarte é glabro ou com alguns pelos confinados à nervura média do dorso, a inflorescência possui 4-6 flores com pedicelos entre 1 e 2,5 mm. O período de floração pode ocorrer de março a julho [110].

A *P. tridentatum* é uma espécie endêmica da Península Ibérica e do Norte de Marrocos (Figura 7). Cresce com abundância nas montanhas do Norte e Centro de Portugal (menos frequente em matos baixos), em rochas ou solos ácidos ou no sub-bosque associada com *Arbutus unedo* L., *Pinus pinaster* Aiton e *Eucalyptus* Labill. [110].

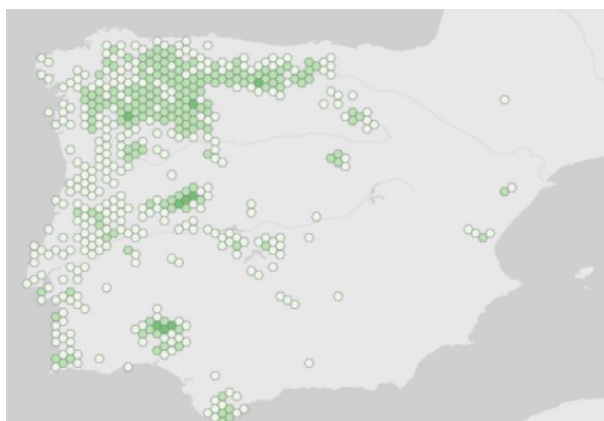


Figura 7. Distribuição geográfica de *P. tridentatum* na Península Ibérica.

(Fonte: <https://www.gbif.org/species/2940312>, acesso a: 09/01/2023)

### 3.3. Metabolitos secundários

A carqueja é uma planta rica em compostos fenólicos e diversos estudos em extratos de diferentes polaridades reportam a sua composição em fenóis, nomeadamente em ácidos fenólicos e flavonóides [112-117]. Na Tabela 4 estão apresentados os compostos fenólicos reportados na bibliografia, sendo que em alguns estudos foi apenas realizada a identificação de compostos [114, 116-120], e em outros foi realizada a identificação e quantificação [112, 113, 115]. Em extratos aquosos de Pt recolhida na Serra da Malcata foram identificados diversos flavonóides, tais como glucósidos de taxifolina, miricetina, genisteina, rutina, quercetina e sissotrina [116]. Também em extratos aquosos de flores de Pt recolhida na região de Castro Daire foram identificados o ácido rosmarínico e flavonóides como derivados de luteolina e isoramnetina [114]. Em extratos alcoólicos de plantas recolhidas durante a época de floração, em plantas recolhidas na Serra da Estrela, foram caracterizados por HPLC-RP, onde foi confirmada a presença de diversos constituintes fenólicos, como os ácidos vanílico, cafeico, cloro-

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

Tabela 4. Compostos fenólicos presentes em extratos de *P. tridentatum*.

Tipo de extrato	Metodologia	Compostos fenólicos (mg/g)	Fonte
Extrato aquoso	HPLC-DAD-ED/ HPLC-DAD-MS Lichrocart RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm)	5,5'-Diidroxí-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido 7-Metilorobol Ácido cítrico Ácido quinínico Genisteína-8-C-glucósido Genisteína Isoquercetina Miricetina-6-C-glucósido Prunetina Quercetina-3-O-galactósido Rutina Taxifolina-6-glucósido	[116]
	ESI-MS	Ácido rosmarínico Isoramnetina-O-hexósido Luteolina-O-(O-acetil)-glucuronídeo Luteolina-O-glucósido Pentahidroxí-flavonol-di-O-glucósido	[114]
Extrato aquoso	HPLC-ESI-MS Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm)	5,5'-Diidroxí-3'-metoxi-isoflavona-7-O-B-glucósido 7-Metilorobol Genisteína Genisteína Isoquercetina Miricetina-6-C-glucósido Prunetina Rutina Sissotrina	[119]
Decocção	HPLC-DAD Lichrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm; 5 µm),	5,5'-Diidroxí-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucósido Genisteína Isoquercetina Prunetina Sissotrina	[118]
Infusão e extrato hidroetanólico	HPLC-DAD Nucleosil® 100-5 C18 (25 cm x 0,46 cm; 5 µm)	Genisteína 7-O-glucósido: Inf (1,6); HE (1,8) Genisteína: Inf (12,7); HE (8,6) Genisteína derivado 1: Inf (N/D); HE (0,4) Genisteína derivado 2: Inf (0,5); HE (2,2) Genisteína derivado 3: Inf (5,6); HE (8,3) Genisteína derivado 4: Inf (2,7); HE (5,3) Quercetina 3-O-rutinósido: Inf (1,6); HE (2,1) Quercetina 3-O-glucósido: Inf (1,5); HE (5,9) Quercetina derivado 1: Inf (1,1); HE (1,0) Quercetina derivado 2: Inf (1,0); HE (2,3) Quercetina derivado 3: Inf (0,2); HE (0,7) Quercetina derivado 4: Inf (0,9); HE (3,0) Quercetina derivado 5: Inf (5,5); HE (1,2)	[120]
Extrato etanólico	UHPLC-DAD-ESI/MS Thermo Scientific hypersil gold (1000 x 20 mm, 1,9 µm)	5-Hidroxí-4',7-dimetoxiflavona (C) Astragalina (C) Biochanin A (F) Daidzeína (R) Epigalocatequina 3-O-glucósido (F, C) Galocatequina 3-O-glucósido (F, C) Genisteína (R, F, C) Genisteína 6-C-glucósido (R, F, C) Isoramnetina 3-O-glucósido (F) Kaempferol (C) Miricetina 6-C-glucósido (R) Prunetina (R, C) Sissotrina (C) Taxifolina glucósido I (F) Taxifolina glucósido II (F) Taxifolina glucósido III (F)	[117]

## Capítulo 1 - Revisão bibliográfica

Extrato metanólico	HPLC-DAD-UV/VIS C18 (250 × 46 mm, 5 µm)	Ácido ferúlico (0,3) Apigenina (0,4) <i>Biochanin A</i> (2,9) <i>Biochanin A-glucoside</i> (1,4) Genisteína (12) Genistina (16,8) Isoquercetina (1,2) Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (1,6) Taxifolina (21,8)	[115]
Extrato metanólico	HPLC-DAD-MS C-18 SeoOak	5,5'-Dihidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7- <i>O</i> -B-glucósido (0,1) 7- <i>O</i> -metilrobof (0,2) <i>Biochanin A</i> (0,4) <i>Biochanin A O-hexoside</i> (0,2) Dihidroquercetina 6- <i>C</i> -hesóxido (3,9) Genisteína (0,2) Genistina (0,2) Isoquercetina (0,9) Metilprunetina (0,1) Miricetina-6- <i>C</i> -glucósido (1,3) Prunetina (0,4) Quercetina <i>O</i> -hexósido (0,5) Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (0,1)	[113]
Extrato metanólico	HPLC-RP Phenomenex Kinetex Luna 2,6 µL PFP 100 <sup>a</sup> (150x4,60 mm)	Ácido cafeico: Flor (3,1); FC (18,2) Ácido clorogénico: Flor (N/D); FC (17,8) Ácido elágico: Flor (10,4); FC (9,7) Ácido ferúlico: Flor (22,2); FC (7,4) Ácido <i>p</i> -cumárico: Flor (N/D); FC (16,8) Ácido siríngico: Flor (1,9); FC (8,3) Ácido vanílico: Flor (4,2); FC (32,2) Quercetina: Flor (9,3); FC (6,6)	[112]

Legenda: N/D: não detetado; FC: caules e folhas; Inf: infusão; HE: extrato hidroetanólico; R: raízes; F: folhas; C: caules.

-génico, cumárico, siríngico, ferúlico e elágico. Em extratos metanólicos de flores, o ácido fenólico maioritário foi o ácido vanílico (32,2 mg/g), enquanto nos extratos de folhas e caules o ácido ferúlico (22,2 mg/g) foi o que apresentou maior concentração [112]. Em relação ao perfil de flavonóides, em diferentes extratos metanólicos, destacaram-se a quercetina, taxifolina, genistina, genisteína e apigenina [113, 115, 117]. Vitor *et al.* (2004) estudaram o perfil dos compostos fenólicos em extratos obtidos pela decocção de flores de carqueja, extrato mais semelhante ao utilizado tradicionalmente, os autores demonstraram que os principais constituintes são as isoflavonas genistina, sissotrina e prunetina, assim como a isoflavona 5,5'-dihidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7'-*O*-B-glucósido [118]. Em plantas recolhidas na região de Vila Real, Aires *et al.* (2016) analisaram o perfil fenólico em extratos hidrometanólicos, destacando a presença dos flavonóides taxifolina (21,8 mg/g) e genistina (16,8 mg/g) [115]. Em flores de plantas recolhidas em Viseu, Gonçalves *et al.* (2020) reportaram também a presença de flavonóides, nomeadamente isoflavonas como a genisteína em infusão (12,7 mg/g) e em extrato hidroetanólico (8,5 mg/g). Apesar do teor de genisteína ser relativamente maior na infusão, a maioria dos flavonóides detetados neste estudo apresentaram um teor mais elevado no extrato hidroetanólico [120]. A

escolha do solvente de extração deve ser ajustada ao objetivo final do estudo ou da sua aplicabilidade. De facto, sabe-se que os solventes orgânicos potenciam a extração de compostos do interior das células, tal deve-se à sua natureza mais apolar e por isso à facilidade em penetrar na parede celular [121]. Outro fator que pode influenciar o teor em compostos fenólicos é o órgão da planta a utilizar. A produção e armazenamento dos metabolitos secundários em *P. tridentatum* não ocorre de forma semelhante em todos os órgãos da parte aérea da planta. Os autores Luís *et al.* (2011) diferenciaram extratos das flores e extratos de folhas e caules, pelo que os extratos das folhas e caules apresentaram um teor em ácidos fenólicos significativamente maior do que ao encontrado nos extratos das flores, exceto para o ácido ferúlico e para o flavonóide quercetina [112]. Ainda em extratos aquosos, Coelho *et al.* (2011), revelaram que o maior teor de fenóis foi encontrado na fase de repouso com 403 mg EAG/g de matéria seca, seguido das folhas e caules na floração (338 mg EAG/g de matéria seca) e flores (310 mg EAG/g de matéria seca) [122]. Simões *et al.* (2020), obtiveram o perfil fenólico de extratos obtidos a partir de raízes, folhas e caules, sendo os extratos das folhas e caules os que revelaram maior presença de compostos fenólicos [117].

De acordo com a bibliografia consultada, apenas um estudo reporta a extração de óleo essencial de *P. tridentatum*. Grosso *et al.* (2007) reportaram a extração de OE de *P. tridentatum* com um rendimento inferior a 0,05 % (v/m), destacando-se álcoois como o 1-octen-3-ol (36,8%), *n*-heptanal (11,8%) e *n*-nonanal (14,5%). No OE também foram identificados terpenos como o geraniol (9,2%), *trans*- e *cis*-*theaspirane* (17,2%), germacreno D (9,7%), linalol (5,2%), eugenol (3,6%) e  $\gamma$ -cadineno (3,3%) [123]. Em resultado do seu muito baixo rendimento de extração, em termos de aplicabilidade, torna-se injustificável o recurso a este subproduto.

### 3.4. Atividades biológicas

Segundo estudos etnobotânicos, as flores, folhas e caules de *P. tridentatum* eram usados na medicina tradicional no tratamento de diversas patologias, tais como hipertensão e colesterol, com benefícios na digestão, constipações, tosse, circulação sanguínea, protetor de fígado e analgésico intestinal. Também usada para o controlo do ácido úrico, gota, como sedativo, com efeitos hipoglicémicos, no tratamento da azia e como cicatrizante [1, 2]. A carqueja também é reportada como usada como condimento na cozinha tradicional portuguesa, em pratos de arroz e carne assada [123].

### 3.4.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos está diretamente relacionada com o teor em compostos fenólicos, por este motivo torna-se importante determinar o conteúdo nestes compostos e a sua identificação. Aires *et al.* (2016) demonstraram que o extrato hidrometanólico de carqueja com elevadas concentrações de isoflavonas e flavonóis, como a genistina (17 mg/g), genisteína (12 mg/g) e a taxofolina (22 mg/g), possui uma elevada atividade antioxidante ( $IC_{50}=0,15$  mg/mL), em comparação com o controlo positivo BHT ( $IC_{50}=0,63$  mg/mL) [115]. Também no extrato aquoso de carqueja o potencial antioxidante foi verificado nas diferentes fases fenológicas de repouso e floração (folhas e flores), obtendo resultados muito próximos nas duas épocas de recolha entre 3,5 e 3,6 mM trolox/Kg de matéria seca [122]. Ferreira *et al.* (2012) revelaram que os extratos aquosos e hidroetanólicos de carqueja apresentaram um teor de fenóis totais de 160 mg EAG/g e 130 mg EAG/g, e de flavonóides de 60 mg EC/g e de 40 mg EC/g, respetivamente. Também revelaram possuir atividade antioxidante numa concentração de 2,5 mg/mL pelos métodos ABTS (143 mmol ETrolox/g) e  $\beta$ -caroteno (170%, após 60 min de reação) [114]. Martínez *et al.* (2012) revelaram a concentração de extratos hidroetanólicos de flores e folhas que inibem 50% ( $IC_{50}$ ) do radical (DPPH), apresentando um  $IC_{50}$  inferior para os extratos das flores e por isso uma maior atividade antioxidante, comparativamente ao valor obtido para as folhas. A atividade antioxidante foi também confirmada pelo método FRAP, onde os extratos de flores e folhas apresentaram valores muito próximos de 0,82 e 0,83 mM EAA/g<sub>ms</sub>, respetivamente [124]. Os resultados deste estudo demonstram a necessidade de se efetuarem diferentes métodos para determinar a atividade antioxidante, pois, como foi referido anteriormente, cada método de análise possui uma abordagem diferente em relação aos mecanismos de reação entre os radicais e as substâncias antioxidantes. Também Neves *et al.* (2020), determinaram a atividade antioxidante de extratos de flores de carqueja onde revelaram um valor de  $IC_{50}$  de 76,3  $\mu$ g/mL e um teor de fenóis totais de 200 mg EAG/g [125]. Na tentativa de investigar novas formas de incorporar compostos bioativos naturais na área alimentar, Balanč *et al.* (2016) determinaram a atividade antioxidante através dos métodos DPPH e ABTS em extratos aquosos de carqueja numa concentração de 2 mg/mL e em extratos encapsulados num complexo de alginato e inulina, os quais apresentaram uma atividade antioxidante máxima de 57% e 40%, respetivamente [126]. O potencial antioxidante de carqueja é destacado em alguns estudos, onde, em conjunto com outras espécies do género *Cytisus*, *Cymbopogon* e *Gomphrena*, a atividade antioxidante de carqueja se revela superior às demais plantas em estudo [127, 128].

### 3.4.2. Atividade antimicrobiana

Sabe-se que os compostos fenólicos contribuem para a atividade antimicrobiana devido ao seu potencial de interferir com os mecanismos bacterianos de síntese de ácidos nucleicos, com a membrana citoplasmática e com o seu metabolismo energético [129]. A atividade antimicrobiana de extratos de carqueja reportada na bibliografia é escassa. Aires *et al.* (2016) demonstraram que o extrato hidrometanólico de carqueja revelou atividade antibacteriana em isolados de *Staphylococcus aureus* com valores de CMI de 39,1 a 78,1 µL/mL, sendo o valor mínimo similar ao antibiótico usado como controlo positivo (gentamicina) cujo valor de CMI foi inferior a 39 µL/mL para todos os isolados testados [115]. Também Martins *et al.* (2015) revelaram a atividade antifúngica de extratos hidrometanólicos de carqueja em *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* [130]. Coelho (2015) reportou atividade antimicrobiana de extratos aquosos em *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, apesar das concentrações de extrato onde se verificou inibição dos microrganismos se situar entre os 40 000 a 100 000 ppm [131].

### 3.4.3. Atividade citotóxica

A citotoxicidade de extratos aquosos de carqueja foi avaliada por Ferreira *et al.* (2012), os quais investigaram o efeito desses extratos na taxa respiratória em mitocôndrias, sendo que concentrações até 500 µg/mL não revelaram efeitos prejudiciais nas taxas respiratórias. Os mesmos autores confirmaram a ausência de efeitos citotóxicos, pelo método MTT, nas concentrações testadas (125 e 375 mg/L) em células cancerígenas do fígado (HepG2) [114]. A viabilidade celular de extratos etanólicos de carqueja de diferentes partes da planta (raízes, folhas e caules) foi também analisada por Simões *et al.* (2020), utilizando células de macrófagos (Raw 264.7), as quais não revelaram suscetibilidade à ação dos extratos até concentrações de 100 µg/mL durante 24 h [117]. Resultados interessantes foram reportados por Gonçalves *et al.* (2020), em que os autores determinaram a viabilidade celular de células cancerígenas do colorretal (Caco-2) e de fibroblastos (NHDF) após exposição aos extratos, observaram que extratos aquosos e hidroetanólicos de flores de carqueja apresentaram uma toxicidade seletiva nas células Caco-2 comparando com a ausência de toxicidade revelada na linha celular NHDF [120]. Estes resultados tornam-se importantes na possibilidade de extratos de carqueja virem a ser utilizados em tratamentos de doenças associadas ao stresse oxidativo e a doenças cancerígenas.

### 3.4.4. Outras atividades biológicas

A atividade anti-inflamatória foi reportada em extratos de carqueja por Simões *et al.* (2020), utilizando o modelo de inflamação em lipopolissacarídeos, tendo verificado que os extratos de folhas e caules de carqueja causaram diminuição na produção de óxido nítrico em macrófagos, comparativamente aos extratos de raízes e caules [117]. Também Fernandes *et al.* (2012) determinou a atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de carqueja recolhida na Serra da Estrela, concluindo que os extratos de caules, folhas e flores têm capacidade de diminuir a atividade da araquidonato 5-lipoxigenase, responsável pela biossíntese de mediadores da resposta inflamatória [132].

A associação da ingestão de extratos/infusão de carqueja ao tratamento da diabetes tem sido reportada por estudos etnobotânicos. Paulo *et al.* (2004) avaliaram os efeitos dos flavonóides isoquercetina e sissotrina, isolados de extrato de carqueja, no nível de glicose em ratos e, concluíram que a combinação de concentrações relativas destes flavonóides, pode diminuir ou aumentar os níveis de glicose no sangue após ingestão, sendo confirmado o efeito hipoglicémico exercido pela isoquercetina, no entanto a sissotrina apresentou ter um efeito contrário [119]. Outra aplicação reportada aos extratos de carqueja é a sua funcionalidade como aditivo alimentar. Neves *et al.* (2020) avaliaram o efeito de extratos etanólicos de flores de carqueja (500 mg/L) na estabilidade do óleo de girassol, verificando que os mesmos preveniram a oxidação do óleo, preservando a sua estabilidade e prolongamento do tempo de vida útil [125].

## 4. Importância da conservação de espécies vegetais

Numa altura em que a preocupação com a preservação da natureza e meio ambiente são prioridade em todos os setores de atividade, é importante e urgente que a comunidade científica desenvolva alternativas de conservação de espécies vegetais, assim como, a preservação dos seus habitats naturais. Devido à sua localização geográfica, Portugal faz parte de um dos 36 *hotspots* conhecidos mundialmente, estando incluído no *hotspot* da Bacia Mediterrânea [133]. Infelizmente, e devido à ação humana, a industrialização e a procura excessiva por recursos naturais, coloca em ameaça a preservação de habitats o que, poderá levar à extinção de espécies vegetais e animais. Paralelamente à direta ação do Homem, diversas previsões científicas indicam que as alterações climáticas poderão afetar substancialmente a continuidade de muitas espécies vegetais.

Em Portugal, as PAM representam cerca de 13% da vegetação portuguesa, e algumas delas têm atribuído um estatuto de conservação vulnerável [14]. De acordo com a Lista Vermelha da Flora Vasculares Portuguesa, publicada em 2020, 381 espécies foram consideradas numa das três categorias de ameaça da UICN (União Internacional para a Conservação da Natureza), 84 espécies estão classificadas na categoria mais grave (Criticamente em perigo) e 19 espécies foram consideradas extintas em Portugal [134]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) cerca de 80% da população mundial utiliza as plantas medicinais, seja através de infusões, decocções ou extratos. Ao longo de séculos, as plantas medicinais foram o suporte para o tratamento de inúmeras doenças, e ainda hoje continuam a ser a base para o desenvolvimento de novas terapias e um recurso natural para o tratamento de doenças. A maioria dos fármacos produzidos pelas indústrias farmacêuticas têm como base os compostos ou homólogos sintéticos isolados a partir de espécies vegetais. Dada a importância que as espécies vegetais têm, não só na indústria farmacêutica, como em outras áreas, cosmética, alimentar, e fitossanidade, torna-se importante estabelecer metodologias de produção, para que colheitas massivas na natureza sejam evitadas. Nos Estados Unidos da América os fitoquímicos, também designados por drogas botânicas ou ervas medicinais, são classificados como suplementos alimentares de acordo com a especificação terapêutica descrita no *Dietary Supplement Health and Education Act*. Em 2006, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro fitoquímico com origem no extrato aquoso das folhas de *Camellia sinensis*, o Veregen®, rico em sincatequinas, que demonstrou atividade terapêutica no uso tópico de pacientes com condiloma perianal e genital [135]. O cultivo de espécies com interesse económico tem sido uma realidade em alguns países, nos Estados Unidos da América, o *Hypericum perforatum* e *Ginkgo biloba* são exemplos de espécies em cultivo para dar resposta às exigências da indústria farmacêutica [136]. Outro exemplo é a *Salvia miltiorhiza* que é uma das plantas mais usadas na medicina tradicional chinesa e tem vindo a ser cultivada em países asiáticos, com efeito terapêutico na doença cardíaca coronária, em doenças cerebrovasculares e em processos de inflamação [135]. Apesar do cultivo de plantas medicinais ser uma solução para a preservação de espécies na natureza, as condições ambientais podem afetar a produção de metabolitos secundários, colocando em causa a padronização dos produtos obtidos. A propagação *in vitro* de espécies vegetais e o desenvolvimento de metodologias de conservação são conceitos importantes para a preservação das espécies vegetais, assim como o papel dos bancos de germoplasma vegetal.

### 4.1. Propagação *in vitro* para obtenção de compostos bioativos

Nas células vegetais a totipotência é a característica crucial que permite a regeneração de plantas inteiras a partir de células individuais ou de um conjunto de células de um tecido ou órgão, com expressão de todo o genoma da planta. Uma vez em condições de cultura adequadas, desde condições físicas como a temperatura e luminosidade, a químicas como nutrientes, fonte de carbono, pH e hormonas, a micropropagação tem como objetivo a multiplicação de indivíduos geneticamente iguais por reprodução assexuada, em que cada clone é uma população de indivíduos originários no mesmo indivíduo [137]. Os sistemas de propagação *in vitro* ou micropropagação têm vindo a ser utilizados nos últimos anos no desenvolvimento de protocolos para o estabelecimento de espécies vegetais, assim como processos de multiplicação e enraizamento dos explantes [11, 116, 138-140]. A propagação *in vitro* deve ser vista como uma solução para a produção de espécies vegetais em larga escala e com interesse económico, pois permite o crescimento de espécies em condições controladas e isentas de doenças, ciclos de multiplicação relativamente curtos e a uniformidade de produção. Por outro lado, e não menos importante, deve ser considerada como uma ferramenta para a conservação de espécies vegetais. No entanto, nos sistemas de propagação *in vitro* a produção de metabolitos secundários pode apresentar alguma variação no teor e composição relativamente ao perfil da espécie silvestre. Zuzarte *et al.* (2010) compararam o perfil volátil dos constituintes do OE de *L. pedunculata*, da planta mãe e de explantes gerados *in vitro*, verificando que os compostos maioritários são os mesmos, mas com alguma variação na concentração. Por outro lado, verificou-se um aumento na concentração de outros compostos, nomeadamente de monoterpenos [11]. Contudo, mesmo em sistemas de propagação *in vitro* os fatores abióticos também influenciam a produção de metabolitos secundários. Tošić *et al.* (2019) estudaram o efeito do regulador de crescimento cinetina no perfil químico do OE de *Micromeria croatica* (Lamiaceae). Os autores compararam o rendimento de extração e a composição química de OE de plantas silvestres e micropropagadas com e sem a presença da cinetina (0,3 µM). O maior rendimento de extração foi obtido nas plântulas de origem *in vitro* com a presença de cinetina (0,45%), no entanto o composto maioritário foi o geranial (33,5%), sendo o borneol o maioritário nas plantas silvestres (25%) e nas plântulas *in vitro* sem regulador de crescimento (20%) [141]. A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura pode estar associada a uma maior produção de metabolitos secundários, pois fornecem moléculas precursoras nas vias biossintéticas dos metabolitos secundários [142]. Para além de fatores químicos, os fatores físicos

também podem influenciar a micropropagação. Bassolino *et al.* (2015) testaram o efeito da intensidade da luz na composição química do OE de *Salvia dolomitica* (Lamiaceae). Os autores verificaram que a exposição a uma maior fonte luminosa (45  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) causou um efeito de stresse nas plântulas revelando um perfil químico do OE diferente das plântulas em condições de controlo (30  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) e das plantas silvestres. Nas plantas silvestres e em plântulas com luz de intensidade normal o composto maioritário do OE foi o  $\beta$ -cariofileno (26% e 15%, respetivamente), enquanto as plântulas com stresse luminoso o composto maioritário foi o 1,8-cineol (17%) [138]. A luminosidade na micropropagação é um fator determinante para o crescimento das culturas, afetando diretamente a fotossíntese e a morfologia das folhas [137]. A produção e acumulação do OE ocorre em estruturas especializadas como os tricomas, no entanto estes parecem não ser afetados pelo stresse luminoso, Fernandes *et al.* (2013) confirmaram que estas estruturas mantiveram a sua morfologia e distribuição [143]. Ainda no estudo anterior, Bassolino *et al.* (2015) verificaram que em ambos os OE com origem em plântulas *in vitro* houve um aumento de compostos monoterpenos e um decréscimo dos sesquiterpenos [138]. Sendo as plântulas propagadas *in vitro* consideradas plantas jovens, a acumulação de monoterpenos ocorre maioritariamente em tecidos jovens devido à elevada capacidade de biossíntese [144]. Gonçalves *et al.* (2019) quantificaram a produção de ácido rosmarínico de plântulas *in vitro* de *Thymus lotocephalus* com a adição ao meio de cultura de eliciadores, como o ácido salicílico (50  $\mu\text{M}$ ), extrato de levedura (500 mg/L), BAP (6-benzilaminopurina) (0,5 mg/L) e nitrato de prata (50  $\mu\text{M}$ ). Os autores verificaram que a produção do ácido fenólico aumentou significativamente com a presença de eliciadores, obtendo um valor máximo de 118 mg/g de extrato na adição de extrato de levedura no meio de cultura. No entanto, as características morfológicas dos explantes foram comprometidas comparativamente ao controlo com e sem adição de BAP [145].

A composição e quantidade dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas são fortemente influenciadas por fatores abióticos, tais como o clima, a altitude, a presença de outras espécies vegetais e animais, assim como a fase fenológica da planta. Por conseguinte, a recolha na natureza, a não ser previamente estudada, pode não corresponder ao perfil pretendido para uma determinada espécie. Devido a estas questões ambientais, a micropropagação de plantas parece ser uma solução para a padronização da produção dos metabolitos secundários em plantas, dado que mesmo em cultivo, as plantas são afetadas por fatores abióticos, podendo por isso afetar o teor e composição dos metabolitos secundários. Contudo, para algumas espécies a micropropagação poderá também apresentar algumas dificuldades pois podem

apresentar uma fraca capacidade regenerativa, assim como os custos associados. Juntando o facto de certas espécies produzirem determinados tipos de compostos e concentrações em condições de stresse o que muitas vezes é difícil de induzir na propagação *in vitro*.

Na secção *Stoechas* do género *Lavandula*, onde se inclui a *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl), têm vindo a ser reportados alguns estudos da sua propagação *in vitro*. Nobre (1996) [146] reportou a multiplicação *in vitro* de *Lavandula stoechas* através de segmentos nodais em meio de cultura com macro- e micro-nutrientes de Margara N30K [147], vitaminas de meio MS (Murashige and Skoog, 1962) [148], suplementado com 217,2 µM de sulfato de adenina e 0,05 µM ANA (ácido α-naftalenacético). Revelando que a presença do sulfato de adenina reduziu fenómenos de hiperhidricidade nos explantes, sendo que a sua presença conjugada com baixas concentrações de ANA aumentou a taxa de multiplicação. A hiperhidricidade caracteriza-se por ser uma desordem fisiológica que pode ocorrer nos explantes, possivelmente devido a estarem expostos a condições especiais como elevada humidade, excesso de açúcares e nitratos e/ou iluminação insuficiente [149]. No caso da micropropagação de *L. viridis* a melhor taxa de multiplicação foi obtida em meio de cultura MS, com metade da concentração dos macronutrientes, suplementado com 0,67 µM de BAP [150]. Em *L. pedunculata*, Zuzarte *et al.* (2010) revelaram que as melhores condições de micropropagação foram obtidas em meio de cultura MS suplementado com 0,25 mg/L de BA [11].

Os estudos de propagação *in vitro* de *P. tridentatum* (Pt) são escassos, sendo reportado por Coelho (2015) os protocolos estabelecidos para o seu estabelecimento e multiplicação em sistemas convencionais *in vitro*. Neste estudo as melhores condições para a multiplicação desta espécie foram obtidas utilizando o meio MS suplementado com 1 mg/L de BA e 0,5 mg/L de AIB (ácido 3-indol butírico) [131]. O uso do meio de cultura MS também tem sido reportado em outros géneros da família Fabaceae, no género *Crotalaria* as melhores condições de multiplicação foram em meio MS suplementado com BA (3 mg/L) ou ANA (0,4 mg/L) [151]. Na mesma família, no género *Dalbergia*, o meio de cultura MS permitiu otimizar o desenvolvimento de explantes, suplementado com BAP (1 mg/L) e ANA (0,1 mg/L) [152].

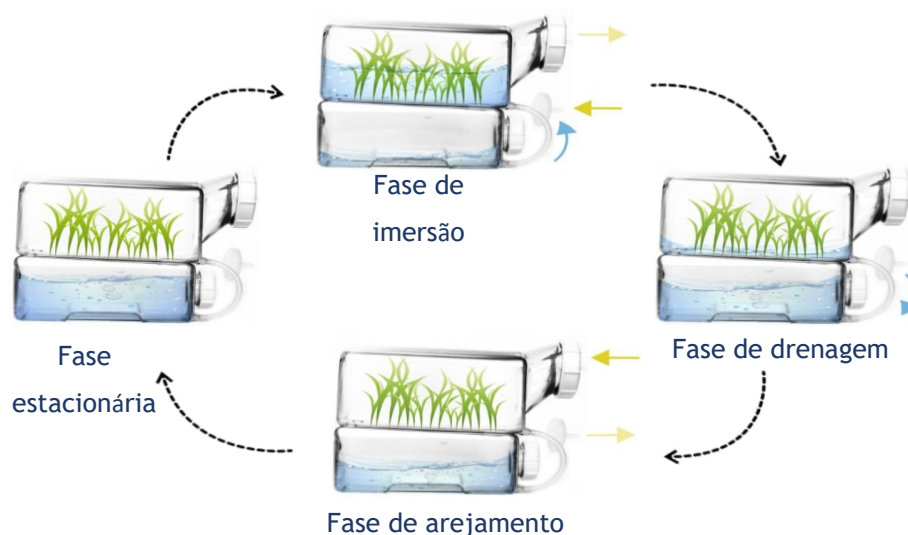
### 4.2. Biorreatores de imersão temporária

Os sistemas de biorreator de imersão temporária (BIT) são sistemas automatizados destinados a providenciarem um melhor ambiente para a propagação *in vitro* de espécie vegetais, através da melhoria da regulação de nutrientes e adequadas condições físicas, contribuindo para o desenvolvimento das culturas, reduzindo

desordens fisiológicas e preservando a integridade morfológica das plantas produzidas [153]. De forma geral, os BIT são constituídos por dois compartimentos (recipientes) de plástico ou vidro, em que um deles contém o material vegetal e o outro armazena o meio de cultura líquido, em que ambos os compartimentos estão ligados por um tubo de silicone, que pela ação da pressão positiva da bomba de ar força o meio líquido a entrar no compartimento no qual está armazenado o material vegetal (imersão). Os compartimentos estão ainda ligados ao sistema de pressão através de um tubo de silicone acoplados a um filtro de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ , garantindo assim a esterilização do ar circulante nos biorreatores. A frequência e duração da imersão do meio de cultura devem ser previamente definidas, sendo que, após a duração desta etapa, o meio retoma para o compartimento inicial por ação da gravidade ou por sucção. No final de cada imersão a bomba de ar é acionada e por ação de uma válvula solenóide o fluxo de ar ocorre na direção oposta, força a entrada de ar no compartimento do material vegetal (arejamento). No funcionamento de um sistema de BIT são essenciais dois parâmetros para o adequado desenvolvimento dos explantes, são eles a frequência e duração da imersão do meio de cultura líquido e a frequência e duração do arejamento. O arejamento ou fornecimento de  $\text{CO}_2$  contribui para o aumento da absorção de nutrientes aquando da imersão dos explantes pelo meio líquido e para a renovação de ar dentro do compartimento. A imersão do meio de cultura para além de ser crucial no fornecimento de nutrientes aos explantes, uma adequada frequência e duração deste processo permite controlar fenómenos de hiperhidricidade [154].

O sistema de BIT deve ser visto como uma estratégia complementar ao sistema convencional (meio agarizado) no sentido que ultrapassar algumas dificuldades ou desvantagens encontradas no sistema convencional. O sistema BIT possui, assim, algumas vantagens comparativamente ao sistema convencional, entre elas, encontram-se aspetos económicos e fisiológicos. Os BIT apresentam vantagens na redução de custos na produção de meio de cultura sem a incorporação de agar e o respetivo aquecimento do meio; na redução de custos de mão-de-obra e de espaço na câmara bioclimática; permite obter maiores taxas de multiplicação comparativamente com o sistema convencional e uma maior autonomia do processo [155]. No entanto, destacam-se como desvantagens no uso deste sistema de propagação *in vitro*, o risco de hiperhidricidade dos explantes, devido ao contacto direto com meio de cultura líquido, e no caso de contaminação microbiológica a perda de todo o material vegetal que se encontra dentro do biorreator. Atualmente, existem inúmeros modelos de biorreatores que podem ser usados como imersão temporária para a propagação *in vitro* de espécies vegetais, entre eles os modelos RITA, *Twin-Flask*, PLANTIMA,

PLANTFORM e SETIS [153]. As diferenças entre eles baseiam-se principalmente nas dimensões dos compartimentos (recipientes); na automatização da imersão ou o controlo por temporizador; no uso de bombas peristálticas, bombas de ar ou movimento mecânico do compartimento para deslocar o meio de cultura e na opção de renovar o meio de cultura [156]. O modelo SETIS<sup>®</sup> foi o modelo utilizado neste trabalho (Figura 8), destacando-se de alguns sistemas pela forma de funcionamento pneumático e gravidade, constituído por polipropileno, sendo autoclavável ou esterilizado por radiação gama. Salientam-se algumas vantagens como a sua elevada capacidade em explantes; o fabrico simples; fácil de transportar e manusear; de automatização simples; possuem uma larga superfície de iluminação; drenagem melhorada; baixos custos de energia e baixo custo de investimento.



**Figura 8.** Esquema representativo das etapas de funcionamento de um biorreator de imersão temporária em modelo SETIS. (Adaptado de: <https://setis-systems.be/about/about-setis>).

Até à data, não existem estudos científicos que reportem a propagação *in vitro* por meio de sistemas de BIT de nenhuma das espécies estudadas neste trabalho. Apenas foi reportado em 2005, um estudo de multiplicação *in vitro* usando o sistema BIT (imersão de meio de cultura com duração de 5 min a cada 4 h) em rebentos de *Lavandula officinalis* [157]. Os autores revelaram que a taxa de multiplicação em BIT (16,5%) foi superior à obtida no sistema agarizado (2,8%), no entanto relativamente ao teor de ácido rosmarínico, foi alcançado o maior teor (55,3 mg/g de massa seca) no sistema convencional, comparativamente ao sistema BIT (5,7 mg/g de massa seca). Como acontece no sistema agarizado, a disponibilidade dos macro- e micronutrientes no desenvolvimento de plantas *in vitro* em sistemas de BIT influencia quer o

desenvolvimento dos explantes, quer a produção de metabólitos secundários. A otimização do meio de cultura pode ter de ser ajustada ao sistema de propagação em BIT, comparativamente ao sistema convencional.

Para além da componente nutricional, nos sistemas de BIT o controlo e monitorização do tempo de imersão e o arejamento são cruciais para o adequado desenvolvimento das culturas [158]. Em rebentos de *Rosmarinus officinalis* foi verificado que as melhores condições de propagação em sistema BIT foram obtidas com 1 min a cada 12 h, quando comparado com a frequência de imersão de 24 h e mesmo aumentando a duração da imersão [159]. Ainda dentro da família Lamiaceae, Grzegorzczuk-Karolak *et al.* (2022) estudaram a propagação *in vitro* de explantes de *Salvia viridis* em sistema de BIT, com duração do ciclo de duas e três semanas, assim como a adição extra de 300 mL de meio de cultura após duas semanas, sendo neste caso a duração de três e quatro semanas. Os autores verificaram que os melhores resultados para os pesos fresco e seco e taxa de multiplicação, foram atingidos nas condições de imersão com duração de 10 min a cada 80 min durante quatro semanas com adição de meio de cultura após duas semanas do início do ciclo. No entanto, quanto ao maior teor de compostos fenólicos, este foi obtido após três semanas de ciclo com a duração de imersão de 10 min a cada 80 min, comparativamente às duas semanas de ciclo e mesmo à adição de meio de cultura e ciclo total de três e quatro semanas [160]. Na família Fabaceae foram desenvolvidos estudos em amendoim (*Arachis hypogaea*), onde foi revelado que as melhores condições de multiplicação *in vitro* em sistema de BIT foram obtidas com a duração de imersão do meio de cultura de 16 min a cada 16 h (24 min de imersão por dia), comparativamente a tempos de imersão diária desde 8 min a 72 min [161].

A variação da duração e frequência de imersão do meio de cultura parece modificar-se com o tipo de espécie em estudo, pois existem espécies mais ou menos exigentes em termos nutritivos. Noutras famílias, mais propriamente em explantes de *Gerbera jamesonii* (Asteraceae), os autores obtiveram as melhores características de multiplicação nas condições de imersão de 4 min a cada 8 h e 1 min a cada 2 h de arejamento. Quando comparado com tratamentos mais curtos de imersão (6 h) verificou-se a presença de vitrificação dos explantes [162]. Esta desordem fisiológica parece ser mais frequente em sistemas BIT cujas frequências de imersão sejam mais curtas. Outro exemplo ocorreu em *Pistacia* sp. (Anacardiaceae), onde as melhores condições de multiplicação foram com a duração de imersão durante 24 min a cada 16 h. Os autores revelam que no tratamento com imersão mais frequente (8 h) a taxa de multiplicação foi a mais baixa, assim como o número de rebentos por explante, e a

taxa de hiperhidricidade foi a mais elevada [163]. Também em *Lycium barbarum* (Solanaceae) as melhores condições de propagação foram 6 min de imersão a cada 24 h, comparando com intervalos de imersão mais curtos (12 h e 16 h) e com maior duração da imersão (20 min e 8 min, respetivamente) [164]. Por outro lado, com a menor frequência de imersão em estudo, em explantes de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) as melhores condições de multiplicação e comprimento de rebento foram obtidas na menor frequência de imersão, 2 min a cada 4 h, comparativamente aos tempos de 8 h e 12 h [165]. Alves *et al.* (2021) avaliaram os parâmetros de multiplicação em *Corema album*, onde verificaram que a taxa de multiplicação duplicou comparativamente ao sistema agarizado. Os autores também testaram o efeito da frequência de imersão e arejamento, sendo que para esta espécie obtiveram melhores resultados de indução de rebentos em frequência de tempo de imersão mais longa, 3 min a cada 12 h, comparando com 3 min a cada 8 h [140].

## 5. Conservação pós-colheita de frutos regionais

### 5.1. A cereja

A cereja é um fruto que provém da árvore *Prunus avium* L., pertencente à família Rosaceae. É, provavelmente, nativa da Europa e da Ásia ocidental. A espécie *P. avium* dá origem à cereja-doce, havendo outras espécies, tais como a *P. cerasus* ou a *P. serotina*, que dão origem, respetivamente, à cereja azeda ou ginja e à cereja-negra. Estas espécies crescem maioritariamente em climas temperados, sendo a região do Mediterrâneo uma das privilegiadas pelo seu clima. Também países como os Estados Unidos da América, Turquia e Chile encontram-se entre os maiores produtores de cereja. As cultivares de cereja doce atingem a maturação no final de abril a junho/julho nas culturas localizadas no hemisfério Norte, pelo contrário, culturas localizadas no hemisfério Sul atingem a sua maturação em dezembro e janeiro. De acordo com a FAO, em 2018 a produção mundial de cereja foi de 2.923.723 toneladas [44]. Em Portugal, nos últimos anos, estima-se que a produção de cerejas ultrapasse as 15.000 toneladas por ano, sendo a região da Beira Interior, designadamente a região da Cova da Beira, distinguida por ser uma região de Indicação Geográfica Protegida [166]. Existem mais de 100 variedades/cultivares de cereja, salientando-se algumas das mais produzidas nesta região: Saco, Brooks, Burlat e Summit.

A cereja é considerada um dos frutos mais apreciados no mundo sendo bastante atrativa para os consumidores devido ao seu particular sabor e cor, é reconhecida também como uma boa fonte de compostos antioxidantes. Nos últimos anos, estudos

sobre as propriedades bioativas em cerejas têm vindo a aumentar. Para além da propriedade antioxidante, as cerejas apresentam potencial antidiabético e anticancerígena [166-168]. Segundo estudos etnobotânicos e no sentido da valorização de subprodutos desta cultura, as infusões de folhas, flores e caules eram usadas como diurético, calmante, anti-inflamatório e benéfico para o sistema cardiovascular [169]. Estas propriedades advêm da sua composição química rica em compostos fenólicos, como ácidos hidroxicinâmicos (éster do ácido cafeico, ácidos *p*-cumárico e ferúlico), flavonóides (apigenina, kaempferol, quercetina, taxifolina, genisteína) e antocianinas (derivados de ciadinina, delphinidina, pelargonidina) [168].

Devido a serem frutos não climatéricos a sua deterioração é rápida no pós-colheita, por isso, alguns requisitos de armazenamento são recomendados para prolongar o seu tempo de vida útil. Após colheita a perda de água nos tecidos leva à subsequente perda de açúcar, perda de cor devido ao decréscimo do teor de antocianinas e oxidação enzimática levando à perda de textura e escurecimento do pedúnculo [170]. Para além destes aspetos fisiológicos, os frutos podem também sofrer danos por fatores ambientais, como a chuva e granizo, ou durante a colheita e armazenamento. Estes danos de natureza mecânica podem ser veículo para a deterioração por microrganismos, nomeadamente fungos, que se encontram naturalmente presentes nos frutos, ar, insetos, animais, solo, manipuladores e superfícies de contacto. De entre a mais diversas infeções por microrganismos, reportam-se as contaminações fúngicas como as causadas por espécies do género *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Monilinia*, causando enormes prejuízos na produção e armazenamento de cerejas. Também a bactéria *Pseudomonas syringae* foi reportada como origem de doença em cereja [171, 172]. Para além dos fatores atrás mencionados, a ocorrência destes microrganismos e a sua influência está também dependente do tipo de cultivar e do estado de maturação do fruto.

### 5.2. O medronho

O medronho é um fruto que provém da espécie *Arbutus unedo* L., pertencente à família Ericaceae, que cresce de forma espontânea e abundante na região Mediterrânica. Segundo Piotto *et al.* (2001), o medronheiro será nativo da Irlanda e região do Mediterrâneo (Sul da Europa e Norte de África) [173], no entanto, é cultivado em outras regiões de climas temperados [174]. Apesar do seu cultivo ainda não ter ganho dimensões económicas importantes, o que se pode atribuir à escassez de cultivares com maiores rendimentos de produção e qualidade do fruto, tem um valor económico no que diz respeito à utilização do fruto para obtenção de aguardente [175]. Existem

algumas cultivares desenvolvidas na China, sendo as mais populares a Zaose, Dongkui, Daliziyangme, Baiyangmei, Zaohongmei e Dahuamei [176]. Em Portugal, para além do crescimento espontâneo, existem algumas áreas de cultivo nomeadamente na região Centro e Sul do país, que recentemente têm vindo a ser incrementadas [177]. O medronheiro caracteriza-se por ser um arbusto, por vezes atinge dimensões de pequena árvore, apresentando um papel ecológico importante, pois tolera solos secos e áridos, sendo uma espécie pioneira após incêndios, e por isso importante na reflorestação [178]. Como é uma espécie característica no ecossistema da região Mediterrânea, e sendo esta região considerada um *hotspot* de biodiversidade, o medronheiro contribui para a manutenção da biodiversidade e para a estabilização de solos, prevenindo a erosão [179]. De acordo com o *Center for Underutilized Crops and the Global Facilitation Unit for Underutilized Species*, a espécie *Arbutus unedo* é classificada na categoria de “*Neglected and Underutilised Crop*” [180]. Apesar de ter sido utilizada na antiguidade devido às suas propriedades aromáticas e medicinais, do ponto de vista económico é considerada uma espécie subaproveitada. No entanto, de acordo com os usos tradicionais apresenta várias potencialidades na área alimentar, como o consumo do fruto em fresco e em produtos processados, em compotas, desidratado ou usado para produzir bebidas alcoólicas [175, 181]. Ao longo dos últimos anos, a valorização desta espécie tem vindo a ser reportada em diversos estudos, nomeadamente as propriedades biológicas e terapêuticas dos frutos e das partes aéreas da planta, apresentando por isso um potencial de aplicação nas áreas da farmacêutica e cosmética [176, 182]. Devido à sua morfologia, o seu estado fenológico de floração coincide com a frutificação, que ocorre nos meses de outono/inverno, entre outubro e dezembro, pode ser aplicado como uma espécie ornamental, pelo que apresenta um papel determinante na atividade apícola.

De acordo com vários estudos científicos, o medronho é considerado uma fonte de elevada qualidade nutricional devido à presença de vitaminas (C e E), fibras, proteínas, açúcares, ácidos gordos insaturados e compostos fenólicos [183]. De entre os compostos fenólicos, podem destacar-se as antocianinas como a delphinina e cianidina, os flavonóides como a quercetina, mircetina e catequina, os ácidos fenólicos como os ácidos cafeico, cinâmico, gálico, ferúlico, vanílico, elágico, entre outros. As folhas de medronheiro também apresentam propriedades nutricionais e potencial biológico devido à presença de compostos fenólicos revelando, à semelhança dos frutos, propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias [184, 185].

Tal como a cereja, o medronho é um fruto não climatérico, o que implica uma rápida deterioração dos frutos após a colheita. Devido ao seu impacto económico, ainda, ser

baixo, não existem muitos estudos sobre a potencial microflora desenvolvida nos frutos. Existem algumas doenças associadas à planta e fruto do medronheiro, como por exemplo a antracnose, doença causada por espécies de fungos dos gêneros *Colletotrichum* ou *Gloeosporium*, que causam manchas escuras nas folhas e frutos [186]; a ferrugem, doença causada por diversos tipos de fungos, alguns deles pertencentes ao gênero *Puccinia* [187]; e a podridão, doença causada por diferentes tipos de fungos, sendo que os mais comuns pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis* e *Rhizopus* [188].

### 5.3. Estratégias de conservação

Os frutos considerados não climatéricos não devem ser colhidos antes da sua completa maturação, pois após a colheita, estes entram em processo de senescência. Por isso, a maturação dos frutos é um processo fisiológico que determina a época de colheita, e neste tipo de frutos, este fator é determinante para o sucesso da colheita. Durante a maturação do fruto ocorre um aumento no processo de respiração, na produção de etileno e alterações na textura, sabor e aroma. O intervalo de tempo que decorre entre a colheita e o consumo pode reduzir a qualidade dos frutos, devido não só à desidratação, o que origina a perda de textura, à ativação de enzimas de deterioração, mas também, ao desenvolvimento de microrganismos. Na conservação e armazenamento de frutos não climatéricos, como é o caso das cerejas e medronhos, existem dois fatores cruciais que devem ser controlados, a temperatura e a humidade relativa. A aplicação de temperaturas baixas é a etapa comumente utilizada na conservação e armazenamento de frutos pós-colheita, no entanto, apresenta algumas consequências negativas no fruto. O impacto da refrigeração pode causar danos estruturais no fruto, sendo esses danos proporcionais ao decréscimo da temperatura, resultando em manchas/deformações. Paralelamente à temperatura, a humidade relativa é outro fator importante pois influencia os processos de respiração, transpiração e senescência dos frutos. Segundo Bernalte *et al.* (1999), a temperatura ótima de colheita situa-se entre 10 a 20°C e as condições ótimas de armazenamento são de 0°C e 90-95% de humidade relativa [189]. Outras estratégias para minimizar a deterioração dos frutos no seu armazenamento é o arrefecimento através do processo *hydrocooling* que consiste no arrefecimento com água a temperaturas muito baixas imediatamente após colheita, no caso das cerejas. Este procedimento reduz o escurecimento do pedúnculo e o enrugamento da epicarpo. A adição de cloreto de cálcio na água do *hydrocooling* pode efetivamente aumentar a qualidade das cerejas durante a conservação, reduzindo a taxa de respiração, a degradação do teor em ácido ascórbico e a peroxidação lipídica da membrana [190]. Para prolongar o tempo de vida

útil das cerejas, têm vindo a ser estudadas embalagens de atmosfera modificada e embalagens de atmosfera controlada. No embalamento de cerejas a longo prazo, têm sido reportados níveis ótimos de oxigénio (2-10%) e de dióxido de carbono (5-20%) [191]. Deverá haver um compromisso entre a concentração destes dois gases, pois a diminuição ou aumento excessivo de um pode comprometer a viabilidade da respiração, originando a ocorrência de outros processos, como por exemplo fermentações.

Outra estratégia para minimizar a deterioração dos frutos é a aplicação de filmes e revestimentos edíveis. Os revestimentos edíveis e filmes consistem em películas finas aplicados na superfície do alimento ou aplicado na embalagem, respetivamente. Os revestimentos edíveis utilizam substâncias de diversa natureza química, que aplicadas na superfície do alimento promovem uma barreira adicional com vista à sua proteção mecânica e física, cujo principal objetivo é prolongar o tempo de vida útil, podendo ser ingerido com o alimento [192, 193]. Em Portugal, a legislação que se refere a revestimentos edíveis é baseada na legislação da União Europeia, nomeadamente pelo Regulamento (CE) n.º 178/2002, que estabelece os princípios e os requisitos gerais da legislação alimentar, pelo Regulamento (CE) n.º 450/2009, que estabelece as disposições gerais sobre os materiais em contacto com alimentos e, como os revestimentos edíveis são considerados aditivos alimentares, deve-se ainda ter em conta o Regulamento (CE) n.º 1333/2008, relativo aos aditivos alimentares. Na comunidade científica, alguns autores diferenciam os termos revestimento e filme edível sob o ponto de vista do método de aplicação, considerando que os revestimentos são aplicados como formulação líquida e formados no alimento, enquanto os filmes são considerados como uma camada de espessura fina de material (previamente secos) e só depois aplicados no alimento [194]. Para que estas substâncias atinjam os objetivos de preservação devem possuir algumas características essenciais, tais como, contribuir para a formação de uma barreira mecânica, apresentarem estabilidade físico-química e microbiológica, serem compatíveis com o alimento sob o ponto de vista organolético, não serem tóxicos, serem seguros para a saúde, possuírem baixo custo de produção e devem estar de acordo com os requisitos da legislação do país em causa [195].

Os revestimentos edíveis são considerados produtos inovadores, de rápido desenvolvimento e sujeitos a atualizações regulatórias em futuros regulamentos. Por estes motivos, torna-se importante a consulta prévia da legislação atualizada e as regulamentações específicas de cada país antes de comercializar qualquer produto que inclua revestimentos edíveis. Normalmente, são constituídos por um biopolímero ou

mistura de biopolímeros, para formar uma matriz densa, podendo ser de natureza diversa: polissacarídea, proteica, lipídica ou resinosa [193, 196]. Os biopolímeros devem também possuir características economicamente sustentáveis. Entre os biopolímeros de natureza polissacarídea mais usados podem-se destacar o quitosano, derivados de celulose, alginato e dextrinas [197]. O quitosano é originado na deacetilação da quitina, que é o maior componente do exoesqueleto dos crustáceos. De acordo com a sua estrutura química, o quitosano é composto por monómeros de glucosamina ligados por  $\beta$ -1,4-glicosidase. O quitosano é solúvel em solventes orgânicos acidificados (pH abaixo de 6), não é tóxico, é biodegradável, biocompatível e, devido à sua carga positiva, apresenta uma boa capacidade de aderência aos alimentos [198, 199]. Devido à sua estrutura química e carga positiva, o quitosano apresenta também propriedades antimicrobianas [200], este biopolímero tem sido um dos mais utilizados em revestimentos, pela sua elevada disponibilidade e preço.

Os revestimentos à base de um único polímero, normalmente possuem características quebradiças e frágeis, por esse motivo, a incorporação de outros componentes com propriedades plastificantes deve ser considerada. O plastificante adicionado é inserido entre as cadeias moleculares do biopolímero e as suas ligações físicas e químicas aumentam a coesão da matriz do revestimento e efetivamente criam elasticidade à estrutura. Os plastificantes mais usados são os polióis, glicerol e sorbitol. No entanto, para promover esta propriedade elástica podem ser também adicionados açúcares ou lípidos. Deverá haver um compromisso na quantidade destes agentes pois poderá perder-se o efeito pretendido [197]. Outra propriedade que o revestimento deve possuir é a sua aderência à superfície do alimento, para promover estas ligações podem ser usados surfactantes como o tween ou a lecitina [196].

Nos últimos anos, têm vindo a ser desenvolvidos revestimentos edíveis aplicados em frutos no sentido de prolongar o seu tempo de vida útil, assim como, a incorporação de compostos bioativos, nomeadamente óleos essenciais. Como já foi referido, os OEs apresentam diversas atividades biológicas de interesse alimentar, tais como as atividades antioxidante e antimicrobiana [9]. Devido a estas propriedades torna-se interessante a incorporação de OEs nas formulações de revestimentos edíveis, conjugando a barreira física dos revestimentos com as propriedades de conservação destes produtos naturais. A eficácia de revestimento à base de quitosano com incorporação de OEs foi demonstrada em diversos estudos. Na conservação pós-colheita de tomate foi utilizado OE de *Ruta graveolens* em revestimentos à base de quitosano, verificando-se uma inibição no crescimento de bolores e leveduras durante 12 dias de armazenamento, comparativamente ao controlo (frutos sem revestimento)

e aos frutos revestidos com quitosano [201]. A aplicação de OE de limão em formulação de revestimentos à base de quitosano revelou efeitos antifúngicos durante o armazenamento a baixas temperaturas [202]. Também na conservação pós-colheita de uvas, Guerra *et al.* (2016) testaram um revestimento de quitosano com incorporação de OE de *Mentha piperita* e *M. villosa*, o qual promoveu a inibição de fungos tais como, *A. niger*, *B. cinerea*, *P. expansum* e *R. stolonifer* [203]. Na conservação de cerejas foram aplicados filmes à base de um polímero constituído por ácido láctico, mais precisamente o poliácido láctico, obtido a partir de recursos renováveis. As embalagens micro-perfuradas à base deste polímero demonstraram contribuir para a melhoria de qualidade dos frutos, nomeadamente a inibição do desenvolvimento de fungos, manutenção do brilho, da cor e da firmeza [172]. Os revestimentos para além de prevenirem impactes mecânicos, podem ainda servir como veículo para o uso de compostos bioativos, como antioxidantes, antimicrobianos, probióticos, aromatizantes ou nutracêuticos contribuindo assim para a melhoria da qualidade do fruto, prolongando o tempo de vida útil e melhorando a qualidade nutricional do fruto [204]. Esta metodologia pode ainda reduzir as taxas de respiração e transpiração, e por isso reduz a perda de firmeza e de peso dos frutos [205]. Alguns estudos realizados na conservação de cerejas através de revestimentos edíveis demonstraram bons resultados em parâmetros fisiológicos [206-208]. Petriccione *et al.* (2015) indicaram que revestimentos à base de quitosano reduziram a perda de água em cerejas e retardaram a alteração de cor, assim como, o teor de ácido ascórbico e de compostos fenólicos [208]. Para além do potencial antimicrobiano e antioxidante que os OEs apresentam nos revestimentos de alimentos, deve ser salientado a questão do *flavour* que alguns OEs apresentam, sendo algumas vezes referido como um atributo negativo. No sentido de minimizar este problema, têm vindo a ser desenvolvidas tecnologias associadas à produção de revestimentos, como a nanoencapsulação dos OEs, onde as propriedades antimicrobianas são potencializadas devido à redução de tamanho, podendo ser ativado o mecanismo passivo de absorção celular, permitindo também a redução na concentração de OE, o que leva a uma diminuição da intensidade do aroma, odor e sabor [209].

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

---



## 1. Propagação *in vitro* das espécies em biorreatores de imersão temporária

### 1.1. Material vegetal

O material vegetal de *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl) foi estabelecido *in vitro* em 2016 de plantas aclimatizadas em estufa, tendo sido recolhidas na Serra da Malcata. O material vegetal de *P. tridentatum* (Pt) usado neste trabalho já se encontrava em ciclo de multiplicação no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Este material foi estabelecido *in vitro* em 2014 de plantas aclimatizadas em estufa, recolhidas na Serra da Malcata [131]. Os exemplares das espécies encontram-se herborizados no Laboratório de Biologia da ESA-IPCB, tendo como respetivos códigos de voucher ESACBMLS07 e ESACBPTM01, para a Lsl e Pt.

### 1.2. Estabelecimento e multiplicação

No caso da Lsl realizou-se o estabelecimento de lançamentos jovens, os quais foram seccionados em 30 segmentos nodais de cada modalidade de desinfecção a ser testada. Em condições laboratoriais, foram lavados em água corrente durante 30 min, seguida de uma pré-desinfecção com fungicida Benlate (Du Pont Ibérica, Barcelona, Espanha) na concentração de 2 g/L durante 10 min (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema simplificado de etapas de estabelecimento de rebentos jovens de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Após esse período e em condições assépticas iniciou-se o procedimento de desinfecção realizado em câmara de fluxo laminar horizontal que consistiu nas seguintes etapas:

- ☞ Imersão em álcool a 70% durante 30 segundos (s);
- ☞ Imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl, 1% e 2%, v:v) com adição de três gotas de tween 20 (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) durante 10 e 15 minutos (Tabela 5);
- ☞ Passagem por água destilada esterilizada (operação repetida três vezes, ficando os segmentos nodais na 4<sup>a</sup> água destilada esterilizada).

**Tabela 5.** Modalidades de desinfecção testadas no estabelecimento de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Tratamento	Hipoclorito de sódio (% v/v)	Duração (min)
E1	1	10
E2	1	15
E3	2	10
E4	2	15

Após a etapa de desinfecção, os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (150x25 mm) contendo cada um 15 mL de meio Murashige e Skoog (MS) [148] (Tabela 31, Apêndice 1), suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,2 mg/L de BAP (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América), com adição de agar numa concentração 7 g/L. O pH foi ajustado entre 5,7 - 5,8 com HCl 1N ou NaOH 1N (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América).

De forma a aumentar a população stock foram realizadas três repicagens sucessivas para tubo de ensaio a cada 3-4 semanas. Após esta etapa as repicagens seguintes foram realizadas em frascos (85x65mm) com 50 mL de meio de cultura, contendo sete explantes por frasco.

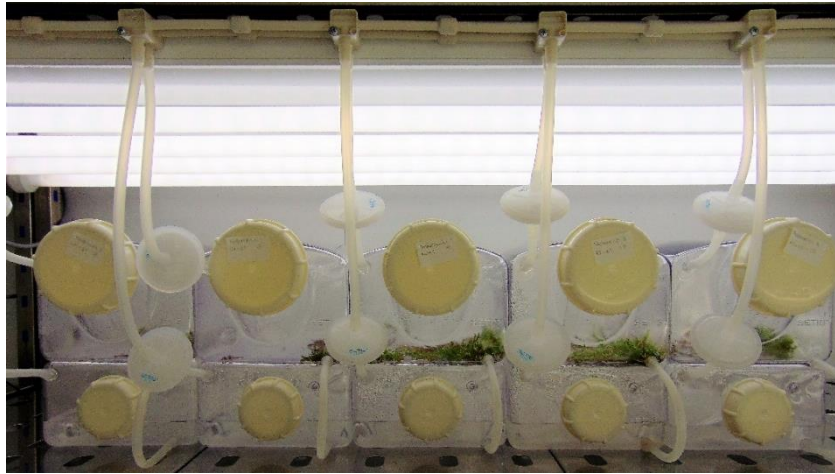
Na etapa de multiplicação de Pt e com o intuito de aumentar a população stock, o meio de cultura utilizado foi o MS, suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 mg/L de BAP, 0,5 mg/L de AIB (ácido indol-3-butírico, Merck, Darmstadt, Alemanha), com adição de agar numa concentração 7 g/L. O pH foi ajustado entre 5,5 - 5,7 com HCl 1N ou NaOH 1N. As repicagens foram realizadas em frascos (85x65mm) com 50 mL de meio de cultura, contendo sete explantes por frasco. A esterilização dos meios foi feita em autoclave a 121°C, 1,2 atm e durante 20 minutos.

Após manuseamento das culturas na câmara de fluxo laminar, as culturas foram transferidas e mantidas na sala de cultura com um fotoperíodo de 16 horas de luz (25°C) e 8 horas de escuro (22°C), sob uma intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , assegurada por lâmpadas fluorescentes, tipo “cool white”.

### 1.3. Biorreatores de imersão temporária

Os biorreatores de imersão temporária (BITs), modelo Setis® (Beervelde, Bélgica), consistem em dois compartimentos de policarbonato, um deles destinado à inoculação dos explantes (superior) e o compartimento inferior onde é colocado o meio de cultura (Figura 10). Os compartimentos estão ligados por um tubo de silicone e o fluxo de ar é esterilizado pela passagem através de membranas hidrofóbicas com porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ . O fluxo de ar é assegurado por um compressor de ar, que tem duas funções, garantir o que o meio de cultura seja transportado para o compartimento dos explantes e arejamento nesse compartimento. O controlo da duração e frequência da imersão

pelo meio de cultura e do arejamento é assegurado por um software de gestão acoplado ao sistema de BIT.



**Figura 10.** Disposição dos biorreatores de imersão temporária instalados na sala de cultura.

### 1.3.1. *L. stoechas* subsp. *luisieri*

#### Ensaio A

Após obtenção da população stock de Lsl multiplicada em meio agarizado, foram realizados ensaios em BIT. De forma a verificar quais as melhores condições para a sua multiplicação, foram realizados vários ensaios com diferentes modalidades. As modalidades e condições do primeiro ensaio de BIT em Lsl, designado por ensaio A, estão apresentadas na Tabela 6. Para comparar os aspetos morfológicos dos explantes usados em BIT, realizou-se um tratamento em meio agarizado (T1). O meio de cultura base usado foi o mesmo que o utilizado na fase de multiplicação apenas com alteração na concentração de ácido ascórbico (10 mg/L, VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Foram também testadas três concentrações do regulador de crescimento BAP: 0,1 mg/L, 0,05 mg/L e 0,01 mg/L. Em cada biorreator foram introduzidos 30 explantes (segmentos nodais) com comprimento entre 15 e 20 mm, e com um volume de meio de cultura líquido de 1 L. O sistema de biorreatores composto pelos compartimentos superior e inferior, tubos de ligação e filtros, foram esterilizados segundo as condições mencionadas atrás. Em ambiente assético, na câmara de fluxo laminar, foi preparado o sistema de biorreator e preparados os respetivos explantes. Os BITs foram colocados na sala de cultura nas condições mencionadas atrás. De entre os seis tratamentos em BIT foram programadas duas modalidades de imersão e arejamento: 3 min a cada 24 h de imersão intercalados com o arejamento de 1 min a cada 4 h para os tratamentos T2, T3 e T4; e 3 min a cada 12 h de imersão intercalados com o arejamento de 1 min a cada 2 h para os tratamento T5, T6 e T7.

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

**Tabela 6.** Modalidades e condições do ensaio A de BIT em *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Tratamento	Método	Meio de cultura	Nº de explantes	Tempo (dias)	Imersão/Arejamento
T1D30	Agarizado	MS*+0,1 mg/L BAP	7/frasco	30	-
T1D50				50	-
T2D30	BIT	MS*+0,1 mg/L BAP	30	30	3' a cada 24h/1' a cada 4h
T2D50				50	
T3D30	BIT	MS*+0,05 mg/L BAP	30	30	3' a cada 24h/1' a cada 4h
T3D50				50	
T4D30	BIT	MS*+0,01 mg/L BAP	30	30	3' a cada 24h/1' a cada 4h
T4D50				50	
T5D30	BIT	MS*+0,1 mg/L BAP	30	30	3' a cada 12h/1' a cada 2h
T5D50				50	
T6D30	BIT	MS*+0,05 mg/L BAP	30	30	3' a cada 12h/1' a cada 2h
T6D50				50	
T7D30	BIT	MS*+0,01 mg/L BAP	30	30	3' a cada 12h/1' a cada 2h
T7D50				50	

\*Meio MS referido na Tabela 31, Apêndice 1.

Os explantes de cada tratamento foram avaliados após 30 e 50 dias de permanência na sala de cultura. Os parâmetros de avaliação foram o número de novos rebentos (NnR), o comprimento do maior rebento (CmR), a taxa de multiplicação (Tm), o peso fresco (Pf), a cor das folhas, hiperhidricidade (%) e a taxa de mortalidade (%). A taxa de multiplicação foi baseada na contagem do número de explantes secundários gerados a partir de um explante original. Neste ensaio foi também avaliada a cor dos explantes, para o efeito criou-se uma escala de referência representada na Figura 11.



**Figura 11.** Explantes de *L. stoechas* subsp. *luisieri* representativos da escala de referência de cor. Da esquerda para a direita considerou-se verde-escuro (#244204), verde (#38610B) e verde-claro (#4D6C0E). A barra a preto corresponde a 1 cm.

### Ensaio B

Tendo em conta os resultados obtidos no ensaio A e no sentido de tentar obter as melhores condições de propagação de explantes de *Lsl* em BIT, realizaram-se ensaios com inclusão do regulador de crescimento meta-topolin (mT, Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Baixos), com o intuito de reduzir fenómenos de hiperhidricidade que

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

foram detetados nos tratamentos do ensaio A, aumentou-se o número de explantes para 60, assim como alterações à frequência e duração de imersão e arejamento. Neste ensaio foi utilizada uma rede na base do compartimento superior, colocada antes da esterilização. A presença de rede pode auxiliar na redução de fenómenos de hiperhidricidade e evitar que os explantes, numa fase inicial, passem para o compartimento inferior através do tubo de comunicação, onde está o meio de cultura. Na Tabela 7 estão apresentadas as modalidades do ensaio B.

**Tabela 7.** Modalidades e condições do ensaio B de BIT em *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Tratamento	Método	Meio de cultura	Nº de explantes	Tempo (dias)	Imersão/Arejamento
T8	BIT	MS+0,05 mg/L BAP	60	50	3' a cada 24 h / 1' a cada 12 h
T9	BIT	MS+0,5 mg/L mT	60	50	3' a cada 24 h / 1' a cada 12 h
T10	BIT	MS+0,05 mg/L BAP	60	50	1' a cada 24 h / 1' a cada 12 h
T11	BIT	MS+0,5 mg/L mT	60	50	1' a cada 24 h / 1' a cada 12 h
T12	BIT	MS+0,05 mg/L BAP	60	50	1' a cada 24 h / 5'' a cada 8h
T13	BIT	MS+0,05 mg/L BAP	60	50	1,5' a cada 12h / 5'' a cada 8h

O meio de cultura em BIT sofreu modificação nos nitratos de amónio e de potássio (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América), com 75 mg/L e 125 mg/L, respetivamente. Em termos cronológicos, realizaram-se primeiramente os ensaios T8 a T11, com diferenciação no regulador de crescimento, BAP e mT, e diferentes condições de imersão e arejamento. Os tratamentos T12 e T13 realizaram-se num momento posterior aos T8-T11 e diferenciaram-se pelas condições de imersão e arejamento. Todos os tratamentos foram avaliados após 50 dias de ciclo de crescimento. Os parâmetros de avaliação foram o número de novos rebentos (NnR), o comprimento do maior rebento (CmR), a taxa de multiplicação (Tm), o peso fresco (Pf), a cor das folhas, hiperhidricidade (%) e a taxa de mortalidade (%).

### 1.3.2. *P. tridentatum*

#### Ensaio A

A partir de explantes previamente estabelecidos *in vitro* em meio de cultura agarizado, realizaram-se ensaios de multiplicação de Pt em sistema de BIT. Com o intuito de identificar quais as melhores condições de multiplicação em BIT, realizou-se um

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

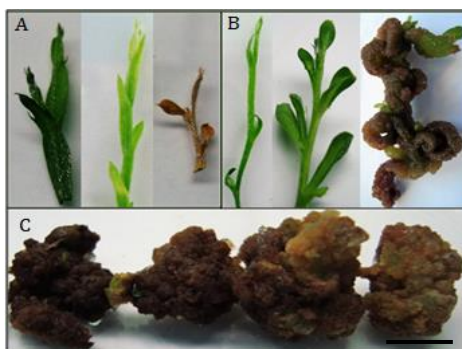
primeiro ensaio, denominado por ensaio A. As condições e modalidades do ensaio A estão apresentadas na Tabela 8. O meio de cultura de Pt usado em BIT é igual ao mencionado na fase de multiplicação, com algumas modificações, nomeadamente o acréscimo de 25% da concentração de nitrato de potássio, redução de 25% da concentração de nitrato de amónio e 10 mg/L de ácido ascórbico. Após preparação do meio de cultura líquido (sem adição de agar), 1 L de meio de cultura foi adicionado no compartimento inferior do BIT.

**Tabela 8.** Modalidades e condições do ensaio A de BIT em *P. tridentatum*.

Tratamento	Método	Meio de cultura	Reguladores de crescimento	Número de explantes	Tempo (dias)	Imersão/ Arejamento
T1	Agarizado	MS*		7/frasco	30 (T1D30) 50 (T1D50)	-
T2	TIB	MS* +25% KNO <sub>3</sub> -25% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 10 mg/L ácido ascórbico	1 mg/L BAP 0,5 mg/L AIB	50/BIT	30 (T2D30) 50 (T2D50)	3' a cada 4 h 1' a cada 2 h
T3	TIB			100/BIT	30 (T3D30) 50 (T3D50)	

Foram utilizados segmentos nodais entre 15 e 20 mm e inoculados no compartimento superior do sistema de BIT. Relativamente às condições de imersão e arejamento dos explantes no BIT foram: imersão de 3 min a cada 4 h e o arejamento 1 min a cada 2 h. Para comparar os aspetos morfológicos dos explantes usados em BIT, realizou-se um tratamento em meio agarizado (T1). Os BIT foram colocados na sala de cultura com as condições atrás mencionadas. A avaliação dos explantes foi realizada após 30 e 50 dias em cada tratamento. Os parâmetros de avaliação foram o peso fresco (Pf) e seco (Ps) (secagem a 70°C até pesagem não diferir mais do que 10 mg), a cor das folhas, hiperhidricidade (%) e a taxa de mortalidade (%). Para a cor das folhas, calo e hiperhidricidade foram estabelecidas escalas de referência (Figura 12) para avaliação qualitativa.

Tendo em conta os resultados do ensaio A, realizaram-se outras modalidades modificando a frequência e duração da imersão e arejamento. No entanto, nesses ensaios a maioria dos explantes apresentaram necrose. Assim, decidiu-se alterar o tipo de explante a usar nos ensaios seguintes de Pt, utilizando também explantes com o calo originado no meio agarizado com o segmento caulinar de 10 mm de comprimento (Ensaio B).



**Figura 12.** Escalas de referência definidas para a cor das folhas (A: verde-escuro, verde-claro e castanho), vitrificação (B: ausente, parcial e total) e a cor do calo (C: castanho-escuro, castanho e castanho-claro) de *P. tridentatum*. A barra a preto corresponde a 1 cm.

### Ensaio B

No ensaio B o meio cultura teve a mesma composição e volume do usado no ensaio A. A Tabela 9 apresenta as modalidades e condições usadas neste ensaio. As alterações centraram-se no número e tipo de explante, exceto o tratamento T5, onde foram usados segmentos nodais, e as condições de imersão e arejamento nos BIT. Neste ensaio foi utilizada a rede na base do compartimento superior. Realizou-se também a avaliação de um tratamento em meio agarizado, em sistema convencional (T4). Após um ciclo de 50 dias, foram avaliados os parâmetros número de novos rebentos (NnR), comprimento do maior rebento (CmR), taxa de multiplicação (Tm), peso fresco (Pf), a cor das folhas, hiperhidricidade (%) e taxa de mortalidade (%).

**Tabela 9.** Modalidades e condições do ensaio B de BIT em *P. tridentatum*.

Tratamento	Número de explantes	Imersão/Arejamento	Tipo de explante
T4	30	Meio agarizado	Segmento nodal
T5	30	1' a cada 24 h / 5'' a cada 8 h	Segmento nodal
T6	30	1' a cada 24 h / 5'' a cada 8 h	Calo + segmento nodal
T7	30	1,5' a cada 24 h / 5'' a cada 8 h	Calo + segmento nodal
T8	30	3' a cada 24 h / 1' a cada 12 h	Calo + segmento nodal

## 2. Obtenção e extração de compostos bioativos

### 2.1. Material vegetal

O material vegetal de *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl) e *P. tridentatum* (Pt) usado para a extração de compostos bioativos foi recolhido na Serra da Malcata, Penamacor (Tabela 10) em três momentos do ciclo vegetativo: repouso (R), pré-floração (PF) e floração (F), recolhidos nos meses de novembro de 2017, fevereiro e maio de 2018, respetivamente. Na fase de floração, em Lsl analisou-se o OE da floração (flores e

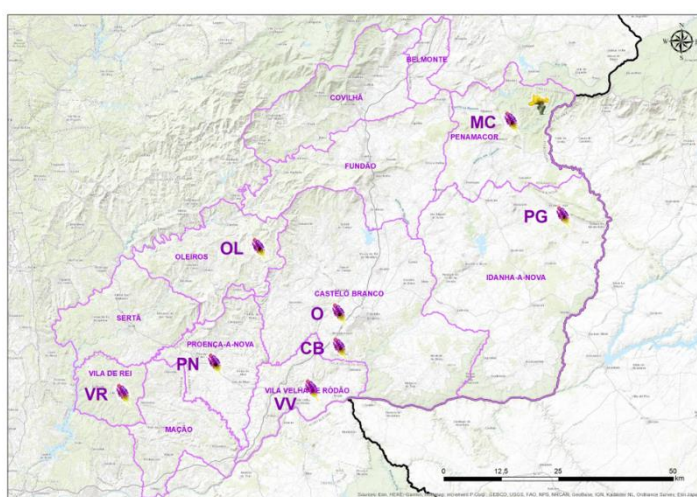
## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

folhas), só de folhas e só de flores. No caso de Lsl as flores estão agrupadas numa inflorescência, por isso o termo correto a designar a parte floral é inflorescência, no entanto, para ser mais prático é usado ao longo do trabalho o termo flores. A Tabela 10 apresenta as coordenadas geográficas dos locais de recolha de Lsl e Pt.

**Tabela 10.** Identificação dos locais de recolha de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *P. tridentatum* na região da Beira Interior.

Sigla	Local	Voucher	Latitude (N)	Longitude (W)	Altitude (m)
MC	Serra da Malcata (Lsl)	ESACBMCLS01-10	40°12.171	7°06.542	558
MC	Serra da Malcata (Pt)	ESACBMCPT01	40°14.059	7°06.528	743
PG	Penha Garcia	ESACBPGLS01-10	40°01.420	6°59.834	492
CB	Castelo Branco	ESACBCBLS01-10	39°45.472	7°33.319	336
OL	Oleiros	ESACBOLLS01-20	39°57.368	7°45.505	654
PN	Proença-a-Nova	ESACBPNLS01-20	39°43.584	7°52.377	410
VR	Vila de Rei	ESACBVRLS01-20	39°40.263	8°06.389	425
VV	Vila Velha de Ródão	ESACBVVLS01-10	39°40.534	7°37.499	141
O	Ocreza	ESACBOLP01-20	39°49.504	7°33.373	318

De forma a caracterizar os constituintes voláteis dos OEs de Lsl da região da Beira Interior, para além do material vegetal de Lsl recolhido na Serra da Malcata, foram recolhidas plantas em floração (10 a 20 exemplares) noutros locais desta região (Figura 13) durante os anos de 2020/2021. Como *outgroup* recolheu-se no local Ocreza (O), no concelho de Castelo Branco, 20 plantas de *L. pedunculata*.



**Figura 13.** Distribuição geográfica dos locais de recolha de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *Pterospartum tridentatum* na região da Beira Interior.

Todos os exemplares foram herborizados e depositados no herbário do Laboratório de Biologia da ESA-IPCB. Em cada local foram registadas as coordenadas geográficas e a elevação (m) utilizando um GPS Trimble-Geoexplorer3 (Trimble, Califórnia, Estados Unidos da América), entre cada planta foi considerada uma distância de pelo menos 5 m. Na Tabela 32 do Apêndice 2 constam as variáveis bioclimáticas selecionadas nos locais de estudo, destacando-se o índice de continentalidade, índice ombrotérmico, precipitação anual, isothermalidade, temperatura máxima e a altitude.

### 2.2. Extração de óleos essenciais e extratos aquosos

A extração de compostos bioativos a partir do material vegetal de Lsl e Pt foi realizada através do processo de hidrodestilação, com a utilização do aparelho de *Clevenger*-modificado durante 2 h, de acordo com o procedimento recomendado pela Farmacopeia Europeia [8]. O material vegetal obtido através do processo de micropropagação também foi sujeito ao mesmo processo de obtenção de compostos bioativos. Foram realizados triplicados de cada estado vegetativo e do material com origem na micropropagação. O material vegetal foi previamente pesado e colocado num balão de extração com água destilada até cobrir todo o material vegetal. O balão é colocado sob uma fonte de calor e após ser depositada a primeira gota de OE é realizada a contagem decrescente para o término do processo. A água de decocção que serviu como base para a hidrodestilação considerou-se o extrato aquoso, e foi obtido em ambas as espécies. No caso da Lsl, para além do extrato aquoso, foi obtido o OE. A escolha deste método prende-se com o facto de posteriormente os extratos/óleos essenciais serem aplicados em revestimentos edíveis, pelo que se optou por não utilizar qualquer extração com solventes orgânicos. A utilização de solventes orgânicos pode, por um lado comprometer a segurança alimentar, e por outro lado a adoção de metodologias mais ecológicas para o ambiente.

Após obtenção dos extratos aquosos, estes foram filtrados com papel de filtro Whatman, distribuídos em copos, registada a massa e congelados a -80°C para posterior liofilização. A liofilização realizou-se em equipamento Zirbus VaCo 10 II-D (Harz, Alemanha), a 0.3 mbar. Após liofilização do extrato aquoso, registou-se a massa final para cálculo do rendimento de extração, que foi obtido através da seguinte equação (1):

$$\eta = \frac{\text{massa extrato aquoso liofilizado (g)}}{\text{massa material vegetal seco (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Para o cálculo do rendimento de extrato aquoso, foi determinada a humidade do material vegetal, sendo o rendimento (%) reportado à massa de extrato liofilizado g/100 g de material vegetal seco (ms).

No caso do óleo essencial, este foi obtido diretamente do aparelho no qual consta uma escala volumétrica e onde é possível medir o volume de OE obtido, que por relação com a massa do material vegetal é calculado o rendimento aplicando a seguinte equação (2):

$$\eta = \frac{\text{volume de OE obtido (mL)}}{\text{massa do material vegetal seco (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Os extratos aquosos de cada espécie com origem silvestre e nos três ciclos vegetativos, e material com origem na micropropagação, foram caracterizados nos seguintes parâmetros: rendimento de extração, teor de fenóis totais, teor de flavonóides, perfil fenólico e atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. No caso do óleo essencial do material vegetal silvestre e de micropropagação foram determinadas as atividades antioxidante, antimicrobiana, a citotoxicidade e identificado o seu perfil volátil.

### 3. Determinação dos compostos fenólicos e voláteis

#### 3.1. Fenóis totais e flavonóides

##### 3.1.1. Fenóis totais

O teor de fenóis presente nos extratos aquosos liofilizados de Lsl e Pt foi determinado usando o método colorimétrico *Folin-Ciocalteu* descrito por Gião *et al.* (2007), com algumas alterações [210]. O extrato liofilizado foi diluído em água destilada, obtendo uma concentração de 2 mg/mL. Utilizaram-se 50 µL de extrato aquoso e de ácido gálico (Alfa Aesar, Massachusetts, Estados Unidos da América) usado como padrão, 50 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu* a 2 N (Panreac, Barcelona, Espanha) e água destilada perfazendo um volume final de 1,5 mL. A mistura permaneceu durante 3 minutos, após os quais foi adicionado 1 mL de solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/L, Biochem, Cosne sur Loire, França). Após incubação no escuro durante 1 hora, a 30°C, o teor de fenóis foi determinado por leitura da absorvância a 765 nm, usando um espectrofotómetro de UV-VIS (Specord 200 plus, Analytikjena, Jena, Alemanha). Para a construção da curva de calibração (Figura 48, Apêndice 3) foi utilizado como referência o ácido gálico nas seguintes concentrações 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 mg/L ( $y=0,0021x+0,0115$ ;  $R^2=0,9993$ ). O teor de fenóis foi expresso em miligramas de

equivalentes de ácido gálico por grama de massa seca (mg GAE/g<sub>ms</sub>). As análises foram realizadas em triplicados.

### 3.1.2. Flavonóides

O teor de flavonóides presente nos extratos foi determinado de acordo com o método descrito por Luís *et al.* (2011) [112]. Para a construção da reta de calibração utilizou-se o padrão quercetina (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América). A partir de uma solução-mãe do padrão quercetina numa concentração de 1000 µg/mL em metanol (Sharlau, Barcelona, Espanha). De seguida efetuaram-se as diluições pretendidas com diferentes concentrações (8, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL). A 250 µL de cada solução anterior adicionaram-se 750 µL de metanol, 50 µL de uma solução aquosa de cloreto de alumínio (10%, m/v, Merck, Darmstadt, Alemanha), 50 µL de uma solução aquosa de acetato de potássio (1 M, Chem-lab, Zedelgem, Bélgica) e 1,4 mL de água destilada, perfazendo um volume total de 2,5 mL em tubos de ensaio. Deixou-se reagir à temperatura ambiente, durante 30 minutos, com agitação intermitente. Para o branco procedeu-se de igual forma ao descrito, substituindo os 250 µL das soluções de padrão por 250 µL de metanol. Decorrido o tempo necessário, as absorvâncias destas misturas reacionais foram registadas a 415 nm, usando um espectrofotómetro de UV-VIS (Specord 200 plus, Analytikjena, Jena, Alemanha). Para a determinação dos flavonóides nos extratos, procedeu-se como descrito anteriormente, substituindo os 250 µL por cada um dos extratos liofilizados dissolvidos em metanol. A quantidade de flavonóides em cada um dos extratos foi calculada utilizando a equação da curva de calibração (Figura 49, Apêndice 3), sendo os valores apresentados em miligramas de equivalentes de quercetina por gramas de matéria seca (mg EQ/g<sub>ms</sub>). As análises foram realizadas em triplicados.

### 3.2. Identificação e quantificação do perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Com o objetivo de identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos de Lsl e Pt de plantas silvestres e com origem na micropropagação, foi desenvolvida e validada uma metodologia para a determinação simultânea dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta precisão acoplada a um detetor de díodos (HPLC-DAD). A metodologia definida foi validada através de um protocolo determinado internacionalmente segundo os critérios de validação da *Bioanalytical Method Validation* [211]. Os parâmetros estudados foram a seletividade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

### 3.2.1. Reagentes e condições cromatográficas

Os padrões analíticos dos compostos fenólicos estudados neste trabalho foram o ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, taxifolina, rutina, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido rosmarínico e quercetina. A fase móvel e restantes soluções foram preparadas com reagentes de grau de pureza HPLC, as quais foram sujeitas a degaseificação por ultrassons antes da utilização no sistema de HPLC. A Tabela 11 apresenta a informação relativa aos padrões dos compostos fenólicos, assim como os respetivos tempos de retenção e comprimento de onda. As soluções-mãe de cada padrão foram preparadas em etanol com uma concentração final de 1 mg/mL. Estas soluções foram armazenadas no escuro a uma temperatura de 4°C até utilização.

**Tabela 11.** Padrões de compostos fenólicos, tempos de retenção e comprimento de onda de absorvância máxima.

Padrão	Marca	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda (nm)
Ácido gálico	Acros	3,826	280
Ácido clorogénico	Sigma-Aldrich	10,710	322
Ácido cafeico	Sigma-Aldrich	13,540	322
Ácido siríngico	Sigma-Aldrich	16,171	280
Ácido <i>p</i> -cumárico	Sigma-Aldrich	20,774	291
Taxifolina	Sigma-Aldrich	24,973	291
Rutina	Acros Organics	25,569	255
Ácido ferúlico	Sigma-Aldrich	25,865	322
Ácido elágico	Sigma-Aldrich	27,266	255
Ácido rosmarínico	Sigma-Aldrich	32,852	322
Quercetina	Sigma-Aldrich	40,654	255

Para a análise foi utilizado um sistema de HPLC constituído por uma bomba binária (modelo 1290, Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos da América) acoplado a um detetor de arranjo de díodos (DAD) (modelo 1260, Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos da América). Os compostos fenólicos foram separados através de uma coluna YMC-Triart PFP (5 µm, 4,6 x 150 mm) (YMC Europe GMBH, Dinslaken, Alemanha) acoplada a uma pré-coluna Triart PFP (5 µm, 3 x 10 mm) (YMC Europe GMBH, Dinslaken, Alemanha). A fase móvel foi constituída por acetoneitrilo (Carlo Erba, Emmendingen, Alemanha) (linha A) e 0,1% de ácido trifluoracético (Sigma-

Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América) (linha B). A separação foi conseguida por gradiente linear de eluição: 10% (v/v) do eluente da linha A até aos 3 min; dos 3 aos 20 min 15% (v/v) linha A; dos 20 aos 25 min 18% (v/v) linha A; dos 25 aos 40 min aumenta para 30% (v/v) linha A; dos 40 aos 45 min 50% (v/v) linha A; dos 45 aos 50 min 100% (v/v) linha A; finalmente dos 50 aos 55 min são restabelecidas as condições iniciais 10% (v/v) linha A. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi de 35°C e a do injetor de 4°C. O volume de injeção foi de 50 µL e os analitos foram detetados entre os comprimentos de onda de 255 a 360 nm. Os extratos aquosos liofilizados (20 mg) foram dissolvidos em 1 mL de etanol 96% (Merck, Darmstadt, Alemanha), centrifugados (20.000×g) e filtrados (0,22 µm) antes da injeção. A concentração dos compostos fenólicos foi expressa em µg/g de extrato liofilizado, de cada amostra foram injetados duplicados de três extrações da mesma fase fenológica.

### 3.2.2. Validação do procedimento analítico

#### Seletividade e especificidade

A seletividade de um método é a capacidade do mesmo diferenciar e quantificar o analito a analisar na presença de outros componentes da amostra. Esta característica depende não só da matriz a analisar, mas também do tipo de detetor usado. A especificidade corresponde à capacidade de o método distinguir um analito de outras substâncias. Muitas vezes ambos os termos são utilizados indistintamente, no entanto, de forma simples, pode-se considerar que um método é considerado específico quando produz uma resposta para um analito, por outro lado um método seletivo produz respostas para vários analitos distinguindo a resposta de um em relação aos outros. Neste trabalho pretendeu-se a análise de mais de um analito e por isso previamente deve-se garantir que os mesmos não interferem entre si. Desta forma, os padrões identificados na Tabela 11 foram injetados puros para a determinação do tempo de retenção e comprimento de onda ao qual a sua absorção é máxima.

#### Linearidade

A linearidade define-se como a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Para esta quantificação é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Para avaliar a linearidade foram elaboradas retas de calibração para cada padrão. Além da linearidade, foi verificado o limite mínimo de quantificação (LLOQ- *Lower Limite of Quantification*). O LLOQ

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

corresponde à concentração mais baixa na curva de calibração, sendo necessário que o pico correspondente seja identificável, discreto e reproduzível com uma precisão de 20% e exatidão entre 80-120% (FDA, 2001). O limite de detecção corresponde à menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada. Para a construção das retas de calibração foram usados 10 calibradores (concentrações) distribuídos dentro do intervalo 2 - 1000 µg/mL. Foram também preparados e analisados 3 *quality controls*, em triplicado, para as concentrações 2, 4 e 8 µg/mL. Com base na regressão linear das áreas obtidas para cada composto, foram obtidas as retas de calibração (Tabela 12).

Tabela 12. Dados relativos à linearidade dos padrões em estudo.

Padrão	Intervalo de linearidade (µg/mL)	Reta de calibração		R <sup>2</sup>	LLOQ (µg/mL)
		m	b		
Ácido gálico		24,716	-9,3974	0,9998	2
Ácido clorogénico		16,394	-56,932	0,9992	8
Ácido cafeico		45,584	-84,695	0,9998	4
Ácido siríngico		18,271	7,598	0,9995	4
Ácido p-coumárico		62,969	24,259	0,9994	4
Taxifolina	2 - 1000	21,271	16,799	0,9998	4
Rutina		4,937	-11,78	0,9993	8
Ácido ferúlico		37,309	-53,453	0,9997	4
Ácido elágico		88,501	-165,71	0,9990	2
Ácido rosmarínico		10,196	-7,508	0,9995	2
Quercetina		9,480	-8,2931	0,9986	4

### Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico corresponde ao grau de concordância entre os resultados de ensaios independentes, quando realizadas repetições de uma mesma amostra ou padrões. A precisão do método foi determinada pela precisão interdia e precisão intradia. A precisão interdia ou reprodutibilidade corresponde à variação de certas condições previamente estabelecidas, como a análise em diferentes dias, diferentes operadores e/ou equipamentos. Contrariamente, a precisão intradia ou repetibilidade corresponde ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas nas mesmas condições, isto é, o mesmo operador, no mesmo dia e equipamento.

A exatidão corresponde à proximidade da média dos resultados obtidos com a concentração real do analito presente, sendo determinada replicando as

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

quantificações de amostras que contenham concentrações definidas do analito. Normalmente a precisão é expressa pelo do coeficiente de variação (%), pelo que não deve exceder 15% do erro médio relativo (EMR), à exceção do LLOQ que pode ir até aos 20% [211]. Neste trabalho foram utilizados 5 calibradores entre 4 - 250 µg/mL. Na precisão interdia foram feitas 3 repetições em diferentes dias e na precisão intradia foram feitas 6 repetições para a mesma concentração. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 13.

**Tabela 13.** Resultados da quantificação a partir de calibradores padrão.

Padrão		Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Desvio Padrão	CV (%)	EMR (%)
Ácido gálico	Precisão interdia	4	4,02	0,31	7,71	2,95
		8	8,13	0,34	4,21	4,00
		16	16,47	0,39	2,35	5,39
		63	68,14	2,14	3,15	9,03
		250	271,94	9,72	3,57	8,77
	Precisão intradia	4	4,00	0,17	4,25	2,35
		8	7,62	0,18	2,40	-2,43
		16	14,96	0,42	2,81	-4,25
		63	69,33	2,34	3,37	10,93
		250	274,61	6,10	2,22	9,84
Ácido clorogénico	Precisão interdia	8	8,84	0,23	2,63	13,14
		16	15,26	0,87	5,69	-2,36
		63	62,12	2,56	4,11	-0,61
	Precisão intradia	250	256,92	14,80	5,76	2,77
		8	8,83	0,20	2,28	12,87
		16	16,33	0,32	1,98	4,07
		63	66,60	2,26	3,40	6,26
	250	245,21	8,55	3,49	-2,05	
Ácido cafeico	Precisão interdia	4	4,36	0,10	2,26	11,62
		8	7,30	0,33	4,51	-6,62
		16	14,84	0,51	3,48	-5,02
		63	56,70	2,49	4,39	-9,29
		250	220,64	9,50	4,31	-11,74
	Precisão intradia	4	4,59	0,01	0,23	17,33
		8	7,45	0,27	3,62	-4,82
		16	14,43	0,74	5,17	-8,39
		63	62,84	3,89	6,18	-1,33
		250	259,82	9,51	3,66	2,76
Ácido siringico	Precisão interdia	4	4,55	0,08	1,72	16,54
		8	8,62	0,23	2,67	10,35
		16	17,68	0,11	0,65	13,12
		63	70,49	1,91	2,70	12,78

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

		250	281,36	3,75	1,33	12,54
		4	3,90	0,41	10,46	-3,16
	Precisão intradia	8	6,95	0,25	3,65	-11,41
		16	15,14	1,11	7,36	-0,99
		63	69,32	2,71	3,91	10,01
		250	277,98	10,38	3,74	11,02
		4	3,92	0,34	8,59	0,28
	Precisão interdia	8	8,49	0,25	2,93	8,69
		16	14,31	0,43	2,97	-8,41
		63	62,63	3,91	6,25	0,20
		250	270,89	12,92	4,77	8,36
Ácido p-coumárico		4	3,40	0,12	3,57	-12,91
	Precisão intradia	8	7,51	0,18	2,34	-3,85
		16	13,77	0,15	1,14	-11,85
		63	67,20	1,10	1,63	7,96
250		273,20	8,48	3,10	9,28	
		4	3,73	0,13	3,53	-4,42
	Precisão interdia	8	7,93	0,47	5,91	1,53
		16	17,45	0,30	1,72	11,66
		63	68,75	0,88	1,28	9,99
		250	266,75	15,76	5,91	6,70
Taxifolina		4	3,40	0,36	10,47	-13,08
	Precisão intradia	8	7,50	0,57	7,63	-4,06
		16	14,85	0,96	6,45	-4,96
		63	71,50	0,80	1,12	14,40
250		277,52	5,71	2,06	11,01	
		8	8,79	0,19	2,21	12,52
	Precisão interdia	16	16,68	0,39	2,32	6,74
		63	65,06	3,08	4,73	4,10
		250	251,34	21,57	8,58	0,54
Rutina		8	9,18	0,12	1,27	17,49
	Precisão intradia	16	15,47	0,63	4,09	-0,97
		63	65,85	3,74	5,68	5,36
		250	254,23	5,57	2,19	1,69
		4	4,46	0,06	1,34	14,16
	Precisão interdia	8	8,08	0,21	2,63	3,40
		16	16,56	0,29	1,74	6,00
		63	66,04	2,60	3,94	5,67
		250	261,79	12,25	4,68	4,72
Ácido ferúlico		4	4,44	0,03	0,69	13,91
	Precisão intradia	8	8,04	0,31	3,80	2,85
		16	15,49	0,10	0,63	-0,89
		63	67,99	2,25	3,31	8,79
		250	265,19	8,50	3,21	6,08
Ácido elágico		4	3,95	0,55	13,94	1,00
	Precisão interdia	8	7,09	0,13	1,82	-9,26
		16	15,97	1,33	8,35	2,20
		63	68,13	2,15	3,15	9,00

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

		250	272,95	9,01	3,30	9,18
		4	3,58	0,04	1,06	-8,40
		8	7,21	0,18	2,50	-7,64
	Precisão	16	16,54	0,67	4,07	5,85
	intradia	63	67,79	0,94	1,39	8,46
		250	280,80	3,36	1,19	12,32
		4	4,37	0,12	2,82	11,82
		8	8,31	0,21	2,54	6,32
	Precisão	16	17,32	0,63	3,62	10,84
	interdia	63	71,66	0,49	0,69	14,65
		250	283,78	3,84	1,35	13,51
	Ácido	4	3,86	0,52	13,47	-1,15
	rosmarínico	8	8,14	0,83	10,17	4,18
		16	16,18	1,25	7,70	3,52
	Precisão	63	71,70	0,25	0,35	14,72
	intradia	250	281,59	5,02	1,78	12,64
		4	3,70	0,30	8,02	-5,28
		8	8,02	0,61	7,64	2,64
	Precisão	16	16,97	0,54	3,17	8,64
	interdia	63	69,53	3,78	5,43	11,24
		250	284,92	4,48	1,57	13,97
	Quercetina	4	3,38	0,06	1,81	-13,49
		8	6,63	0,22	3,36	-15,10
		16	13,98	0,11	0,80	-10,54
	Precisão	63	65,23	5,61	8,60	4,36
	intradia	250	286,17	1,30	0,46	14,47

### 3.3. Identificação e quantificação de compostos voláteis nos óleos essenciais

O perfil volátil dos óleos essenciais de *Lsl* obtidos nas diferentes fases fenológicas (repouso, pré-floração e floração) foi obtido por cromatografia gasosa acoplada a detetor de ionização de chama (GC-FID) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer 8700 (Connecticut, Estados Unidos da América) equipado com dois detetores de ionização de chama, um sistema de tratamento de dados e um injetor, o qual estão instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm) (J&W Scientific Inc., Califórnia, Estados Unidos da América) e uma coluna DB-17HT de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm) (J&W Scientific Inc., Califórnia, Estados Unidos da América). A temperatura do forno foi programada a 45°C, com aumento gradual de 3°C/min até aos 175°C, atingindo os 300°C com aumento gradual de

15°C/min, mantendo-se nesta temperatura durante 10 min. A temperatura do injetor e dos detetores definiram-se para 290°C e 280°C, respetivamente. Na análise em GC-FID o gás de arraste foi o hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s, com um split de 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções. Nas análises de GC-MS utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm) (J&W Scientific Inc., Califórnia, Estados Unidos da América) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão do programa 4.1) (Connecticut, Estados Unidos da América). As condições cromatográficas da corrida foram iguais às descritas atrás. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C e a temperatura da fonte de iões foi de 220°C. O volume de injeção foi de 1 µL. O gás de arraste foi o hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s, com um split de 1:50, a energia de ionização foi de 70 eV, a corrente de ionização foi de 60 µA; a gama de massas de 40-300 amu e o tempo de varrimento de 1 segundo. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção em relação aos dos n-alcenos C9-C21 e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Lisboa.

Para o trabalho referente à recolha de material vegetal nas diferentes regiões da Beira Interior e material de propagação *in vitro*, a análise de compostos dos OEs foi realizada utilizando o equipamento disponível no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior. O equipamento cromatográfico utilizado foi o SCION-SQ 456 (Bruker, Massachusetts, Estados Unidos da América) acoplado a uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, Califórnia, Estados Unidos da América), com um fluxo de 1 mL/min, utilizando o hélio como gás de arraste. Os OEs foram diluídos em pentano (1:200) e injetados num volume de 1 µL, usando um split de 1:100. A temperatura inicial foi programada para 45°C, com aumento gradual de 3°C/min até aos 175°C, atingindo os 300°C com aumento gradual de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura durante 10 min. As temperaturas da linha de transferência e a fonte de iões foram programadas para 250°C e 220°C, respetivamente. As amostras foram analisadas a partir de espectrometria de massa por ionização por impacto de eletrões a 70 eV, sendo os compostos identificados em modo de varredura com polaridade positiva de iões 20-300 m/z com tempo de 250,0 ms. A identificação dos compostos baseou-se no índice de retenção (IR) comparando com os IR dados pela biblioteca (NIST 17 versão 2.3, Maryland, Estados Unidos da América) e o IR calculado com base na série

de alcanos C7-C30 (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América), a qual foi injetada nas mesmas condições cromatográficas que as amostras. A quantidade relativa de cada composto foi expressa como percentagem da área relativa de cada composto relativamente à área total dos picos quantificados na amostra.

## 4. Determinação das atividades biológicas

### 4.1. Atividade antioxidante

#### 4.1.1. DPPH

A atividade antioxidante dos extratos e óleo essencial foi avaliada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). Preparou-se uma solução-mãe de DPPH (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América) com uma concentração de 0,08 mM em metanol (Scharlau, Barcelona, Espanha), preparada no dia de análise, armazenada no frio (4°C) e em ambiente escuro até utilização. Para a análise, o extrato liofilizado foi dissolvido em metanol numa concentração de 2 mg/mL. A partir desta solução de extrato foram preparadas diluições em diferentes concentrações (1,2-0,2 mg/mL). Foram pipetados 0,3 mL de cada diluição dos extratos e adicionaram-se 2,7 mL da solução de DPPH. Para que fosse obtido o equilíbrio entre o oxidante e as espécies oxidadas, incubaram-se no escuro à temperatura ambiente durante 30 min. Após a incubação foi lida a absorvância a 517 nm, utilizando o metanol como referência, num espectrofotómetro UV-VIS (Specord 200 plus, Analytikjena). O controlo consistiu na leitura da mistura substituindo o extrato por 0,3 mL de metanol. Como antioxidante de referência foi usado o padrão Trolox (Acros Organics, Massachusetts, Estados Unidos da América). As determinações foram efetuadas em triplicado. A atividade bloqueadora de radicais foi calculada pela seguinte equação (3):

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \left[ \frac{\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1}{\text{Abs}_0} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde, Abs0 é a absorvância do controlo e Abs1 corresponde à absorvância de cada amostra.

Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> (µg/mL) calculado graficamente usando curvas de calibração de cada concentração de amostra *versus* a atividade antioxidante calculada pela equação 3.

### 4.1.2. FRAP

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi usado também o método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Primeiramente foi preparada uma curva padrão de sulfato ferroso (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América) variando em concentrações de 500-2000  $\mu\text{M}$  (Figura 50, Apêndice 3). Os extratos foram preparados numa concentração de 0,5 mg/mL diluídos em água destilada. Em ambiente escuro, a 30  $\mu\text{L}$  das amostras (procedeu-se da mesma forma para a curva de calibração) juntaram-se 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL reagente FRAP. Após homogeneização em vórtex, colocaram-se a reagir em banho-maria a 37°C durante 30 minutos. De seguida realizou-se a leitura das absorvâncias a 595 nm, o reagente FRAP foi utilizado como referência (substituindo os 30  $\mu\text{L}$  das amostras por água destilada) no espectrofotómetro UV-Vis (Specord 200 plus, Analytikjena, Jena, Alemanha). O reagente FRAP foi preparado a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução 10 mM de TPTZ (complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina) e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (Chem-lab, Zedelgem, Bélgica), devendo ser usado imediatamente após a sua preparação. A solução TPTZ foi preparada dissolvendo 3,12 g de TPTZ (Tokyo Chemical Industry, Tóquio, Japão) em 5 mL de HCl a 40 mM (Merck, Darmstadt, Alemanha), completando o volume para 1 L num balão volumétrico com HCl 40 mM. A solução tampão acetato 0,3 M, pH 3,6 foi preparada adicionando 3,1 g de acetato de sódio (Honeywell, Carolina do Norte, Estados Unidos da América) a 16 mL de ácido acético glacial (Panreac, Barcelona, Espanha), completando o volume para 1000 mL com água destilada. As determinações foram efetuadas em triplicado e os resultados foram expressos em  $\text{mmol Fe}^{2+}/100 \text{ g}_{\text{ms}}$ .

### 4.1.3. Sistema $\beta$ -Caroteno/ácido linoleico

A metodologia do método  $\beta$ -caroteno foi baseada no descrito por Luís *et al.* (2011) [112]. Foi preparada uma solução de  $\beta$ -caroteno (Tokyo Chemical Industry, Tóquio, Japão) dissolvendo este composto em clorofórmio (Fisher Scientific, Pensilvânia, Estados Unidos da América) numa concentração 20 mg/mL. Para um balão de fundo redondo adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  da solução anterior, 400 mg de tween 20 (Scharlau, Barcelona, Espanha), 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoleico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 1 mL de clorofórmio. Removeu-se o clorofórmio num evaporador rotativo (IKA RV10, Staufen, Alemanha) a 45°C durante cerca de 5 min, de seguida juntaram-se 100 mL de água destilada. Transferiram-se 5 mL desta emulsão para tubos de ensaio contendo 0,3 mL de diferentes concentrações dos extratos (0,5 a 4 mg/mL). Como controlo substituiu-se o volume das amostras por água destilada. Logo após a adição da emulsão a cada

tubo, agitaram-se e foi determinada a absorvância a 470 nm (Specord 200 Plus, AnalytikJena, Jena, Alemanha) do tempo zero do controlo. Seguidamente, os tubos foram incubados num banho termoestatizado a 50 °C durante 2 h. Passado esse tempo registou-se novamente a leitura da absorvância a 470 nm. Como padrão antioxidante foi utilizado o hidroxitolueno butilado (BHT). O branco consistiu na emulsão sem o  $\beta$ -caroteno. A inibição do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação (4):

$$\% \text{ inibição} = [(Abs_{t2 \text{ amostra}} - Abs_{t2 \text{ controlo}}) / (Abs_{t0 \text{ controlo}} - Abs_{t2 \text{ controlo}})] \quad (4)$$

Onde,  $t_2$  e  $t_0$  correspondem à leitura da absorvância após 2 h de incubação e antes da incubação, respetivamente.

### 4.2. Atividade antimicrobiana

Este subcapítulo foi parcialmente publicado como: “**Joana Domingues**, Manuela Goulão, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Joana Gonçalves and Cristina Santos Pintado. 2023. Essential oils of two Portuguese endemic species of *Lavandula* as a source of antifungal and antibacterial agents. *Processes*, 11, 1165.” e “**Joana Domingues**, Fernanda Delgado, José Carlos Gonçalves, Cristina Santos Pintado. 2021. Essential oils of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* as antifungal agent against fungi from strawberry tree fruit. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 98-106.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia da ESA-IPCB. As culturas microbianas testadas estão depositadas na coleção do mesmo laboratório, sendo usadas as suas referências internas ao longo do trabalho.

Neste trabalho, e por forma a abranger um espetro amplo da atividade antimicrobiana dos extratos e OE, foram utilizadas culturas bacterianas (isolados e cultura de referência) e culturas de fungos filamentosos e leveduras (isolados e cultura de referência). Na Tabela 14 estão apresentadas as 10 culturas bacterianas testadas, nove das quais são culturas isoladas de origem alimentar e uma de referência ATCC.

Relativamente às culturas de fungos, foram testados 18 microrganismos. À exceção da levedura *Candida albicans* (ESALD/2016, isolado clínico), e de três culturas de referência (*Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Penicillium roqueforti* (PRB6 HYP5D) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763)), todas as restantes 14 culturas de fungos filamentosos (9) e leveduras (5) foram isoladas de medronho, cujo trabalho de identificação vem detalhado no Capítulo 3, subcapítulo 3.2. As referências ESA-IPCB para identificação dos isolados de fungos filamentosos são ESA.M.11, ESA.M.13, ESA.M.38, ESA.M.44, ESA.M.45, ESA.M.48, ESA.M.51, ESA.M.54 e ESA.M.60, e para as leveduras são ESA.M.47, ESA.M.57, ESA.M.64, ESA.M.89 e ESA.M.99.

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

Tabela 14. Identificação e descrição das culturas bacterianas testadas neste trabalho.

Microrganismo	Referência ESA-IPCB	Origem	Coloração de Gram
<i>Aeromonas hydrophila</i>	SC-V-AP/2015	Água de poço	-
<i>Bacillus cereus</i>	A-FL-PB/2013	Farinha p/ pão Brioche	+
<i>Burkholderia</i> sp.	B-AM-Pa-3F/2014	Água de mina	-
<i>Chromobacterium violaceum</i>	SC-AF/2014	Água de furo	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	QD-LCP <sub>24</sub> /2014	Leite de cabra	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SC-V-AP/2015	Água de poço	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	Sangue	-
<i>Salmonella</i> sp.	-	Isolado alimentar	-
<i>Serratia marcescens</i>	A-LO-596/2018	Leite de ovelha	-
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	CB-QM- L7/11/2018	Isolado de queijo de mistura	+

### 4.2.1. Ensaio prévios

Para a verificação da atividade antimicrobiana de extratos e OE foi realizado um *screening* inicial, cujo objetivo foi o de verificar o potencial efeito inibitório dos extratos e OEs sobre as culturas. Foram realizados ensaios em duplicado através do método de difusão em placa, com e sem disco. Para a maioria das bactérias foi utilizado o meio de cultura *Müller-Hinton Agar* (MHA, Oxoid, Madrid, Espanha), com exceção da *L. monocytogenes* para a qual foi usado o meio *Tryptone Soy Yeast Extract Agar* (TSYEA, Biokar, Pantin, França). Para as culturas fúngicas foi usado o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA, VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Apenas para os ensaios com OE, os meios de cultura foram suplementados com 0,8% (v/v) de tween 80 (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Os meios de cultura foram preparados de acordo com as indicações do fabricante e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Como controlos positivos para as bactérias foi usado o cloranfenicol (0,1%, m/v, Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América) e para os fungos foi usada a natamicina (0,2%, m/v, Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América).

### 4.2.2. Preparação do inóculo e condições de incubação

Para a obtenção do inóculo das bactérias foi preparada uma suspensão em soro fisiológico a 0,85% (v/v) e comparada com o padrão 0,5 da escala de McFarland (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. As culturas

de fungos encontravam-se criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em água destilada esterilizada e glicerol a 50% (v/v, VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) no caso dos fungos filamentosos, e em meio de cultura *Yeast Glucose Peptone* (YGP) com glicerol (50%,v/v) no caso das leveduras. Em relação às culturas de referência *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, estas foram adquiridas à Ielab (Alicante, Espanha). Após a sua descongelação, foram repicadas para o meio de cultura PDA. Todas as culturas foram incubadas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 a 5 dias para os fungos filamentosos e 48 h para as leveduras. Após o período de incubação das leveduras, foi preparada uma suspensão do inóculo em soro fisiológico a 0,85% NaCl, sendo esta suspensão comparada com o padrão 1 da escala de McFarland, correspondendo a uma densidade celular de leveduras de  $3,0\times 10^7$  UFC/mL. De acordo com Alizadeh-Salteh *et al.* (2010), para os fungos filamentosos foi feita uma suspensão de esporos em soro fisiológico a 0,85% NaCl a partir do crescimento dos fungos em placa, acertando a densidade ótica da suspensão a uma absorvância entre 0,150 - 0,170 no comprimento de onda de 570 nm com o auxílio de um espectrofotômetro (Genesys 10 UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) [212]. A partir de cada suspensão de esporos foram realizadas diluições sucessivas em soro fisiológico a 0,85% NaCl para a quantificação do inóculo em placa de meio PDA. Para *B. cereus*, *A. hydrophila*, *Burkholderia* sp., *S. marcescens* e *C. violaceum* as condições de incubação foram de  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, e a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h para *Staphylococcus* coagulase positiva, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *P. aeruginosa*. Para os fungos a temperatura de incubação foi de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 h para as leveduras e até 5 dias para os fungos filamentosos.

### 4.2.3. Método da microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória

Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) foram utilizadas microplacas com 96 poços (Deltalab, Barcelona, Espanha). Em cada microplaca utilizou-se um microrganismo e testou-se o OE, em triplicado. As concentrações testadas do OE variaram entre 0,1 e 74,7  $\mu\text{L}/\text{mL}$  e entre 4,7 e 149,3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , para fungos e bactérias, respetivamente. Na Figura 14 está representada a microplaca com o delineamento experimental usado. A cada primeiro poço dos triplicados (A1, B1 e C1; E1, F1 e G1) foram adicionados 235,2 ou 257,6  $\mu\text{L}$  (para bactérias ou fungos, respetivamente) de meio *Müller-Hinton Broth* (MHB, Oxoid, Madrid, Espanha) para bactérias, *Tryptone Soy Yeast Extract* (TSYE, Biokar, Pantin, França) para *L. monocytogenes* ou *Potato Dextrose Broth* (PDB, VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) com 0,8% de tween

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

80 para fungos. Ainda nestes poços o volume de OE de Lsl foi de 44,8 ou 22,4  $\mu\text{L}$ , perfazendo um volume total de 280  $\mu\text{L}$  de meio de cultura + OE. A partir deste poço esta mistura foi diluída nos poços seguintes de cada linha, sucessivamente, transportando 140  $\mu\text{L}$  de poço para poço, ou seja, fazendo uma diluição de 1:2, com o auxílio de uma micropipeta. Após as diluições, em cada poço foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do inóculo perfazendo um volume de 150  $\mu\text{L}$ . A coluna 10 corresponde ao controlo positivo que contém somente 140  $\mu\text{L}$  de meio PDB e 10  $\mu\text{L}$  de inóculo; a coluna 11 corresponde ao controlo do meio de cultura onde se adicionaram 150  $\mu\text{L}$  do meio de cultura MHB, TSYEB ou PDB; e na coluna 12 foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de água esterilizada, para promover alguma humidade no interior da microplaca. O controlo negativo foi realizado em linha após cada conjunto de triplicados (nas linhas D1-D9 e H1-H9), contendo meio de cultura e o OE nas mesmas concentrações para que se possa comparar com os restantes poços e verificar a existência de interferência da concentração do óleo essencial nos resultados.

	Vt 280	$\mu\text{L}$	
Meio de cultura	235,2/ 257,6	140	Controlo positivo 140 $\mu\text{L}$ + 10 $\mu\text{L}$ Controlo do meio 150 $\mu\text{L}$ Água esterilizada 150 $\mu\text{L}$
Óleo essencial	44,8/ 22,4	Diluições 1:2	
Inóculo		10	
Resazurina		30	

**Figura 14.** Desenho experimental da microplaca para a determinação da concentração mínima inibitória.

As microplacas foram colocadas num agitador de microplacas durante 1 min e incubadas na estufa com temperatura adequada para o crescimento de cada microrganismo (como referido atrás) e até visualização de crescimento no controlo positivo. Após o período de incubação foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de solução resazurina (0,01%, VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) e re-incubadas durante 2 h. Finalmente, os resultados (em triplicado) foram interpretados e comparados com o controlo positivo e negativo.

### 4.2.4. Avaliação da concentração mínima bactericida e fungicida

A concentração mínima bactericida (CMB) e fungicida (CMF) é considerada como a menor concentração testada do agente antibacteriano/antifúngico capaz de matar o microrganismo testado em meio de cultura sólido após incubação a temperatura adequada ao crescimento do microrganismo. Para a avaliação da CMB e CMF foram utilizados os meios MHA, TSYEA e PDA, tendo em conta o microrganismo. As placas de Petri foram marcadas em quadrículas, cada uma das quais identificada com a referência de cada poço, para cada um dos microrganismos e OE. De cada poço da microplaca, foram retirados 5 µL (bactérias e leveduras) ou 10 µL (fungos filamentosos) do seu conteúdo e colocado no centro da quadrícula correspondente. A leitura das placas foi realizada após incubação nas respectivas temperaturas, registando-se a presença ou ausência de crescimento do microrganismo em triplicado, determinando-se assim a CMB e CMF.

### 4.3. Atividade citotóxica

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), como descrito por Santos *et al.* (2020) [213]. A citotoxicidade do OE de *Lsl* em floração (0,3 a 10 µL/mL) e do extrato aquoso de *Pt* em floração (500 µg/mL a 5000 µg/mL) foi determinado após 24 h de incubação. A linha celular testada foram os fibroblastos (NHDF), a cultura foi mantida em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de mistura antibiótica/antimicótica, 0,02 M de L-glutamina, 0,01 M de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano sulfónico), e 0,001 M de piruvato de sódio. As células foram incubadas a 37°C numa incubadora ventilada com 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente as células foram semeadas em microplacas de 96 poços, com uma densidade celular de 5×10<sup>3</sup> células/poço, que após atingir a confluência foram expostas às amostras dissolvidas em meio de cultura RPMI-1640. O mesmo meio de cultura foi usado como controlo negativo. No final da incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionada a solução de MTT (0,5 mg/mL) e incubada novamente a 37°C durante 3 h. Após este período, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazano foram dissolvidos em 0,5% DMSO (dimetilsulfóxido), sendo as absorvâncias registadas em leitor de microplacas a 570 nm. As amostras foram testadas em triplicado e os resultados expressos em percentagem de inibição em relação ao controlo.

## 5. Ensaio de conservação de frutos endógenos da Beira Interior

### 5.1. Cereja

O ensaio de conservação de cerejas baseou-se no desenvolvimento de formulações de revestimento e a avaliação das suas propriedades mecânicas e higroscópicas. Após aplicação das formulações de revestimento selecionadas, os frutos foram avaliados em termos de perda de massa, textura e em relação à microbiota de frutos sem revestimento (C), revestidos com quitosano (CH) e revestidos com quitosano e OE de Lsl (CH+OE). Para cada modalidade de revestimento, os frutos foram conservados à temperatura ambiente (22°C) e de refrigeração (4°C). As cerejas da variedade Brooks produzidas na Quinta da Popa/Monte Serrano-Ferro, Covilhã foram colhidas em maio de 2021. As análises realizaram-se em três momentos cronológicos: dia 0 (T0), após 4 dias (T1), após 8 dias (T2) e após 12 dias (T3).

#### 5.1.1. Seleção da formulação de revestimento

As formulações dos revestimentos foram preparadas de acordo com o desenho experimental representado na Figura 15.

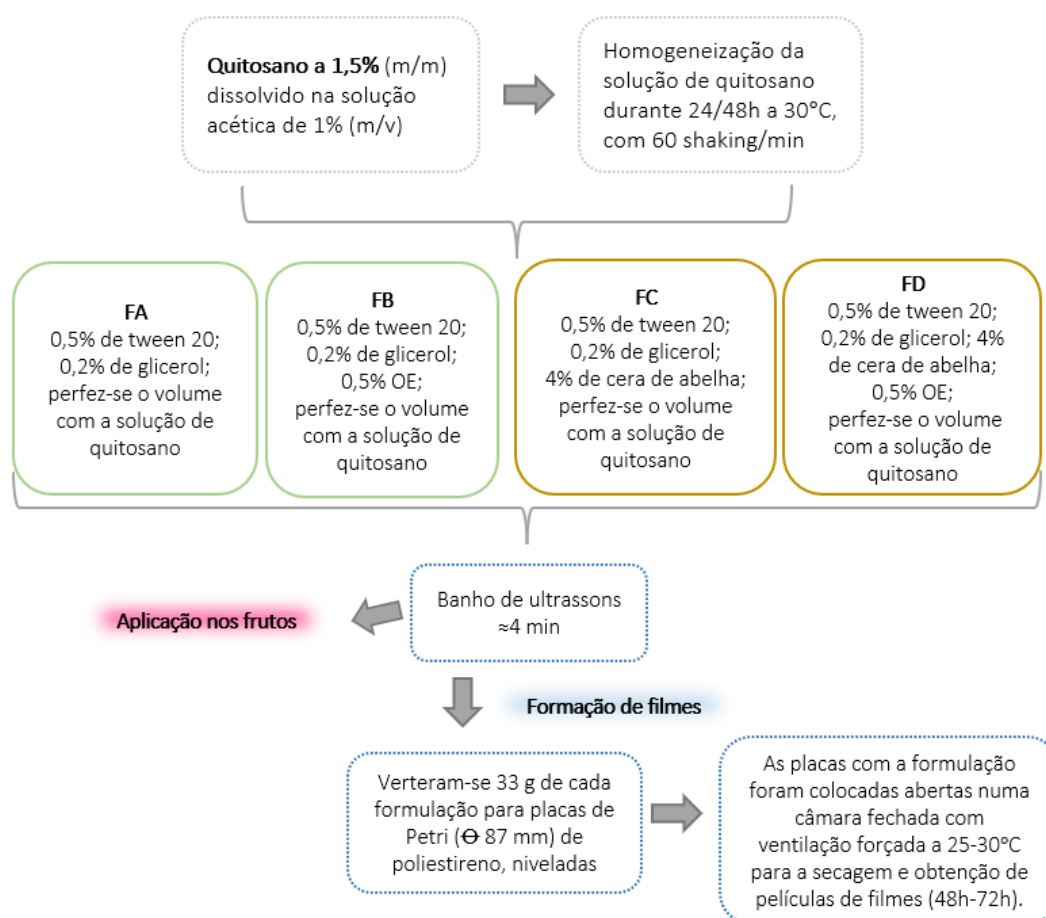


Figura 15. Delineamento experimental das quatro formulações e formação de filmes.

Foram elaboradas quatro formulações: FA corresponde à formulação base de quitosano a 1,5% (m/m), glicerol a 0,2% (m/m) e tween 20 a 0,5% (m/m); FB tem como base a composição da FA com adição de 0,5% (m/m) OE de Lsl; FC corresponde à formulação base de quitosano com cera de abelha a 4% (m/m); FD tem como base a composição da FC com adição de 0,5% (m/m) de OE de Lsl. A elaboração dos filmes para sua posterior caracterização foi feita através de secagem a 25-30°C dos mesmos previamente dispostos em placas de Petri.

### 5.1.2. Avaliação das propriedades mecânicas e higroscópicas dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada com um micrómetro eletrônico (Digital Caliper) realizando-se três medições em diferentes zonas do filme, entre cada medição calibrou-se o equipamento. A tensão superficial e elasticidade foram avaliadas de acordo com a norma ASTM D882-02 [214], com algumas modificações.

A avaliação da tensão máxima de rutura (TS), a percentagem do alongamento na rutura (E%) e o módulo de Young (MY) foram realizadas no Laboratório de Química do Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar de Castelo Branco. A tensão máxima de rutura pode ser definida como a tensão máxima que um material pode suportar ao ser alongado antes de ocorrer a rutura. A alongação na rutura representa a capacidade máxima de alongamento de um filme e o módulo de Young está relacionado com a rigidez do material utilizado no filme. Antes da realização dos ensaios mecânicos, foram cortados 10 segmentos de filmes de cada formulação, com dimensões de 1 cm x 6 cm. Depois de cortados os segmentos de cada formulação foram colocados numa placa de Petri e acondicionados num exsiccador, devidamente selado com vaselina e contendo uma solução de nitrato de cálcio tetrahidratado (Panreac, Barcelona, Espanha), de forma a proporcionar uma humidade relativa de 50±5% a uma temperatura de 25±2°C, durante 72 horas antes das análises mecânicas. Para a avaliação utilizou-se o equipamento um texturómetro TAXTplus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) equipado com agarradores de tração (modelo A/TG). Fixaram-se os segmentos de cada filme pelas extremidades a uma sonda de gancho de tração com uma separação inicial entre as extremidades de 3 cm. O teste consistiu no alongamento do filme a uma velocidade de 50 mm/min constante até à sua rutura. O texturómetro conectado ao software *Texture Exponent 32*, gerou um gráfico de força de tração *versus* a distância de separação dos agarradores (mm). Para cada segmento de filme obteve-se um gráfico com os valores necessários para calcular os parâmetros TS, E% e MY. Para cada formulação, foram realizadas 10 repetições.

Para calcular a tensão máxima de rutura (TS), foi usada a seguinte equação (5):

$$TS=F/(h \times L) \quad (5)$$

Onde:

TS= tensão máxima de rutura (Mpa)

F= força máxima de rutura (N)

h= espessura da tira (mm)

L= largura da tira (mm)

O alongamento na rutura (%E) é um indicador da flexibilidade e elasticidade do filme, e é expresso como a percentagem de variação da distância final dos agarradores aquando da rutura em relação à distância inicial dos agarradores. Os resultados foram calculados através da seguinte equação (6):

$$E\%=(C_f-C_i)/C_i \times 100 \quad (6)$$

Onde:

C<sub>f</sub>= distância final dos agarradores aquando da rutura (mm)

C<sub>i</sub>= distância inicial dos agarradores (mm)

A partir deste teste também é possível obter a deformação (d), a qual é calculada a partir da equação seguinte (7):

$$d=((C_{i+1} \text{ mm})-C_i)/C_i \quad (7)$$

Onde:

C<sub>i+1</sub>= corresponde ao C<sub>f</sub>

C<sub>i</sub>= distância inicial dos agarradores (mm)

O módulo de Young (MY, Mpa) corresponde ao quociente entre a tensão de rutura e a deformação, indica a resistência que o filme oferece à deformação, e é obtido através da equação (8):

$$MY=\sigma/d \quad (8)$$

Onde:

σ = tensão de rutura

d= deformação

Os filmes à base de polissacarídeos possuem fracas propriedades de barreira ao vapor de água, isto é, são permeáveis à sua transferência, o que é uma desvantagem no embalamento de alimentos. Por isso, esta propriedade torna-se muito importante para a seleção de formulações de revestimentos [215]. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) determinou-se gravimetricamente, de acordo com a norma ASTM E96-95 [216]. Para cada formulação foram testados triplicados com dimensões de 5 cm de

diâmetro. As amostras foram colocadas num exsiccador durante 72 h a uma temperatura e humidade controladas (21°C e 80% de humidade, Figura 16). Passadas 72 h, selaram-se as amostras no topo das placas de Petri com 5 cm de diâmetro, nas quais se verteram previamente 9 ml de uma solução salina de cloreto de sódio (Honeywell, Carolina do Norte, Estados Unidos da América). Pesaram-se cada uma das placas preparadas e foram colocadas em seguida dentro de um exsiccador com uma solução de nitrato de magnésio hexahidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), garantindo uma humidade relativa de 50%. Foi colocada uma ventoinha dentro do exsiccador com a finalidade de minimizar a resistência à transferência de massa acima do filme, produzida pela cama de ar. Foram monitorizadas as condições de temperatura e humidade relativa dentro de exsiccador usando um termohigrómetro. A permeabilidade ao vapor de água foi determinada através da pesagem das caixas em intervalos de 2 h (até se obterem no mínimo 4 medições). Os resultados da PVA foram expressos em g/m s Pa [217]. Para o cálculo da PVA aplicou-se a seguinte equação (9):

$$PVA = \Delta m / A \Delta t X / \Delta p \quad (9)$$

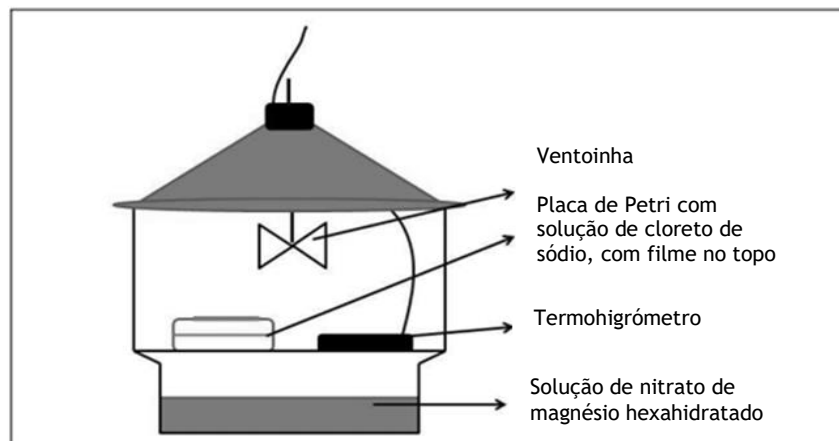
Onde,

$\Delta m / A \Delta t$  = massa de humidade ganha por unidade de tempo (g/s)

X = a média da espessura do filme (m)

A = a área da superfície exposta do filme (m<sup>2</sup>)

$\Delta p$  = a diferença da pressão de vapor de água entre os dois lados do filme (Pa)



**Figura 16.** Esquema experimental utilizado para medir a permeabilidade ao vapor de água (Adaptado de Godinho, 2014 [218]).

Para cada formulação foi avaliada a cor, utilizando-se um colorímetro (Konica Minolta CTR-300, New Jersey, Estados Unidos da América). O modelo utilizado foi o CIELAB que define as três coordenadas tridimensionais L\*, a\* e b\*. O L diz respeito à luminosidade (varia entre 0 e 100, correspondendo o 0 ao preto e o 100 ao branco). O a\* e o b\* dizem

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

respeito ao croma (o seu valor varia entre -60 e +60), o  $a^*$  indica-nos o valor associado ao vermelho/verde e o  $b^*$  o valor associado ao amarelo/azul. O aparelho calibrou-se com uma placa de padrão branco e foram efetuadas três medições em triplicados de amostra de filme.

### 5.1.3. Aplicação das formulações de revestimentos nos frutos

Os frutos foram colocados em placa de Petri (90 mm), onde foi colocado previamente um papel de filtro esterilizado para ajudar na estabilidade dos frutos. Foram usados 12 frutos (6 frutos por caixa de Petri) por modalidade de revestimento, nas duas temperaturas, temperatura ambiente a  $22\pm 1^\circ\text{C}$  (TA) e refrigerada a  $4\pm 1^\circ\text{C}$  (R), e em cada tempo de ensaio, após 4 dias (T1), após 8 dias (T2) e após 12 dias (T3). A Figura 17 ilustra o delineamento do ensaio de conservação de cereja.

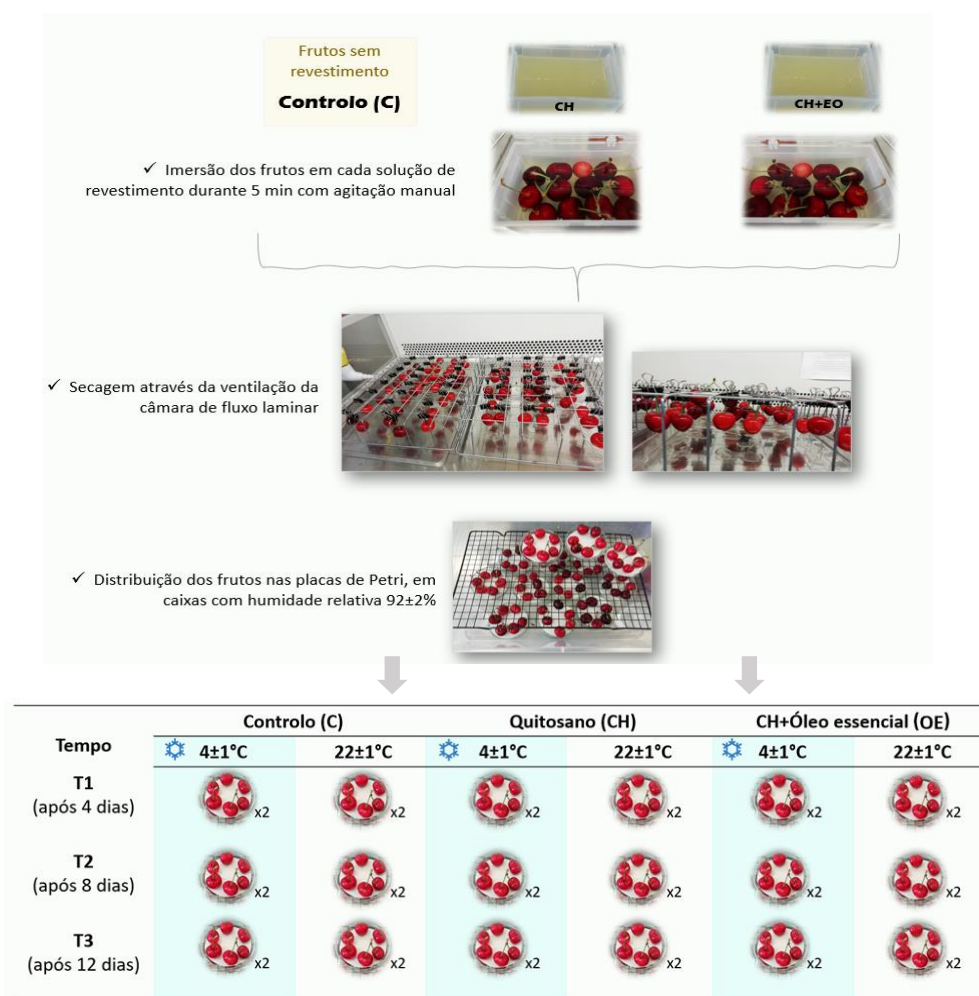


Figura 17. Delineamento do ensaio de conservação de cerejas com aplicação de revestimento.

Os frutos sem revestimento foram colocados nas respetivas placas de Petri, enquanto os frutos sujeitos a revestimento foram mergulhados na respetiva solução de revestimento durante 5 min com agitação manual. Depois foram colocados a secar

através da ventilação da câmara de fluxo laminar durante 2 h, sendo posteriormente distribuídos pelas caixas de Petri e colocados em caixas transparentes com solução saturada de cloreto de potássio (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América) de forma a obter uma humidade relativa superior a 90%.

Durante o ensaio de conservação foi determinada a perda de massa através de pesagem de frutos identificados de cada revestimento a testar controlo sem revestimento (C), FA e FB ao longo do tempo. A perda de massa foi expressa como a percentagem de perda em relação à massa inicial. Para esta determinação utilizou-se uma balança analítica com precisão a 0,0001 g (Precisa Instruments BJ-11000).

A textura dos frutos foi avaliada num texturómetro TA-Xtplus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Foi realizado um teste de compressão utilizando uma sonda plana com 75 mm de diâmetro. A amostra de cereja foi fixa na plataforma e pressionada na zona central a uma velocidade constante de 0,20 mm/s. Através do teste efetuado obtém-se a força exercida (N) em função da distância e do tempo exercido para pressionar o fruto. A percentagem de compressão (3%) foi escolhida de modo a minimizar a influência do caroço. Nesta avaliação utilizaram-se 10 cerejas de cada tratamento.

### 5.1.4. Avaliação da microbiota

A avaliação da microbiota presente nos frutos foi realizada no dia de colheita (T0) e nos três momentos seguintes de análise: após 4 dias (T1), após 8 dias (T2) e após 12 dias (T3). Para a avaliação microbiológica dos frutos seguiram-se os referenciais normativos: ISO 4833:2003 [219] para a contagem de microrganismos mesófilos, a NP-2307:1987 [220] para a contagem de microrganismos psicotróficos, e a NP-3277-1:1987 [221] para a contagem de bolores e leveduras. No caso das cerejas foram utilizados 10 g de fruto, tendo sido homogeneizados em 90 mL da solução de triptona sal (Biokar, Pantin, França) com 0,08% de tween 80 durante 1 min a 260 rpm em *stomacher* 400 Circulator (Seward, West Sussex, Reino Unido). Foram preparadas várias diluições da suspensão inicial em solução de triptona sal. A suspensão inicial e as diluições decimais seguintes foram inoculadas no meio de cultura adequado para cada parâmetro microbiológico avaliado. Para a contagem dos microrganismos mesófilos e psicotróficos foi usado o meio PCA (*Plate Count Agar*, VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) com temperaturas de incubação de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 72 h e de  $6,5\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias, respetivamente. Para a contagem de bolores e leveduras foi usado o meio DRBC (*Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar*, Biokar, Pantin, França) a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias. Foram feitos quadruplicados das análises e os

resultados foram expressos em log UFC (Unidade Formadora de Colónia) por g de fruto (UFC/g fruto).

### 5.2. Medronho

Este subcapítulo foi parcialmente publicado como: “**Joana Domingues**, Manuela Goulão, Maria Teresa Coelho, José Carlos Gonçalves, Cristina Santos Pintado. 2022. Different postharvest storage conditions of *Arbutus unedo* L. fruits and their physicochemical and microbiological characterization. International Food Research Journal, 29 (1).”

Com o objetivo de caracterizar a microbiota presente naturalmente no medronho, e no âmbito do projeto CENTRO 2020, PROVERE - Operational Program (Grant no.: CENTRO-04-3928-FEDER-000009), *Strawberry Tree Innovation Platform Action*, Portugal 2020, foram recolhidos medronhos de um pomar situado em Oleiros, Castelo Branco, durante dois anos consecutivos. As amostras constaram de 200 frutos de cada planta-mãe, com quatro origens diferentes, pelo que se denominaram de: Seminal, AL1, AL2 e AL3. Para minimizar contaminações cruzadas, os frutos foram recolhidos da árvore e colocados em caixas isotérmicas previamente desinfetadas, sendo transportadas para o Laboratório de Microbiologia da ESA-IPCB.

Para avaliar o efeito da temperatura de conservação na vida de prateleira dos frutos, diferentes métodos de conservação foram definidos em diferentes momentos de análise (Tabela 15). As análises microbiológicas foram realizadas no dia em que as amostras chegaram ao laboratório, no tempo 0 (T0), após 4 (T1) e 11 (T2) dias.

**Tabela 15.** Métodos de conservação e tempos de análise aplicados no ensaio de conservação de medronho para avaliação da sua microbiota.

Tempo	Método de conservação
Dia 0	T0- Frutos frescos
4º dia	T1TA- Temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ )
	T1R- Refrigeração ( $6,5\pm 1^\circ\text{C}$ )
11º dia	T2TA- Temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ )
	T2R- Refrigeração ( $6,5\pm 1^\circ\text{C}$ )
21º dia	T3F- Congelação ( $-22\pm 1^\circ\text{C}$ )

Em ambos os tempos os frutos foram mantidos sob refrigeração ( $6,5\pm 1^\circ\text{C}$ ) e em temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ). Paralelamente, separaram-se frutos das diferentes

origens que foram mantidos congelados ( $-22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e após 21 dias (T3) foram analisados nos mesmos parâmetros.

### 5.2.1. Avaliação da microbiota

Para proceder à avaliação da microbiota presente nos frutos, seguiram-se os seguintes referenciais normativos: ISO 4833:2003 [219] para a contagem de microrganismos mesófilos, a NP-2307:1987 [220] para microrganismos psicrotróficos, a NP-4137:1991 [222] para as *Enterobacteriaceae* e a NP-3277-1:1987 [221] para bolores e leveduras. A seleção destes grupos de microrganismos baseou-se na sua probabilidade de ocorrência nos frutos, assim como a possível sobrevivência e multiplicação quando os frutos fossem sujeitos a diferentes métodos de conservação. De cada amostra pesaram-se 10 g de frutos, tendo sido homogeneizadas em 90 mL da solução de triptonal sal (Biokar, Pantin, França) com 0,08% de tween 80 (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) durante 1 min a 260 rpm em *stomacher* 400 Circulator (Seward, West Sussex, Reino Unido). Foram preparadas várias diluições da suspensão inicial em solução de triptonal sal. A suspensão inicial e as diluições decimais seguintes foram inoculadas no meio de cultura adequado para cada parâmetro microbiológico avaliado. Para a contagem dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos foi usado o meio PCA (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) com temperaturas de incubação de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 72 h e de  $6,5\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias, respetivamente. Para a contagem de bolores e leveduras foi usado o meio DRBC (*Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar*, Biokar, Pantin, França) a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias; para a contagem de *Enterobacteriaceae* foi usado o meio VRBG (*Violet Red Bile Glucose*, Biokar, Pantin, França) a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Foram feitos quadruplicados das análises e os resultados foram expressos em log UFC/g fruto.

### 5.2.2. Seleção da micobiota predominante nos frutos

No primeiro ano deste ensaio (2017) e para todas as amostras e métodos de conservação, as colónias de fungos mais representativas foram selecionadas, isoladas, purificadas e caracterizadas morfológicamente. Foram isoladas e caracterizadas morfológicamente 97 colónias de fungos (51,5% corresponderam a fungos filamentosos e 48,5% a leveduras). Cada um dos isolados selecionados foi inoculado em meio PDA (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) e incubado a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  até 5 dias. De acordo com o seu aspeto morfológico e crescimento rápido em meio PDA, assim como a sua representatividade ao longo do ensaio de conservação, foram selecionados 57 isolados de medronho para a sua identificação molecular.

### 5.2.3. Identificação molecular da micobiota do medronho

Todos os isolados de fungos foram crioconservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sendo os fungos filamentosos conservados numa solução de glicerol:água (1:1) e as leveduras em meio de cultura YGP com glicerol a 50%. De forma a identificar a maioria dos isolados, foram selecionados 57 isolados para análise utilizando técnicas de biologia molecular. O trabalho de caracterização genética foi realizado com a colaboração da Micoteca da Universidade do Minho.

#### Extração de ácidos nucleicos

Para a extração de ácidos nucleicos pesaram-se entre 50 - 200 mg de biomassa de cada isolado para um tubo de rosca destinado ao equipamento Fast Prep-24<sup>TM</sup> Instrument (MP Biomedicals, Califórnia, Estados Unidos da América), com esferas de vidro ( $\varnothing 710-1,180\ \mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos da América) no interior, e adicionou-se 1 mL de tampão CTAB (100 mM de Tris-HCl pH 8,4, 1,4 M de NaCl, 25 mM de EDTA pH 8 e 2% (m/v) de brometo de cetrimónio). As amostras foram homogeneizadas no Fast Prep-24<sup>TM</sup> Instrument durante 30 segundos à velocidade 6 m/s, seguido de centrifugação a 14.000xg durante 8 minutos. Transferiram-se 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um novo tubo eppendorf. Para precipitar os polissacarídeos e proteínas adicionou-se 1 mL de acetato de sódio 3 M pH 5,5. Homogeneizou-se cuidadosamente por inversão, incubaram-se as amostras a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, e centrifugaram-se novamente a 14.000xg durante 10 min. Pipetou-se 1 mL do sobrenadante para um tubo novo e precipitaram-se os ácidos nucleicos com 1 mL de isopropanol. Homogeneizou-se cuidadosamente por inversão e incubaram-se as amostras durante 1 h à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000xg durante 10 min e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o *pellet* de ácidos nucleicos com 1 mL de etanol a 70% frio ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), centrifugaram-se as amostras a 6000xg durante 7 min, repetiu-se o processo duas vezes, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado foi seco ao ar. Normalmente para além de ADN co-extrai-se ARN, por isso é realizado um tratamento com ARNase (10 mg/mL) a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. O ADN foi ressuscitado com 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até utilização.

#### Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após controlo de qualidade das amostras de ADN através de análise por eletroforese em gel de agarose e de quantificação por espectrofotometria UV/VIS utilizando o equipamento NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

América), as amostras foram preparadas para a reação de amplificação por PCR. No caso de fungos filamentosos cuja sua macro e micromorfologia correspondesse aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, foi utilizado o marcador genético beta-tubulina (*benA*). Para os restantes fungos filamentosos foi utilizada a região espaçadora transcrita interna (*ITS-internal transcribed spacer*) e para as leveduras o domínio D1/D2 do gene da subunidade 28S do ARN ribossomal. Na Tabela 16 apresentam-se os volumes dos reagentes utilizados em cada reação de PCR e as condições do ciclo de amplificação para cada marcador genético no termociclador C1000™ (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos da América).

### Purificação dos produtos de PCR

Para cada amostra purificou-se 30 µL de produto de PCR utilizando o kit NZYGelpure (NZYTech, Lisboa, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. As amostras purificadas foram preparadas para sequenciação de Sanger: a 5 µL de produto de PCR purificado adicionaram-se 2,5 µL de primer (rev) a 10 µM. As amostras são depois enviadas para sequenciação na StabVida Lda (Lisboa, Portugal).

**Tabela 16.** Condições e reagentes do ciclo da PCR.

Reagentes	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Fungos filamentosos	Leveduras
2x Taq Master Mix (VWR)	25 µL	25 µL	25 µL
Primer fwd (10 µM)	1 µL (Bt2a)	1 µL (ITS1)	1 µL (NL1)
Primer rev (10 µM)	1µL (Bt2b)	1µL (ITS4)	1µL (NL4)
Água ultrapura	22 µL	22 µL	22 µL
ADN	1 µL	1 µL	1 µL
Iniciação	6 min a 95°C		2 min a 95°C
Desnaturação	1 min a 95°C		30 s a 95°C
Hibridação	45 s a 56°C		1 min a 56,7°C
Alongamento	90 s a 72°C		1 min a 72°C
<i>repetição</i>	<i>x35</i>		<i>x35</i>
Alongamento final	10 min a 72°C		10 min a 72°C
Finalização	10°C a tempo indefinido		10°C a tempo indefinido

### Análise filogenética

Para a identificação molecular dos microrganismos isolados de medronho construíram-se árvores filogenéticas com as sequências geradas através de sequenciação de Sanger e as melhores correspondências na base de dados GenBak do NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, acessado em outubro de 2019). Após determinação do gênero/espécies com correspondência mais próxima através de uma análise utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), descarregaram-se sequências, para o mesmo marcador genético, de referência ou, quando indisponíveis, outras sequências depositadas com referência em publicações científicas. Com a compilação de todas as sequências, elaboraram-se as árvores filogenéticas utilizando o software MEGA11.

### 6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao software IBM SPSS Statistics v.25. Os resultados dos trabalhos realizados na micropropagação foram comparados através da análise de variância unidirecional (ANOVA), conjuntamente com o teste *post-hoc* Tukey HSD, com um nível de significância de  $p < 0,05$ . A normalidade dos resultados de cada ensaio foi confirmada através do teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância através do teste Levene. Os tratamentos estatísticos utilizados nos demais ensaios estão apresentados junto dos respectivos resultados. Nos resultados em que os pressupostos dos testes paramétricos não se confirmaram, foram realizados testes não paramétricos respetivamente identificados.

## Capítulo 3 - Resultados e Discussão

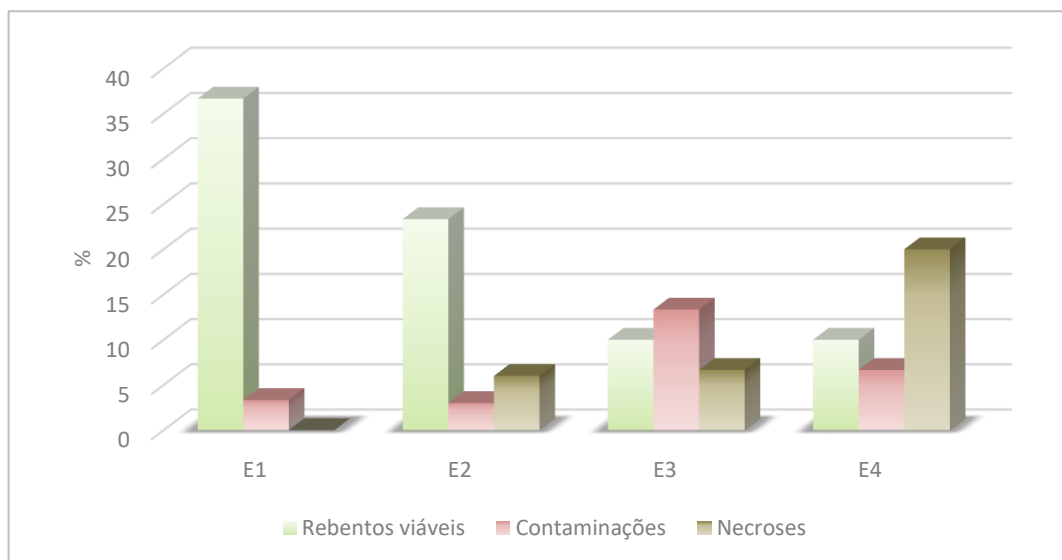
---



## 1. Propagação *in vitro* das espécies em biorreatores de imersão temporária

### 1.1. Estabelecimento de material *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro* da *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl) realizaram-se quatro modalidades de tratamento na etapa de desinfecção, com variação na concentração de hipoclorito de sódio (NaOCl) e duração da exposição dos explantes. Para cada um dos tratamentos avaliaram-se os rebentos viáveis (%), contaminações (%) e necroses (%), após 15 dias. Na Figura 18 estão apresentados os resultados de estabelecimento para cada modalidade. De acordo com os resultados é possível verificar que o aumento de concentração de NaOCl tem um efeito negativo nos explantes, pois nos tratamentos E3 e E4 com 2% de NaOCl a percentagem de rebentos viáveis é inferior a 10%, aumentando também a percentagem de necroses, com valores entre 7 e 20%. Relativamente às contaminações, estas podem ser de origem fúngica ou bacteriana, no tratamento E3 foi onde se obteve a maior percentagem de contaminação (13%), contrariamente aos E1 e E2 com concentração de NaOCl inferior. O tratamento E1 com 1% NaOCl durante 10 min foi o tratamento onde se obteve maior percentagem de rebentos viáveis (37%), seguido do E2 (1% NaOCl durante 15 min) com 23%.



**Figura 18.** Efeito da concentração e exposição ao hipoclorito de sódio na etapa de desinfecção de explantes de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

A duração da exposição ao agente desinfetante e a sua concentração são dois dos fatores mais importantes na etapa de desinfecção, assim como o nível de contaminação a que o material vegetal está exposto. Em diversas culturas, nomeadamente em *L.*

*viridis*, as taxas de contaminação na fase de estabelecimento podem ser elevadas, superiores a 50% [150]. Durante esta etapa também é importante assegurar que todos os explantes estão expostos da mesma forma ao agente, assegurando alguma agitação para promover a exposição à totalidade do explante. No estabelecimento de *L. pedunculata*, Zuzarte *et al.* (2010) reportaram uma percentagem de rebentos novos superior a 80% [11]. A eficácia do estabelecimento *in vitro*, para além dos fatores relacionados com o processo de desinfecção, também pode ser influenciada por fatores bióticos da planta, nomeadamente pela fase fenológica e pelo tipo de segmentos utilizados [137].

### 1.2. Multiplicação em biorreatores de imersão temporária

#### 1.2.1. *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*

##### Ensaio A

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados do ensaio A em Lsl no sistema agarizado (T1) e em BIT (T2-T7). Neste ensaio foram avaliados os parâmetros: número de novos rebentos (NnR), comprimento do maior rebento (CmR, cm), a taxa de multiplicação (Tm), os pesos fresco (Pf, g) e seco (Ps, g), e a taxa de mortalidade (%). Com o objetivo de perceber o efeito da duração do ciclo na cultura, os explantes propagados em cada tratamento (T1-T7) foram avaliados em dois momentos distintos, após 30 dias (D30) e 50 dias de ciclo (D50). Os tratamentos T2 a T4 caracterizaram-se por ter as mesmas condições de imersão e arejamento, de 3 min uma vez por dia e 1 min seis vezes por dia, respetivamente. Enquanto nos tratamentos T5 a T7 as condições de imersão e arejamento foram 3 min duas vezes por dia e 1 min oito vezes por dia, apenas com diferenciação na concentração de regulador de crescimento utilizado.

De acordo com os resultados podemos verificar que em relação ao parâmetro número de novos rebentos, e para o ciclo de 30 dias, os tratamentos T3 (3,29) e T4 (3,42) apresentaram os maiores valores, deferindo entre si na concentração de BAP aplicada no meio de cultura, 0,05 e 0,01 mg/L, respetivamente. Para estes dois tratamentos a diferença de concentração da hormona não pareceu contribuir de forma significativa para os parâmetros avaliados. No entanto, a concentração máxima testada (0,1 mg/L), no tratamento T2, contribuiu para uma redução dos parâmetros avaliados. Ruta *et al.* (2020) também revelaram resultados semelhantes na multiplicação de *Lycium barbarum*, onde com o uso de diferentes concentrações de BAP (0,1, 0,5 e 1 mg/L) obtiveram maiores valores nos parâmetros número de novos rebentos e comprimento do maior rebento com a concentração mais baixa [164]. No T2 obtiveram-se os menores valores para os parâmetros número de novos rebentos, comprimento do maior rebento

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

e taxa de multiplicação. Em relação ao parâmetro comprimento do maior rebento, para o ciclo de 30 dias, foi o T7 que revelou o maior comprimento com 3,73 cm, não diferindo estatisticamente dos restantes tratamentos, exceto do T2 (2,84 cm). Relativamente à taxa de multiplicação, o valor mais elevado foi obtido no sistema agarizado (4,29), sendo que nos tratamentos BIT não houve diferenças significativas. Os pesos fresco e seco mantiveram o perfil de proporção, sendo que os maiores pesos fresco e seco foram obtidos no tratamento T5 com 1,01 g e 0,09 g, respetivamente.

**Tabela 17.** Efeito dos diferentes tratamentos no número de novos rebentos (NnR), no comprimento do maior rebento (CmR), na taxa de multiplicação (Tm), no peso fresco (Pf) e no peso seco (Ps) no ensaio A de explantes de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

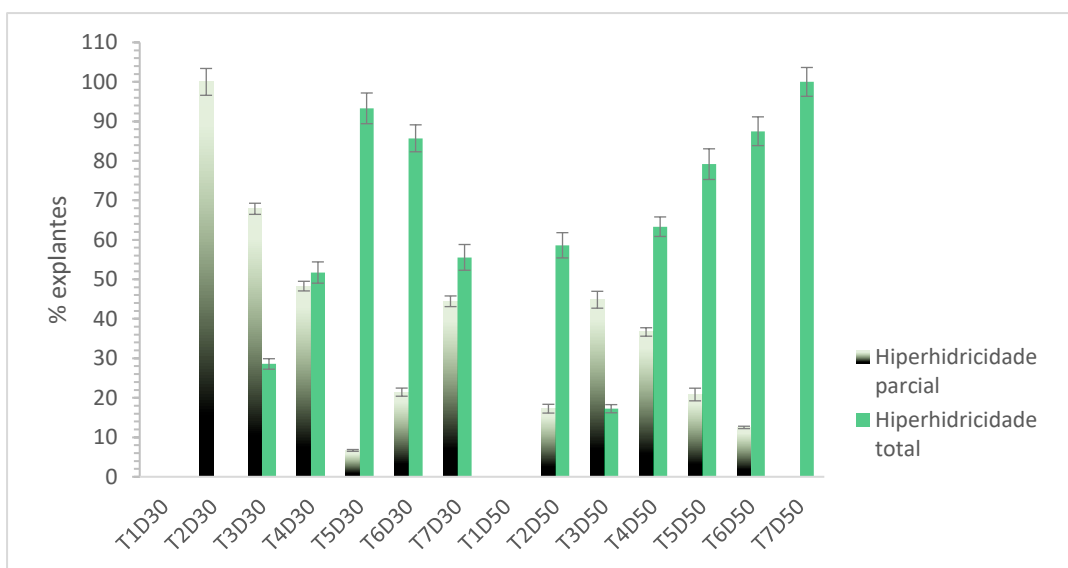
Tratamento	NnR	CmR (cm)	Tm	Pf (g)	Ps (g)	Mortalidade (%)
T1D30	2,58±0,18 <sup>abc;DE</sup>	3,08±0,11 <sup>ab;EF</sup>	4,29±0,27 <sup>a;B</sup>	0,16±0,01 <sup>d;F</sup>	0,02±0,00 <sup>d;D</sup>	0
T2D30	1,50±0,13 <sup>c;E</sup>	2,84±0,12 <sup>b;F</sup>	1,42±0,05 <sup>b;D</sup>	0,49±0,05 <sup>c;EF</sup>	0,04±0,00 <sup>cd;D</sup>	0
T3D30	3,29±0,32 <sup>a;DE</sup>	3,33±0,18 <sup>ab;EF</sup>	1,62±0,03 <sup>b;CD</sup>	0,48±0,03 <sup>c;EF</sup>	0,06±0,00 <sup>bc;D</sup>	0
T4D30	3,42±0,34 <sup>a;DE</sup>	3,37±0,19 <sup>ab;DEF</sup>	1,66±0,04 <sup>b;CD</sup>	0,58±0,04 <sup>bc;EF</sup>	0,07±0,00 <sup>b;D</sup>	3,33
T5D30	2,68±0,36 <sup>ab;DE</sup>	3,09±0,12 <sup>ab;EF</sup>	1,55±0,09 <sup>b;D</sup>	1,01±0,09 <sup>a;DE</sup>	0,09±0,01 <sup>a;D</sup>	0
T6D30	1,63±0,18 <sup>bc;E</sup>	3,37±0,17 <sup>ab;DEF</sup>	1,68±0,06 <sup>b;CD</sup>	0,74±0,06 <sup>b;EF</sup>	0,08±0,00 <sup>ab;D</sup>	6,67
T7D30	2,42±0,20 <sup>abc;DE</sup>	3,73±0,29 <sup>a;CDEF</sup>	1,87±0,05 <sup>b;CD</sup>	0,49±0,05 <sup>c;EF</sup>	0,06±0,01 <sup>bc;D</sup>	10
T1D50	3,34±0,29 <sup>c;DE</sup>	4,91±0,19 <sup>a;A</sup>	6,76±0,33 <sup>a;A</sup>	0,26±0,02 <sup>d;F</sup>	0,04±0,00 <sup>d;D</sup>	0
T2D50	6,77±0,53 <sup>b;B</sup>	3,87±0,18 <sup>bcd;BCDE</sup>	1,93±0,09 <sup>bc;CD</sup>	2,77±0,27 <sup>ab;B</sup>	0,29±0,03 <sup>ab;AB</sup>	3,33
T3D50	10,52±0,97 <sup>a;A</sup>	4,68±0,22 <sup>ab;AB</sup>	2,34±0,11 <sup>b;C</sup>	2,48±0,22 <sup>bc;B</sup>	0,25±0,02 <sup>abc;B</sup>	0
T4D50	5,61±0,27 <sup>bc;BC</sup>	4,23±0,21 <sup>abc;ABCD</sup>	2,11±0,11 <sup>bc;CD</sup>	2,26±0,19 <sup>bc;BC</sup>	0,23±0,04 <sup>bc;BC</sup>	0
T5D50	6,32±0,66 <sup>b;B</sup>	4,59±0,22 <sup>abc;ABC</sup>	2,29±0,11 <sup>b;CD</sup>	3,60±0,32 <sup>a;A</sup>	0,35±0,03 <sup>a;A</sup>	20
T6D50	3,68±0,28 <sup>c;CD</sup>	3,76±0,20 <sup>cd;CDE</sup>	1,88±0,10 <sup>bc;CD</sup>	2,14±0,22 <sup>bc;BC</sup>	0,22±0,02 <sup>bc;BC</sup>	3,33
T7D50	5,62±0,21 <sup>bc;BC</sup>	3,10±0,14 <sup>d;EF</sup>	1,55±0,07 <sup>c;D</sup>	1,64±0,20 <sup>c;CD</sup>	0,17±0,02 <sup>c;C</sup>	0

Os resultados estão representados como valor médio±erro padrão. Valores médios inseridos na mesma coluna e com diferentes letras são significativamente diferentes pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas referem-se à comparação de valores médios entre o mesmo tempo de ensaio (D30 ou D50), enquanto letras maiúsculas referem-se à comparação de valores médios de ambos os tempos de ensaio (D30 e D50).

Relativamente ao ciclo com maior duração (50 dias), e comparativamente com o ciclo de 30 dias, a maioria dos tratamentos revelaram uma melhoria nos resultados dos parâmetros avaliados. Observando os resultados consegue-se perceber que o aumento da duração do ciclo contribuiu para o aumento da multiplicação dos explantes. Nos tratamentos BIT o valor mais elevado no parâmetro número de novos rebentos

verificou-se no tratamento T3 com um valor médio de 10,52 novos rebentos, assim como a taxa de multiplicação (2,34) e o comprimento do maior rebento com 4,68 cm. No sistema convencional foi obtido o maior valor de taxa de multiplicação nos dois momentos de análise, diferindo estatisticamente dos tratamentos de BIT. Em relação aos pesos fresco e seco, os maiores valores médios ocorreram no T5, com 3,60 g e 0,35 g, respetivamente. Para estes parâmetros, o T5 obteve os maiores valores médios no ciclo de 30 dias, estes resultados podem estar associados à concentração relativamente elevada de BAP (0,1 mg/L), que conjugado com o aumento da duração e frequência de imersão contribui para uma maior absorção de água nos tecidos do explante e com a maior concentração do regulador de crescimento que também está associada a fenómenos de hiperhidricidade [149].

Na Figura 19 estão apresentadas as percentagens de hiperhidricidade dos explantes em cada tratamento. Neste ensaio ocorreram dois tipos de hiperhidricidade, de forma parcial, isto é, a parte basal do explante e que está frequentemente em contacto com o meio de cultura apresenta-se hiperhidratada, sendo que a parte aérea não apresenta sinais de hiperhidricidade, e a hiperhidricidade total do explante.



**Figura 19.** Percentagem de hiperhidricidade total e parcial nos explantes do ensaio A de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Devido à elevada hiperhidricidade verificada neste ensaio de BIT, as taxas de multiplicação foram reduzidas, pois apesar de o número de novos rebentos ser elevado na maioria dos tratamentos, para a avaliação da taxa de multiplicação apenas foram considerados os explantes secundários gerados com ausência de hiperhidricidade.

Graficamente é observável que nos tratamentos de 30 dias de ciclo de crescimento, todos apresentam hiperhidricidade, seja parcial ou total, apenas o T3 apresenta

hiperhidricidade total abaixo de 50%, o mesmo acontece no ciclo de 50 dias onde se verificou um decréscimo deste distúrbio fisiológico.

Avaliando globalmente o ensaio, pode-se observar que em relação ao número de novos rebentos, ao tamanho do maior rebento e à taxa de multiplicação, o melhor tratamento de BIT foi o T3D50. Em relação à massa produzida, o maior valor de peso fresco e seco foi verificado no T5D50. Comparativamente com o T3, o T5 difere na concentração de BAP, com 0,05 e 0,1 mg/L, respetivamente. A utilização de concentrações elevadas de BAP parece estar relacionada com o aumento de fenómenos de hiperhidricidade [149]. Para além da influência que o regulador de crescimento pode ter na fisiologia dos explantes, também devemos ter em consideração as condições de imersão e arejamento em BIT. Corroborando esta tendência, a imersão do meio de cultura é mais frequente (2x por dia) no T5 do que no T3 (1x por dia), o aumento da frequência de imersão de meio de cultura pode contribuir para a ocorrência de hiperhidricidade nos explantes [35, 162, 163]. Verificou-se também que entre 30 e 50 dias de ciclo, os parâmetros biométricos foram maiores no ciclo mais longo, esta tendência também é verificada no tratamento agarizado.

Outro parâmetro importante na propagação de culturas *in vitro* é a avaliação da cor, pois a maioria das necessidades que a planta e, neste caso, os explantes precisam traduzem-se em aspetos morfológicos, como em fenómenos de hiperhidricidade o aspeto do explante fica mais translúcido e de tonalidade mais escura em relação ao aspeto saudável. No caso de explantes com tonalidades muito claras, esta morfologia pode estar relacionada com problemas na produção de clorofilas, assim como explantes com tonalidades amareladas ou acastanhadas pode dever-se à falta ou excesso de nutrientes [223]. Neste ensaio apesar de na maioria dos tratamentos a cor média ser verde hiperhidratado/translúcido, alguns tratamentos apresentaram cores de verde mais claro (Figura 20). O tratamento agarizado (T1) caracterizou-se por apresentar tonalidades de verde a verde-claro, enquanto os tratamentos de BIT, mesmo naqueles em que a hiperhidricidade maioritária foi parcial, apresentaram uma tonalidade de verde-escuro na base e a parte aérea com tons de verde a verde-claro.

#### Ensaio B

Relativamente ao ensaio B em Lsl foram realizados tratamentos com dois reguladores de crescimento, a BAP numa concentração de 0,05 mg/L (T8 e T10) e mT numa concentração de 0,5 mg/L (T9 e T11). Neste ensaio as condições de imersão mantiveram-se iguais ao melhor resultado do ensaio A, 3 min a cada 24 h, e o arejamento foi de 1 min a cada 12 h para os tratamentos T8 e T9. Nos tratamentos T10

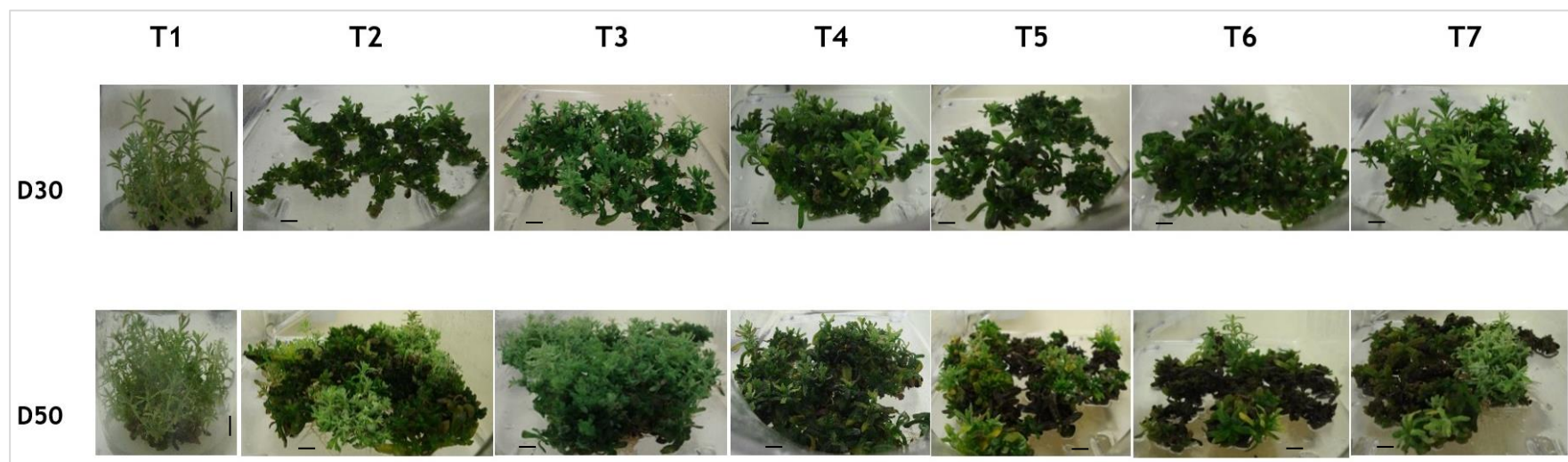


Figura 20. Aspecto visual dos explantes de *L. stoechas* subsp. *luisieri* produzidos nos diferentes tratamentos do ensaio A. A barra a preto corresponde a 1 cm.

e T11 a imersão foi reduzida para 1 min a cada 24 h. No T12 mantiveram-se as condições de imersão de 1 min a cada 24 h, alterando o arejamento para 5 s a cada 8 h de arejamento e no T13 a imersão foi de 1,5 min a cada 12 h. Comparando os tratamentos T8 a T11, verificou-se um maior número de novos rebentos no T9 (10,43) não diferindo estatisticamente do T8 (9,79) (Tabela 18). O mesmo comportamento verificou-se nos parâmetros comprimento do maior rebento, com um valor de 2,20 cm no T9, seguido de 1,58 cm no T8; na taxa de multiplicação com 1,46 no T9 e 1,05 no T8; e no peso fresco com 0,67 g no T9. No entanto, estes tratamentos revelaram as maiores taxas de hiperhidricidade, o que, apesar de apresentarem valores elevados de NnR e de CmR, a sua taxa de multiplicação foi reduzida pois não se consideraram explantes com hiperhidricidade como viáveis para multiplicação. Comparando a duração de imersão que foi reduzida para 1 min nos T10 e T11, esta alteração revelou ser menos eficiente no número de novos rebentos e no comprimento do maior rebento, do que as condições de imersão de 3 min em 24 h. No entanto para a taxa de multiplicação verificou-se um ligeiro aumento para estes últimos tratamen-

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

tos. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2016) obtiveram melhores resultados nos parâmetros de multiplicação de explantes de *Stevia rebaudiana* em condições de imersão de meio de cultura com frequências maiores do que períodos mais curtos [224]. Também Akdemir *et al.* (2014) comparam diferentes tempos de frequência de imersão na multiplicação em BIT de *Pistacia* spp., pelo que os melhores resultados de multiplicação foram obtidos em frequências maiores [163].

Em relação aos tratamentos T12 e T13, utilizou-se a BAP como regulador de crescimento. O aumento da frequência de arejamento ajustou-se devido ao facto de ocorrerem explantes hiperhidratados. O arejamento pode contribuir para evitar/retardar processos de hiperhidricidade, reduzindo a humidade no compartimento do biorreator, assim como na superfície do explante, contribuindo dessa forma para uma maior eficiência na absorção de nutrientes [162]. Entre os tratamentos deste ensaio, o T13 destacou-se nos parâmetros do comprimento do maior rebento (3,92 cm), taxa de multiplicação (4,51) e peso fresco (0,97 g).

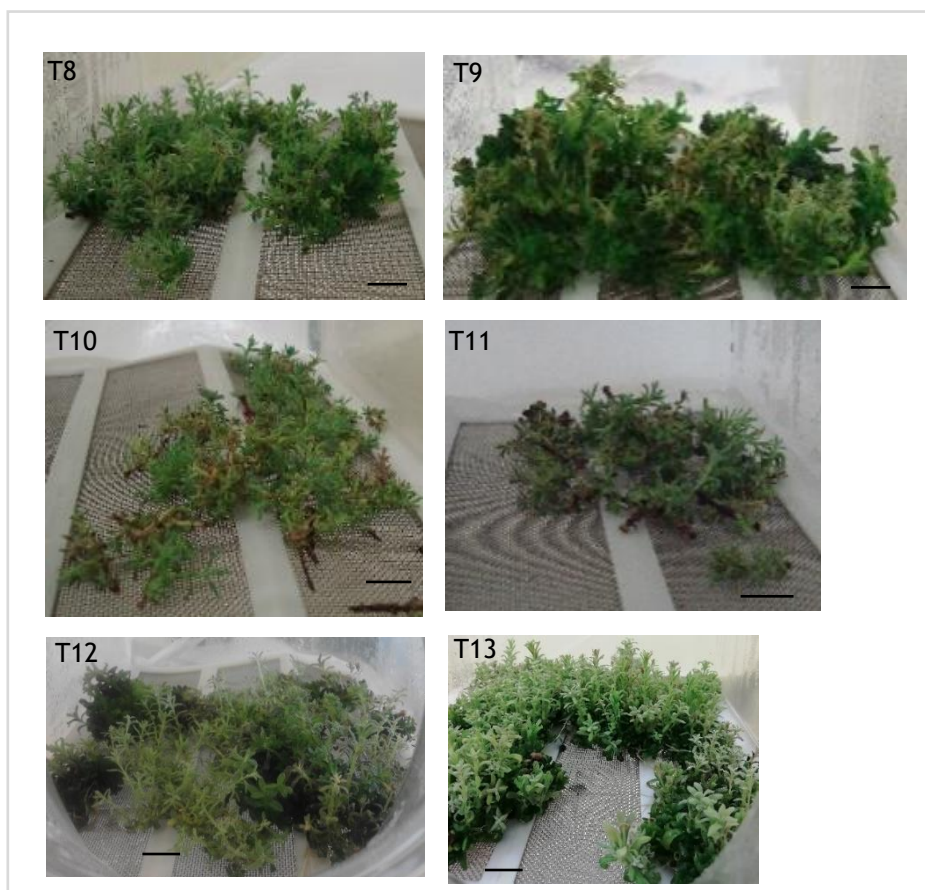
**Tabela 18.** Efeito dos diferentes tratamentos no número de novos rebentos (NnR), no comprimento do maior rebento (CmR), na taxa de multiplicação (Tm), no peso fresco (Pf, g), hiperhidricidade (%) e mortalidade (%) no ensaio B de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Tratamento	NnR	CmR (cm)	Tm	Pf (g)	Hiperhidricidade (%)	Mortalidade (%)
T8	9,79±0,64 <sup>a</sup>	1,58±0,08 <sup>cd</sup>	1,05±0,05 <sup>d</sup>	0,24±0,02 <sup>c</sup>	60	0
T9	10,43±0,59 <sup>a</sup>	2,20±0,14 <sup>b</sup>	1,46±0,09 <sup>cd</sup>	0,67±0,07 <sup>b</sup>	83	37
T10	2,89±0,46 <sup>c</sup>	1,13±0,07 <sup>d</sup>	1,75±0,15 <sup>cd</sup>	0,07±0,01 <sup>d</sup>	0	0
T11	5,05±0,60 <sup>b</sup>	1,21±0,08 <sup>d</sup>	2,16±0,31 <sup>c</sup>	0,13±0,02 <sup>cd</sup>	37	0
T12	5,25±0,36 <sup>b</sup>	1,89±0,14 <sup>bc</sup>	3,50±0,24 <sup>b</sup>	0,11±0,01 <sup>cd</sup>	12	3
T13	6,76±0,47 <sup>b</sup>	3,92±0,17 <sup>a</sup>	4,51±0,31 <sup>a</sup>	0,97±0,04 <sup>a</sup>	40	10

Os resultados estão representados como valor médio±erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna correspondem a diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

No ensaio B, os explantes revelaram hiperhidricidade de forma parcial. A maior percentagem de hiperhidricidade dos explantes foi obtida no T9, com 83%, seguido do T8 com 60%. Estes resultados podem dever-se aos tempos de imersão do meio de cultura aplicados serem os mais elevados. Pelo contrário, no T10 observou-se ausência de explantes hiperhidratados, seguido do T12 com 12% dos explantes a revelarem esta desordem fisiológica. Relativamente à taxa de mortalidade, o T9 foi onde se verificou a maior taxa com 37%, seguido do T13 com 10%. Outro aspeto que pode ter contribuído para a redução da hiperhidricidade nos explantes neste ensaio foi a aplicação da rede no compartimento dos explantes.

Na Figura 21 podemos observar o aspeto visual dos explantes produzidos nos tratamentos do ensaio B.



**Figura 21.** Aspetto visual dos explantes de *L. stoechas* subsp. *luisieri* produzidos nos diferentes tratamentos do ensaio B. A barra a preto corresponde a 1 cm.

Tendo em conta todos os ensaios de BIT realizados em Lsl, podemos concluir que a espécie não é muito exigente em termos de frequência e duração de imersão de meio de cultura, suportando períodos relativamente longos, entre 12 h a 24 h de imersão. Noutra espécie da família das Lamiaceae, em *Rosmarinus officinalis*, as frequências de imersão também se ajustaram entre 12 h e 24 h, sendo que os melhores resultados de propagação foram obtidos em tempos de imersão mais curtos (1 min) e em menor frequência (a cada 12 h) [159].

#### 1.2.2. *Pterospartum tridentatum*

##### Ensaio A

Numa primeira fase e para verificar o comportamento dos explantes em BIT, foi realizado um ensaio preliminar onde se avaliou a duração do ciclo de multiplicação de 30 e 50 dias, a densidade de explantes e as condições de arejamento e imersão de meio de cultura. Na Tabela 19 estão apresentados os parâmetros de avaliação, peso fresco e seco (g). Relativamente ao peso fresco, independentemente do tratamento

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

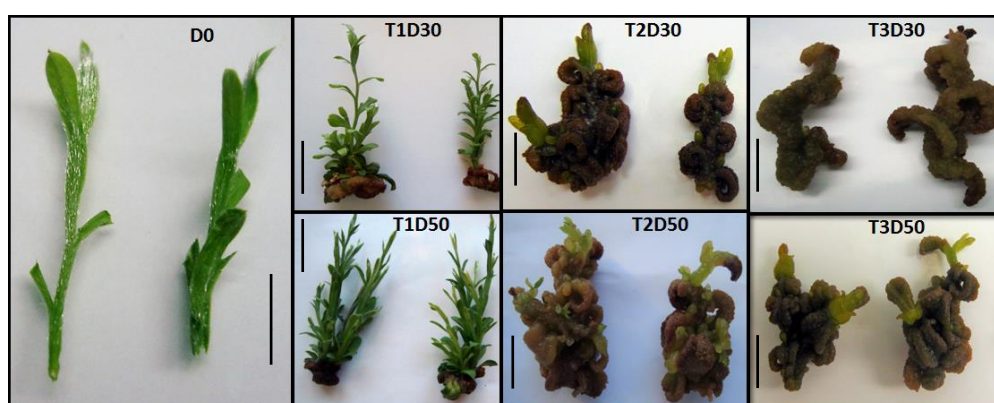
este aumentou com o tempo, quer no tratamento agarizado (T1) ou em BIT (T2 e T3). O tratamento onde se verificou um valor mais elevado foi no T2 com 2,08 g (D30) e 3,69 g (D50), ambos estatisticamente diferentes do T1 e T3. Este aumento de peso pode dever-se à relação volume de meio de cultura disponível por explante, e por isso contribuir para uma maior absorção de nutrientes e água nos tecidos do explante. A influência da densidade de explantes nos parâmetros de multiplicação também é reportada por Rahman *et al.* (2015) os autores demonstraram que entre 60 e 90 explantes o número de entrenós, o comprimento dos explantes e peso fresco foram inferiores a densidades superiores na propagação de *Solanum tuberosum* em sistemas de *nutrient spray bioreactor* [225]. No tratamento agarizado observaram-se os menores pesos fresco e seco, nos dois tempos de duração de ciclo.

**Tabela 19.** Efeito dos tratamentos do ensaio A no peso fresco e seco em *P. tridentatum*.

Tratamento	Peso fresco (g)			Peso seco (g)		
	D0	D30	D50	D0	D30	D50
T1		0,60±0,26 <sup>c</sup>	0,99±0,50 <sup>c</sup>		0,06±0,03 <sup>c</sup>	0,10±0,05 <sup>c</sup>
T2	0,03±0,00	2,08±0,22 <sup>a</sup>	3,69±0,18 <sup>a</sup>	0,01±0,00	0,17±0,02 <sup>a</sup>	0,31±0,02 <sup>a</sup>
T3		1,79±0,05 <sup>b</sup>	2,25±0,36 <sup>b</sup>		0,15±0,01 <sup>b</sup>	0,19±0,03 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em média±erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna correspondem a diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Tukey HSD ( $p<0,05$ ).

Na Figura 22, podem observar-se as características morfológicas dos explantes nos diferentes tratamentos. A cor das folhas de *P. tridentatum* variaram de verde-claro e verde-escuro no T1, enquanto para os T2 e T3 a cor das folhas foi maioritariamente verde-escuro a castanho.



**Figura 22.** Aspeto visual dos explantes de *P. tridentatum* produzidos nos diferentes tratamentos do ensaio A. A barra a preto corresponde a 1 cm.

A cor das folhas nos tratamentos em biorreatores revelou um escurecimento ao longo do tempo e forte hiperhidricidade, corroborando os resultados de peso fresco e

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

consequente maior absorção de água. Outro aspecto morfológico que ocorre na micropropagação de *P. tridentatum* é a formação de calos na base do explante. Neste ensaio, a presença de calos apenas foi verificada em explantes propagados em sistema agarizado. Nos explantes propagados em BIT não se verificou o desenvolvimento deste órgão. Em nenhum dos tratamentos se observou a morte de explantes.

#### Ensaio B

No ensaio B de propagação de *P. tridentatum* em BIT foram testadas quatro modalidades em que o T5 corresponde ao uso de segmento nodal e nos T6 ao T8 foram usados explantes com calo e 1 cm de segmento caulinar. Na Tabela 20 é possível observar-se que o tratamento T5 foi o que apresentou valores dos parâmetros avaliados mais baixos, número de novos rebentos (3,45), comprimento do maior rebento (4,12 cm), taxa de multiplicação (3,65) e peso fresco (0,37 g). Pelo contrário, nos tratamentos de BIT, o tratamento T6 revelou maior número de rebentos (7,15), maior comprimento (6,95 cm) e maior taxa de multiplicação (13,45).

**Tabela 20.** Efeito dos diferentes tratamentos no número de novos rebentos (NnR), no comprimento do maior rebento (CmR), na taxa de multiplicação (Tm), no peso fresco (Pf) e a hiperhidricidade (%) no ensaio B em *P. tridentatum*.

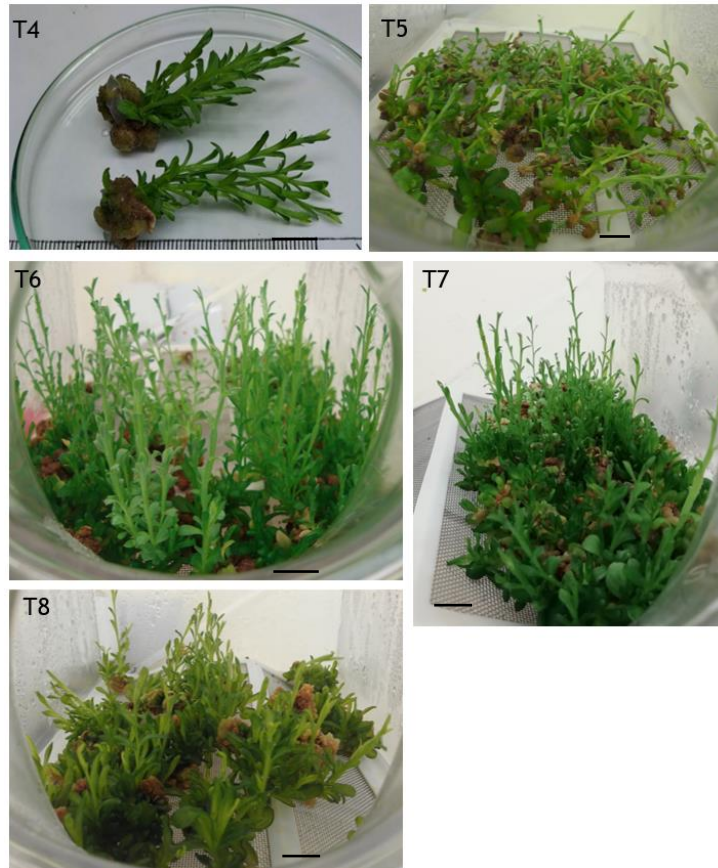
Tratamento	NnR	CmR (cm)	Tm	Pf (g)	Hiperhidricidade (%)
T4	6,84±0,44 <sup>a</sup>	5,12±0,11 <sup>a</sup>	13,33±0,78 <sup>a</sup>	0,34±0,15 <sup>c</sup>	9
T5	3,45±0,23 <sup>c</sup>	4,12±0,29 <sup>b</sup>	3,65±0,24 <sup>c</sup>	0,37±0,06 <sup>c</sup>	5
T6	7,15±0,59 <sup>a</sup>	6,95±0,36 <sup>a</sup>	13,45±0,54 <sup>a</sup>	1,91±0,15 <sup>b</sup>	10
T7	5,17±0,43 <sup>b</sup>	4,89±0,30 <sup>b</sup>	7,63±0,50 <sup>b</sup>	1,93±0,22 <sup>b</sup>	20
T8	5,09±0,41 <sup>b,c</sup>	4,70±0,35 <sup>b</sup>	6,22±0,76 <sup>b,c</sup>	2,58±0,18 <sup>a</sup>	50

Os parâmetros encontram-se representados como valor médio±erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna correspondem a diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

O aumento da duração do tempo de imersão dos explantes, para 1,5 min e 3 min, não se traduziu em melhores resultados de multiplicação, como se pode observar nos resultados dos parâmetros dos tratamentos T7 e T8, respetivamente, comparativamente ao T6. No caso do T7 a duração da imersão para 1,5 min, gerou uma redução significativa dos parâmetros avaliados, comparativamente ao tratamento T6, exceto para o peso fresco que não se diferenciou deste (1,92 g). No T8 o aumento da duração de imersão para 3 min destacou-se no maior peso fresco. Em relação à hiperhidricidade, o T5 foi o tratamento que revelou menor valor desta desordem fisiológica, opostamente ao T8, o qual revelou o maior valor, tendo-se verificado a presença de hiperhidricidade em 50% dos explantes. Em relação aos explantes produzidos em meio agarizado (T4), pode-se observar que nos parâmetros avaliados

obtiveram-se valores elevados de número de novos rebentos, comprimento do maior rebento e taxa de multiplicação, não diferindo estatisticamente do T6.

Na Figura 23 pode observar-se o aspeto dos explantes produzidos nos diferentes tratamentos de BIT do ensaio B.



**Figura 23.** Aspeto visual dos explantes de *P. tridentatum* produzidos nos diferentes tratamentos no ensaio B. A barra a preto corresponde a 1 cm.

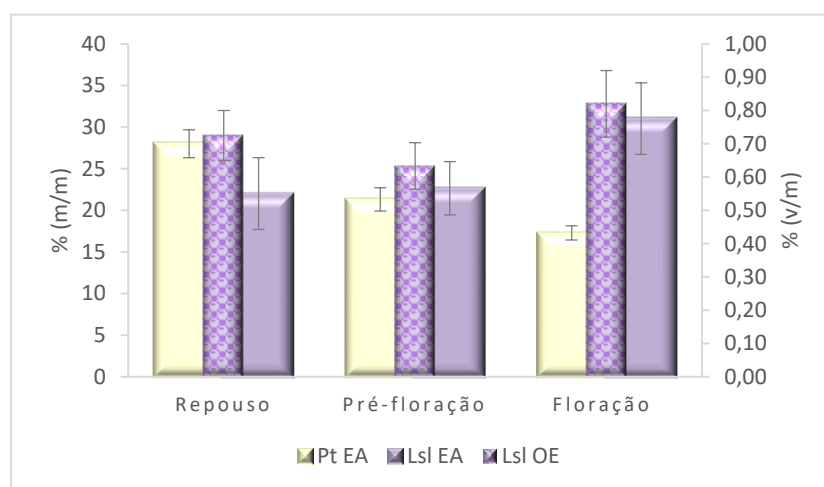
De acordo com os resultados deste ensaio pode-se afirmar que a multiplicação desta espécie em BIT foi atingida de forma mais eficaz comparativamente ao ensaio A. Verificou-se também que os parâmetros de multiplicação foram mais elevados quando se usaram explantes iniciais com calo. À semelhança do ensaio anterior, neste ensaio não se observou morte de nenhum explante.

## 2. Caracterização dos extratos e óleos essenciais

### 2.1. Rendimento de extração

Os rendimentos de extração do extrato aquoso de *P. tridentatum* (Pt) e do extrato e óleo essencial (OE) de *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl) das diferentes fases fenológicas de plantas silvestres estão apresentados na Figura 24. De acordo com os resultados

para a Pt obteve-se o maior rendimento de extração na fase de repouso vegetativo com 28%, seguido da fase de pré-floração com 21% e a floração apresentou o rendimento mais baixo com 17%. O rendimento de extração pode ser influenciado por diversos fatores, nomeadamente pela fase fenológica e conseqüentemente pelas condições edafo-climáticas. Gonçalves *et al.* (2018) obtiveram resultados de rendimento de extração para extratos aquosos de Pt de 19% para o período de repouso, sendo que para a floração obteve rendimentos entre 11% e 15%. Nesse mesmo estudo é possível observar a influência das condições edafo-climáticas, pois os autores comparam plantas recolhidas na mesma fase fenológica, mas em diferentes localizações, observando-se diferenças entre os locais [116].

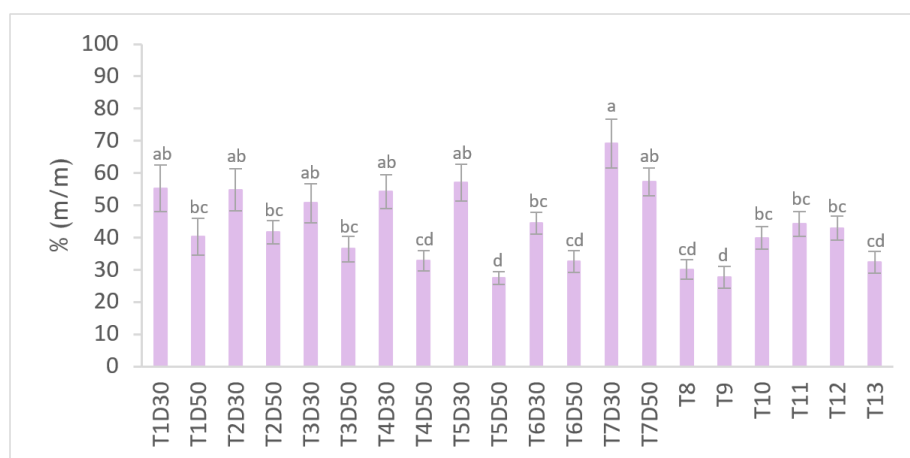


**Figura 24.** Rendimento de extração dos extratos aquosos e óleo essencial de plantas silvestres de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e de *P. tridentatum*. Pt EA: extrato aquoso de *P. tridentatum*; Lsl EA: extrato aquoso de *L. stoechas* subsp. *luisieri*; Lsl OE: óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Os resultados estão expressos em média±desvio padrão.

Luís *et al.* (2009) também revelaram rendimentos na extração de extratos aquosos em Pt de 11,01%. Em relação ao rendimento de extração dos extratos aquosos de Lsl observa-se um comportamento diferente, uma vez que foi na fase de floração onde se obteve a maior percentagem de rendimento de extração com 31,03%. As fases de repouso e pré-floração não se distinguiram entre si, obtendo-se valores muito próximos de 22% [112]. Pereira *et al.* (2013) através do método de maceração durante 24 h à temperatura ambiente, obtiveram extratos de Lsl usando diferentes solventes, incluindo extratos aquosos, os quais apresentaram maiores rendimentos de extração (4,6%) comparativamente a extratos obtidos com metanol, n-hexano, diclorometano e acetato de etilo [93]. Relativamente ao rendimento de extração do OE de Lsl, seguiu o mesmo comportamento do extrato, com maior rendimento na floração (0,82%), seguida da fase de repouso (0,73%) e pré-floração (0,63%). Resultados próximos dos

obtidos no rendimento da extração do OE na fase de floração também foram obtidos por outros autores, Arantes *et al.* (2016) revelaram um rendimento de OE de Lsl de 0,8% (v/m) [78]. Também Pombal *et al.* (2016) indicaram que os maiores rendimentos de extração do OE de Lsl foram obtidos antes da floração (nas folhas e inflorescências) (2,8%) e em plena floração (2%, nas inflorescências) [79]. Na mesma subespécie, González-Coloma *et al.* (2011) revelaram uma variação de rendimentos de extração na fase de floração de 0,07 a 0,38% [75]. Apesar de se tratar da mesma subespécie, existem algumas oscilações nos valores do rendimento de extração, ainda que durante a mesma fase fenológica, mas de locais diferentes, demonstrando que as condições edafo-climáticas apresentam influência no rendimento de OE. Outros fatores que influenciam o rendimento de extração, quer seja de OE ou de extratos, é o método/solvente que se usa para a extração. Crisan *et al.* (2023) dividem em duas categorias os fatores que influenciam a produção de OE, todos os fatores que se podem enumerar antes e durante a colheita das plantas, abióticos e bióticos, e os fatores que a planta pode estar sujeita depois da recolha, como o método de conservação até à extração do OE, o método de extração, o solvente, entre outros [226].

Relativamente aos ensaios com material micropropagado, a Figura 25 apresenta os rendimentos de extração de extratos aquosos.

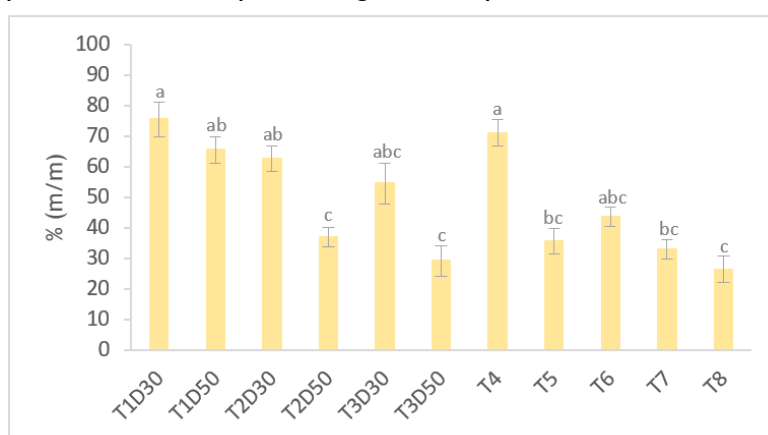


**Figura 25.** Rendimento de extração dos extratos aquosos de *L. stoechas* subsp. *luisieri* micropropagada. Resultados estão expressos em média±desvio padrão, nas colunas, letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes pelo teste Scheffé ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos, observa-se um maior rendimento de extração de extrato aquoso no T7D30 (69,08%). Nos tratamentos do ensaio A pode observar-se que o rendimento de extração diminui no tempo de ciclo de 50 dias comparativamente ao ciclo de 30 dias. Este resultado pode confirmar o aumento de explantes hiperhidratados demonstrado nos tratamentos do ciclo de 50 dias. No ensaio B, os

tratamentos com maior rendimento de extração foram o T11 (44,29%), T12 (42,87%) e T10 (39,85%). Os tratamentos que apresentaram menores rendimentos foram aqueles que apresentaram maiores taxas de hiperhidricidade, o T8, T9 e T13, sendo que o T9 foi onde se verificou o rendimento de extração mais baixo (27,78%), diferenciando-se significativamente dos restantes tratamentos deste ensaio. Em extratos aquosos de *L. viridis* micropropagada em sistema agarizado foi obtido um rendimento de extração de 18,76%, rendimento relativamente inferior ao obtido no mesmo sistema para Lsl [87]. Em todos os ensaios de BIT observou-se a formação de pequenas gotículas de OE, no entanto como o volume do OE foi inferior a 0,05 mL, não foi possível a sua adequada recolha e isolamento. Apenas no T12 se obteve um volume de OE de 0,05 mL, apresentando um rendimento de OE de 2,21%.

Na Figura 26 estão apresentados os rendimentos de extração dos extratos aquosos de Pt, onde é possível observar que os tratamentos com maiores rendimentos de extração foram os T1D30 (75,47%) e T4 (71,05%). Estes tratamentos tiveram origem nas plantas obtidas em meio agarizado, podendo dever-se ao facto de que nos tratamentos em BIT os explantes apresentam maior percentagem de hiperhidricidade.



**Figura 26.** Rendimento de extração dos extratos aquosos de *P. tridentatum* micropropagada. Resultados estão expressos em média±desvio padrão, nas colunas, letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes pelo teste Scheffé ( $p<0,05$ ).

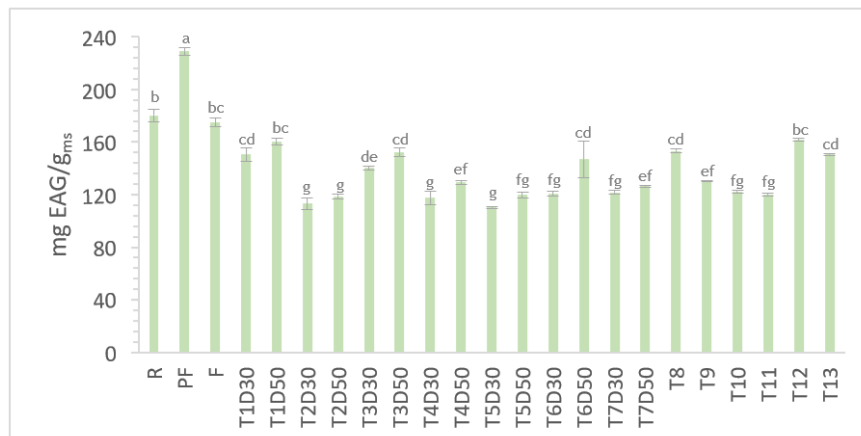
Comparativamente ao tempo de ciclo, observou-se o mesmo comportamento dos tratamentos do ensaio A de Lsl, isto é, os tratamentos com o ciclo de 50 dias apresentaram uma diminuição de rendimento em relação ao ciclo com 30 dias. O comportamento demonstrado nas duas espécies estudadas relacionado com um maior rendimento de extrato/OE, também foi revelado por Bassolino *et al.* (2015) na micropropagação de *Salvia dolomitica* [138]. Na micropropagação de uma outra espécie da família Lamiaceae, a *Micromeria croatica*, os autores revelaram rendimentos de extração de OE superiores em material vegetal com origem *in vitro* do

que na planta silvestre [141]. Em Pt também foi revelado um maior rendimento de extração de extratos aquosos de plantas com origem *in vitro* comparado com plantas provenientes do campo [116].

## 2.2. Caracterização dos compostos fenólicos e voláteis

### 2.2.1. Fenóis totais e flavonóides

O teor de fenóis totais foi quantificado nos extratos aquosos obtidos do material silvestre e do material com origem nos ensaios de micropropagação. Na Figura 27 pode-se observar a diferença do teor de fenóis totais entre as três fases fenológicas de Lsl. O maior teor de fenóis totais foi obtido na fase da pré-floração (PF) com um valor de 229,02 mg EAG/g<sub>ms</sub>, significativamente diferente dos demais extratos. A fase de repouso (R) apresentou um teor de fenóis de 180,29 mg EAG/g<sub>ms</sub>, sendo a fase de floração (F) a que obteve um teor menor com 174,83 mg EAG/g<sub>ms</sub>. Nunes *et al.* (2017) revelou teores de fenóis totais em extratos aquosos de Lsl próximos aos obtidos, com 277 mg EAG/g<sub>ms</sub>, teor este superior ao obtido em extratos hidroetanólicos (etanol:água).

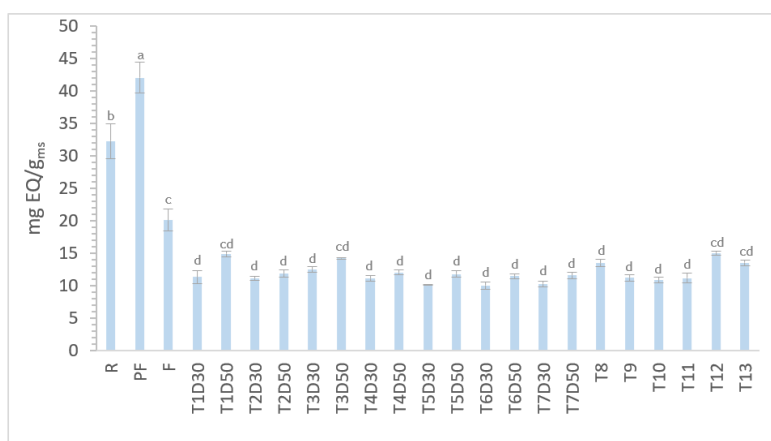


**Figura 27.** Teor de fenóis totais em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. R-reposo; PF- pré-floração; F- floração. Resultados estão expressos em média±desvio padrão, nas colunas, letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes pelo teste Scheffé ( $p < 0,05$ ).

Baptista *et al.* (2015) compararam o teor de fenóis totais de Lsl na fase de floração em extratos de diferentes polaridades, sendo o maior teor de fenóis encontrado nos extratos aquosos com 1689 mg EAG/g<sub>ms</sub> [90]. Outro estudo, em extratos de acetato de etilo:água de *L. angustifolia* revelaram um teor bastante inferior de fenóis totais de 50,6 mg EAG/g<sub>ms</sub> [227]. Em diferentes subespécies de *L. angustifolia*, extratos hidroetanólicos das flores revelaram teores de fenóis totais de 75 a 90 mg EAG/g<sub>ms</sub>

[228]. A influência do solvente na extração de compostos fenólicos é confirmada por Mammeri *et al.* (2022), onde o teor de fenóis totais é testado em diferentes extratos de *L. multifida*, sendo que o solvente acetato de etilo (462,23 mg EAG/g<sub>ms</sub>) revelou um maior poder de extração de fenóis comparativamente a extratos metanólicos e butanólicos. Neste estudo foi demonstrado ainda que extratos de diclorometano revelaram o menor poder de extração [229]. Relativamente aos ensaios de micropropagação em sistema agarizado (T1) e em BIT observou-se uma tendência para teores relativamente mais elevados no ciclo de 50 dias, comparativamente ao ciclo de 30 dias. No ensaio A observaram-se teores ligeiramente mais elevados no sistema agarizado do que os ensaios em BIT. Em relação ao ensaio B, os T8, T12 e T13 obtiveram teores mais elevados de fenóis totais, 153,27 mg EAG/g<sub>ms</sub>, 161,66 mg EAG/g<sub>ms</sub> e 150,51 mg EAG/g<sub>ms</sub>, respetivamente. No sistemas de produção *in vitro* a temperatura estabelecida para o crescimento das culturas pode influenciar este processo de produção de fenóis totais. De facto, Mansinhos *et al.* (2022) ao estudarem o efeito da temperatura na produção de fenóis totais em *L. viridis* micropropagada em sistema agarizado, verificaram que as plantas que se desenvolveram a temperaturas de 15°C e 20°C obtiveram teores de fenóis totais superiores ( $\approx$  125 mg EAG/g<sub>ms</sub>) ao de plantas colocadas a temperaturas de 25°C e 30°C ( $\approx$  100 mg EAG/g<sub>ms</sub>) [230].

Os teores de flavonóides dos extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de *Lsl* encontram-se apresentados na Figura 28.



**Figura 28.** Teor de flavonóides em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. R-reposou; PF- pré-floração; F- floração. Resultados estão expressos em média±desvio padrão, nas colunas, letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes pelo teste Scheffé ( $p<0,05$ ).

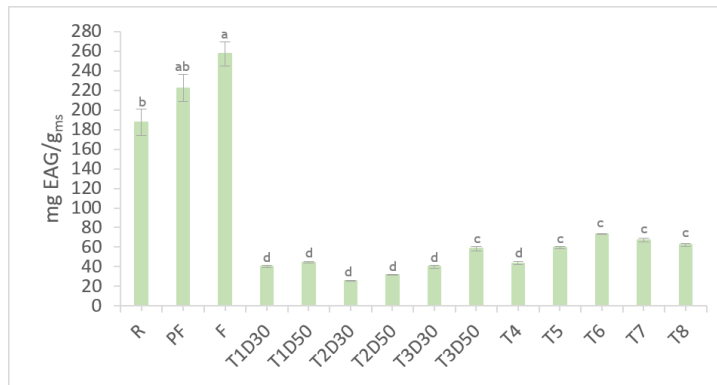
À semelhança do teor de fenóis, o teor de flavonóides manteve o comportamento nas fases fenológicas, sendo o maior teor observado na pré-floração (PF) com 42,01 mg EQ/g<sub>ms</sub>, estatisticamente diferente dos demais, seguida da fase de repouso (R) com

32,22 mg EQ/g<sub>ms</sub> e a floração (F) com 20,05 mg EQ/g<sub>ms</sub>. Também em extratos aquosos de Lsl, o teor de flavonóides revelado para plantas recolhidas no início de floração foi de 13,26 mg EQ/g<sub>ms</sub>, resultado relativamente mais baixo do que o obtido nas fases de pré-floração e floração [81]. Por outro lado, Baptista *et al.* (2015) reportaram um teor de flavonóides em extratos aquosos de Lsl (floração) de 459 mg ER/g<sub>ms</sub>, resultado este bastante superior ao teor encontrado [90]. Nos extratos aquosos com origem na micropropagação, o teor flavonóides diminuiu significativamente em comparação com as plantas silvestres, os valores variaram de 9,97 mg EQ/g<sub>ms</sub> (T6D30) a 15 mg EQ/g<sub>ms</sub> (T12).

Em relação aos extratos aquosos de Pt, os teores de fenóis e flavonóides estão apresentados nas Figuras 29 e 30, respetivamente. De acordo com os resultados o teor de fenóis totais variou de acordo com a fase fenológica, observando-se um maior teor de fenóis totais na floração com 257,34 mg EAG/g<sub>ms</sub>, seguida da fase de pré-floração com 222,28 mg EAG/g<sub>ms</sub> e repouso com 187,28 mg EAG/g<sub>ms</sub>. Luís *et al.* (2009) também reportaram um teor de fenóis totais em extratos aquosos próximo aos obtidos, com 222,69 mg EAG/g<sub>ms</sub>. Os autores compararam o teor de fenóis totais em extratos aquosos e em extratos etanólicos, sendo que o teor de fenóis foi superior nos extratos aquosos [231]. Em extratos metanólicos de Pt o teor de fenóis foi superior nas flores (171,4 mg EAG/g<sub>ms</sub>) comparado com os extratos de caules/folhas (113,6 mg EAG/g<sub>ms</sub>) [112]. Semelhanças nos teores de fenóis totais foram observadas em extratos hidroetanólicos de flores (282 mg EAG/g<sub>ms</sub>) e folhas/caules (292 mg EAG/g<sub>ms</sub>) de Pt. Neste estudo realizado com 35 plantas aromáticas e medicinais, a Pt é considerada uma espécie com elevado teor de fenóis, encontrando-se entre as sete espécies com o teor de fenóis totais mais elevado [124]. Coelho *et al.* (2011) apresentaram teores de fenóis mais elevados em extratos aquosos de Pt na fase de repouso (402,9 mg EAG/g<sub>ms</sub>) comparativamente à fase de floração (337,7 mg EAG/g<sub>ms</sub>) [122]. Esta variabilidade de teor de fenóis em fases fenológicas diferentes, apesar de serem recolhidas no mesmo local, mas em anos diferentes, pode justificar-se devido a condições edafo-climáticas diferentes. Contudo, as plantas aromáticas possuem diversos mecanismos moleculares que podem ser ativados como defesa a condições de stresse influenciando de forma significativa a produção de metabolitos secundários [232].

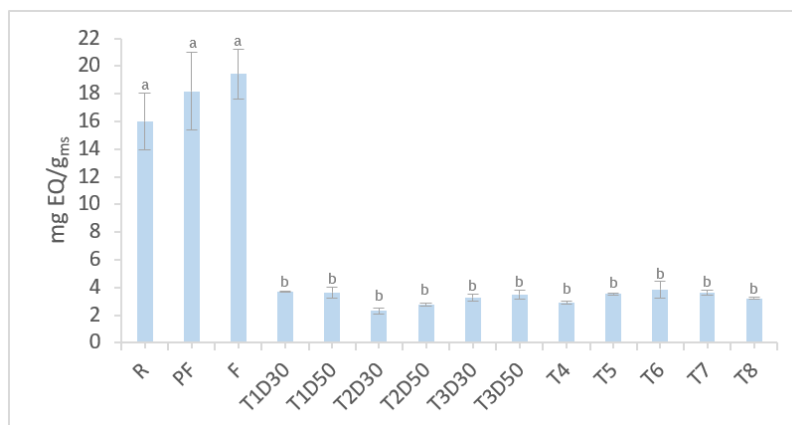
Relativamente aos ensaios de micropropagação em Pt, o teor de fenóis totais diminuiu significativamente em relação às plantas silvestres, variando de 25,79 mg EAG/g<sub>ms</sub> (T2D30) a 73,54 mg EAG/g<sub>ms</sub> (T6). Em extratos aquosos de plantas silvestres de Pt foi reportado um teor de fenóis mais elevado ( $\approx$ 250-350 mg EAG/g<sub>ms</sub>) comparativamente a extratos aquosos de plantas micropropagadas proveniente de sistema agarizado ( $\approx$ 100

mg EAG/g<sub>ms</sub>) [116], valores estes mais elevados aos encontrados nos extratos de plantas com origem na micropropagação.



**Figura 29.** Teor de fenóis totais em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de *P. tridentatum*. R-reposou; PF- pré-floração; F- floração. Resultados estão expressos em média±desvio padrão, nas colunas, letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes pelo teste Scheffé ( $p<0,05$ ).

O teor de flavonóides nas plantas silvestres de Pt demonstrou o mesmo comportamento que os fenóis, sendo a fase da floração onde se obteve o maior teor (19,43 mg EQ/g<sub>ms</sub>), seguida da fase de pré-floração (18,17 mg EQ/g<sub>ms</sub>) e repouso (16 mg EQ/g<sub>ms</sub>), não se observando diferenças significativas entre os resultados. Luís *et al.* (2009) apresentaram teores relativamente mais elevados em extratos aquosos de Pt (25 mg EQ/g<sub>ms</sub>). Em extratos metanólicos de flores de Pt, o teor de flavonóides foi superior a 45 mg EQ/g<sub>ms</sub>, revelando o dobro do teor comparativamente com o mesmo extrato em caules/folhas ( $\approx 20$  mg EQ/g<sub>ms</sub>) [231].



**Figura 30.** Teor de flavonóides em extratos aquosos de plantas silvestres e micropropagadas de *P. tridentatum*. R-reposou; PF- pré-floração; F- floração. Resultados estão expressos em média±desvio padrão, nas colunas, letras diferentes indicam que as médias são significativamente diferentes pelo teste Scheffé ( $p<0,05$ ).

Em relação aos ensaios de micropropagação em Pt, o teor de fenóis e flavonóides diminuiu significativamente em relação às plantas silvestres, variando de 2,32 mg

EQ/g<sub>ms</sub> (T2D30) a 3,85 mg EQ/g<sub>ms</sub> (T6). A produção de compostos fenólicos, para além da influência de fatores bióticos na planta, está bastante dependente de fatores abióticos, como o tipo de solo, clima, fitossociologia [23, 232]. No seu habitat natural, esta variabilidade dificulta a padronização do teor destes componentes nas plantas silvestres [234].

#### 2.2.2. Perfil fenólico dos extratos aquosos

O perfil fenólico dos extratos aquosos de Lsl e de Pt com origem silvestre, nas três fases fenológicas, e com origem em BIT, foi determinado através da metodologia de HPLC-DAD. Os extratos de cada espécie provenientes dos tratamentos de BIT foram selecionados tendo em consideração os resultados de micropropagação e teor de fenóis totais e flavonóides. A Figura 31 representa os cromatogramas obtidos dos extratos de Lsl na fase de repouso, pré-floração, floração e BIT (T12). Através da observação dos cromatogramas, é possível verificar a diversidade e abundância em compostos fenólicos que a espécie apresenta no seu estado silvestre comparativamente ao extrato obtido na micropropagação em BIT. A quantificação de cada composto estudado está apresentada na Tabela 21. De entre os 11 compostos fenólicos estudados, incluem-se ácidos hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos e flavonóides. Nos extratos de Lsl não foram detetados o ácido clorogénico, a taxifolina e a rutina. O ácido elágico foi detetado no extrato de Lsl com origem no tratamento de BIT, no entanto, dado a ser inferior ao limite mínimo de quantificação não foi possível quantificar este composto. O composto fenólico mais abundante nos extratos de plantas silvestres foi o ácido rosmarínico, com 17765 µg/g<sub>ms</sub> na fase de pré-floração, seguida da fase de repouso (4189 µg/g<sub>ms</sub>) e na floração (3766 µg/g<sub>ms</sub>). O ácido cafeico e a quercetina também estão presentes em quantidades elevadas nos extratos de Lsl, sendo que o ácido cafeico varia de 336 µg/g<sub>ms</sub> na fase de floração a 1014 µg/g<sub>ms</sub> no repouso. O extrato da fase da floração apresentou a menor quantidade de quercetina de 451 µg/g<sub>ms</sub> ao contrário da fase de repouso onde foi obtido o teor mais elevado deste composto (1883 µg/g<sub>ms</sub>).

De forma geral, a fase da floração revelou possuir menor quantidade de compostos fenólicos, em comparação com as fases de repouso e pré-floração, onde se observaram teores superiores na maioria dos compostos. Em extratos hidrometanólicos de *Valeriana jatamansi* também foram reportadas quantidades de compostos fenólicos superiores nas fases de pré-floração e repouso comparativamente com a fase da floração [235]. Também em extratos metanólicos de *Origanum majorana* se observou um maior teor de compostos fenólicos na fase de repouso [236]. Relativamente ao extrato com origem na micropropagação, os compostos maioritários foram os ácidos cafeico e rosmarínico, com 729 e 363 µg/g<sub>ms</sub>, respetivamente.

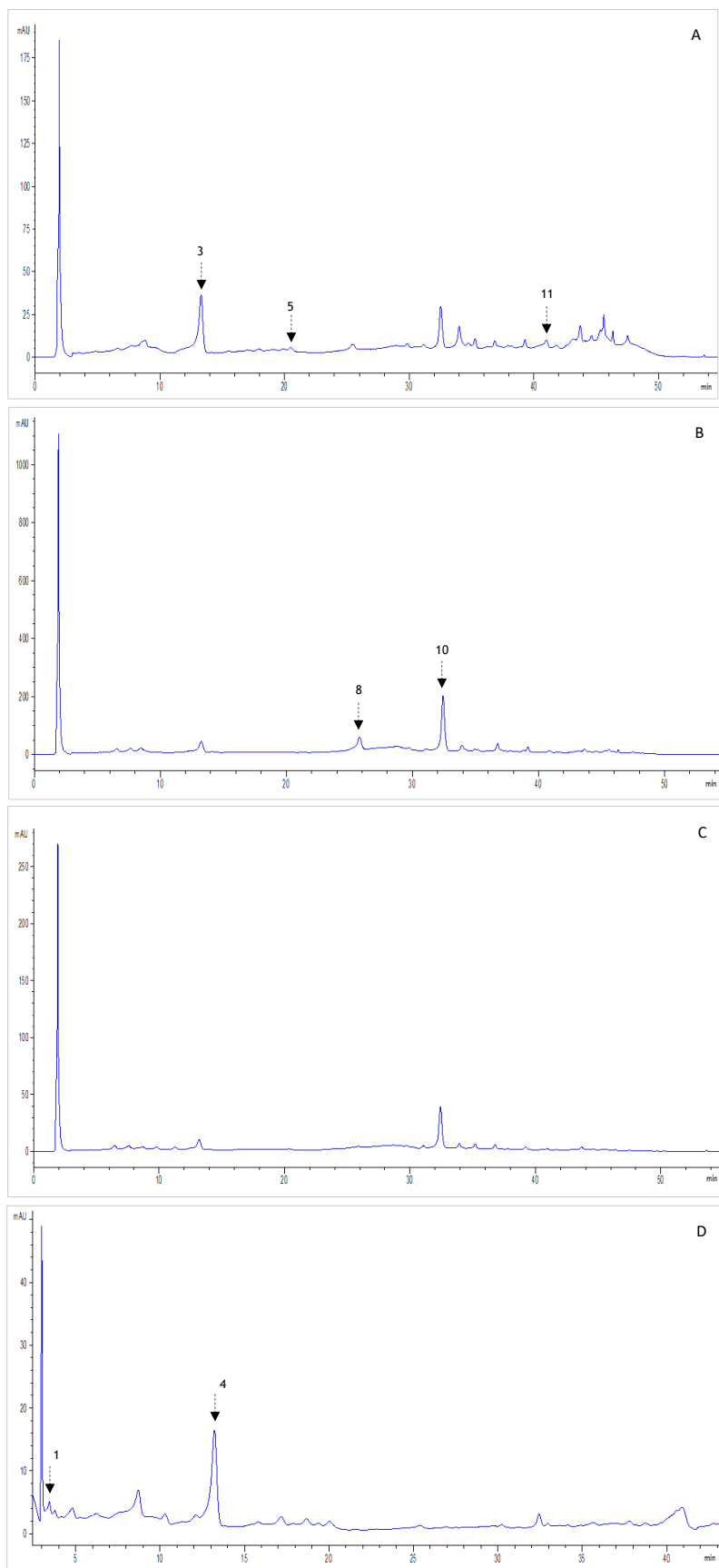


Figura 31. Cromatogramas (322 nm) do perfil fenólico de extratos aquosos de plantas silvestres (A: repouso; B: pré-floração; C: floração) e de BIT (D) de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Ácido gálico

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

---

(1), ácido clorogénico (2), ácido cafeico (3), ácido siríngico (4), ácido p-cumárico (5), taxifolina (6), rutina (7), ácido ferúlico (8), ácido elágico (9), ácido rosmarínico (10), quercetina (11).

No género *Lavandula* existe uma diversidade considerável de ácidos fenólicos, nomeadamente ácidos hidroxicinâmicos, muitos deles derivados do ácido cafeico, sob a forma de ésteres, como é o caso dos ácidos rosmarínico e clorogénico [237]. Entre as espécies de *Lavandula* da secção *Stoechas*, o ácido rosmarínico é o composto fenólico encontrado em maior concentração [238]. A presença de ácido rosmarínico em extratos metanólicos de *L. officinalis* micropropagada em BIT também foi confirmada por Wilken *et al.* (2005), os autores revelaram um teor deste ácido fenólico (5700 µg/g<sub>ms</sub>) próximo ao obtido em plantas silvestres (4800 µg/g<sub>ms</sub>) [157]. Elevadas quantidades de ácido rosmarínico (70000 µg/g<sub>ms</sub>) também foram reportadas em extratos etanólicos de Lsl de plantas recolhidas na região de Madrid, através do método Soxhlet [17]. Em extratos metanólicos de Lsl recolhida na região do Algarve, Nunes *et al.* (2017) reportaram teores de ácido rosmarínico semelhantes aos obtidos (3017 µg/g<sub>ms</sub>), sendo este o composto maioritário identificado. Quantidades consideráveis de ácidos clorogénico (164 µg/g<sub>ms</sub>) e ferúlico (173 µg/g<sub>ms</sub>) também foram identificadas nestes extratos [81].

Relativamente aos extratos de Pt, nas amostras estudadas, apenas não foi identificado o ácido gálico. A Figura 32 apresenta os cromatogramas obtidos nos diferentes extratos de Pt. O extrato da fase de repouso é caracterizado por elevadas concentrações de rutina (26285 µg/g<sub>ms</sub>), ácido elágico (2082 µg/g<sub>ms</sub>), quercetina (1542 µg/g<sub>ms</sub>) e ácido clorogénico (1303 µg/g<sub>ms</sub>). A fase da pré-floração foi caracterizada por elevadas concentrações de rutina (19587 µg/g<sub>ms</sub>), quercetina (4246 µg/g<sub>ms</sub>) e ácido elágico (2195 µg/g<sub>ms</sub>), enquanto na fase de floração apresentou elevadas quantidades de quercetina (14748 µg/g<sub>ms</sub>), rutina (6385 µg/g<sub>ms</sub>) e o maior teor de ácido elágico (3878 µg/g<sub>ms</sub>). À semelhança do que ocorreu nos extratos de Lsl, nesta espécie também se confirmou que as fases de repouso e pré-floração foram as fases fenológicas onde se observaram maiores teores dos compostos fenólicos analisados. Em relação aos extratos de BIT (T6), os compostos fenólicos maioritários foram o ácido elágico (708 µg/g<sub>ms</sub>), seguido da rutina (532 µg/g<sub>ms</sub>) e quercetina (102 µg/g<sub>ms</sub>). O extrato obtido em BIT (T6) manteve o perfil fenólico que as plantas silvestres. Gonçalves *et al.* (2018) também estudaram o perfil fenólico de extratos aquosos de Pt micropropagadas em sistema agarizado, os autores encontraram diferenças na presença de alguns flavonóides, destacando-se a

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

**Tabela 21.** Identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *P. tridentatum* de plantas silvestres e micropropagadas.

Pico	Composto ( $\mu\text{g/gms}$ )	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>				<i>P. tridentatum</i>			
		repouso	pré-floração	floração	T12	repouso	pré-floração	floração	T6
1	Ácido gálico	106,47 $\pm$ 0,11	126,70 $\pm$ 0,07	84,22 $\pm$ 0,04	18,05 $\pm$ 0,04	N/D	N/D	N/D	N/D
2	Ácido clorogénico	N/D	N/D	N/D	N/D	1302,85 $\pm$ 0,05	1363,71 $\pm$ 0,11	450,99 $\pm$ 0,02	90,49 $\pm$ 0,01
3	Ácido cafeico	1014,45 $\pm$ 0,05	745,94 $\pm$ 0,06	335,63 $\pm$ 0,05	729,42 $\pm$ 0,03	95,51 $\pm$ 0,02	95,59 $\pm$ 0,01	102,02 $\pm$ 0,01	47,19 $\pm$ 0,01
4	Ácido siríngico	289,38 $\pm$ 0,08	132,32 $\pm$ 0,04	79,80 $\pm$ 0,03	42,16 $\pm$ 0,07	245,13 $\pm$ 0,14	235,15 $\pm$ 0,10	255,86 $\pm$ 0,12	38,84 $\pm$ 0,02
5	Ácido <i>p</i> -cumárico	13,40 $\pm$ 0,12	28,11 $\pm$ 0,03	21,20 $\pm$ 0,12	13,51 $\pm$ 0,01	725,11 $\pm$ 0,14	685,00 $\pm$ 0,05	85,88 $\pm$ 0,11	17,33 $\pm$ 0,01
6	Taxifolina	N/D	N/D	N/D	N/D	121,52 $\pm$ 0,11	60,82 $\pm$ 0,16	176,07 $\pm$ 0,21	8,55 $\pm$ 0,07
7	Rutina	N/D	N/D	N/D	N/D	26285,04 $\pm$ 0,10	19587,42 $\pm$ 0,09	6384,95 $\pm$ 0,11	532,18 $\pm$ 0,10
8	Ácido ferúlico	202,49 $\pm$ 0,09	1215,02 $\pm$ 0,02	98,81 $\pm$ 0,03	76,32 $\pm$ 0,08	130,98 $\pm$ 0,11	135,20 $\pm$ 0,04	94,24 $\pm$ 0,01	42,12 $\pm$ 0,11
9	Ácido elágico	228,32 $\pm$ 0,04	190,43 $\pm$ 0,01	174,26 $\pm$ 0,01	<LLOQ	2081,60 $\pm$ 0,03	2194,95 $\pm$ 0,09	3877,89 $\pm$ 0,05	707,67 $\pm$ 0,08
10	Ácido rosmarínico	4188,95 $\pm$ 0,11	17764,49 $\pm$ 0,07	3765,80 $\pm$ 0,11	362,95 $\pm$ 0,05	1044,12 $\pm$ 0,07	560,17 $\pm$ 0,11	208,00 $\pm$ 0,05	39,69 $\pm$ 0,04
11	Quercetina	1882,46 $\pm$ 0,11	696,48 $\pm$ 0,10	450,89 $\pm$ 0,06	59,40 $\pm$ 0,07	1542,31 $\pm$ 0,21	4246,29 $\pm$ 0,05	14747,93 $\pm$ 0,06	102,35 $\pm$ 0,05

Resultados expressos em média  $\pm$  coeficiente de variação de triplicados. N/D: não detetado; <LLOQ: inferior ao limite mínimo de quantificação.

ausência de taxifolina e rutina em extratos de plantas micropropagadas, ao contrário dos extratos de plantas silvestres. No mesmo estudo, em plantas de *Pt* recolhidas na mesma região, na Serra da Malcata (Penamacor), foram identificados compostos fenólicos nas diferentes fases fenológicas, destacando-se a presença de flavonóides como os glicósidos de taxifolina, miricetina, genisteína e de quercetina. Neste estudo

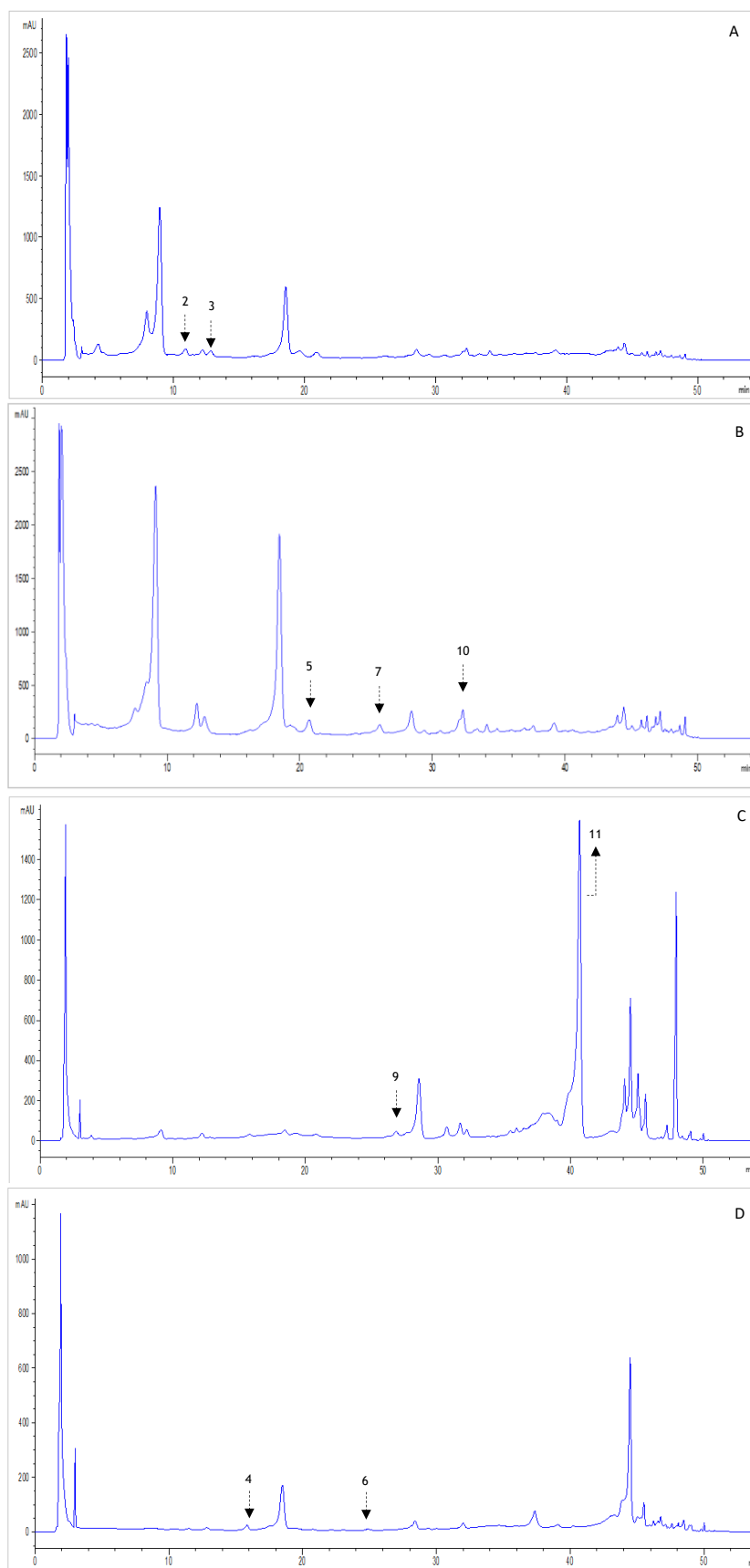


Figura 32. Cromatogramas (255/280 nm) do perfil fenólico de extratos aquosos de plantas silvestres (A: repouso; B: pré-floração; C: floração) e de BIT (D) de *P. tridentatum*. Ácido gálico

(1), ácido clorogénico (2), ácido cafeico (3), ácido siríngico (4), ácido *p*-cumárico (5), taxifolina (6), rutina (7), ácido ferúlico (8), ácido elágico (9), ácido rosmarínico (10), quercetina (11).

foi verificada a influência da fase fenológica na diversidade dos compostos fenólicos, pelo que nas fases de floração e pré-floração o perfil fenólico foi mais diversificado comparativamente com a fase de repouso [116]. Em infusões e extratos hidroetanólicos de Pt, foi confirmada a presença de flavonóides, nomeadamente derivados de quercetina e genisteína, sissotrina, o 5,5-diidroxi-3-metoxi-isoflavona-7-*O*-glucósido, genistina, prunetina, rutina e 7-metilrobol [118-120]. No estudo de Gonçalves *et al.* (2020) verificou-se o poder de extração do etanol na obtenção de flavonóides, pois o teor de flavonóides foi superior nos extratos hidroetanólicos (43 mg/g<sub>ms</sub>) do que na infusão (35 mg/g<sub>ms</sub>) [120]. A presença de compostos fenólicos em extratos de Pt é reportada em diversos estudos com plantas de diversas origens. Em extratos metanólicos de caules e folhas de Pt recolhida na Serra da Estrela, Luís *et al.* (2011) identificaram o ácido vanílico como maioritário (32,2 mg/g<sub>ms</sub>), seguido dos ácidos cafeico (18,2 mg/g<sub>ms</sub>) e clorogénico (17,8 mg/g<sub>ms</sub>), enquanto nos extratos de flores os compostos fenólicos maioritários foram o ácido ferúlico (22,2 mg/g<sub>ms</sub>), seguido do ácido elágico (10,4 mg/g<sub>ms</sub>) e quercetina (9,3 mg/g<sub>ms</sub>) [112]. A presença de flavonóides também foi confirmada em extratos hidrometanólicos de Pt recolhida na região de Vila Real, destacando-se a presença de taxifolina (22 mg/g<sub>ms</sub>), a genistina (17 mg/g<sub>ms</sub>), a genisteína (12 mg/g<sub>ms</sub>), já os glicósidos de quercetina também foram identificados numa concentração inferior (<1,6 mg/g<sub>ms</sub>) [115]. Roriz *et al.* (2014) identificaram 21 flavonóides em extratos metanólicos de Pt recolhida na região de Castro Daire, sendo que os maioritários foram o 6-*C*-hexósido de dihidroquercetina (3874 µg/g<sub>ms</sub>), seguido do 6-*C*-glucósido de miricetina (1317 µg/g<sub>ms</sub>) e a isoquercetina (963 µg/g<sub>ms</sub>) [113].

### 2.2.3. Perfil volátil dos óleos essenciais

O perfil volátil dos OE de Lsl foram caracterizados em dois momentos diferentes, numa primeira fase caracterizaram-se os OEs das diferentes fases fenológicas de plantas com origem na Serra da Malcata e posteriormente foi realizada uma caracterização mais abrangente de Lsl de diferentes locais de recolha da região da Beira Interior. De forma a detalhar a composição volátil de cada fase fenológica, foram analisados os OEs da fase de repouso, pré-floração, floração (flores+folhas), floração (flores) e floração (folhas). Na Tabela 22 está apresentada a concentração (%) de cada composto identificado. Num total de 37 compostos voláteis foram identificados nos OEs de plantas silvestres e de BIT, correspondendo a percentagens de identificação entre 66% a 81%, sendo a percentagem máxima de identificação atingida no OE da fase de

floração. No que diz respeito às classes de compostos, independentemente da fase fenológica, os OEs de Lsl são representados maioritariamente por monoterpenos oxigenados (38% a 65%). Foram registados compostos não identificados (NI B, C, D, E e F) que, sem possibilidade de identificação neste trabalho, têm surgido frequentemente nos OEs de Lsl. O composto volátil maioritário nas diferentes fases foi o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo, variando entre 13% (pré-floração) a 31% (floração: folhas), à exceção da fase de repouso onde o maioritário foi o 2,3,4,4-tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona (26%). Na floração é possível observar que o OE das folhas na floração apresentou a maior percentagem de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (30,5%), sendo que nas flores a sua percentagem foi de 17%, estando estes resultados em concordância com outros estudos em Lsl. Apesar de não se verificar em todos os locais do estudo, González-Coloma *et al.* (2011) reportaram diferenças consideráveis no teor de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo entre folhas e flores na floração, verificando um maior teor nas folhas (48%) do que o encontrado nas flores (23%). Quando esta diferença não se verificou, o teor entre folhas e flores foi muito próximo [75]. Lavoine-Hanneguelle e Casabianca (2004) também reportaram um maior teor do composto maioritário, acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo no OE de folhas (28%) comparativamente ao das flores (19%) [63]. Para além do acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo, todos os derivados de necrodano apresentaram maiores teores no OE de folhas do que no OE de flores, o que sugere que estes compostos são produzidos/armazenados em maior quantidade nas folhas e durante a floração. A fase de repouso apresentou ainda quantidades consideráveis de 1,8-cineol (6%) e fenchona (6%), assim como na pré-floração. Na floração o teor destes monoterpenos oxigenados diminuiu significativamente, contrariando o comportamento de compostos como o linalol (flores: 7%), a cânfora (flores: 4%) e o *trans*- $\alpha$ -necrodol (folhas: 13%), onde se registaram teores mais elevados.

O linalol está fortemente associado à atração de polinizadores e/ou atua como repelente de insetos e herbívoros, estando os seus enantiómeros associados a funções distintas na planta, sendo sugerido que o (S)-(+)-linalol está associado à atração de polinizadores e o (R)-(-)-linalol na ação repelente de insetos [239]. Apesar de, em alguns estudos, ser referido que a concentração de linalol é maior na fase de floração, associado à sua função de atração de polinizadores [239, 240], noutros, elevadas concentrações deste composto são encontradas na fase vegetativa, podendo assim estar também associado à defesa da planta [241, 242].

A composição e teor de compostos voláteis produzidos pelas plantas e a sua interação com o meio envolvente tem vindo a ser divulgada em vários estudos [243-245].

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

**Tabela 22.** Compostos voláteis (%) do óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* nas diferentes fases fenológicas.

Compostos	IR	Repouso	Pré-floração	Floração (flores+folhas)	Floração (flores)	Floração (folhas)	T12
Triciclono	913	-	-	-	-	-	0,1±0,0
3,5-Dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno	930	2,4±0,3	3,8±0,1	5,8±0,6	4,0±0,0	3,0±0,1	-
α-Pineno	930	1,5±0,2	2,3±0,1	3,1±0,1	2,4±0,0	1,8±0,1	4,2±0,1
Canfeno	938	-	0,3±0,3	-	-	-	1,5±0,0
β-Pineno	963	-	1,1±0,0	-	-	-	12,0±0,1
p-Cimeno	1003	0,3±0,3	0,3±0,3	-	-	-	0,7±0,0
1,8-Cineol	1005	6,0±0,5	4,8±0,1	1,3±0,1	1,7±0,0	1,0±0,0	1,4±0,0
Limoneno	1017	-	-	-	-	-	0,8±0,0
3,4,4-Trimetil-2-ciclohexenona	1038	2,0±0,1	1,5±0,1	0,9±0,1	0,8±0,0	0,7±0,0	0,8±0,0
Óxido de <i>trans</i> -linalol	1045	4,3±0,2	1,6±0,0	0,3±0,3	0,5±0,0	-	0,7±0,0
NI B de Lsl	≈1050	-	-	0,7±0,0	0,7±0,0	0,3±0,0	-
Fenchona	1050	6,0±0,2	6,0±0,1	2,8±0,1	2,8±0,0	1,3±0,0	0,1±0,0
Óxido de <i>cis</i> -linalol	1059	3,3±0,1	0,6±0,6	-	-	-	0,3±0,0
2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona	1071	1,5±0,0	0,8±0,0	-	-	-	-
Linalol	1074	-	-	5,8±0,2	6,9±0,2	5,3±0,1	1,6±0,0
Cânfora	1102	2,2±0,1	3,2±0,0	1,4±0,0	4,3±0,0	-	10,5±0,1
<i>trans</i> -Pinocarveol	1106	1,1±0,3	1,0±0,0	-	-	-	1,8±0,0
Fenchol	1110	-	-	-	-	-	0,1±0,0
<i>trans</i> -α-Necrodol	1114	2,2±0,0	5,2±0,1	13,0±0,2	6,4±0,1	12,7±0,2	1,2±0,1
NI C de Lsl	≈1137	1,1±0,0	0,6±0,0	2,3±0,1	2,5±0,0	2,6±0,4	-
Lavandulol	1142	-	-	0,6±0,0	-	0,8±0,0	-
<i>cis</i> -α-Necrodol	1147	2,5±0,0	3,5±0,0	2,3±0,1	3,1±0,0	3,9±0,0	0,6±0,0
2,3,4,4-Tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona	1152	<b>26,3±0,0</b>	11,0±0,5	3,5±0,5	-	2,1±0,0	0,4±0,0
Verbenona	1164	2,4±0,0	1,0±0,1	-	-	-	0,7±0,0

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

Terpinen-4-ol	1181	-	-	-	-	-	0,4±0,0
<i>p</i> -Cimeno-8-ol	1188	-	-	-	-	-	0,6±0,0
Mirtenal	1202	-	-	-	-	-	2,2±0,0
Acetato de bornilo	1265	1,6±0,0	1,6±0,0	0,9±0,1	1,0±0,2	1,0±0,0	-
Acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo	1265	2,2±0,1	<b>12,6±0,3</b>	<b>26,9±1,1</b>	<b>17,4±0,2</b>	<b>30,5±0,5</b>	<b>16,2±0,1</b>
NI D de Lsl	<i>≈</i> 1267	2,4±0,1	4,2±0,1	2,8±0,0	4,4±0,1	2,7±0,0	-
Acetato de lavandulilo	1278	1,7±0,1	4,1±0,1	6,5±0,1	6,1±0,1	7,0±0,1	7,8±0,0
Acetato de <i>cis</i> - $\alpha$ -necrodilo	1285	2,0±0,3	1,9±0,0	1,6±0,2	1,7±0,2	1,7±0,0	0,6±0,0
$\delta$ -Cadineno	1505	-	-	0,8±0,0	1,4±0,0	1,0±0,0	-
$\alpha$ -Selineno	1506	-	-	-	-	-	0,4±0,0
Cubebol	1515	-	-	-	-	-	1,0±0,0
Viridiflorol	1569	3,8±0,3	3,0±0,0	2,1±0,2	3,6±0,1	2,3±0,1	5,2±0,0
Ledol	1580	1,5±0,1	1,9±0,1	1,3±0,1	2,1±0,1	1,0±0,1	-
Óxido de cariofileno	1598	-	-	-	-	-	0,9±0,0
Copaborneol	1617	-	-	-	-	-	4,3±0,1
<i>T</i> -Muurolol	1653	-	-	-	-	-	0,9±0,0
NI E de Lsl	<1850	-	-	3,4±0,4	4,0±0,1	3,0±0,5	4,4±0,1
NI F de Lsl	<1850	-	-	2,7±0,0	3,0±0,1	2,1±0,3	3,3±0,0
<b>% Identificação</b>		76,8	73,1	80,9	66,2	75,0	80,0
Monoterpenos		1,8	4,0	3,1	2,4	1,8	19,3
Monoterpenos oxigenados		37,5	47,1	63,4	51,9	65,2	46,8
Sesquiterpenos		0,0	0,0	0,8	1,4	1,0	0,4
Sesquiterpenos oxigenados		5,3	4,9	3,4	5,7	3,3	12,3
Outros		32,2	17,1	10,2	4,8	3,7	1,2

Resultados apresentados em média±desvio padrão de duplicados de injeção. Os compostos estão listados por ordem de eluição em coluna capilar DB-1 (30 m×0,25 mm×0,25  $\mu$ m). IR: índice de retenção. Índices de retenção em itálico correspondem a eluição em coluna capilar HP-5MS (30 m×0,25 mm×0,25  $\mu$ m). -: não detetado.

Guitton *et al.* (2010) analisaram os compostos voláteis do OE de inflorescências de *L. angustifolia* e *L. intermedia* em diferentes estados de maturação das flores (flores fechadas, flores abertas e flores desbotadas), e verificaram que no OE das inflorescências com as flores abertas o composto maioritário foi o acetato de linalilo e o acetato de lavandulilo, este último com maior concentração na floração (6,5%), sugerindo assim o potencial destes compostos na atração de polinizadores. Por outro lado, os voláteis maioritários presentes no OE de flores fechadas foram o  $\delta$ -3-careno, cânfora e 1,8-cineol, e em flores desbotadas o linalol e terpineno-4-ol, podendo sugerir o potencial destes compostos na ação repelente de insetos/herbívoros [247].

Os OEs de Lsl em floração recolhidas no sul de Portugal, revelaram um perfil volátil diferente do obtido neste trabalho, sendo o composto maioritário o 1,8-cineol (18-34%) e apresentando teores relativamente inferiores de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (11-18%) [72, 78]. Zuzarte *et al.* (2012) estudaram o perfil volátil dos OEs de Lsl em floração recolhidas no centro (região de Piódão) e sul (região do Cabo de São Vicente) de Portugal. O OE de plantas da região centro apresentou o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo como maioritário (17%), seguido do *trans*- $\alpha$ -necrodol (7%) e 1,8-cineol (6%), enquanto o OE de plantas do sul revelou o 1,8-cineol (34%) e a fenchona (18%) como maioritários, apresentando um baixo teor de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (3%) [64]. Considerando que a Lsl apenas ocorre na Península Ibérica, o perfil volátil dos OEs com origem em plantas de Espanha apresenta algumas diferenças nos compostos maioritários. Estudos em Lsl em floração revelam compostos maioritários como cânfora (52%), 2,3,4,4-tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona (38%), fenchona (22%) e 1,8-cineol (21%), enquanto os compostos de necrodano estão presentes em baixas concentrações (3%) [17, 67, 68, 73]. A elevada taxa de polimorfismo e capacidade de hibridação das espécies de *Lavandula*, pode justificar a variabilidade encontrada na composição volátil dos seus OEs, sugerindo a possibilidade de ocorrerem vários quimiótipos [75, 247]. Todos estes resultados confirmam que a produção de compostos voláteis é fortemente influenciada pelas condições do edafo-climáticas em que a planta se desenvolve, quer sejam fatores bióticos ou abióticos [249].

Neste trabalho é reportado e identificado, pela primeira vez, o perfil volátil do OE de Lsl proveniente de micropropagação, nomeadamente de BIT (Tabela 22). A composição do OE proveniente do T12 apresenta algumas diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao OE de plantas silvestres. Foi possível a identificação de 80% dos constituintes voláteis do OE, sendo maioritariamente representado por monoterpenos oxigenados (47%), à semelhança das plantas silvestres. No entanto, verificou-se um aumento considerável no teor de monoterpenos (19%) e de sesquiterpenos oxigenados

(12%). Compostos como  $\beta$ -pineno (12%), cânfora (11%) e  $\alpha$ -pineno (4%) tiveram os maiores teores no OE de BIT, sendo o composto maioritário o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (16%). Foram também reportados teores elevados de acetato de lavandulilo (8%), viridiflorol (5%) e copaborneol (4%). Os monoterpenos e sesquiterpenos que não foram identificados nos OEs de plantas silvestres, mas surgiram, ainda que em pequenas quantidades, no OE de BIT, foram o triciclono, limoneno, fenchol, terpineno-4-ol, *p*-cimeno-8-ol, mirtenal, cubebol, óxido de cariofileno, copaborneol e *T*-muurolol. O aumento do teor de monoterpenos e de sesquiterpenos oxigenados no OE de plantas micropropagadas também foi reportado por Krol *et al.* (2023), onde os autores compararam o perfil volátil do OE de *Salvia apiana* de plantas silvestres e micropropagadas em BIT. Os monoterpenos como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno e *p*-cimeno apresentaram os maiores teores no OE de BIT, comparativamente com OE da planta silvestre. Também os sesquiterpenos oxigenados como o óxido de cariofileno, 4-epi-cubebol e o cedrol apresentaram os maiores teores em plantas micropropagadas [250]. Zuzarte *et al.* (2010) encontraram algumas diferenças quantitativas nos OEs de *L. pedunculata* com origem *in vitro* em sistema agarizado, apesar dos compostos maioritários serem os mesmos aos encontrados nas plantas silvestres, foi verificado um aumento no teor de monoterpenos como o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e limoneno no OE do sistema agarizado [11]. Em estudos de OEs de *L. angustifolia* com origem *in vitro* (sistema agarizado) também foi verificado um aumento de monoterpenos nos OEs comparativamente à planta silvestre. Neste estudo, apesar da composição qualitativa ser semelhante, os autores reportaram uma menor diversidade de compostos no OE com origem *in vitro* [251]. A menor diversidade de compostos e o aumento do teor de alguns compostos encontrados em OEs com origem em plantas micropropagadas, pode dever-se não só ao facto de serem plantas em estágios iniciais de desenvolvimento, mas também ao facto de estarem num ambiente mais controlado onde as variáveis abióticas são mais reduzidas do que na natureza e, por isso, não são estimuladas a produzir uma maior diversidade de compostos [251, 252]. Outro aspeto importante na produção de OE está relacionado com as estruturas produtivas e de acúmulo de OE, os tricomas. Zuzarte *et al.* (2010) confirmaram que o material *in vitro* de *L. pedunculata* apresentaram o mesmo tipo de tricomas que as plantas silvestres, confirmando que plantas mais jovens (com origem na micropropagação) são capazes de produzir e acumular OE [11].

Em Portugal o número de destilarias de óleos essenciais tem vindo a aumentar, sendo que a maioria dos produtores recolhe as suas plantas na natureza. Apesar do seu conhecimento geral sobre a planta que recolhem, por vezes a colheita de rosmaninho

(*Lavandula* spp.) não é seletiva a uma única espécie, pelo que óleos essenciais com mistura de espécies e/ou incorretamente identificados surgem no mercado. Sabe-se que, apesar de serem considerados produtos naturais, os óleos essenciais são constituídos por componentes químicos, os quais podem apresentar toxicidade no organismo recetor. Podem-se destacar alguns fatores que influenciam a toxicidade do uso de OEs, como a concentração do composto e a forma de uso/aplicação [254].

Na região da Beira Interior dominam o rosmaninho-maior (*Lavandula pedunculata*) e o rosmaninho-menor (*Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e/ou a subsp. *stoechas*). No entanto, existem algumas antinomias na existência de subespécies, nomeadamente na espécie *stoechas*, entre a subespécie *luisieri* e *stoechas*. Segundo o último referencial de flora publicado, a Flora Ibérica (2010), na região da Beira Interior apenas são referenciadas as espécies de *Lavandula pedunculata* e *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* [55]. No entanto, em 2004, a publicação “The genus *Lavandula*”, refere que a *L. stoechas* subsp. *luisieri* também existe nesta região, para além da *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* e da *Lavandula pedunculata* [53]. Franco na sua publicação “Nova Flora de Portugal” (1984) indicava que em Portugal Continental não existiria *Lavandula stoechas*, e o rosmaninho-menor existente no nosso país seria a *Lavandula luisieri* [54]. A morfologia das duas subespécies é muito semelhante, sendo por vezes difícil a sua distinção no campo. No entanto, em termos químicos o óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* é distinto do óleo essencial de *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* e de *L. pedunculata*, distinguindo-se da maioria dos óleos essenciais que ocorrem no Reino Vegetal devido à presença de compostos derivados de necrodano. Devido a alguma controversa em relação à presença de Lsl na região da Beira Interior, justificou-se a realização de um trabalho de recolha e caracterização de OEs de Lsl em diversos locais da Beira Interior.

A Tabela 23 apresenta os compostos voláteis identificados nas plantas recolhidas em cada local, foram identificados 36 compostos. A percentagem de identificação em todos os locais foi superior a 74%, sendo os monoterpenos oxigenados a classe de compostos mais representativa nos OEs de *Lavandula* spp. (>56%). Os rendimentos (% v/m) de extração de OE variaram entre 0,2% e 0,9%, para a população de Oleiros (OL) e para Vila Velha de Ródão (VV), respetivamente. Tendo em conta os resultados, o composto maioritário dos OEs de Lsl foi o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (>26%), exceto na população de VV, onde o composto maioritário foi a fenchona (34%). Para além do acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo, os compostos voláteis maioritários partilhados entre as populações são o *trans*- $\alpha$ -necrodol e o acetato de lavandulilo. A população da Serra da Malcata (MC) revelou um perfil com elevados teores de fenchona (12%), cânfora

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

**Tabela 23.** Compostos voláteis (%) dos óleos essenciais de *Lavandula* spp. recolhidas nos diferentes locais da Beira Interior.

Compostos voláteis	MC	PG	CB	OL	PN	VR	VV	O
$\alpha$ -Pineno	1,4 $\pm$ 1,0	0,5 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 5,1	4,6 $\pm$ 1,8
Canfeno	0,1 $\pm$ 0,2	-	-	-	-	-	-	0,7 $\pm$ 0,4
$\beta$ -Mirreno	-	-	-	-	-	0,1 $\pm$ 0,4	-	0,1 $\pm$ 0,1
$\delta$ -3-Careno	0,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,6	-	-
<i>p</i> -Cimeno	0,3 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 1,0	0,2 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 1,5	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3
Limoneno	-	0,1 $\pm$ 0,1	-	-	-	-	0,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,7
1,8-Cineol	3,3 $\pm$ 2,6	0,9 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 2,9	4,2 $\pm$ 5,6	3,3 $\pm$ 6,5	2,2 $\pm$ 5,4	0,6 $\pm$ 1,3
Óxido de <i>trans</i> -linalol	0,5 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 1,0	-
3,4,4-Trimetil-2-ciclohexenona	0,7 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	-
Óxido de <i>cis</i> -linalol	0,1 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3	-	0,1 $\pm$ 0,3	-	0,2 $\pm$ 0,6	-
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	-	0,2 $\pm$ 0,3	-	0,1 $\pm$ 0,2	-	0,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3
Fenchona	12,1 $\pm$ 23,9	-	0,6 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 1,4	0,5 $\pm$ 1,1	0,1 $\pm$ 0,5	<b>34,3<math>\pm</math>31,1</b>	64,2 $\pm$ 9,4
Linalol	4,5 $\pm$ 2,4	4,8 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 1,3	4,8 $\pm$ 2,5	3,1 $\pm$ 1,4	8,2 $\pm$ 5,3	1,0 $\pm$ 0,6
Fenchol	-	-	-	-	-	-	0,6 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,9
Cânfora	5,1 $\pm$ 3,7	1,3 $\pm$ 1,1	1,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 1,8	1,3 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 2,1	18,5 $\pm$ 9,3
<i>trans</i> - $\alpha$ -Necrodol	10,1 $\pm$ 2,9	7,9 $\pm$ 1,3	7,9 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 4,8	11,4 $\pm$ 2,7	9,3 $\pm$ 3,4	2,6 $\pm$ 2,0	-
Borneol	-	-	-	-	-	-	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,4
NI C de Lsl	0,6 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,3	-
<i>cis</i> - $\alpha$ -Necrodol	2,4 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,7	-
<i>p</i> -Cimeno-8-ol	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
2,3,4,4-Tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona	0,9 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,6	-
$\alpha$ -Terpineol	0,1 $\pm$ 0,3	-	-	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1
Acetato de fenchilo	0,3 $\pm$ 0,7	-	-	-	-	-	0,8 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,2
Acetato de linalilo	0,1 $\pm$ 0,2	-	-	-	-	-	1,0 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,1
Acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo	<b>27,9<math>\pm</math>11,8</b>	<b>34,7<math>\pm</math>1,4</b>	<b>32,8<math>\pm</math>5,0</b>	<b>25,5<math>\pm</math>10,1</b>	<b>32,4<math>\pm</math>5,2</b>	<b>31,4<math>\pm</math>7,1</b>	16,5 $\pm$ 16,8	-
Acetato de lavandulilo	9,6 $\pm$ 3,6	14,2 $\pm$ 1,2	13,7 $\pm$ 1,5	9,9 $\pm$ 4,0	13,8 $\pm$ 1,8	12,6 $\pm$ 1,9	4,5 $\pm$ 3,9	0,1 $\pm$ 0,3

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

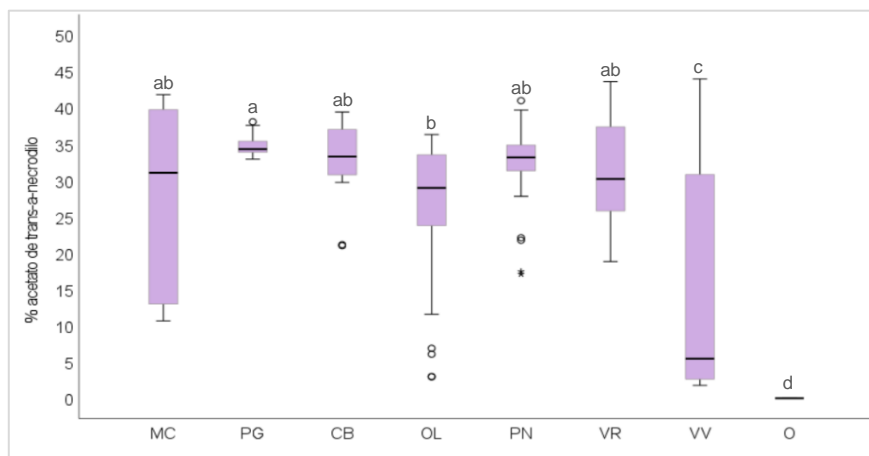
Acetato de <i>cis</i> - $\alpha$ -necrodilo	1,0 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 1,1	-
Acetato de terpenilo	-	1,4 $\pm$ 1,4	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,6	-	-
Acetato de bornilo	-	-	-	-	-	-	-	0,7 $\pm$ 1,1
$\delta$ -Cadineno	-	0,2 $\pm$ 0,4	-	-	-	0,4 $\pm$ 0,5	-	-
Selina-3,7(11)-dieno	-	0,6 $\pm$ 0,6	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,5	-	-
Cubebol	-	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2	-	-
Cariofileno	-	-	-	0,5 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	-	-
Óxido de cariofileno	1,2 $\pm$ 2,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,9	0,1 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	-	-
Ledol	-	-	-	-	-	-	3,2 $\pm$ 6,4	-
Viridiflorol	-	2,0 $\pm$ 1,0	3,8 $\pm$ 1,1	7,7 $\pm$ 5,3	4,4 $\pm$ 2,2	2,8 $\pm$ 1,5	2,6 $\pm$ 3,8	-
Copaborneol	-	1,5 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 1,0	5,3 $\pm$ 3,8	2,8 $\pm$ 1,7	1,0 $\pm$ 1,2	-	-
NI E de Lsl	2,1 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,8	8,1 $\pm$ 5,9	2,8 $\pm$ 1,1	4,8 $\pm$ 1,9	3,1 $\pm$ 5,6	-
NI F de Lsl	1,6 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 4,3	2,1 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 1,4	2,4 $\pm$ 4,5	-
Rendimento (% v/m)	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2
Identificação (%)	82,0	79,3	77,2	73,5	87,0	74,9	87,8	96,3
Monoterpenos	2,0	1,7	0,8	1,1	2,8	3,7	2,6	8,7
Monoterpenos oxigenados	77,2	69,4	66,9	55,7	73,0	64,2	78,3	87,5
Sesquiterpenos	-	0,9	-	0,5	0,2	0,9	-	0,1
Sesquiterpenos oxigenados	1,2	4,2	7,4	14,0	7,5	4,2	5,8	-
Outros	1,6	3,1	2,1	2,2	3,5	1,9	1,1	-

Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão de duplicados de injeção de cada planta. Os compostos estão listados por ordem de eluição em coluna de sílica fundida HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25  $\mu$ m). MC: Serra da Malcata; PG: Penha Garcia; CB: Castelo Branco; OL: Oleiros; PN: Proença-a-Nova; VR: Vila de Rei; VV: Vila Velha de Ródão; O: Ocreza. -: não detetado.

(5%), linalool (5%) e 1,8-cineol (3%). As populações de Penha Garcia (PG) e Castelo Branco (CB) revelaram um perfil volátil muito semelhante, com consideráveis concentrações de linalol. A população de OL revelou o maior teor de sesquiterpenos oxigenados (14%), com elevadas concentrações de viridiflorol (8%) e de copaborneol (5%). A população recolhida em Proença-a-Nova (PN) destacou-se por apresentar o maior teor de 1,8-cineol, juntamente com a população de Vila de Rei (VR). A população de VR também se destacou pela maior concentração de

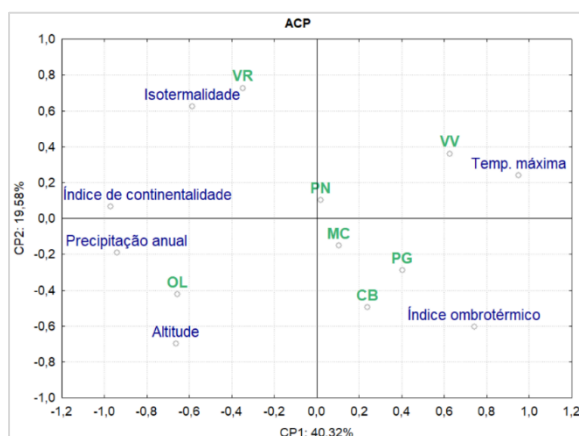
monoterpenos, como o *p*-cimeno e careno. A população de VV revelou as maiores diferenças entre as populações de Lsl, nos OEs de Lsl deste local o composto maioritário foi a fenchona (34%), seguido do acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (17%) e o maior teor de  $\alpha$ -pineno (2%). A população *outgroup* de *L. pedunculata* revelou a ausência de compostos derivados de necrodano, compostos exclusivos em Lsl, sendo os seus compostos maioritários a fenchona (64%), cânfora (19%) e o  $\alpha$ -pineno (5%), como corroborado por outros estudos na espécie [11, 72, 237]. González-Coloma *et al.* (2011) estudaram o perfil volátil dos OEs de plantas de VV e de MC, os autores também encontraram diferenças nos componentes dos OEs entre os dois locais, sendo que o OE de VV apresentou elevados teores de fenchona (>37%) e baixos teores de compostos derivados de necrodano, contrastando com os OEs de plantas da Serra da Malcata (Penamacor) [75]. A semelhança morfológica entre as subespécies de *L. stoechas* (subsp. *luisieri* e subsp. *stoechas*), que, sem alguma análise detalhada são facilmente confundidas na natureza, justifica a investigação de diferenciação entre as duas através de distinção dos constituintes voláteis. A composição volátil do OE de *L. stoechas* subsp. *stoechas* referido na bibliografia é distinto de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Estudos em *L. stoechas* subsp. *stoechas* com origem em Espanha, Turquia, Grécia e Itália, o seu OE apresenta como compostos maioritários a fenchona (40-71%), cânfora (12-47%) e o 1,8-cineol (15-18%), não revelando os compostos derivados de necrodano [254-257]. Em Portugal, não foi encontrado nenhum estudo com *L. stoechas* subsp. *stoechas*. A existência de *L. stoechas* subsp. *stoechas* na região da Beira Interior referida na *Flora Iberica* [55] ao invés da *L. stoechas* subsp. *luisieri*, tese não sustentada por Franco [54], não é corroborada pela prospeção e resultados obtidos neste trabalho e para os locais de estudo. Com a presença dos compostos derivados de necrodano nos OEs das plantas recolhidas, confirma-se a presença de *L. stoechas* subsp. *luisieri* nesta região. De forma a detalhar o teor do derivado de necrodano maioritário (acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo), na Figura 33 pode-se verificar que a população de PG foi a que registou um valor mediano de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo superior às restantes populações, não se observando diferenças significativas entre as populações MC, CB, PN e VR. A população de OL e VV foram as que revelaram teores deste composto inferiores, destacando-se a população de VV com valores medianos abaixo de 10%.

Para verificar a influência das condições bioclimáticas no perfil volátil dos OEs de cada local, realizou-se uma Análise de Componentes Principais (ACP) com as seis variáveis bioclimáticas, previamente selecionadas através de uma matriz de correlação, inicialmente com 24 variáveis ambientais.



**Figura 33.** Percentagem de acetato de *trans-α-necrodilo* nos óleos essenciais de *L. stoechas* subsp. *luisieri* dos diferentes locais estudados. MC: Serra da Malcata; PG: Penha Garcia; CB: Castelo Branco; OL: Oleiros; PN: Proença-a-Nova; VR: Vila de Rei; VV: Vila Velha de Ródão. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

Na Figura 34, a ACP explica 60% da variação com os dois componentes principais. Pode-se observar um grupo no quadrante inferior direito com os locais PN, MC, CB e PG, revelando semelhanças relativamente às variáveis bioclimáticas em estudo, influenciados pelo índice ombrotérmico. O local VV encontra-se isolado no quadrante superior direito, influenciado pela temperatura máxima registada, revelando por isso maior termicidade e conseqüentemente stresse hídrico. O local VR está situado no quadrante superior esquerdo sendo caracterizado pela isothermalidade e o local OL encontra-se isolado no quadrante inferior esquerdo com influência da altitude e precipitação.



**Figura 34.** Análise de componentes principais, *biplot* com as variáveis bioclimáticas dos locais estudados.

Tendo em consideração o teor mediano de acetato de *trans-α-necrodilo*, a população de VV foi a que apresentou o menor teor, com a ACP pode-se inferir que a produção

deste composto parece ser influenciada negativamente por temperaturas elevadas, o que conseqüentemente leva a um stresse hídrico por parte das plantas. A influência dos fatores edafo-climáticos na produção e composição de OE é referenciada em diversos estudos [258, 259]. Farré-Armengol *et al.* (2020) reportaram uma prevalência na produção de monoterpenos de plantas que crescem em condições de secura, sugerindo que pode estar relacionado com o facto de as emissões de monoterpenos protegerem as plantas contra o stresse oxidativo durante os períodos de seca [259]. De facto, os locais que apresentaram mais influência por temperaturas elevadas foram VV e PN, embora este último esteja mais distante, ainda assim no mesmo quadrante, foram os locais onde a percentagem de monoterpenos foi maior (>87%). Segundo a ACP, o local OL é o mais influenciado pela precipitação anual, apresentando um menor rendimento de OE (0,2%). Este resultado é corroborado pelo estudo de Mehalaine e Chenchouni (2021), que sugerem um efeito negativo da precipitação na acumulação de OEs na planta, diminuindo o seu armazenamento com o aumento da precipitação [260].

### 2.3. Caracterização das atividades biológicas

#### 2.3.1. Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante depende de vários fatores, como o tipo de amostra, a extração, os solventes, assim como o método antioxidante usado. A metodologia usada influencia o mecanismo de ação antioxidante, que pode ser complexo consoante a matriz e outras substâncias podem intervir nesse modo de ação. Dada a complexidade de ação, a determinação da atividade antioxidante parece ter um significado insuficiente quando realizado por um único método, por isso é aplicado mais do que um método para esta avaliação.

A atividade antioxidante dos extratos e OEs foi avaliada pelos métodos do radical DPPH, FRAP e através do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Na Tabela 24 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante avaliada nos extratos e OEs através dos dois primeiros métodos mencionados.

Os extratos aquosos de Lsl apresentaram atividade antioxidante no método DPPH com valores entre 14,5 e 21  $\mu\text{g/mL}$ , para a fase de pré-floração e repouso/floração, respetivamente. Este resultado vai de encontro ao maior teor de fenóis e flavonóides obtidos, sendo considerados os principais responsáveis pela atividade antioxidante. O tratamento em biorreator selecionado para avaliação da atividade antioxidante (T12) obteve um  $\text{IC}_{50}$  ligeiramente superior ao das plantas silvestres de 42,2  $\mu\text{g/mL}$ . Em

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

plantas silvestres de Lsl na fase de início de floração foi reportado uma IC<sub>50</sub> ligeiramente superior (26 µg/mL) aos resultados obtidos na mesma fase fenológica (Nunes *et al.*, 2017). Pelo mesmo método de análise, Baptista *et al.* (2015), analisaram extratos aquosos de Lsl e reportaram que concentrações acima de 400 µg/mL apresentaram cerca de 60% de inibição do radical, sendo que os autores referem usar uma concentração superior do radical DPPH [90]. Um dos principais fatores que influencia fortemente a ação de antioxidantes é a concentração do radical, quanto maior for a concentração usada mais quantidade de antioxidante é necessária para neutralizar os radicais presentes na solução [39]. Neste método os OEs de Lsl revelaram uma capacidade de neutralização do radical DPPH bastante inferior aos extratos com a menor IC<sub>50</sub> no OE da fase de floração (2 mg/mL) e a maior IC<sub>50</sub> na fase de repouso (6 mg/mL). De entre as três fases fenológicas estudadas, foi na floração que ocorreu a maior produção/acúmulo de compostos derivados de necrodano, sugerindo ser um fator importante para a atividade antioxidante encontrada no OE de floração. Pombal *et al.* (2016) também reportaram a atividade antioxidante do OE de Lsl (floração) com valores próximos aos obtidos neste trabalho, com IC<sub>50</sub> de 1,3 mg/mL [79]. Também Arantes *et al.* (2016) confirmaram a atividade antioxidante do OE de Lsl na floração com concentrações inibitórias de 50% do radical de 9 mg/mL [78].

**Tabela 24.** Atividade antioxidante de extratos aquosos e óleos essenciais de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *P. tridentatum*.

Extratos/OE	DPPH (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /100 g <sub>ms</sub> )
LR	21,0±1,8	900,1±48,6
LPF	14,5±0,4	1666,9±49,0
LF	21,1±0,6	794,4±55,0
LT12	42,2±3,1	260,9±40,8
OER	6,2±0,1*	-
OEPF	3,5±0,1*	-
OEF	2,0±0,0*	-
CR	32,1±0,1	663,0±6,5
CPF	27,8±0,9	720,1±62,6
CF	27,1±1,5	964,1±54,4
CT6	235,3±0,9	87,8±2,8
Trolox	7,3±0,0	-

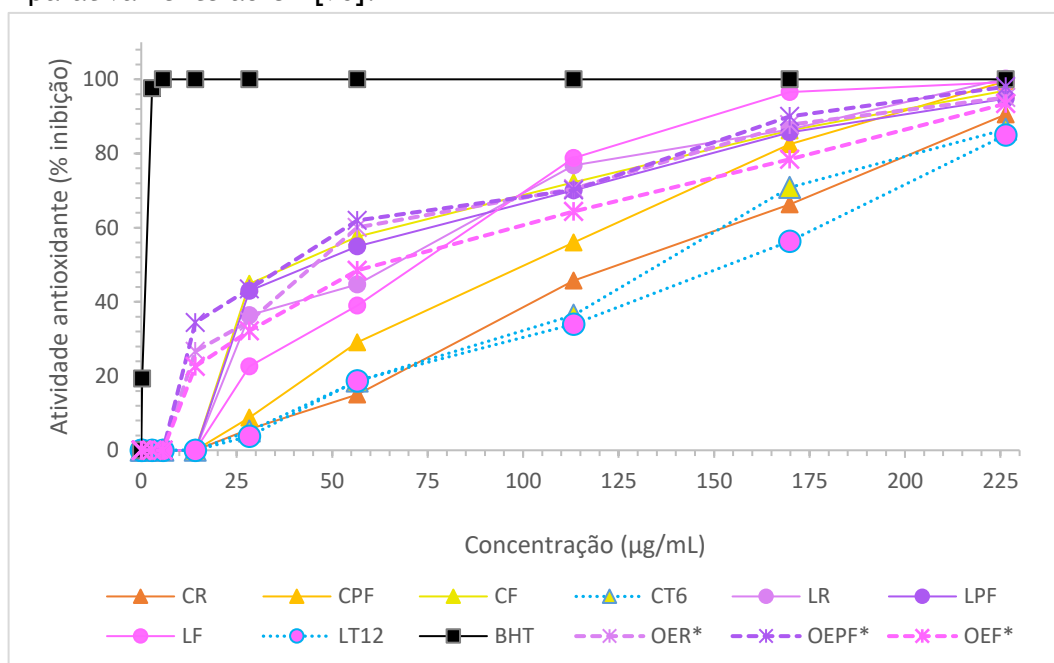
CR: extrato aquoso de Pt em repouso; CPF: extrato aquoso de Pt em pré-floração; CF: extrato aquoso de Pt em floração; CT6: extrato aquoso de Pt do biorreator T6; LR: extrato aquoso de Lsl em repouso; LPF: extrato aquoso de Lsl em pré-floração; LF: extrato aquoso de Lsl em floração; LT12: extrato aquoso de Lsl do biorreator T12; OER: óleo essencial de Lsl em repouso; OEPF: óleo essencial de Lsl em pré-floração; OEF: óleo essencial de Lsl em floração. Resultados estão expressos em média±desvio padrão. \*resultados expressos em mg/mL.

Em Lsl, relativamente ao método FRAP, a fase da floração obteve um teor máximo de 1666,9 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub>, 900 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub> na fase de repouso, 794,4 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub> na pré-floração e o menor valor obtido no T12 (260,9 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub>). Em extratos aquosos de Lsl, Nunes *et al.* (2017) revelaram um valor de FRAP inferior ao obtido de 80 mg Etrolox/g<sub>ms</sub>. A atividade antioxidante de três espécies de *Lavandula* foi avaliada pelo mesmo método, sendo que extratos metanólicos de *L. stoechas* revelaram valores inferiores aos obtidos (224 µmol Fe<sup>2+</sup>/g) [261]. Em extratos aquosos de *L. angustifolia* o teor máximo obtido no método FRAP foi de 131 µM Etrolox/g<sub>ms</sub> [262].

Em relação aos extratos aquosos de Pt, as plantas silvestres apresentaram valores de IC<sub>50</sub> no método de DPPH entre os 27 e 32 µg/mL, sendo a fase da floração a que apresentou menor valor de IC<sub>50</sub> (27,1 µg/mL) e por isso maior atividade antioxidante. O tratamento de biorreator de Pt selecionado para as análises antioxidantes foi o T6, sendo que obteve um teor de IC<sub>50</sub> neste método bastante superior aos extratos de plantas silvestres (235,3 µg/mL) e por isso com menor atividade antioxidante. Em extratos metanólicos de Pt em floração, Luís *et al.* (2011) revelaram valores de IC<sub>50</sub> próximos aos encontrados, de 26 µg/mL (flores) e de 70 µg/mL (folhas e caules), tendo os autores considerado como atividade antioxidante forte e moderada, respetivamente [112]. Coelho *et al.* (2011) em extratos aquosos de Pt em floração, reportaram um potencial de captura do radical DPPH de 3,6 mM Etrolox/Kg [122]. Relativamente ao método FRAP, as plantas silvestres apresentaram um teor entre 663 e 964,1 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub>, na fase de repouso e floração, respetivamente. Coelho (2015) revelou os valores mais elevados de FRAP em extratos aquosos de Pt em floração de 832 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub>, sendo que os menores valores foram na fase de repouso, em plantas micropropagadas os valores de FRAP de 250 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g<sub>ms</sub> [131]. Em extratos hidroetanólicos de folhas/caules e flores de Pt revelaram um valor de FRAP muito semelhante entre si, de 0,8 mmol EAA/g<sub>ms</sub> [124]. Em Pt a fase de floração revelou ter maior teor de fenóis totais e flavonóides, e através das análises antioxidantes confirmou a influência desses compostos nesta atividade biológica.

A percentagem de inibição dos extratos e OEs obtida no método da peroxidação lipídica pelo método do β-caroteno/ácido linoleico está representada na Figura 35. No caso dos OEs de Lsl, as concentrações apresentadas no gráfico correspondem a mg/mL. A percentagem de inibição exercida pelos OEs no sistema β-caroteno/ácido linoleico revelou o potencial de proteção dos OEs, sendo que nas primeiras concentrações (0,14 mg/mL) os OEs revelaram inibições de 22,6% no OEF (floração), 26,7% no OER (repouso) e 34,5% no OEPF (pré-floração). De forma geral, os OEs apresentaram 50% de inibição

com concentrações de 0,6 mg/mL. Arantes *et al.* (2016) estudaram a peroxidação lipídica do OE de Lsl (floração) pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, sendo reportado que na concentração 1,7 mg/mL obtiveram 55,3% de inibição [78]. Através de outro método de peroxidação lipídica, Baptista *et al.* (2015) reportaram que concentrações de 0,2 mg/mL de OE de Lsl (floração) corresponderam a 15% de inibição [90]. Nos extratos aquosos de Lsl a concentração de 56,6  $\mu$ g/mL correspondeu a 55% para a fase de pré-floração, de 44,7% para a fase de repouso e 39% para a fase de floração. No extrato aquoso de Lsl em BIT (T12), a concentração de 170  $\mu$ g/mL correspondeu a uma percentagem de inibição de 56,4%. Em extratos aquosos de Lsl (0,2 mg/mL) foi reportada uma inibição da peroxidação lipídica de 49%, neste estudo os autores revelaram uma maior percentagem de inibição do extrato aquoso comparativamente ao OE [90].



**Figura 35.** Atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, *P. tridentatum* e do padrão BHT através do método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. CR: extrato aquoso de Pt em repouso; CPF: extrato aquoso de Pt em pré-floração; CF: extrato aquoso de Pt em floração; CT6: extrato aquoso de Pt do biorreator T6; LR: extrato aquoso de Lsl em repouso; LPF: extrato aquoso de Lsl em pré-floração; LF: extrato aquoso de Lsl em floração; LT12: extrato aquoso de Lsl do biorreator T12; BHT: hidroxitolueno butilado; OER: óleo essencial de Lsl em repouso; OEPF: óleo essencial de Lsl em pré-floração; OEF: óleo essencial de Lsl em floração. \*valores correspondem a mg/mL.

Relativamente aos extratos aquosos de Pt, foi na fase de floração onde se obtiveram melhores resultados de inibição, na concentração de 56,6  $\mu$ g/mL obteve-se uma inibição de 57,6%, enquanto as fases de repouso e pré-floração obtiveram para a

mesma concentração 15% e 29%, respetivamente. Quanto ao extrato aquoso obtido no tratamento BIT (T6), este revelou um maior potencial de inibição comparativamente ao extrato de Lsl (T12), pois na concentração de 170 µg/mL correspondeu uma percentagem de inibição de 71%. Luís *et al.* (2011) reportaram que extratos metanólicos de Pt tiveram uma fraca atividade de peroxidação lipídica [112]. Ferreira *et al.* (2012) revelaram que em concentração de 2,5 mg/mL de extratos de Pt 170% de inibição após 60 min de reação [114].

Entre os diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante usados nem sempre se observou a consistência da atividade antioxidante no mesmo extrato/OE. De facto, em relação aos extratos aquosos de plantas silvestres de Lsl a fase fenológica que apresentou melhores resultados de atividade antioxidante, nos três métodos testados, foi a fase de pré-floração. O OE de Lsl apresentou melhor atividade pelo DPPH na fase de floração e pelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi a fase de pré-floração que revelou maiores valores de inibição para a mesma concentração. Nos extratos de Pt a fase de floração manteve o maior potencial antioxidante em relação às outras fases fenológicas. O modo de ação antioxidante é afetado por vários fatores, como o tipo de amostra e a metodologia aplicada, e o uso de um método não invalida os resultados de outro método. Alguns estudos reportam a ausência de correlação entre os métodos de atividade antioxidante, Martínez *et al.* (2012) obtiveram valores elevados pelo método FRAP e valores baixos pelo método DPPH [124]. Luís *et al.* (2011) também verificou que extratos de plantas que apresentaram valores de IC<sub>50</sub> elevados no método DPPH, pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico os mesmos extratos apresentaram uma elevada capacidade de inibição da oxidação das moléculas de ácido linoleico [112]. Coelho (2015) em extratos aquosos de *P. tridentatum* também revelou resultados de atividade antioxidante pelo método DPPH elevados, o que não se confirmaram pelo método de capacidade redutora (FRAP) [131]. Estes resultados demonstram a relevância do uso de diferentes métodos de atividade antioxidante na avaliação desta propriedade em extratos vegetais.

### 2.3.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de extratos e OE de Lsl e Pt foi avaliada primeiramente através de um *screening* inicial, cujo objetivo foi de verificar, de forma simples e rápida, o potencial de inibição das amostras sobre as culturas testadas. Os resultados dos ensaios prévios estão apresentados na Tabela 33 do Apêndice 4. Destes resultados prévios pode salientar-se a inibição total provocada pelo OE de Lsl (floração) sobre as culturas de fungos e bactérias, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 que não apresentou inibição e *Serratia marcescens* cuja inibição foi parcial. Os extratos

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

aquosos de ambas as espécies revelaram fraca inibição sobre as culturas testadas. Dada a elevada atividade inibitória apresentada pelo OE, avançou-se apenas com este para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e bactericidas/fungicidas (CMB/CMF).

Na Tabela 25 encontram-se identificadas as CMI do OE de Lsl sobre as culturas de bactérias. As CMI variam entre 4,7  $\mu\text{L/mL}$  a 149,3  $\mu\text{L/mL}$  para as bactérias Gram negativas e entre 4,7  $\mu\text{L/mL}$  e 37,3  $\mu\text{L/mL}$  para as bactérias Gram positivas. As culturas de bactérias mais suscetíveis à inibição pelo OE foram a *Salmonella* sp. (4,7  $\mu\text{L/mL}$ ), *B. cereus* (4,7  $\mu\text{L/mL}$ ), *A. hydrophila* (9,3  $\mu\text{L/mL}$ ) e o *C. violaceum* (9,3  $\mu\text{L/mL}$ ), sendo esta última considerada de maior sensibilidade, pois a sua CMB corresponde à CMI. À exceção do *B. cereus*, as restantes três bactérias são Gram negativas. As bactérias Gram negativas são conhecidas pela sua forte resistência a agentes antibacterianos devido à presença da membrana externa na sua parede celular, tornando-a impermeável a substâncias lipofílicas, e às porinas que restringem a difusão de compostos hidrofílicos [46, 262]. No entanto, a CMB foi bastante superior no caso da *Salmonella* sp. (74,7  $\mu\text{L/mL}$ ) e *A. hydrophila* (18,7  $\mu\text{L/mL}$ ). Em relação à CMB referente ao *B. cereus*, não foi possível confirmar a sua CMB, pois na concentração máxima testada (149,3  $\mu\text{L/mL}$ ) observou-se crescimento da bactéria. Esta maior resistência revelada por *B. cereus* pode dever-se ao facto da sua capacidade de produzir esporos altamente resistentes a condições adversas [264].

Tabela 25. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas bactericidas (CMB) do óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

Microrganismos	Gram	CMI ( $\mu\text{L/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{L/mL}$ )
<i>A. hydrophila</i>	-	9,3	18,7
<i>B. cereus</i>	+	4,7	>149,3
<i>Burkholderia</i> sp.	-	37,3	37,3
<i>C. violaceum</i>	-	9,3	9,3
<i>L. monocytogenes</i>	+	18,7	18,7
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	149,3	149,3
<i>P. aeruginosa</i>	-	37,3	149,3
<i>Salmonella</i> sp.	-	4,7	74,7
<i>S. marcescens</i>	-	74,7	149,3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	+	37,3	37,3

Por outro lado, a bactéria mais resistente à ação do OE foi a *P. aeruginosa* ATCC 27853 cuja CMI foi a concentração máxima testada e igual à CMB (149,3  $\mu\text{L/mL}$ ). A atividade antimicrobiana do OE de Lsl tem vindo a ser reportada em alguns estudos. Pombal *et*

al. (2016) testaram o OE de Lsl (flores e folhas) em *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase positiva*, revelando CMI e CMB de 22 µg/mL para ambas as bactérias para o OE de flores, enquanto que o OE de folhas apresentou uma CMI e CMB inferior (11 µg/mL) para o *Staphylococcus coagulase positiva* [79]. Arantes *et al.* (2016) reportaram uma CMI de 250 µg/mL no OE de Lsl para as duas culturas de referência de *S. aureus* (ATCC 6538 e LFG 1007), e para *E. coli* ATCC 25922 foi revelada uma CMI muito superior de 1000 µg/mL. Em *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* foram reveladas CMI de 750 µg/mL e de 500 µg/mL, respetivamente [78].

Relativamente à atividade antifúngica do OE de Lsl, as CMI e CMF estão apresentadas na Tabela 26, estando também identificadas as respetivas referências ESA-IPCB. A quantificação do inóculo de cada suspensão de esporos dos fungos filamentosos variou entre  $6,4 \times 10^2$  e  $6,6 \times 10^4$  UFC, obtendo especificamente as seguintes concentrações em cada poço da microplaca: *Alternaria* secção *Alternata* ( $7,0 \times 10^3$  UFC), *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 ( $6,6 \times 10^4$  UFC), *Aspergillus carbonarius* ( $6,4 \times 10^2$  UFC), *Aspergillus niger* ( $2,0 \times 10^3$  UFC), *Aspergillus* sp. ( $5,0 \times 10^5$  UFC), *Penicillium brevicompactum* ( $3,6 \times 10^4$  UFC), *Penicillium crustosum* ( $5,0 \times 10^3$  UFC), *Penicillium glabrum* ( $1,2 \times 10^3$  UFC), *Penicillium simile* ( $3,8 \times 10^4$  UFC), *Penicillium roqueforti* PRB6 HYP5D ( $1,6 \times 10^4$  UFC) e *Rhizopus stolonifer* ( $8,2 \times 10^3$  UFC).

As concentrações utilizadas de OE variaram entre 0,1 e 74,7 µL/mL, as quais permitiram encontrar a CMI e a CMF para a maioria das culturas de fungos. A identificação dos fungos isolados de medronho está referida no subcapítulo 3.2., no entanto para ser mais exato e compreensível, foram atribuídos os respetivos nomes das espécies/géneros nesta parte do trabalho.

O isolado de fungo filamentoso mais suscetível ao efeito inibitório do OE foi o *Penicillium roqueforti* PRB6 HYP5D pois as CMI e CMF foram as mais baixas testadas, sendo respetivamente 0,1 e 0,6 µL/mL. A suscetibilidade de *P. roqueforti* PRB6 HYP5D foi corroborada num estudo com mais três culturas, sendo o que apresentou maior suscetibilidade à ação de agentes antimicrobianos [265]. Em relação aos fungos filamentosos o que apresentou uma maior suscetibilidade de inibição foi o *Rhizopus stolonifer* ESA.M.44 com 0,1 µL/mL. No caso das leveduras, as mais suscetíveis foram *Aureobasidium* sp. ESA.M.64 e *Sacchettoecium rubi* ESA.M.89 com 0,3 µL/mL. Por outro lado, as culturas mais resistentes (CMF > 74,7 µL/mL) à ação do OE foram *Alternaria* secção *Alternata* ESA.M.11, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 e o *Penicillium glabrum* ESA.M.54, sendo que a concentração máxima testada (74,7 µL/mL) não foi suficiente para a sua respetiva inibição. As leveduras revelaram ser menos resistentes

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

à ação do OE, sendo que a levedura onde se observou a CMF mais elevada foi a *Meyerozyma guilliermondii* ESA.M.47 com uma CMF de 9,3 µL/mL.

**Tabela 26.** Concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações mínimas fungicidas (CMF) do óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

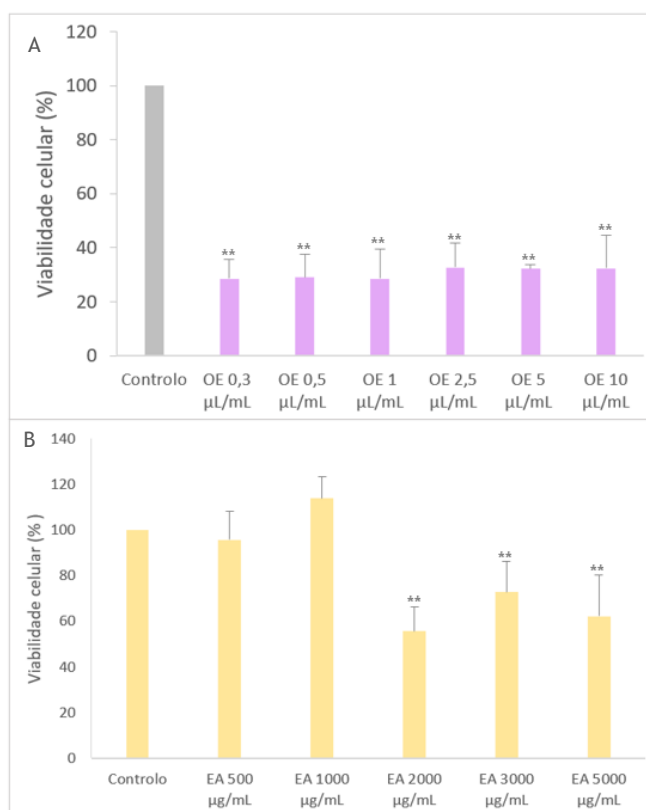
Microrganismos	CMI (µL/mL)	CMF (µL/mL)
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i> ESA.M.11	2,3	>74,7
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	4,7	>74,7
<i>Aspergillus carbonarius</i> ESA.M.51	0,3	9,3
<i>Aspergillus niger</i> ESA.M.45	4,7	4,7
<i>Aspergillus</i> sp. ESA.M.38	2,3	2,3
<i>Aureobasidium</i> sp. ESA.M.64	0,3	2,3
<i>Aureobasidium</i> sp. ESA.M.57	1,2	2,3
<i>Candida albicans</i> ESALD/2016	4,7	9,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. ESA.M.99	1,2	2,3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ESA.M.47	4,7	9,3
<i>Penicillium brevicompactum</i> ESA.M.60	0,3	2,3
<i>Penicillium crustosum</i> ESA.M.48	2,3	4,7
<i>Penicillium glabrum</i> ESA.M.54	1,2	>74,7
<i>Penicillium simile</i> ESA.M.13	9,3	9,3
<i>Penicillium roqueforti</i> PRB6 HYP5D	0,1	0,6
<i>Rhizopus stolonifer</i> ESA.M.44	0,1	9,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	1,2	2,3
<i>Sacothecium rubi</i> ESA.M.89	0,3	1,2

O isolado clínico da levedura *Candida albicans* revelou uma atividade antimicrobiana com CMI e CMF de 4,7 e 9,3 µL/mL, respetivamente. Zuzarte *et al.* (2012) também verificaram a atividade antimicrobiana do OE de Lsl (floração) contra três estirpes desta espécie, e a CMI nas três estirpes variou de 0,64 a 2,5 µL/mL, valores ainda assim bastante inferiores aos obtidos neste trabalho. Os autores também verificaram o comportamento de *A. niger* ATCC 16404 sob efeito do OE, onde a CMF (20 µL/mL) foi muito superior à CMI (0,3 µL/mL) [64]. Baptista *et al.* (2015) comparou a atividade antimicrobiana dos OEs de Lsl e de *L. pedunculata* em diferentes culturas de fungos, sendo que o OE de Lsl demonstrou globalmente maior eficácia, isto é, obteve menores concentrações inibitórias. Os autores revelaram uma CMI do OE de Lsl sob *A. niger* de 15,5 µg/mL e para a levedura *C. albicans* a concentração máxima testada (100 µg/mL) foi não suficiente para a inibir [90].

De acordo com os resultados, a atividade antimicrobiana do OE de Lsl apresentou inibição contra todas as culturas bacterianas e fúngicas testadas, assim como o efeito bactericida e fungicida foi revelado para a maioria das culturas estudadas. As culturas de fungos demonstraram maior suscetibilidade ao OE comparativamente com as culturas de bactérias. Um dos fatores que se deve considerar nos resultados de atividade antimicrobiana é precisamente a densidade de inóculo do microrganismo usada, pois maiores densidades poderão sugerir CMI e/ou CMB/CMF mais elevadas, por isso é importante a quantificação do inóculo.

### 2.3.3. Atividade citotóxica

A citotoxicidade do extrato aquoso de Pt (floração) e do OE de Lsl (floração) foi avaliada através do método MTT em células de fibroblastos (NHDF). A Figura 36 representa graficamente a percentagem de viabilidade das células sob ação do extrato e OE. De acordo com a ISO 10993-5:2009 [266] consideram-se efeitos citotóxicos quando o agente a ser testado reduz a viabilidade celular para valores inferiores a 70%. A ação do OE sob as células após 24 h de incubação revelou um efeito citotóxico nas células, reduzindo a viabilidade celular para valores entre 30% e 40% mesmo na concentração mais baixa testada (0,3 µL/mL), valores significativamente diferentes do controlo. Zuzarte *et al.* (2012) estudaram a citotoxicidade de OEs de Lsl de duas origens diferentes, sendo que um OE foi caracterizado por apresentar elevado teor de compostos de necrodano (17%) e outro baixos teores (3%). Assim, avaliaram a atividade citotóxica do dois OEs sob células de macrófagos (Raw264.7), e verificaram que o OE com maior teor de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo apresentou uma maior citotoxicidade (<50% de viabilidade celular) na concentração mais elevada (0,6 µL/mL), comparativamente com o OE com menor teor deste composto, revelando o possível efeito citotóxico dos compostos derivados de necrodano sobre as células [64]. Em células normais, fibroblastos, Nunes *et al.* (2017) confirmaram o efeito citotóxico de extratos de Lsl em concentrações superiores a 3,2 mg/mL. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que, nas mesmas concentrações de extrato, as células tumorais (HepG2) apresentaram maior suscetibilidade ao extrato de Lsl do que as células normais (fibroblastos) [81]. Por outro lado, as linhas celulares apresentam diferentes respostas de acordo com a sua origem e o seu estado metabólico, tal como foi verificado num estudo usando duas linhas celulares fibroblastos e macrófagos (Raw 264.7), em que os fibroblastos apresentaram maior resistência à ação do mesmo agente citotóxico, comparado com a maior suscetibilidade dos macrófagos [267].



**Figura 36.** Viabilidade celular de células de fibroblastos sob efeito do óleo essencial de *L. stoechas* subsp. *luisieri* (A) e de extrato aquoso de *P. tridentatum* (B). OE: óleo essencial; EA: extrato aquoso. Resultados expressos em média±desvio padrão, diferenças significativas pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney (\*\* $p < 0,01$  comparado com o respetivo controlo).

No extrato aquoso de Pt, as concentrações mais baixas testadas (500-1000 µg/mL) não revelaram diferenças significativas em relação ao controlo, sendo que nas concentrações 2000 a 5000 µg/mL os resultados diferiram significativamente do controlo, podendo apresentar possível efeito citotóxico nas células. A viabilidade celular de extratos etanólicos de Pt de diferentes partes da planta (raízes, folhas e caules) foi também estudada por Simões *et al.* (2020), em células de macrófagos (Raw 264.7), as quais não revelaram suscetibilidade à ação dos extratos até concentrações de 100 µg/mL durante 24 h [117]. Ferreira *et al.* (2012), confirmaram a ausência de efeitos citotóxicos de extratos aquosos de Pt (flores) nas concentrações 125 e 375 mg/L em células cancerígenas do fígado (HepG2) [114]. Gonçalves *et al.* (2020), avaliaram a viabilidade celular de células cancerígenas do colorretal (Caco-2) e de fibroblastos (NHDF) e verificaram que extratos aquosos e hidroetanólicos de flores de Pt apresentaram uma toxicidade seletiva nas células Caco-2 comparando com a ausência de toxicidade revelada na linha celular de fibroblastos [120]. A maior suscetibilidade apresentada por células cancerígenas tem sido demonstrada em alguns estudos, o que

representa uma possível aplicação de extratos de plantas no tratamento de doenças cancerígenas e doenças associadas ao stresse oxidativo [50, 103, 104].

### 3. Ensaio de conservação de frutos endógenos da Beira Interior

#### 3.1. Ensaio de conservação em cereja

No ensaio de conservação de cerejas foram elaboradas quatro formulações à base de quitosano (1,5%), glicerol (0,2%) e tween 20 (0,5%) com e sem adição de OE de Lsl (floração), designadas respetivamente, FA e FB; e a FC e FD que contém a base da FA com a adição de cera de abelha (4%) e no caso da FD mais a adição do OE de Lsl (0,5%). As quatro formulações de filmes foram avaliadas quanto às suas propriedades mecânicas e higroscópicas (Tabela 27). Relativamente à espessura dos filmes pode observar-se que os filmes sem a cera de abelha (FA e FB) apresentaram menor espessura média do que os que contém este ingrediente (FC e FD). A tensão máxima de rutura (TS), definida como a tensão máxima que um material suporta ao ser alongado antes de ocorrer a sua rutura, para os filmes FA e FB, sem cera de abelha, foram obtidos os resultados mais elevados de tensão máxima de rutura, destacando-se o FB pelo maior valor de TS (46,20 MPa). No caso dos filmes FC e FD, a presença da cera de abelha parece ter influenciado a tensão de rutura, apresentando valores bastante inferiores, de 3,61 e 3,12 MPa, respetivamente. Na percentagem de alongamento na rutura (E%), e sendo este um indicador da flexibilidade e elasticidade de um filme, quanto maior esse valor maior a sua elasticidade. Os valores mais elevados foram obtidos nos FA e FB, diferindo estatisticamente dos filmes FC e FD. Resultados semelhantes foram descritos por Godinho (2014), onde apresenta resultados em filmes com e sem incorporação de cera de abelha. A autora demonstra que os filmes sem incorporação de cera de abelha apresentaram resultados mais elevados de tensão de rutura e alongamento na rutura, comparativamente aos filmes com cera de abelha [218]. Shen e Kamdem (2015) revelaram que em filmes de quitosano utilizando diferentes concentrações de OE (10-30%, m/m) a presença de concentrações mais elevadas de OE no filme contribuiu para a redução dos valores de TS e E% [217]. Considerando a percentagem de OE a incorporar, este facto pode estar relacionado com a substituição parcial na rede do filme das interações polímero-polímero (mais fortes) por interações polímero-OE (mais fracas), reduzindo a coesão das forças da rede polimérica.

Em relação ao módulo de Young (MY) que se traduz na resistência do filme à deformação os resultados apresentaram diferenças significativas entre os FA e FB,

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

sendo o maior valor obtido no FB (75,64 MPa), tornando este filme mais resistente à deformação. A diferença no filme FA e FB, é que este último tem a incorporação do OE de Lsl (0,5%), o que parece ter tido influência na resposta mecânica dos respectivos filmes. Os filmes FA, FC e FD mantiveram semelhanças estatísticas nos resultados, o que com a presença da cera de abelha, o OE não teve influência nas propriedades mecânicas. Estes resultados relativamente elevados dos FC e FD, tendo em conta a sua fraca resistência à rutura, podem dever-se à sua maior espessura, sendo esta propriedade considerada no cálculo do MY, conferindo por isso uma relativa resistência à deformação. Filmes sem incorporação de cera de abelha também revelaram maiores valores de MY do que os filmes incorporados com cera de abelha [218].

**Tabela 27.** Propriedades mecânicas e higroscópicas dos filmes elaborados.

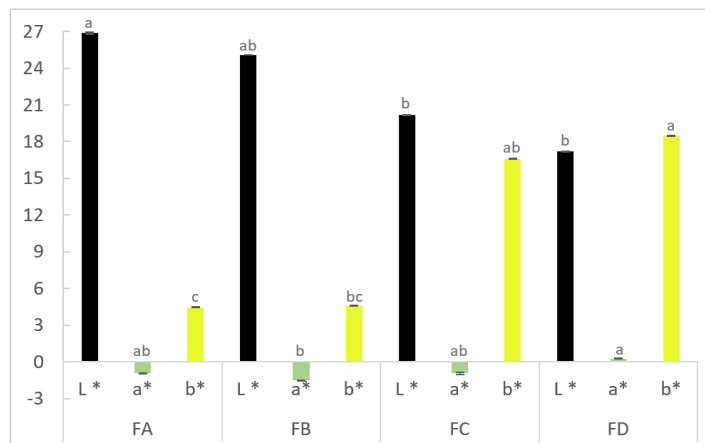
Formulações	Espessura (mm)	TS (MPa)	E%	MY (MPa)	PVA ( $\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ) (n=3)
FA	0,17±0,07 <sup>c</sup>	18,53±3,65 <sup>b</sup>	53,53±1,49 <sup>a</sup>	48,87±10,09 <sup>b</sup>	9,46±0,01x10 <sup>-07b</sup>
FB	0,10±0,01 <sup>b</sup>	46,20±6,01 <sup>a</sup>	58,12±5,47 <sup>a</sup>	75,64±9,17 <sup>a</sup>	5,64±0,03x10 <sup>-07c</sup>
FC	0,28±0,07 <sup>a</sup>	3,61±0,67 <sup>c</sup>	4,78±2,43 <sup>b</sup>	46,14±12,51 <sup>b</sup>	1,58±0,01x10 <sup>-06a</sup>
FD	0,32±0,06 <sup>a</sup>	3,12±1,18 <sup>c</sup>	4,88±2,06 <sup>b</sup>	46,52±11,69 <sup>b</sup>	1,12±0,02x10 <sup>-06a</sup>

Os resultados estão expressos em média±desvio padrão. TS: tensão máxima de rutura; E%: percentagem do alongamento na rutura; MY: módulo de Young; PVA: permeabilidade ao vapor de água. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ( $p<0,05$ ).

Para além das propriedades mecânicas, os filmes devem conferir alguma barreira ao vapor de água, minimizando assim as trocas gasosas entre o alimento e o espaço exterior. A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi avaliada nas quatro formulações, obtendo o valor mais baixo de PVA no FB ( $5,64 \times 10^{-07}$ ), e o valor mais elevado no FC ( $1,58 \times 10^{-06}$ ), não diferindo significativamente do FD. O intuito da adição de substâncias hidrofóbicas nas formulações de revestimentos, como o caso da cera de abelha e o OE, consiste na contribuição para a diminuição da permeabilidade ao vapor de água. Os resultados obtidos indicam que a presença de cera de abelha aumentou a permeabilidade, os filmes que têm cera de abelha, FC e FD, revelaram resultados de PVA superiores ( $1,58 \times 10^{-06}$  e  $1,12 \times 10^{-06}$ , respetivamente) aos dos filmes FA e FB (sem cera de abelha). Resultados semelhantes foram obtidos por Godinho (2014), quando comparados filmes com e sem cera de abelha, obteve resultados mais elevados de PVA nos filmes que continham este ingrediente hidrofóbico [218]. Estes resultados podem dever-se à elevada concentração de substâncias hidrofóbicas presentes na formulação, onde as moléculas de oxigénio podem penetrar através das interfaces cera-polímero, proporcionando canais de penetração de oxigénio quando o filme contém alto teor de cera, facilitando a permeabilidade à água [268].

Diversos estudos reportam o aumento da permeabilidade ao vapor em formulações com adição de substâncias lipofílicas [268-270]. Chiumarelli e Hubinger (2014) estudaram as propriedades higroscópicas de formulações de revestimentos de amido, sendo que na formulação com maior teor de substâncias hidrofóbicas o resultado de resistência ao vapor de água foi o mais baixo, ou seja, maior permeabilidade ao vapor de água [271]. Por outro lado, a incorporação de OEs nas formulações de matrizes poliméricas dos revestimentos pode resultar na redução da permeabilidade ao vapor de água [272]. A incorporação de OE de Lsl nas formulações FB e FD parece ter influenciado a redução da permeabilidade, comparativamente com a respectiva formulação base, a FA e a FC, tendo os resultados de PVA diminuído com a adição de OE. Shen e Kamdem (2015) também estudaram o efeito da adição de OE em filmes à base de quitosano, e reportaram que maiores quantidades de OE adicionado no filme contribuiu para a redução da permeabilidade ao vapor de água, nomeadamente concentrações superiores a 20% [217]. A conjugação das propriedades mecânicas e higroscópicas para a obtenção de um filme ideal, é difícil de ser obtida, pois deve de ser atingido um compromisso na adição de substâncias hidrofóbicas, com influência na redução da permeabilidade ao vapor de água e as características que essas substâncias conferem nas propriedades mecânicas do filme, nomeadamente na diminuição da elasticidade e tensão superficial [215].

A avaliação da cor dos filmes está representada graficamente na Figura 37.



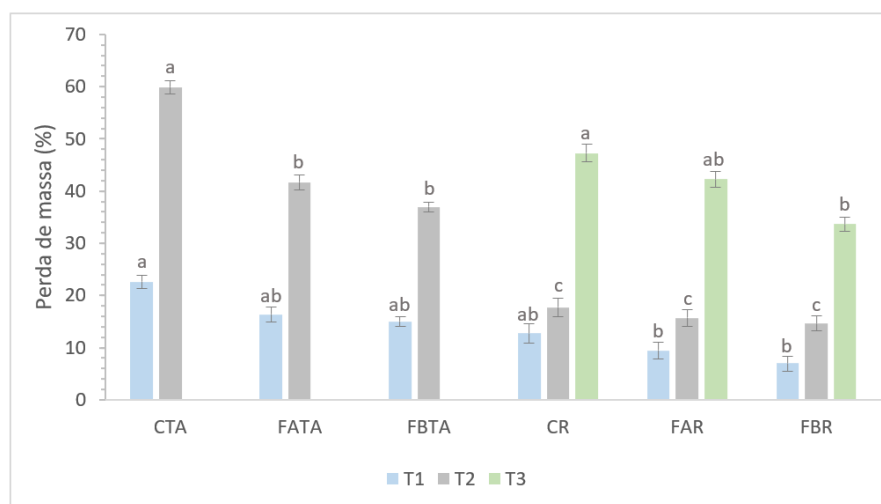
**Figura 37.** Avaliação dos parâmetros de cor (L\*, a\*, b\*) nos filmes. Resultados médios±desvio padrão, diferentes letras para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas pelo teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ).

Através dos resultados é possível verificar a influência da adição da cera de abelha nos filmes FC e FD, com o aumento do valor de b\*, sendo o FD estatisticamente dos FA e FB. A luminosidade, representada pelo L\*, teve maiores valores nos filmes FA e FB (26,9 e 25,1, respetivamente), o que corrobora com a opacidade revelada pelas

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

formulações com incorporação de cera de abelha. Na concentração usada, a adição de OE na FB, não pareceu aumentar a tonalidade amarela, não se observando diferenças significativas entre FA/FB e FC/FD.

Após os resultados obtidos na caracterização das propriedades mecânicas e higroscópicas, foram selecionadas as formulações FA e FB para o ensaio de aplicação em cerejas. Em relação à perda de massa (%) durante o ensaio de conservação de cerejas, os resultados estão apresentados na Figura 38. É possível observar o efeito da temperatura, sendo a maior perda de massa obtida à temperatura ambiente em frutos sem revestimento (60%), comparativamente com os resultados em temperaturas de refrigeração. Também é possível observar o efeito que os revestimentos apresentaram na diminuição de perda de massa dos frutos, em ambas as temperaturas e ao longo do tempo. De forma geral e constante em cada tempo de análise, observam-se diferenças significativas na perda de massa que é maior nos frutos sem revestimento (CTA e CR) comparativamente aos frutos revestidos (FA e FB). No tempo T3, após 12 dias, apenas foi possível obter resultados para os frutos que estavam refrigerados, pois os frutos que permaneceram à temperatura ambiente desenvolveram contaminação, não sendo, por isso, possível a sua pesagem. No último tempo de análise pode-se verificar o efeito que o revestimento FB apresentou na menor percentagem de perda de massa, não diferindo significativamente do FA.



**Figura 38.** Perda de massa em cerejas ao longo do ensaio de conservação e em diferentes temperaturas. CTA: controlo à temperatura ambiente; FATA: FA à temperatura ambiente; FBTA: FB à temperatura ambiente; CR: controlo em refrigeração; FAR: FA em refrigeração; FBR: FB em refrigeração; T1: após 4 dias; T2: após 8 dias; T3: após 12 dias. Diferentes letras para o mesmo tempo de análise indicam diferenças significativas pelo teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,01$ ).

Avaliação da firmeza dos frutos submetidos aos tratamentos sem e com aplicação dos revestimentos foi realizada após quatro dias de conservação (T1). Após análise

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

estatística (teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ) não se obtiveram diferenças significativas nos diferentes tratamentos, sendo que o valor mais elevado de firmeza dos frutos foi obtido nas formulações FA e FB (0,96 N) em frutos refrigerados e o mais baixo foi obtido nos frutos sem revestimento à temperatura ambiente (CTA 0,86 N). Estes resultados sugerem que nenhum dos revestimentos aplicados influenciou a firmeza das cerejas ao longo do ensaio de conservação. Resultados semelhantes foram obtidos por Godinho (2014), em que a autora desenvolveu revestimentos à base de quitosano em cerejas e verificou que os revestimentos não influenciaram a firmeza dos frutos [218].

Neste ensaio, para os diferentes tratamentos e ao longo do tempo de conservação, foi avaliada a carga microbiana, nomeadamente a contagem de mesófilos, psicrotróficos, leveduras e fungos filamentosos. A carga microbiana total permite ter uma noção da qualidade do alimento, apresentando também um papel crucial para a determinação do prazo de consumo, uma vez que quanto maior a carga microbiana, maior e mais rápida será a deterioração do alimento. Sendo o objetivo dos revestimentos conservar e prolongar a vida útil dos frutos, tornou-se importante verificar a sua ação na carga microbiana dos frutos ao longo do tempo deste ensaio.

A Tabela 28 apresenta os resultados das análises microbiológicas aos frutos nos diferentes tratamentos.

**Tabela 28.** Contagem microbiológica (log UFC/g) de grupos de microrganismos em cereja ao longo do ensaio de conservação.

Temperatura/Tempo	Tratamento	Mesófilos	Psicrotróficos	Leveduras	Fungos filamentosos	
22 °C	T0	2,11±0,41 <sup>abc</sup>	2,72±0,55 <sup>ab</sup>	2,48±0,48 <sup>ab</sup>	2,22±0,52 <sup>ab</sup>	
	T1	CTA	4,08±0,18 <sup>a</sup>	4,33±0,14 <sup>a</sup>	3,87±0,12 <sup>a</sup>	4,37±0,83 <sup>a</sup>
		FATA	2,20±0,18 <sup>ab</sup>	2,93±0,33 <sup>ab</sup>	2,15±0,15 <sup>ab</sup>	1,00±0,50 <sup>b</sup>
		FBTA	1,44±0,44 <sup>bc</sup>	2,65±0,05 <sup>ab</sup>	N/D	1,00±0,60 <sup>b</sup>
	T2	CTA	4,41±0,05 <sup>a</sup>	4,32±0,11 <sup>a</sup>	3,82±0,04 <sup>a</sup>	4,27±0,58 <sup>a</sup>
		FATA	2,64±0,10 <sup>ab</sup>	4,08±0,84 <sup>a</sup>	1,09±0,5 <sup>b</sup>	3,26±0,65 <sup>ab</sup>
FBTA		2,55±0,03 <sup>ab</sup>	2,80±0,06 <sup>ab</sup>	N/D	3,07±0,67 <sup>ab</sup>	
4 °C	T1	CR	2,08±0,20 <sup>abc</sup>	3,06±0,13 <sup>ab</sup>	2,33±0,15 <sup>ab</sup>	1,50±0,20 <sup>b</sup>
		FAR	1,59±0,29 <sup>bc</sup>	2,24±0,24 <sup>ab</sup>	N/D	1,15±0,29 <sup>b</sup>
		FBR	1,09±0,09 <sup>bc</sup>	1,24±0,24 <sup>b</sup>	N/D	1,00±0,09 <sup>b</sup>
	T2	CR	3,83±0,54 <sup>a</sup>	3,70±0,13 <sup>a</sup>	3,02±0,02 <sup>ab</sup>	2,57±0,54 <sup>ab</sup>
		FAR	2,44±0,09 <sup>ab</sup>	2,99±0,50 <sup>ab</sup>	N/D	N/D
		FBR	1,04±0,02 <sup>bc</sup>	1,30±0,50 <sup>b</sup>	N/D	N/D
	T3	CR	2,73±0,37 <sup>ab</sup>	3,15±0,34 <sup>ab</sup>	2,91±0,31 <sup>ab</sup>	2,39±0,37 <sup>ab</sup>
		FAR	1,98±0,05 <sup>abc</sup>	2,97±0,97 <sup>ab</sup>	N/D	N/D
		FBR	N/D	1,70±0,20 <sup>c</sup>	N/D	N/D

CTA: controlo à temperatura ambiente; FATA: FA à temperatura ambiente; FBTA: FB à temperatura ambiente; CR: controlo em refrigeração; FAR: FA em refrigeração; FBR: FB em refrigeração; T1: após 4 dias; T2: após 8 dias; T3: após 12 dias. N/D: ausência de contagem. Resultados expressos em

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

---

média±desvio-padrão. Diferentes letras na mesma coluna correspondem a diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Duncan ( $p<0,05$ ).

No dia de receção dos frutos (T0) a contagem de mesófilos foi de 2,11 log UFC/g, para os psicrotróficos foi de 2,72 log UFC/g, para as leveduras foi de 2,48 log UFC/g e para os fungos filamentosos obteve-se uma contagem de 2,22 log UFC/g. Relativamente ao grupo dos mesófilos, à temperatura ambiente verificou-se que as formulações apresentaram algum efeito inibidor deste grupo de microrganismos comparativamente com os frutos sem revestimento, onde a contagem aumentou significativamente após 4 e 8 dias. Apesar de se ter verificado um ligeiro aumento após 8 dias nas FA e FB (2,64 e 2,55 log UFC/g, respetivamente), após 4 dias a FB revelou possuir um efeito inibitório nestes microrganismos, apresentando contagens inferiores (1,44 log UFC/g) relativamente ao momento inicial de análise (T0). Em relação aos tratamentos na temperatura de refrigeração, após 4 dias verificou-se, mesmo nos frutos sem revestimento, a manutenção na contagem dos mesófilos, e redução dos valores nas FA e FB. No último momento de análise, após 12 dias (T3), a formulação FB não apresentou contagem de microrganismos, este resultado sugere o efeito inibitório do OE de *Lsl* conjugado a temperaturas baixas, que poderá ser uma boa estratégia de redução/inibição da carga microbiana. O comportamento dos psicrotróficos foi semelhante aos mesófilos, no entanto verificou-se um ligeiro aumento ao longo do tempo, na temperatura de refrigeração, na FB, o que corrobora com a resistência ao longo do tempo desta classe de microrganismos a temperaturas baixas.

Em relação à contagem de leveduras, nos frutos sem revestimento na temperatura ambiente verificou-se um aumento ao longo do tempo, sendo as contagens estatisticamente diferentes da formulação FA (no T2), sendo que para a FB não se obtiveram contagens. Na temperatura de refrigeração, apenas se obteve contagens nos frutos sem revestimento, observando-se uma manutenção dos valores iniciais (T0). Por fim, relativamente à contagem de fungos filamentosos, observou-se uma redução na contagem à temperatura ambiente para as FA e FB, no entanto, após 8 dias verificou-se um aumento da contagem de bolores para ambas as formulações, não diferindo estatisticamente entre si, com ligeiro aumento no tempo T2. Nos frutos refrigerados verificou-se uma diminuição, em relação ao T0, nos frutos sem revestimento e nas FA e FB, no entanto, ao longo do tempo apenas se registaram contagens nos frutos não revestidos. Perdana *et al.* (2021) estudaram o efeito de revestimentos à base de quitosano com incorporação de OE de erva-príncipe na conservação de pimentos, os autores verificaram uma redução na contagem de mesófilos e fungos comparativamente com pimentos não revestidos após 4 dias de

conservação à temperatura ambiente [273]. Também Peralta-Ruiz *et al.* (2020) estudaram o efeito de revestimentos à base de quitosano com incorporação de OE de *Ruta graveolens* na conservação pós-colheita de tomate, tendo os autores verificado uma diminuição da contagem de mesófilos e fungos nos frutos revestidos com e sem OE, observando menores contagens nos frutos revestidos com OE [201]. A aplicação de OE de limão em revestimentos à base de quitosano também revelou efeitos antifúngicos durante o armazenamento de morangos a baixas temperaturas [202]. Em suma, com a análise destes resultados é possível verificar que mesmo à temperatura ambiente e num curto período (4 dias) é possível retardar o desenvolvimento de microrganismos com a aplicação dos revestimentos. Se conjugarmos temperaturas baixas com a aplicação de revestimentos poderemos prolongar o tempo de vida útil dos frutos, inibindo o desenvolvimento de microrganismos.

A realização do trabalho de revestimentos em cerejas efetuou-se na mesma linha temporal dos ensaios de atividade citotóxica. Relativamente ao potencial uso do OE de Lsl como componente de revestimentos edíveis, tendo em consideração os resultados da atividade citotóxica em fibroblastos testada neste trabalho, e até se obterem resultados mais robustos em outras linhas celulares, deverá ser ponderado o seu uso como ingrediente alimentar. Apesar dos OEs serem considerados produtos naturais os mesmos apresentam uma complexa constituição química, que dependendo de vários fatores, principalmente da sua concentração, podem causar efeitos citotóxicos no organismo. Por outro lado, em termos de formulação dos revestimentos, os OEs sendo constituídos por compostos voláteis que se podem volatilizar ao longo do período de conservação, exigirá a monitorização dos mesmos com a realização de análises de controlo ao longo do tempo. Também se justificaria a realização de ensaios de citotoxicidade em fibroblastos e em células do trato digestivo, utilizando as formulações de revestimentos, sendo estes resultados determinantes para a confirmação da citotoxicidade dos revestimentos. Assim, uma possível estratégia alternativa da utilização do OE de Lsl, como agente conservante de fruta pós-colheita, seria adaptar os revestimentos como componentes de embalagem e não como revestimento edível.

#### **3.2. Ensaios de conservação em medronho**

O ensaio de conservação do medronho foi realizado temporalmente antes do ensaio realizado com as cerejas. Neste ensaio foi estudado o efeito da temperatura, sob

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

refrigeração ( $6,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), em temperatura ambiente ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e em congelamento ( $-22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) [274]. A Tabela 29 apresenta os resultados das contagens de grupos de microrganismos testados neste ensaio, o grupo das *Enterobacteriaceae*, mesófilos, psicrotróficos, leveduras e fungos filamentosos em medronho nos diferentes momentos de análise. As *Enterobacteriaceae*, incluindo os coliformes, são um grupo de microrganismos que deve receber especial atenção, pois está bastante associado a amostras de solo e plantas e conseqüentemente podem surgir em frutos [275].

**Tabela 29.** Contagem microbiológica (log UFC/g) de grupos de microrganismos em medronho ao longo do ensaio de conservação.

Tratamento	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mesófilos	Psicrotróficos	Leveduras	Fungos filamentosos
T0	N/D	$3,26\pm 1,20^b$	$4,07\pm 0,25^a$	$3,39\pm 0,18^{ab}$	$2,70\pm 0,55^b$
T1TA	N/D	$4,80\pm 0,89^b$	$5,93\pm 1,71^a$	$5,99\pm 0,26^a$	$3,87\pm 0,74^{ab}$
T2TA	N/D	$6,50\pm 0,56^a$	$6,74\pm 0,26^a$	$6,53\pm 0,32^a$	$5,84\pm 1,48^a$
T1R	N/D	$4,82\pm 2,25^a$	$5,20\pm 1,16^a$	$4,00\pm 1,36^{ab}$	$2,39\pm 0,74^b$
T2R	N/D	$3,37\pm 1,66^b$	$5,73\pm 0,78^a$	$5,17\pm 0,73^a$	$2,59\pm 0,79^b$
T3F	N/D	$2,69\pm 0,77^b$	$4,13\pm 0,55^a$	$3,49\pm 0,70^{ab}$	$2,63\pm 0,74^b$

T0: frutos no dia de colheita; T1TA: após 4 dias à temperatura ambiente; T2TA: após 11 dias à temperatura ambiente; T1R: após 4 dias à temperatura de refrigeração; T2R: após 11 dias à temperatura de refrigeração; T3F: após 21 dias de congelamento. N/D: ausência de contagem. Resultados expressos em média±desvio-padrão. Diferentes letras na mesma coluna correspondem a diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de ANOVA, Tukey HSD ( $p<0,05$ ).

Para o grupo das *Enterobacteriaceae* não se obtiveram contagens deste grupo de microrganismos. A contagem de microrganismos nos frutos frescos representa a referência para os tratamentos posteriores, apresentando valores de mesófilos de 3,26 log UFC/g, para os psicrotróficos 4,07 log UFC/g, para as leveduras 3,39 log UFC/g e para os fungos filamentosos 2,70 log UFC/g. A contagem de microrganismos em frutos ou vegetais pós-colheita, depende de alguns fatores essenciais como fatores ambientais, da época de colheita, da irrigação e do estado fitossanitário da planta [276]. No entanto, durante o armazenamento, os frutos frescos podem estar sujeitos a diversas fontes de contaminação, sendo os fungos os principais responsáveis pela deterioração. Devido ao pH baixo, normalmente característico de frutos frescos, o desenvolvimento de bactérias pode ficar condicionado [276, 277].

Nos tratamentos à temperatura ambiente verificou-se um aumento progressivo da contagem ao longo do tempo, sendo o maior valor para mesófilos no T2 de 6,50 log UFC/g, sendo que para o mesmo grupo de microrganismos, a temperatura de refrigeração manteve os valores próximos aos do T0, nomeadamente no T2 (após 11 dias). A congelamento teve um efeito inibitório neste grupo de microrganismos,

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

apresentando valores inferiores ao de T0. Verificou-se igual comportamento para os psicrotróficos e leveduras, destacando os maiores valores obtidos na contagem de psicrotróficos, mesmo para o tratamento de congelação, denotando que as baixas temperaturas não afetam de forma significativa este grupo de microrganismos. Em relação aos fungos filamentosos, a temperatura de refrigeração e congelação contribuíram para a manutenção de valores próximos aos de T0, não sendo observadas diferenças significativas entre T0, T1R, T2R e T3F.

Como mencionado no sub-subcapítulo 2.3.2. do presente capítulo, para os ensaios da atividade antimicrobiana com o OE de Lsl, foram selecionados 14 isolados de medronho, nove fungos filamentosos e cinco leveduras (Tabela 30).

**Tabela 30.** Identificação de microrganismos isolados de medronho.

Microrganismos	Referência ESA-IPCB	Microrganismos	Referência ESA-IPCB
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.11	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ESA.M.47
<i>Aspergillus carbonarius</i>	ESA.M.51	<i>Penicillium brevicompactum</i>	ESA.M.60
<i>Aspergillus niger</i>	ESA.M.45	<i>Penicillium crustosum</i>	ESA.M.48
<i>Aspergillus</i> sp.	ESA.M.38	<i>Penicillium glabrum</i>	ESA.M.54
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.64	<i>Penicillium simile</i>	ESA.M.13
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.57	<i>Rhizopus stolonifer</i>	ESA.M.44
<i>Hanseniaspora</i> sp.	ESA.M.99	<i>Saccharothecium rubi</i>	ESA.M.89

A identificação de cada isolado foi realizada através da construção de árvores filogenéticas, tendo em conta a sequência gerada na reação em cadeia PCR com o marcador genético adequado para a sua amplificação.

Neste estudo foram isolados leveduras e fungos filamentosos durante o ensaio de conservação do medronho, desde os frutos frescos e ao longo dos diferentes tratamentos e tempos de conservação, obtendo um total de 97 isolados (51,5% de fungos filamentosos e 48,5% de leveduras). Em colaboração com a Micoteca da Universidade do Minho propuseram-se para identificação 57 isolados, selecionados pela sua representatividade ao longo do ensaio (Tabela 34, Apêndice 5). Na Figura 39 estão representados os géneros dos fungos isolados de medronho. Através de análises filogenéticas foi possível a identificação a nível de género da maioria dos isolados, com a exceção de 2% em que não foi possível a correspondência a nenhum género conhecido. Em 35% dos isolados foi possível a identificação ao nível da espécie. Os géneros mais representativos de fungos filamentosos foram os géneros *Alternaria* (14%), *Cladosporium* (9%), *Penicillium* (9%) e *Aspergillus* (7%). Em relação aos géneros de leveduras os mais representativos foram *Aureobasidium* (24%) e *Saccharothecium* (10%). Estes géneros de fungos filamentosos e leveduras têm sido comumente encontrados em frutos e vegetais [278-280].

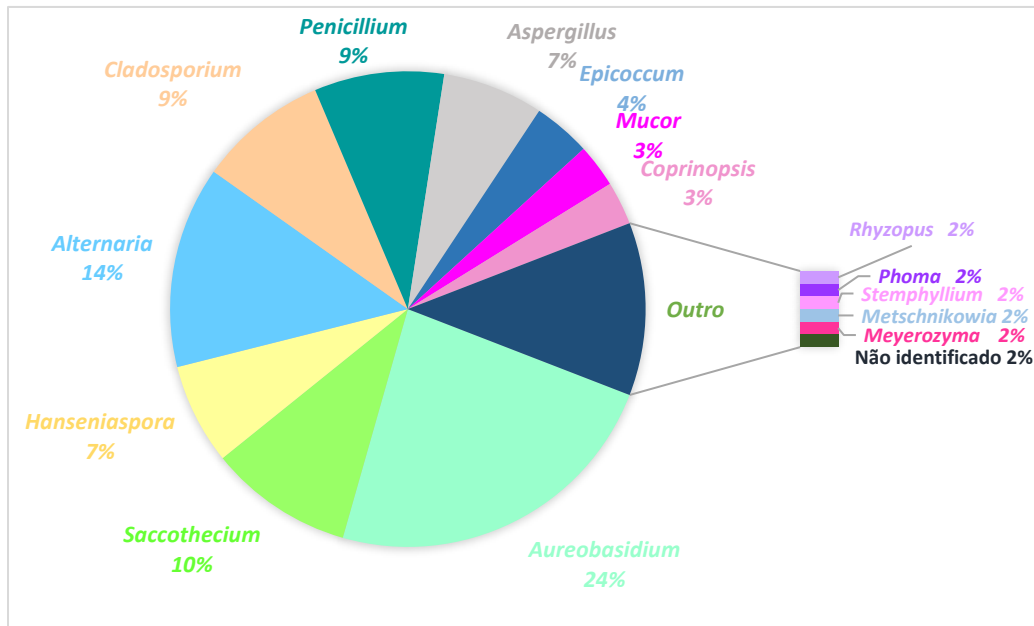


Figura 39. Percentagem dos diferentes gêneros de microrganismos isolados de medronho.

Para os gêneros mais representativos de fungos filamentosos foram elaboradas as respectivas árvores filogenéticas que estão apresentadas nas Figuras 40 a 43. Relativamente à árvore filogenética do gênero *Alternaria* (Figura 40) pode observar-se que o isolado ESA.M.11 e mais cinco isolados apresentaram correspondência a espécies pertencentes à secção *Alternata*.

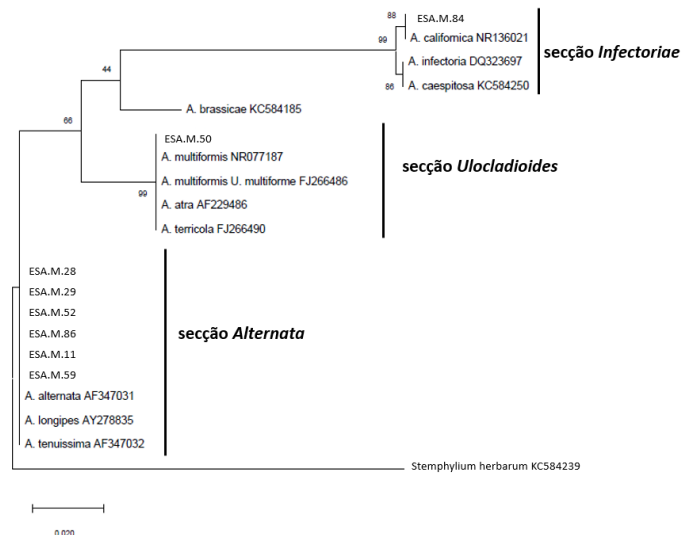
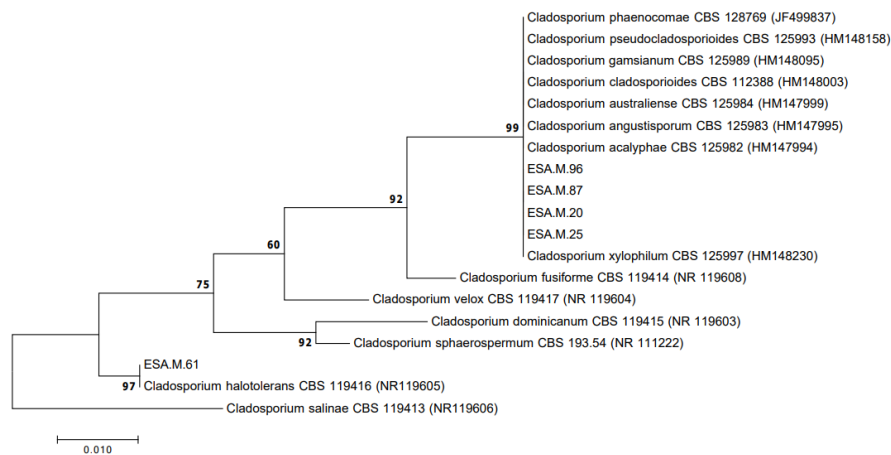


Figura 40. Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao gênero *Alternaria*. Construção da árvore a partir de seqüências obtidas pelo marcador da região ITS. *Stemphyllium herbarum* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Tamura-Nei. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

O isolado ESA.M.50 obteve correspondência na secção *Ulocladioides* com uma similaridade de 99%. Ainda neste género, o isolado ESA.M.84 apresentou uma similaridade de 99% juntamente com outras espécies da secção *Infectoriae*, que mais especificamente apresentou similaridade de 88% com a espécie *A. californica* (isolado NR136021).

A Figura 41 apresenta a árvore filogenética dos isolados do género *Cladosporium*, o segundo género mais representativo (9%) dos fungos filamentosos isolados de medronho.

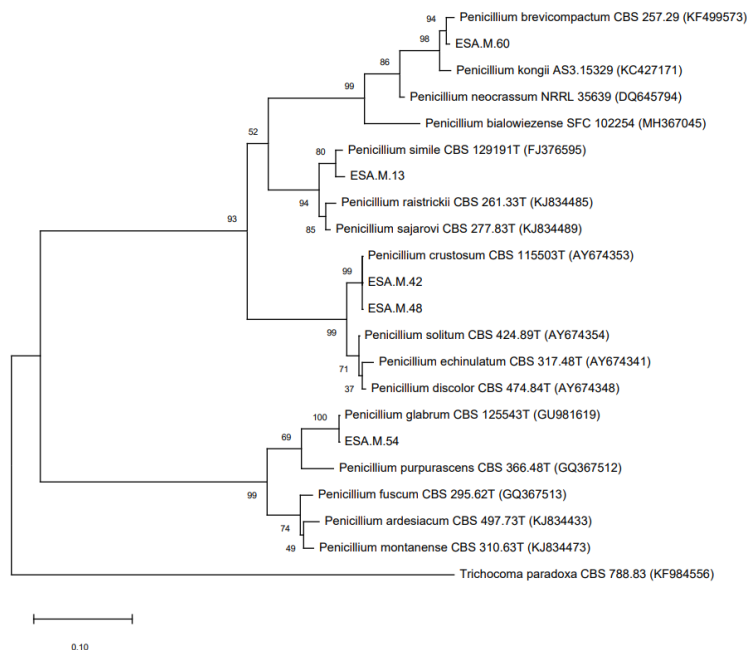


**Figura 41.** Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género *Cladosporium*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador da região ITS. *Cladosporium salinae* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Tamura-Nei. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

Neste caso apenas foi possível identificar ao nível da espécie um dos cinco isolados, o ESA.M.61 apresentou similaridade (97%) com o isolado CBS 119416, o que indica correspondência com a espécie *Cladosporium halotolerans*. Para os restantes isolados não foi possível alcançar a correspondência ao nível de espécie.

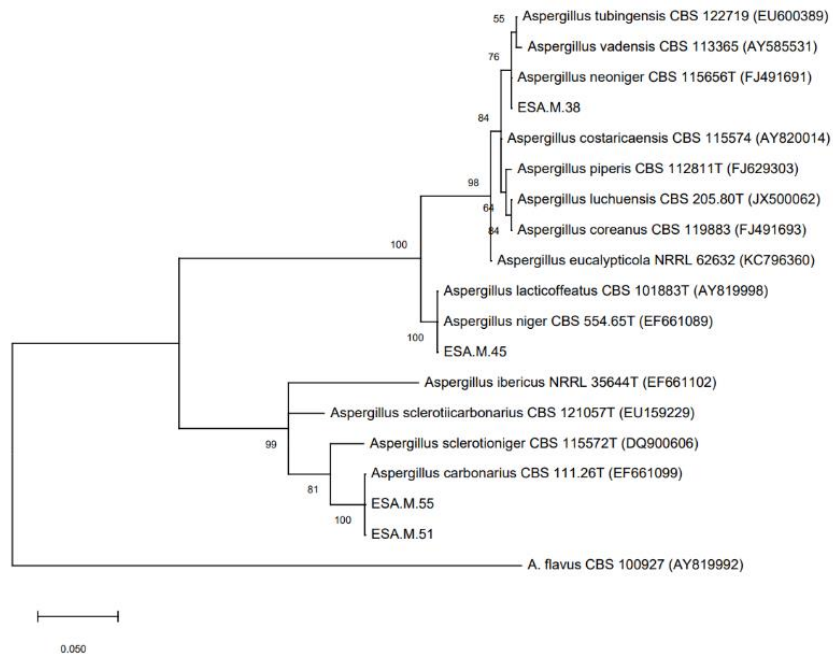
Os isolados que micro- e macro-morfológicamente foram identificados no género *Penicillium* foram analisados com o marcador do gene parcial beta-tubulina. Neste género foi possível a correspondência dos cinco isolados ao nível da espécie, como se pode observar na árvore filogenética apresentada na Figura 42. Para todos os isolados obteve-se similaridade considerável (>80%). No caso do isolado ESA.M.54 obteve-se uma similaridade de 100% com o isolado CBS 125543T, indicando correspondência com a espécie *P. glabrum*. Os isolados ESA.M.42 e ESA.M.48 também obtiveram similaridade elevada (99%) com a espécie *P. crustosum* (isolado CBS 115503T). O isolado ESA.M.60 apresentou similaridade de 94% com a espécie *P. brevicompactum* (isolado CBS 25729).

Com uma similaridade de 80%, o isolado ESA.M.13 apresentou correspondência com o *P. simile*, mais especificamente com o isolado CBS 129191T.



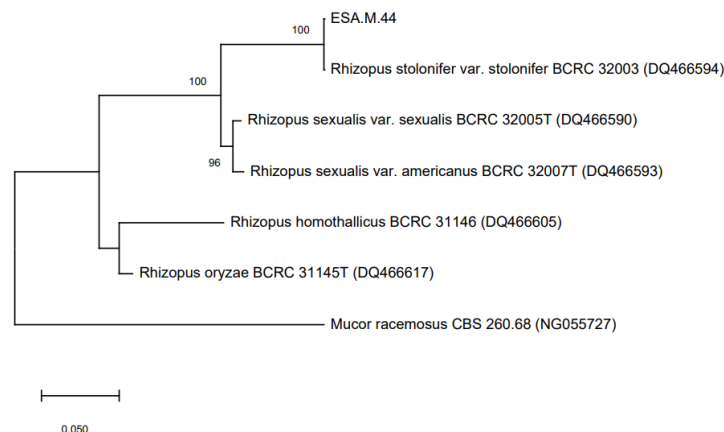
**Figura 42.** Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao gênero *Penicillium*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador do gene parcial beta-tubulina (Bt2a/Bt2b). *Trichocoma paradoxa* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Kimura 2-parameter. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

Os isolados atribuídos ao gênero *Aspergillus* também foram analisados com o marcador do gene parcial beta-tubulina. A Figura 43 apresenta a árvore filogenética correspondente ao gênero *Aspergillus*, sendo que para este gênero se obteve a identificação ao nível da espécie de 3 dos 4 isolados. Os isolados ESA.M.51 e ESA.M.55 apresentaram similaridade de 100% com a espécie *A. carbonarius* (isolado CBS 11126T), sendo que o isolado ESA.M.45 apresentou similaridade de 100% com duas espécies *A. niger* (isolado CBS 55465T) e *A. lacticoffeatus* (isolado CBS 101883T). A espécie *A. lacticoffeatus* foi isolada pela primeira vez em grãos de café [282] e é considerada como um sinônimo de *A. niger* [283]. Com este marcador e com as sequências utilizadas não foi possível a identificação ao nível da espécie do isolado ESA.M.38.



**Figura 43.** Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao género *Aspergillus*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador do gene parcial beta-tubulina (Bt2a/Bt2b). *Aspergillus flavus* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Kimura 2-parameter. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

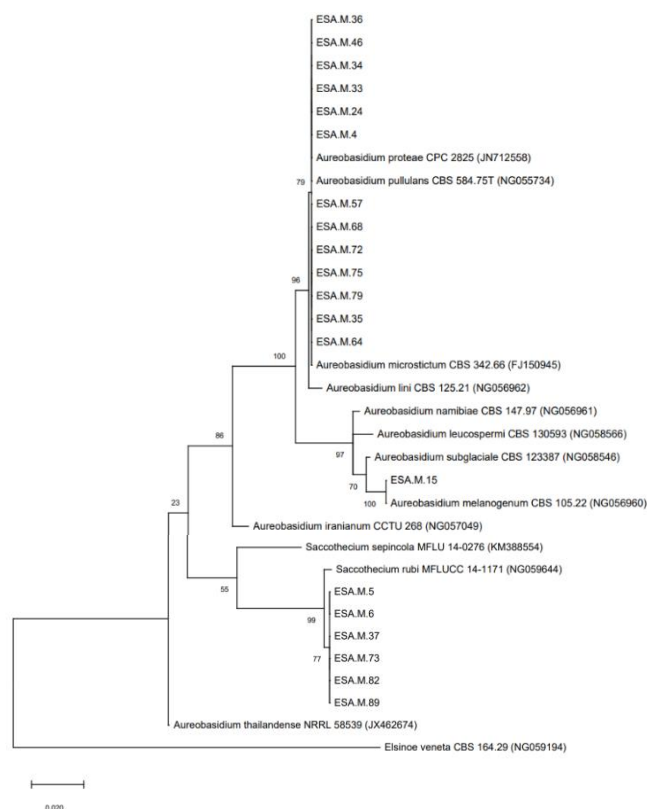
No estudo de atividade antimicrobiana também foi considerado o isolado pertencente ao género *Rhizopus*, pois apesar da sua representatividade ser de 2% é considerado um fungo de rápido desenvolvimento e deterioração de alimentos [284]. A árvore filogenética do isolado ESA.M.44 está apresentada na Figura 44, onde é possível observar a sua correspondência à espécie *R. stolonifer* var. *stolonifer* (isolado BCRC 32003).



**Figura 44.** Árvore filogenética do isolado de medronho correspondente ao género *Rhizopus*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador da região ITS. *Mucor racemosus* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Tamura-Nei. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

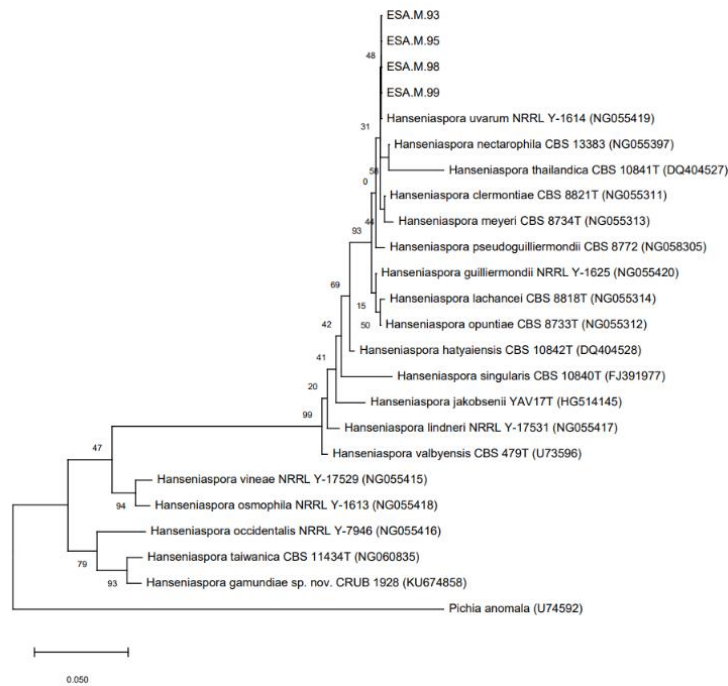
Em relação aos gêneros de leveduras, o gênero *Aureobasidium* foi o mais representativo com 24% de prevalência entre os isolados, seguindo-se o gênero *Saccharothecium* (10%). Devido à sua relação próxima e pertencendo à mesma família (Saccharotheciaceae), optou-se por fazer a árvore filogenética com os dois gêneros juntos (Figura 45).



**Figura 45.** Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes aos gêneros *Aureobasidium* e *Saccharothecium*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador da região D1/D2 do LSU. *Elsinoe veneta* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Kimura 2-parameter. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

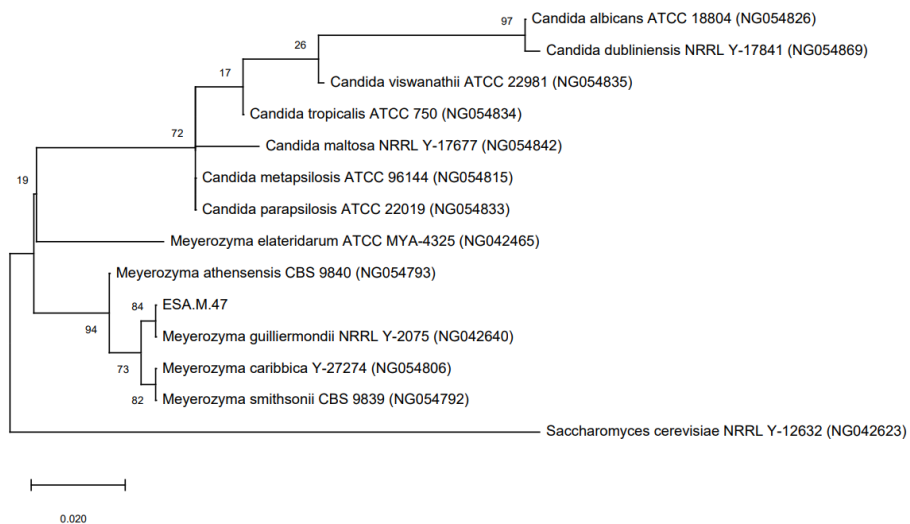
Relativamente ao gênero *Aureobasidium* observaram-se 14 isolados com correspondência a espécies deste gênero, sendo que apenas foi possível obter uma similaridade (100%) do isolado ESA.M.15 com a espécie *A. melanogenum* (isolado CBS 10522). Os seis isolados que agruparam no gênero *Saccharothecium* obtiveram uma similaridade (99%) com a espécie *S. rubi*, apresentando um coeficiente de similaridade (77%) mais baixo entre os isolados.

Para o gênero *Hanseniaspora* os quatro isolados apresentaram correspondência com a espécie *H. uvarum* (isolado NRRL Y-1614) apesar da similaridade ser baixa (48%) e por isso, com este marcador genético e sequências usadas/disponíveis não é possível a sua identificação ao nível da espécie (Figura 46).



**Figura 46.** Árvore filogenética dos isolados de medronho correspondentes ao gênero *Hanseniaspora*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador da região D1/D2 do LSU. *Pichia anomala* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o método Maximum Likelihood e o modelo Kimura 2-parameter. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

Na Figura 47 está apresentada a árvore filogenética elaborada para o isolado ESA.M.47, que correspondeu à espécie *Meyerozyma guilliermondii* (isolado NRRL Y-2075) com uma similaridade de 84%.



**Figura 47.** Árvore filogenética do isolado de medronho correspondente ao gênero *Meyerozyma*. Construção da árvore a partir de sequências obtidas pelo marcador da região D1/D2 do LSU. *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como *outgroup*. As análises evolucionárias foram obtidas usando o

### Capítulo 3 - Resultados e Discussão

---

método Maximum Likelihood e o modelo Kimura 2-parameter. Foi realizado um bootstrap de 1000 repetições utilizando o software MEGA11.

De acordo com os resultados pode-se afirmar que existe uma grande diversidade de microrganismos nos frutos de medronho, algumas espécies, nomeadamente algumas leveduras identificadas, não acarretam patogenicidade para o ser humano. No entanto, outras espécies identificadas apresentam potencial patogénico, nomeadamente fungos filamentosos produtores de micotoxinas, como o caso de *A. carbonarius*, *P. brevicompactum* e *P. crustosum* produtores da ocratoxina A [284, 285]. No entanto, algumas espécies do género *Aspergillus* são reportadas por apresentarem potencial biotecnológico, ao nível da produção de enzimas, como as  $\beta$ -galactosidasas (lactases) capazes de hidrolisarem a lactose e transferir reações para produzir prebióticos à base de lactose com potencial aplicação na indústria alimentar e farmacêutica [287]

De entre as leveduras isoladas de medronho, foram encontrados géneros como o *Aureobasidium* que têm vindo a ser estudados como potencial de aplicação tecnológico. Mais propriamente *A. pullulans*, espécie reconhecida como produtora de enzimas como a  $\beta$ -glucosidase, amilases, celulasas, lipases, proteases, entre outras, sendo uma levedura com elevado potencial em diversas indústrias, nomeadamente em vitivinicultura [288]. Para além destas propriedades, a *A. pullulans* é reportada por possuir atividade antibacteriana e antifúngica devido à produção de compostos voláteis e enzimas hidrolíticas. Em uvas e subprodutos da vitivinicultura, esta espécie foi encontrada em grandes densidades, estando associada ao biocontrolo de fungos filamentosos como *Botrytis* sp. e *Aspergillus* sp. [288, 289]. A espécie *Sacchettoecium rubi* foi identificada pela primeira vez em 2016 em espinhos de *Rubus ulmifolius* (amoreira-brava) [291], e em 2019 também foi isolada de caules de *Amygdalus scoparia* [292].

Com a realização deste trabalho de isolamento de fungos a partir de frutos de medronho, foi possível conhecer a diversidade de microbiota presente nos frutos. Identificar quais os microrganismos presentes pode facilitar a investigação futura, quer ao nível da conservação de frutos pré- e pós-colheita, quer ao nível da segurança alimentar. Além disso, esta informação permite o conhecimento do potencial biotecnológico da microbiota presente nos frutos de medronho, abrindo caminhos para a sua investigação e aplicação, valorizando assim, produtos naturais endógenos de regiões rurais.



# Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras

---



Neste trabalho foram caracterizados dois endemismos importantes em Portugal, a *L. stoechas* subsp. *luisieri* (rosmaninho-menor) e a *P. tridentatum* (carqueja). Os resultados contribuíram para aumentar o conhecimento científico das espécies e para a sua valorização e potencial de utilização em diversas áreas, nomeadamente na área alimentar.

No sentido de preservar os ecossistemas e evitar recolhas massivas de espécies endógenas na natureza, torna-se de extrema importância a conservação *in vitro* das espécies estudadas. Foram desenvolvidos protocolos de propagação de ambas as espécies em sistemas de biorreatores de imersão temporária (BIT), sendo estes considerados vantajosos para a produção em larga escala. As espécies produzidas em BIT foram caracterizadas obtendo bons resultados de propagação *in vitro*, atingindo uma taxa de multiplicação de 4,51 e de 13,45 para *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Lsl) e para *P. tridentatum* (Pt), respetivamente. Dos melhores tratamentos de BIT de cada espécie foram obtidos extratos aquosos e analisado o seu teor em compostos fenólicos e a sua ação antioxidante, sendo que o extrato aquoso de Lsl do T12 revelou um teor de fenóis totais de 161,66 mg EAG/g<sub>ms</sub> e de flavonóides de 15 mg EQ/g<sub>ms</sub>; enquanto o extrato aquoso de Pt revelou teores de fenóis e flavonóides mais baixos, respetivamente, de 73,54 mg EAG/g<sub>ms</sub> e de 3,85 mg EQ/g<sub>ms</sub>. Quanto ao perfil fenólico destes extratos, salientam-se os ácidos cafeico (729 µg/g<sub>ms</sub>), rosmarínico (363 µg/g<sub>ms</sub>) e ferúlico (76,32 µg/g<sub>ms</sub>) para Lsl, e o ácido elágico (708 µg/g<sub>ms</sub>), a rutina (532 µg/g<sub>ms</sub>) e a quercetina (102 µg/g<sub>ms</sub>) para os extratos de Pt.

Pela primeira vez, foi reportado o perfil volátil do óleo essencial (OE) de Lsl produzida em BIT, apresentando algumas diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao das plantas silvestres. Através da metodologia de GC-MS foi possível a identificação de 80% dos constituintes voláteis do OE, sendo maioritariamente representado por monoterpenos oxigenados (47%), à semelhança das plantas silvestres, no entanto, verificou-se um aumento considerável no teor de monoterpenos (19%) e de sesquiterpenos oxigenados (12%). Os compostos maioritários deste OE foram o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (16%),  $\beta$ -pineno (12%), cânfora (11%), acetato de lavandulilo (8%), viridiflorol (5%), copaborneol (4%) e  $\alpha$ -pineno (4%). Os compostos como  $\beta$ -pineno, cânfora e  $\alpha$ -pineno tiveram os maiores teores no OE de BIT, comparativamente aos OEs de plantas silvestres nas diferentes fases fenológicas.

Relativamente aos OEs de Lsl de plantas silvestres, em diferentes fases fenológicas, foram caracterizados os seus constituintes voláteis, revelando algumas diferenças quantitativas. O OE na fase de repouso apresentou como composto maioritário o 2,3,4,4-tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona (26%), fenchona (6%) e 1,8-cineol (6%).

Na pré-floração o OE foi caracterizado pela presença de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (13%), 2,3,4,4-tetrametil-5-metilciclopenten-2-enona (11%) e fenchona (6%), sendo que na floração verificou-se um aumento do teor de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (27%), *trans*- $\alpha$ -necrodol (13%), acetato de lavandulilo (7%) e linalol (6%). Quanto aos OEs só de inflorescências prevaleceram os compostos acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (17%), linalool (7%), acetato de lavandulilo (6%) e *trans*- $\alpha$ -Necrodol (6%), verificando que o maior teor de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo foi encontrado no OE de folhas com 31%, seguido do *trans*- $\alpha$ -necrodol (13%), sugerindo que na floração estes compostos derivados de necrodano apresentam uma maior produção nas folhas.

O estudo realizado em Lsl com origem em oito locais da Beira Interior, revelou que as populações recolhidas, à exceção da população de *L. pedunculata*, produziram todos os compostos derivados de necrodano, que podem ser considerados marcadores quimiotaxonómicos de *L. stoechas* subsp. *luisieri*. Estes resultados corroboram a tese defendida por Franco (1984), em Nova Flora de Portugal, onde o autor refere que na região não existe a subespécie *stoechas*, mas sim a subespécie *luisieri*. As variáveis bioclimáticas estudadas revelaram que a população de Vila Velha de Ródão (VV) está mais associada a temperaturas mais elevadas, comparativamente aos outros locais. O perfil químico desta população diferiu das restantes populações, sendo que o composto maioritário foi a fenchona (34%), apresentando teores de acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo muito inferiores aos encontrados nas outras populações estudadas. Com estes resultados pode-se inferir que a produção de compostos derivados de necrodano pode ser influenciada negativamente por temperaturas elevadas e consequentemente por condições de stresse hídrico na planta.

Neste trabalho caracterizaram-se os extratos aquosos das duas espécies com origem em plantas silvestres nas diferentes fases fenológicas ao nível dos compostos fenólicos. O ácido fenólico maioritário nos extratos de Lsl foi o ácido rosmarínico com teores acima de 3700  $\mu\text{g/g}_{\text{ms}}$ , sendo a fase de pré-floração a revelar o maior teor obtido. Na fase de repouso encontraram-se elevados teores de quercetina e de ácido cafeico. Na pré-floração foram encontrados os maiores teores dos ácidos ferúlico, gálico e *p*-cumárico. Os extratos da floração revelaram menores teores nos compostos fenólicos estudados. Em relação ao extrato aquoso obtido em plantas de BIT (T12), registou-se um perfil muito semelhante ao das plantas silvestres, sendo os compostos fenólicos maioritários o ácido cafeico e o ácido rosmarínico, tendo este extrato apresentado teores mais elevados dos ácidos cafeico e *p*-cumárico aos encontrados na fase de floração.

## Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras

---

Os extratos aquosos de Pt apresentaram como compostos fenólicos majoritários a rutina, o ácido elágico e a quercetina. Na fase da floração foi obtido o maior teor de rutina (26285  $\mu\text{g/g}_{\text{ms}}$ ), seguida de elevados teores dos ácidos clorogénico e rosmarínico. Na pré-floração os compostos majoritários foram a rutina e a quercetina, enquanto o extrato aquoso da floração apresentou elevados teores de quercetina, rutina e de ácido elágico. Comparativamente com as restantes fases fenológicas de Pt, na floração foram ainda encontrados os teores mais elevados dos ácidos cafeico e síringico, e de taxifolina. O extrato aquoso obtido de plantas do tratamento de BIT (T6) apresentou como compostos fenólicos majoritários o ácido elágico, rutina e quercetina.

Os extratos aquosos de Lsl e de Pt revelaram possuir atividade antioxidante pelos métodos utilizados. Os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos no extrato da fase de pré-floração em Lsl e no extrato de floração em Pt. Estes resultados corroboram com os maiores teores, para cada espécie, de fenóis e flavonóides. O extrato aquoso de Lsl com origem em plantas obtidas em BIT revelou possuir melhor atividade antioxidante comparativamente com o de Pt com a mesma origem. O OE de Lsl revelou possuir menor atividade antioxidante pelo método de DPPH comparativamente com os extratos, apresentando a menor  $\text{IC}_{50}$  (2 mg/mL) revelada na fase da floração, fase que corresponde com o maior teor obtido de compostos de necrodano. Quanto à atividade antimicrobiana do OE de Lsl, foram reportadas as respetivas CMI do OE de Lsl para bactérias (<149,3  $\mu\text{L/mL}$ ), assim como para os fungos filamentosos e leveduras (<9,3  $\mu\text{L/mL}$ ). Para a maioria dos microrganismos testados foram também reveladas as CMB e CMF, revelando valores inferiores a 149,3  $\mu\text{L/mL}$  e a 74,7  $\mu\text{L/mL}$ , respetivamente. O OE de Lsl da fase de floração revelou possuir efeitos citotóxicos em células de fibroblastos nas concentrações testadas (0,3 a 10  $\mu\text{L/mL}$ ), enquanto o extrato aquoso de Pt da fase de floração não apresentou diferenças significativas do controlo nas concentrações mais baixas (500-1000  $\mu\text{L/mL}$ ).

Neste trabalho foi estudada a conservação pós-colheita de medronho através de aplicação de diferentes temperaturas e conservação, neste ensaio foram também isolados fungos, sendo a sua identificação ao nível do género/espécie realizada por meio de técnicas moleculares. Os principais fungos filamentosos isolados de medronho pertencem aos géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, e os géneros de leveduras mais representativos foram *Aureobasidium* e *Sacchothecium*.

No ensaio realizado para a conservação pós-colheita de cerejas foram elaboradas formulações à base de quitosano com incorporação de OE de Lsl. Os filmes selecionados apresentaram propriedades mecânicas adequadas e propriedades antimicrobianas com redução da carga microbiana nos frutos ao longo do ensaio, contribuindo assim para

## Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras

---

uma melhor conservação pós-colheita de cerejas. Relativamente à citotoxicidade apresentada pelo OE sobre células de fibroblastos, mesmo em concentrações baixas, coloca-se a questão da toxicidade de ingestão como ingrediente do revestimento, sendo que mais ensaios de citotoxicidade devem ser realizados no OE e também na formulação de revestimento.

Como perspectivas futuras e no seguimento dos estudos já iniciados, futuro trabalho a desenvolver poderá incluir os seguintes aspetos:

- ⇒ Desenvolver ensaios de micropropagação das espécies em BIT com moléculas eliciadoras de forma a obter um possível aumento na produção de compostos fenólicos;
- ⇒ Dado à exclusividade da presença de necrodanos no OE de Lsl e ao seu potencial biológico, deveriam ser aprofundados estudos no seu isolamento e propriedades biológicas;
- ⇒ Testar a citotoxicidade do OE de Lsl e de formulações de revestimento com incorporação de OE em outras linhas celulares, nomeadamente em células do trato intestinal;
- ⇒ Devido à possível toxicidade apresentada pelo OE de Lsl em células de fibroblastos, seria interessante direcionar o desenvolvimento de revestimentos como componentes de embalagem;
- ⇒ Dada a sua importância e abundância no território português, e sendo um endemismo restrito à Península Ibérica, deveriam ser estudadas mais populações de Lsl ao longo do território nacional.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---



## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [1] M. H. Novais, I. Santos, S. Mendes, and C. Pinto-Gomes, "Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 93, no. 2-3, pp. 183-195, 2004.
- [2] J. M. Neves, C. Matos, C. Moutinho, G. Queiroz, and L. R. Gomes, "Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 124, no. 2, pp. 270-283, 2009.
- [3] A. Roychoudhury and R. Bhowmik, "Health benefits of plant-derived bioactive secondary metabolites as dietary constituents," *SF J Clin Pharm Res.*, vol. 2, no. 1, 2020.
- [4] M. S. Ahmad Khan and I. Ahmad, *Herbal Medicine: Current Trends and Future Prospects*. In New look to phytomedicine, pp. 3-13, Academic Press., 2018.
- [5] S. Baptista-Silva, S. Borges, O. L. Ramos, M. Pintado, and B. Sarmento, "The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 279-295, 2020.
- [6] J. Ju, Y. Xie, Y. Guo, Y. Cheng, H. Qian, and W. Yao, "Application of edible coating with essential oil in food preservation," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, no. 15, pp. 2467-2480, 2019.
- [7] Food and Agriculture Organization. Global food losses and food waste-extent, "in: Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., Meybeck, A. Rome (eds.)," 2011.
- [8] Council of Europe, "European Pharmacopoeia, 9th ed." Council of Europe: Strasbourg, France, 2016.
- [9] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils - A review," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 2. Pergamon, pp. 446-475, Feb. 01, 2008.
- [10] M. R. Zuzarte, A. M. Dinis, J. Canhoto, and L. Salgueiro, "Leaf trichomes of Portuguese *Lavandula* species: a comparative morphological study," *Microsc. Microanal.*, vol. 15, no. S3, pp. 37-38, Jul. 2009.
- [11] M. R. Zuzarte, A. M. Dinis, C. Cavaleiro, L. R. Salgueiro, and J. M. Canhoto, "Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 32, no. 3, pp. 580-587, 2010.
- [12] J. Buckle, "Basic plant taxonomy, basic essential oil chemistry, extraction, biosynthesis, and analysis," in *Clinical aromatherapy*, Edition 3., Elsevier, 2015, pp. 37-72.
- [13] Y. Guillon *et al.*, "A comparative study of terpene composition in different

- clades of the genus *Lavandula*,” *Bot. Lett.*, vol. 165, no. 3-4, pp. 494-505, 2018.
- [14] S. J. J. C. Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., “Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 23, pp. 213-226, 2008.
- [15] M. Mahajan, R. Kuiry, and P. K. Pal, “Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants,” *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, vol. 18, no. April, p. 100255, 2020.
- [16] E. S. Giray, S. Kirici, D. A. Kaya, M. Türk, Ö. Sönmez, and M. Inan, “Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*,” *Talanta*, vol. 74, no. 4, pp. 930-935, 2008.
- [17] L. F. Julio *et al.*, “Comparative chemistry and insect antifeedant effects of conventional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO<sub>2</sub>) of two *Lavandula luisieri* populations,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 58, pp. 25-30, 2014.
- [18] C. L. Lopes *et al.*, “Phenolic Composition and Bioactivity of *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. Samples from Different Geographical Origin,” *Molecules*, vol. 23, no. 5, pp. 1-19, 2018.
- [19] E. De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., and Alvarez-Parrilla, “Phenolic compounds,” in *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, Woodhead Publishing, Ed. 2019, pp. 253-271.
- [20] P. Cosme, A. B. Rodríguez, J. Espino, and M. Garrido, “Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications,” *Antioxidants 2020*, vol. 9, no. 12, pp. 1263, Dec. 2020.
- [21] B. Kefeli, V.I. Kalevitch, and M.V. Borsari, “Phenolic cycle in plants and environment,” *J. Cell Mol. Biol.*, vol. 2, pp. 13-18, 2003.
- [22] M. Ansari, A. Anurag, Z. Fatima, and S. Hameed, “Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent,” *Microb. Pathog. Strateg. Combat. Sci. Technol. Educ*, 1, 1189-1195, 2013.
- [23] D. C. Costa, H. S. Costa, T. G. Albuquerque, F. Ramos, M. C. Castilho, and A. Sanches-Silva, “Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 2, pp. 336-354, 2015.
- [24] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, “Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L.,” *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852-6865, 2013.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [25] M. M. Vuolo, V. S. Lima, and M. R. Maróstica Junior, "Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power," *Bioact. Compd. Heal. Benefits Potential Appl.*, pp. 33-50, Dec. 2018.
- [26] N. Kumar and N. Goel, "Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications," *Biotechnol. Reports*, vol. 24, pp. e00370, Dec. 2019.
- [27] N. Croteau, R. Kutchan, and T. Lewis, "Natural Products (Secondary Metabolites)," in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Eds., Rock Ville: American Society of Plant Physiologists, 2000, pp. 1311-1314.
- [28] Dewick P.M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.*, 3rd ed. Chichester, United Kingdom: Wiley & Sons, 2009.
- [29] World Health Organization (WHO), *Guidelines on Good Agricultural and Collections Practices (GACP) for Medicinal Plants*. Geneva, 2003.
- [30] L. Wen, Z. Zhang, D. W. Sun, S. P. Sivagnanam, and B. K. Tiwari, "Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 60, no. 11, pp. 1826-1841, 2020.
- [31] S. B. Bagade and M. Patil, "Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 51, no. 2, pp. 138-149, 2021.
- [32] N. Mehta *et al.*, "Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications," *Foods*, vol. 11, no. 19, pp. 1-35, 2022.
- [33] P. A. Uwineza and A. Waśkiewicz, "Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials," *Molecules*, vol. 25, no. 17, 2020.
- [34] R. P. F. F. da Silva, T. A. P. Rocha-Santos, and A. C. Duarte, "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 40-51, 2016.
- [35] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review," *Chinese Med. (United Kingdom)*, vol. 13, no. 1, pp. 1-26, 2018.
- [36] M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 51, no. 1, pp. 15-25, Jan. 01, 2013.
- [37] T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Bloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi, and

- R. D. Lele, "Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects," *J. Assoc. Physicians India*, vol. 52, no. OCT, pp. 794-804, 2004.
- [38] A. Karadag, B. Ozcelik, and S. Saner, "Review of methods to determine antioxidant capacities," *Food Anal. Methods*, vol. 2, no. 1, pp. 41-60, 2009.
- [39] I. G. Munteanu and C. Apetrei, "Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, 2021.
- [40] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841-1856, 2005.
- [41] R. Scherer and H. T. Godoy, "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method," *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 654-658, 2009.
- [42] A. L. Dawidowicz and M. Olszowy, "Depletion/protection of  $\beta$ -carotene in estimating antioxidant activity by  $\beta$ -carotene bleaching assay," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 11, pp. 7321-7328, 2015.
- [43] H. Ueno, S. Yamakura, R. S. Arastoo, T. Oshima, and K. Kokubo, "Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using  $\beta$ -Carotene bleaching assay," *J. Nanomater.*, vol. 2014, 2014,.
- [44] Food and Agriculture Organization (FAO), "The Sustainable Development Goals Report," 2022.
- [45] S. K. Balouri, M. Sadiki, and M. Ibensouda, "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, pp. 71-79, 2016.
- [46] S. Burt, "Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223-253, Aug. 01, 2004.
- [47] S. Basak and P. Guha, "A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 12, pp. 4701-4710, 2018.
- [48] A. R. Koroch, H. Rodolfo Juliani, and J. A. Zygodlo, "Bioactivity of essential oils and their components," in *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 87-115.
- [49] A. Adan, Y. Kiraz, and Y. Baran, "Cell proliferation and cytotoxicity assays," *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 17, no. 14, pp. 1213-1221, 2016.
- [50] A. P. Kulkarni, H. S. Mahal, S. Kapoor, and S. M. Aradhya, "*In vitro* studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic action of punicalagin," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 4, pp. 1491-1500, 2007.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [51] M. Shoemaker, I. Cohen, and M. Campbell, "Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 93, no. 2-3, pp. 381-384, 2004.
- [52] M. J. Tolosa, L. Donato, and M. T. Gómez-Lechón, "General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay," *Protocols in in Vitro Hepatocyte Research*, pp. 338-348, 2015.
- [53] S. Upson and T. M. Andrews, *The Genus Lavandula*. London: The Royal Botanical Gardens, 2004.
- [54] J. A. Franco, *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores), Vol II -Clethraceae-Compositae*. Sociedade Astória, Lda, Lisboa, 1984.
- [55] R. Morales, *Flora Iberica. Lavandula*. Madrid: Real Jardín Botánico CSIC, 2010.
- [56] E. Guinea, "Lavandula L.," in *Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., & Webb D.A. Flora Europaea. Vol 3*. Cambridge University Press, Cambridge, 1981.
- [57] E. Valdés, B. Talavera, and S. Fernández-Galiano, *Flora Vascular de Andalucía Occidental 2. KETRES ed.* 1987.
- [58] S. Rivas-Martínez, "Vascular Plant Communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001, part I," *Itinera Geobot.*, vol. 15, pp. 5-432, 2002.
- [59] M. I. García Vallejo, "Aceites Esenciales De Las Lavandulas Ibericas Ensayo Ide La Quimiotaxonomia," PhD Thesis, Universidade Complutense, Madrid, Espanha, 1992.
- [60] N. Baldovini, S. Lavoine-Hanneguelle, G. Ferrando, G. Dusart, and L. Lizzani-Cuvelier, "Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*," *Phytochemistry*, vol. 66, no. 14, pp. 1651-1655, 2005.
- [61] T. Eisner and J. Meinwald, "Defensive Spray Mechanism of A Silphid Beetle (*Necrodes Surinamensis*)," *Psyche (New York)*, vol. 89, no. 3-4, pp. 357-367, 1982.
- [62] Y. Kashima and M. Miyazawa, "Chemical Composition and Aroma Evaluation of Essential Oils from *Evolvulus alsinoides* L.," *Chem. Biodivers.*, vol. 11, no. 3, pp. 396-407, Mar. 2014.
- [63] S. Lavoine Hanneguelle and H. Casabianca, "New compounds from the essential oil and absolute of *Lavandula luisieri* L.," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 16, no. 5, pp. 445-448, 2004.
- [64] M. Zuzarte *et al.*, "*Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs," *Food Chem.*, vol. 135, no. 3, pp. 1505-1510, 2012.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [65] B. A. Figadère, J. S. McElfresh, D. Borchardt, K. M. Daane, W. Bentley, and J. G. Millar, “*trans*- $\alpha$ -Necrodyl isobutyrate, the sex pheromone of the grape mealybug, *Pseudococcus maritimus*,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 48, no. 48, pp. 8434-8437, Nov. 2007.
- [66] S. Vacas, I. Navarro, J. Marzo, V. Navarro-Llopis, and J. Primo, “Sex Pheromone of the Invasive Mealybug Citrus Pest, *Delottococcus aberiae* (Hemiptera: Pseudococcidae). A New Monoterpenoid with a Necrodane Skeleton,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 34, pp. 9441-9449, Aug. 2019.
- [67] J. Sanz, A. C. Soria, and M. C. García-Vallejo, “Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1024, no. 1-2, pp. 139-146, 2004.
- [68] A. González-Coloma, D. Martín-Benito, N. Mohamed, M. C. García-Vallejo, and A. C. Soria, “Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L.,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 34, no. 8, pp. 609-616, 2006.
- [69] N. Dias, M. C. Dias, C. Cavaleiro, M. C. Sousa, N. Lima, and M. Machado, “Oxygenated monoterpenes-rich volatile oils as potential antifungal agents for dermatophytes,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 460-464, 2017.
- [70] J. Domingues, M. Goulão, F. Delgado, J. C. Gonçalves, J. Gonçalves, and C. S. Pintado, “Essential Oils of Two Portuguese Endemic Species of *Lavandula* as a Source of Antifungal and Antibacterial Agents,” *Processes*, vol. 11, no. 4, pp. 1-12, 2023.
- [71] J. Domingues, F. Delgado, J. C. Gonçalves, and C. Santos Pintado, “Essential Oils of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* as Antifungal Agent against Fungi from Strawberry Tree Fruit,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 9, pp. 98-106, 2021.
- [72] F. Matos *et al.*, “Antioxidant capacity of the essential oils from *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* grown in algarve (Portugal),” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 327-336, 2009.
- [73] S. Roller, N. Ernest, and J. Buckle, “The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA),” *J. Altern. Complement. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 275-279, 2009.
- [74] M. F. G. Delgado, “Conservação e valorização de *Asphodelus bento-rainhae* P. Silva e *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martínez da Beira Interior,” PhD Thesis, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2010.

- [75] A. González-Coloma, F. Delgado, J. M. Rodilla, L. Silva, J. Sanz, and J. Burillo, “Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 39, no. 1, pp. 1-8, 2011.
- [76] R. Videira, P. Castanheira, M. Grãos, L. Salgueiro, C. Faro, and C. Cavaleiro, “A necrodane monoterpene from *Lavandula luisieri* essential oil as a cell-permeable inhibitor of BACE-1, the  $\beta$ -secretase in Alzheimer’s disease,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 28, no. 6, pp. 380-388, 2013.
- [77] A. T. Rufino *et al.*, “Differential effects of the essential oils of *Lavandula luisieri* and *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* in cell models of two chronic inflammatory diseases,” *Pharm. Biol.*, vol. 53, no. 8, pp. 1220-1230, 2015.
- [78] S. Arantes *et al.*, “Pharmacological and toxicological studies of essential oil of *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*,” *Planta Med.*, vol. 82, no. 14, pp. 1266-1273, 2016.
- [79] S. Pombal *et al.*, “Antibacterial and antioxidant activity of Portuguese *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas-Martinez and its relation with their chemical composition,” *Springerplus*, vol. 5, no. 1, 2016.
- [80] V. I. Babushok, P. J. Linstrom, and I. G. Zenkevich, “Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils,” *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 40, no. 4, p. 043101, Dec. 2011.
- [81] R. Nunes, P. Pasko, M. Tyszka-Czochara, A. Szewczyk, M. Szlosarczyk, and I. S. Carvalho, “Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs,” *Pharm. Biol.*, vol. 55, no. 1, pp. 114-123, 2017.
- [82] M. del M. Contreras, F. Algieri, A. Rodriguez-Nogales, J. Gálvez, and A. Segura-Carretero, “Phytochemical profiling of anti-inflammatory *Lavandula* extracts via RP-HPLC-DAD-QTOF-MS and -MS/MS: Assessment of their qualitative and quantitative differences,” *Electrophoresis*, vol. 39, no. 9-10, pp. 1284-1293, May 2018.
- [83] P. Costa, S. Gonçalves, P. B. Andrade, P. Valentão, and A. Romano, “Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties,” *Food Chem.*, vol. 126, no. 4, pp. 1779-1786, Jun. 2011.
- [84] F. Algieri *et al.*, “Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L.,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 190, pp. 142-158, 2016.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [85] E. Celep, S. Akyüz, and E. Yesilada, "Assessment of potential bioavailability of major phenolic compounds in *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*," *Ind. Crops Prod.*, vol. 118, no. March, pp. 111-117, 2018.
- [86] I. K. Karabagias, V. K. Karabagias, and K. A. Riganakos, "Physico-chemical parameters, phenolic profile, in vitro antioxidant activity and volatile compounds of ladastacho (*Lavandula stoechas*) from the region of saidona," *Antioxidants*, vol. 8, no. 4, pp. 1-16, 2019.
- [87] P. Costa, S. Gonçalves, P. Valentão, P. B. Andrade, and A. Romano, "Accumulation of phenolic compounds in *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 57, pp. 69-74, 2013.
- [88] A. Rasul, F. M. Millimouno, W. Ali Eltayb, M. Ali, J. Li, and X. Li, "Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013.
- [89] X. Shen, Y. Liu, X. Luo, and Z. Yang, "Advances in biosynthesis, pharmacology, and pharmacokinetics of pinocembrin, a promising natural small-molecule drug," *Molecules*, vol. 24, no. 12, 2019.
- [90] R. Baptista *et al.*, "Antioxidant and antimycotic activities of two native *Lavandula* species from Portugal," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015, 2015.
- [91] G. Teixeira, A. I. Correia, T. Vasconcelos, A. Duarte, N. Oliveira, and A. M. Madureira, "*Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* and *L. pedunculata*: comparative antibacterial activity," *J. Phyther. Pharmacol.*, vol. 1, no. 4, pp. 11-15, 2012.
- [92] İ. Gülçin, I. G. Şat, Ş. Beydemir, M. Elmastaş, and Ö. I. Küfrevioğlu, "Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.)," *Food Chem.*, vol. 87, no. 3, pp. 393-400, 2004.
- [93] F. Pereira *et al.*, "Production and characterization of nanoparticles containing methanol extracts of Portuguese Lavenders," *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 74, pp. 170-177, 2015.
- [94] M. Zuzarte *et al.*, "Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér," *J. Med. Microbiol.*, vol. 60, no. 5, pp. 612-618, 2011.
- [95] N. Karaca, B. Demirci, and F. Demirci, "Evaluation of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* L., *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* L. essential oils and their main components against sinusitis pathogens," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 73, no. 9-10, pp. 353-360, 2018.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [96] N. Bouzouita *et al.*, “Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. Oil from Tunisia,” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 17, no. 5, pp. 584-586, 2005.
- [97] S. Bouazama, J. C. Harhar, H., J. M. Desjobert, A. Talbaoui, and M. Tabyaoui, “Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *L. pedunculata* and *L. dentata*,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 8, no. 6, pp. 2154-2160, 2017.
- [98] M. N. Boukhatem *et al.*, “A new eucalyptol-rich lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oil: Emerging potential for therapy against inflammation and cancer,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, pp. 1-17, 2020.
- [99] M. Zuzarte *et al.*, “Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 44, pp. 97-103, Jan. 2013.
- [100] S. S. Kulabas *et al.*, “Ameliorative potential of *Lavandula stoechas* in metabolic syndrome via multitarget interactions,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 223, no. January, pp. 88-98, 2018.
- [101] A. C. Gören, G. Topçu, G. Bilsel, M. Bilsel, Z. Aydoğmuş, and J. M. Pezzuto, “The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*,” *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 57, no. 9-10, pp. 797-800, 2002.
- [102] P. Costa, T. Grevenstuk, A. M. Rosa da Costa, S. Gonçalves, and A. Romano, “Antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Lavandula viridis* L’Hér extracts after in vitro gastrointestinal digestion,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 55, pp. 83-89, Apr. 2014.
- [103] V. Zuco *et al.*, “Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells,” *Cancer Lett.*, vol. 175, no. 1, pp. 17-25, 2002.
- [104] M. Rashidi *et al.*, “Selective cytotoxicity and apoptosis-induction of *Cyrtopodion scabrum* extract against digestive cancer cell lines,” *Int. J. Cancer Manag.*, vol. 10, no. 5, 2017.
- [105] D. Szwajgier, “Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives,” *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 68 C, no. 3-4, pp. 125-132, 2013.
- [106] M. Naushad, S. S. K. Durairajan, A. K. Bera, S. Senapati, and M. Li, “Natural Compounds with Anti-BACE1 Activity as Promising Therapeutic Drugs for Treating Alzheimer’s Disease,” *Planta Med.*, vol. 85, no. 17, pp. 1316-1325, Oct. 2019.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [107] A. Azab, A. Nassar, and A. N. Azab, "Anti-inflammatory activity of natural products," *Molecules*, vol. 21, no. 10, pp. 1-19, 2016.
- [108] L. F. Julio *et al.*, "Phytotoxic and Nematicidal Components of *Lavandula luisieri*," *J. Nat. Prod.*, vol. 79, no. 2, pp. 261-266, 2016.
- [109] L. F. Julio *et al.*, "Ixicidal compounds from pre-domesticated *Lavandula luisieri*," *Ind. Crops Prod.*, vol. 110, no. June, pp. 83-87, 2017.
- [110] S. Talavera and S. Castroviejo, *Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares: Vol. VII (I) Leguminosae (partim) (Vol. 1)*. Editorial CSIC-CSIC Press, 1999.
- [111] G. Teixeira and A. L. Pereira, "Winged stems in *Pterospartum tridentatum*: Morphoanatomical study," *Acta Bot. Gall.*, vol. 151, no. 1, pp. 103-109, 2004.
- [112] A. Luís, F. Domingues, and A. P. Duarte, "Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 6, no. 12, 2011.
- [113] C. L. Roriz, L. Barros, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga, and I. C. F. R. Ferreira, "*Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds," *Food Res. Int.*, vol. 62, pp. 684-693, 2014.
- [114] F. M. Ferreira *et al.*, "Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts," *CYTA - J. Food*, vol. 10, no. 2, pp. 92-102, 2012.
- [115] A. Aires, E. Marrinhas, R. Carvalho, C. Dias, and M. J. Saavedra, "Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *pterospartum tridentatum* and *mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* isolates," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016.
- [116] J. C. Gonçalves *et al.*, "*In vitro* shoot cultures of *pterospartum tridentatum* as an alternative to wild plants as a source of bioactive compounds," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 13, no. 4, pp. 439-442, 2018.
- [117] M. A. M. Simões, D. C. G. A. Pinto, B. M. R. Neves, and A. M. S. Silva, "Flavonoid Profile of the *Genista tridentata* L., a Species Used Traditionally to Treat Inflammatory Processes," *Molecules*, vol. 25, no. 4, 2020.
- [118] R. F. Vitor *et al.*, "Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 93, no. 2-3, pp. 363-370, 2004.
- [119] H. Paulo *et al.*, "The Opposing Effects of the Flavonoids Isoquercitrin and Sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on Oral Glucose Tolerance

- in Rats,” *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, vol. 22, no. 4, pp. 539-543, 2008.
- [120] A. C. Gonçalves, C. Bento, A. R. Nunes, M. Simões, G. Alves, and L. R. Silva, “Multitarget protection of *Pterospartum tridentatum* phenolic-rich extracts against a wide range of free radical species, antidiabetic activity and effects on human colon carcinoma (Caco-2) cells,” *J. Food Sci.*, vol. 85, no. 12, pp. 4377-4388, 2020.
- [121] R. Cabana, L. R. Silva, P. Valentão, C. I. Viturro, and P. B. Andrade, “Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae),” *Ind. Crops Prod.*, vol. 48, pp. 49-56, 2013.
- [122] M. T. Coelho, J. C. Gonçalves, V. Alves, and M. M. - Martins, “Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal,” *Procedia Food Sci.*, vol. 1, pp. 1454-1458, 2011.
- [123] A. Clara Grosso *et al.*, “Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal,” *Food Chem.*, vol. 102, no. 4, pp. 1083-1088, 2007.
- [124] A. Martínez, J. C. Estévez, and F. J. Silva-Pando, “Antioxidant activity, total phenolic content and skin care properties of 35 selected plants from Galicia (NW Spain),” *Front. Life Sci.*, vol. 6, no. 3-4, pp. 77-86, 2012.
- [125] M. Neves, A. Miranda, M. F. L. Lemos, S. Silva, and C. Tecelão, “Enhancing oxidative stability of sunflower oil by supplementation with prickled broom (*Pterospartum tridentatum*) ethanolic extract,” *J. Food Sci.*, vol. 85, no. 9, pp. 2812-2821, 2020.
- [126] B. Balanč *et al.*, “Calcium-Alginate-Inulin Microbeads as Carriers for Aqueous Carqueja Extract,” *J. Food Sci.*, vol. 81, no. 1, pp. E65-E75, 2016.
- [127] J. Pinela, L. Barros, A. M. Carvalho, and I. C. F. R. Ferreira, “Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe *Genisteae* (Fabaceae),” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 11, pp. 2983-2989, 2011.
- [128] C. L. Roriz, L. Barros, A. M. Carvalho, C. Santos-Buelga, and I. C. F. R. Ferreira, “Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation,” *Food Chem.*, vol. 185, pp. 16-24, 2015.
- [129] I. Górniak, R. Bartoszewski, and J. Króliczewski, “Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids,” *Phytochem. Rev.*, vol. 18, pp. 241-

- 272, 2019.
- [130] N. Martins, I. C. F. R. Ferreira, L. Barros, A. M. Carvalho, M. Henriques, and S. Silva, "Plants used in folk medicine: The potential of their hydromethanolic extracts against *Candida* species," *Ind. Crops Prod.*, vol. 66, pp. 62-67, 2015.
- [131] M. Coelho, "Estudos de propagação in vitro, caracterização e valorização de carqueja (*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk)," Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2015.
- [132] J. C. V. Fernandes, "Determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de *Pterospartum tridentatum*," PhD Thesis, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2012.
- [133] J. Myers, N. Mittermeier, R. A. Mittermeier, C. G. Da Fonseca, and G. A. Kent, "Biodiversity hotspots for conservation priorities," *Nature*, vol. 403, no. 6772, pp. 853-858, 2000.
- [134] P. M. Carapeto, A. Francisco, and P. Pereira, "Lista Vermelha da Flora Vasculare de Portugal Continental," *Sociedade Portuguesa de Botânica, Associação Portuguesa de Ciência da Vegetação - PHYTOS e Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (coord.). Coleção «Botânica em Português», Vol. 7, 2020.*
- [135] S. Li, W. Yuan, P. Yang, M. D. Antoun, M. J. Balick, and G. M. Cragg, "Pharmaceutical Crops: An Overview," *Pharm. Crop.*, vol. 1, no. 1, pp. 1-17, 2010.
- [136] O. Julsing, M.K. Quax, and W.J. Kayser, "The Engineering of Medicinal Plants: Prospects and Limitations of Medicinal Plant Biotechnology," in O. Kaiser, W.J. Quax (Ed.). *Medicinal plant biotechnology: from basic research to industrial applications. Vol 1, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.*
- [137] J. M. Canhoto, "Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética," *Imprensa da Universidade de Coimbra*, 2010.
- [138] L. Bassolino *et al.*, "Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 121, no. 1, pp. 83-95, 2015.
- [139] D. Rebelo *et al.*, "A protocol for micropropagation of the medicinal species *Tuberaria lignosa* provides ploidy true-to-type plants with high antioxidant capacity," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 150, no. 3, pp. 599-609, 2022.
- [140] V. Alves, R. Pinto, C. Debiasi, M. C. Santos, J. C. Gonçalves, and J. Domingues, "Micropropagation of *Corema album* from adult plants in semisolid medium and temporary immersion bioreactor," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 145, no. 3, pp. 641-648, 2021.

- [141] S. Tošić *et al.*, “Phytochemical composition and biological activities of native and in vitro-propagated *Micromeria croatica* (Pers.) Schott (Lamiaceae),” *Planta*, vol. 249, no. 5, pp. 1365-1377, 2019.
- [142] S. C. Debnath and J. C. Goyali, “Properties in Micropropagated *Vaccinium* Berry,” *Molecules*, vol. 25, no. 4, pp. 1-26, 2020.
- [143] V. F. Fernandes *et al.*, “Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*,” *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 23, no. 3, pp. 419-424, 2013.
- [144] M. Azam, Q. Jiang, B. Zhang, C. Xu, and K. Chen, “*Citrus* leaf volatiles as affected by developmental stage and genetic type,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 17744-17766, 2013.
- [145] S. Gonçalves, I. Mansinhos, R. Rodríguez-Solana, E. Pérez-Santín, N. Coelho, and A. Romano, “Elicitation improves rosmarinic acid content and antioxidant activity in *Thymus lotocephalus* shoot cultures,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 137, no. April, pp. 214-220, 2019.
- [146] J. Nobre, “*In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 46, no. 2, pp. 151-155, 1996.
- [147] J. Margara, “Mise au point d’une gamme de milieux mine´raux pour les conditions de la culture *in vitro*,” *C R Seances Acad Agric Fr.*, vol. 64, pp. 654-661, 1978.
- [148] F. Murashige and T. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures,” *Physiol Plant*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [149] O. B. Polivanova and V. A. Bedarev, “Hyperhydricity in Plant Tissue Culture,” *Plants*, vol. 11, no. 23, 2022.
- [150] M. C. Dias, R. Almeida, and A. Romano, “Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L’Hér through in vitro axillary shoot proliferation,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 68, no. 1, pp. 99-102, 2002.
- [151] S. Nakka and B. N. Devendra, “A Rapid *in Vitro* Propagation and Estimation of Secondary Metabolites for in Vivo and in Vitro Propagated *Crotalaria* Species, a Fabaceae Member,” *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, vol. 2, no. vol. 10, pp. 897-916, 2012.
- [152] A. Hernández-García, E. Ambriz-Parra, P. López-Albarrán, J. C. De León, and R. Salgado-Garciglia, “*In vitro* propagation from axillary buds of the endangered tree *Dalbergia congestiflora* Pittier (Fabaceae),” *Plant Biotechnol.*, vol. 38, no. 4, pp. 409-414, 2021.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [153] V. Georgiev, A. Schumann, A. Pavlov, and T. Bley, “Temporary immersion systems in plant biotechnology,” *Eng. Life Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 607-621, 2014.
- [154] D. Gago, S. Vilavert, M. Á. Bernal, C. Sánchez, A. Aldrey, and N. Vidal, “The effect of sucrose supplementation on the micropropagation of *Salix viminalis* L. Shoots in semisolid medium and temporary immersion bioreactors,” *Forests*, vol. 12, no. 10, 2021.
- [155] L. S. O. Carvalho, E. A. Ozudogru, M. Lambardi, and L. V. Paiva, “Temporary immersion system for micropropagation of tree species: A bibliographic and systematic review,” *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, vol. 47, no. 2, pp. 269-277, 2019.
- [156] H. Etienne and M. Berthouly, “Temporary immersion systems in plant micropropagation,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 69, no. 3, pp. 215-231, 2002.
- [157] A. Wilken *et al.*, “Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system,” *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, pp. 525-537, 2005.
- [158] A. De Carlo, W. Tarraf, M. Lambardi, and C. Benelli, “Temporary immersion system for production of biomass and bioactive compounds from medicinal plants,” *Agronomy*, vol. 11, no. 12, 2021.
- [159] E. Villegas-Sánchez, M. Macías-Alonso, S. Osegueda-Robles, L. Herrera-Isidró, H. Nuñez-Palenius, and J. González-Marrero, “*In vitro* culture of *Rosmarinus officinalis* L. In a temporary immersion system: Influence of two phytohormones on plant growth and carnosol production,” *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 8, 2021.
- [160] I. Grzegorzczak-Karolak, P. Staniewska, L. Lebelt, and D. G. Piotrowska, “Optimization of cultivation conditions of *Salvia viridis* L. shoots in the Plantform bioreactor to increase polyphenol production,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 149, no. 1-2, pp. 269-280, 2022.
- [161] E. A. Ozudogru, E. Karlik, D. Elazab, and M. Lambardi, “Establishment of Direct Organogenesis Protocol for *Arachis hypogaea* cv. virginia in Liquid Medium by Temporary Immersion System (TIS),” *Horticulturae*, vol. 8, no. 12, 2022.
- [162] O. Mosqueda Frómata, M. M. Escalona Morgado, J. A. Teixeira da Silva, D. T. Pina Morgado, and M. A. Daquinta Gradaille, “*In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 129, no. 3, pp. 543-551, 2017.
- [163] H. Akdemir, V. Süzerer, A. Onay, E. Tilkat, Y. Ersali, and Y. O. Çiftçi,

- “Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 117, no. 1, pp. 65-76, 2014.
- [164] C. Ruta *et al.*, “Large-scale plant production of *Lycium barbarum* L. By liquid culture in temporary immersion system and possible application to the synthesis of bioactive substance,” *Plants*, vol. 9, no. 7, pp. 1-10, 2020.
- [165] A. Ramos-Castellá, L. G. Iglesias-Andreu, J. Bello-Bello, and H. Lee-Espinosa, “Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system,” *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant*, vol. 50, no. 5, pp. 576-581, 2014.
- [166] A. T. Serra *et al.*, “Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 2. Evaluation of SCF extracts as promising natural chemotherapeutical agents,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 55, no. 3, pp. 1007-1013, 2011.
- [167] C. Bastos *et al.*, “Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems,” *Food Chem.*, vol. 173, pp. 1045-1053, 2015.
- [168] A. R. Nunes, A. C. Gonçalves, A. Falcão, G. Alves, and L. R. Silva, “*Prunus avium* L. (sweet cherry) by-products: A source of phenolic compounds with antioxidant and anti-hyperglycemic properties—a review,” *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 18, 2021.
- [169] S. A. Sargin, E. Akçicek, and S. Selvi, “An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 150, no. 3, pp. 860-874, 2013.
- [170] R. Alique, J. P. Zamorano, M. A. Martínez, and J. Alonso, “Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelf-life of sweet cherry, type picota cv ‘Ambrunés,’” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 35, no. 2, pp. 153-165, 2005.
- [171] A. A. Wani, P. Singh, K. Gul, M. H. Wani, and H. C. Langowski, “Sweet cherry (*Prunus avium*): Critical factors affecting the composition and shelf life,” *Food Packag. Shelf Life*, vol. 1, no. 1, pp. 86-99, 2014.
- [172] G. Koutsimanis, J. Harte, and E. Almenar, “Development and Evaluation of a New Packaging System for Fresh Produce: a Case Study on Fresh Cherries Under Global Supply Chain Conditions,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 8, no. 3, pp. 655-669, 2015.
- [173] P. Piotto, B. Piccini, and C. Arcadu, “La ripresa della vegetazione dopo gli incendi nella regione mediterranea. Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea,” *Dipartimento Prevenzione e Risanamento*

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- Ambientali, Manuale ANPA (Agenz. Naz. per la Protezi. dell’Ambiente)*, pp. 32-38, 2001.
- [174] J. A. Torres, F. Valle, C. Pinto, A. García-Fuentes, C. Salazar, and E. Cano, “*Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains,” *Plant Ecol.*, vol. 160, no. 2, pp. 207-223, 2002.
- [175] O. Anjos, S. Canas, J. C. Gonçalves, and I. Caldeira, “Development of a spirit drink produced with strawberry tree (*Arbutus unedo* l.) fruit and honey,” *Beverages*, vol. 6, no. 2, pp. 1-11, 2020.
- [176] A. Bebek Markovinović *et al.*, “Strawberry Tree Fruits and Leaves (*Arbutus unedo* L.) as Raw Material for Sustainable Functional Food Processing: A Review,” *Horticulturae*, vol. 8, no. 10, 2022.
- [177] R. L. Gomes *et al.*, “Medronheiro-Manual de boas práticas para a cultura,” *Edição Digital. REN-Redes Energéticas Nacionais. IPC-Instituto Politécnico de Coimbra, ESAC-Escola Superior Agrária de Coimbra, CERNAS-Centro de Estudos e Recursos Naturais Ambiente e Sociedade. CPM-Cooperativa Portuguesa de Medronho srl.*, Coimbra, 2019.
- [178] D. E. Santo, L. Galego, T. Gonçalves, and C. Quintas, “Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits’ fermentations,” *Food Res. Int.*, vol. 47, no. 1, pp. 45-50, 2012.
- [179] F. Gomes, M. Simões, M. L. Lopes, and J. M. Canhoto, “Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree),” *N. Biotechnol.*, vol. 27, no. 6, pp. 882-892, 2010.
- [180] H. Hart, “Inviting All the World’s Crops to the Table Supporting Traditional Crops to Supply Future Needs,” n. 25, ISBN: 978-92-9043-763-5, 2007.
- [181] M. C. Tenuta, R. Tundis, J. Xiao, M. R. Loizzo, A. Dugay, and B. Deguin, “*Arbutus* species (Ericaceae) as source of valuable bioactive products,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, no. 6, pp. 864-881, 2019.
- [182] I. Oliveira, P. Guedes De Pinho, R. Malheiro, P. Baptista, and J. A. Pereira, “Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage,” *Food Chem.*, vol. 128, no. 3, pp. 667-673, 2011.
- [183] J. A. Bento and I. Pereira, “*Arbutus unedo* L. and its benefits on human health,” *J. food Nutr. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 73-85, 2011.
- [184] A. Bouyahya, N. Moussaoui, J. Abrini, Y. Bakri, and N. Dakka, “Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts,” *Br. Biotechnol. J.*, vol. 14, no. 3, pp. 1-10, 2016.

- [185] M. C. Tenuta *et al.*, “Contribution of flavonoids and iridoids to the hypoglycaemic, antioxidant, and nitric oxide (NO) inhibitory activities of *Arbutus unedo* L.,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 2, pp. 1-25, 2020.
- [186] V. O. Ntui *et al.*, “Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 22, no. 10, pp. 1302-1314, 2021.
- [187] M. Glen, A. C. Alfenas, E. A. V. Zauza, M. J. Wingfield, and C. Mohammed, “*Puccinia psidii*: A threat to the Australian environment and economy - A review,” *Australas. Plant Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 1-16, 2007.
- [188] S. Carmona-Hernandez, J. J. Reyes-Pérez, R. G. Chiquito-Contreras, G. Rincon-Enriquez, C. R. Cerdan-Cabrera, and L. G. Hernandez-Montiel, “Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review,” *Agronomy*, vol. 9, no. 3, 2019.
- [189] E. Bernalte, M. J. Hernández, M. T. Vidal-Aragón, and M. C. Sabio, “Physical, chemical, flavor and sensory characteristics of two sweet cherry varieties grown in ‘Valle del Jerte’(Spain).,” *J. Food Qual.*, vol. 22, no. 4, pp. 403-416, 1999.
- [190] G. A. Manganaris, I. F. Ilias, M. Vasilakakis, and I. Mignani, “The effect of hydrocooling on ripening related quality attributes and cell wall physicochemical properties of sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.),” *Int. J. Refrig.*, vol. 30, no. 8, pp. 1386-1392, 2007.
- [191] S. Correia, R. Schouten, A. P. Silva, and B. Gonçalves, “Factors affecting quality and health promoting compounds during growth and postharvest life of sweet cherry (*Prunus avium* L.),” *Front. Plant Sci.*, vol. 8, no. December, pp. 1-15, 2017.
- [192] L. Ciolacu, A. I. Nicolau, and J. Hoorfar, *Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables*. Woodhead Publishing Limited, 2013.
- [193] S. Paidari *et al.*, “Edible coating and films as promising packaging: a mini review,” *J. Food Meas. Charact.*, vol. 15, no. 5, pp. 4205-4214, 2021.
- [194] A. Gennadios, “*Protein-based films and coatings*,” CRC Press, 2002.
- [195] A. Guimarães, L. Abrunhosa, L. M. Pastrana, and M. A. Cerqueira, “Edible Films and Coatings as Carriers of Living Microorganisms: A New Strategy Towards Biopreservation and Healthier Foods,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 17, no. 3, pp. 594-614, 2018.
- [196] Ó. L. Ramos, J. C. Fernandes, S. I. Silva, M. E. Pintado, and F. X. Malcata, “Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, no. 6, pp. 533-552, 2012.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [197] S. Kokoszka and A. Lenart, "Polish Journal of Food and Nutrition Sciences Edible Coatings-Formation, Characteristics and Use-a Review," *Pol. J. Food Nutr. Sci*, vol. 57, no. 4, pp. 399-404, 2007.
- [198] A. S. Rayees, A. M. Maqsood, A. al-T. Shaeel, and A. S. Muneer, "Chitosan as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits," *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 19, no. 2, pp. 139-155, 2013.
- [199] P. Sahariah and M. Másson, "Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship," *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 11, pp. 3846-3868, 2017.
- [200] E. I. Rabea, M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1457-1465, 2003.
- [201] Y. Peralta-Ruiz, C. D. G. Tovar, A. Sinning-Mangonez, E. A. Coronell, M. F. Marino, and C. Chaves-Lopez, "Reduction of postharvest quality loss and microbiological decay of tomato 'chonto' (*Solanum lycopersicum* L.) using chitosan-E essential oil-based edible coatings under low-temperature storage," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 8, 2020.
- [202] A. Perdones, L. Sánchez-González, A. Chiralt, and M. Vargas, "Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 70, pp. 32-41, 2012.
- [203] I. C. D. Guerra *et al.*, "The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 34, pp. 112-121, 2016.
- [204] A. E. Quirós-Sauceda, J. F. Ayala-Zavala, G. I. Olivas, and G. A. González-Aguilar, "Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 9, pp. 1674-1685, 2014.
- [205] E. Velickova, E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, V. D. Alves, and M. Moldão-Martins, "Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions," *Lwt*, vol. 52, no. 2, pp. 80-92, 2013.
- [206] D. Martínez-Romero *et al.*, "Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by Aloe vera treatment: A new edible coating," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 39, no. 1, pp. 93-100, 2006.
- [207] C. E. N. G. I. Z. Aday and M. S. Caner, "Understanding the effects of various edible coatings on the storability of fresh cherry," *Packag. Technol. Sci.*, vol.

- 23, no. 8, pp. 441-456, 2010.
- [208] M. Petriccione *et al.*, “The Effect of Chitosan Coating on the Quality and Nutraceutical Traits of Sweet Cherry During Postharvest Life,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 8, no. 2, pp. 394-408, 2015.
- [209] R. Severino, G. Ferrari, K. D. Vu, F. Donsì, S. Salmieri, and M. Lacroix, “Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on green beans,” *Food Control*, vol. 50, pp. 215-222, 2015.
- [210] F. X. Gião, M. S. González-Sanjósé, M. L. Rivero-Pérez, M. D. Pereira, C. I. Pintado, and M. E. Malcata, “Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 87, no. 14, pp. 2638-2647, 2007.
- [211] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv.,” *Food and Drug Administration*, 2001.
- [212] S. Alizadeh-Salteh, K. Arzani, R. Omidbeigi, and N. Safaie, “Essential oils inhibit mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*,” *Eur. J. Hortic. Sci.*, vol. 75, no. 6, pp. 278-282, 2010.
- [213] E. S. Santos *et al.*, “*Julbernardia paniculata* and *Pterocarpus angolensis*: From ethnobotanical surveys to phytochemical characterization and bioactivities evaluation,” *Molecules*, vol. 25, no. 8, 2020.
- [214] Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, ASTM D 882-02, 2002, ASTM International, Estados Unidos da América.
- [215] G. Kerch, “Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2, pp. 159-166, 2015.
- [216] Standard test method for water vapor transmission of materials, ASTM E96-95, 1995, ASTM International, Estados Unidos da América.
- [217] Z. Shen and D. P. Kamdem, “Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 289-296, 2015.
- [218] A. C. M. Godinho, “Revestimentos Comestíveis Bioativos Com Extrato de Carqueja: Aplicação na Conservação Pós-Colheita da Cereja,” PhD Thesis, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2014.
- [219] Microbiology of the food chain - horizontal method for the enumeration of microorganisms - part 2: colony count at 30°C by the surface plating technique, ISO 4833-2, 2013, International Organization for Standardization, Suíça.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [220] General rules for counting psychrotrophic microorganisms, NP 2307, 1987, Instituto Português da Qualidade, Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- [221] Mold and yeast count - part 1: incubation at 25°C, NP 3277-1, 1987, Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- [222] General rules for determination of Enterobacteriaceae without revitalization: most probable number (MPN) and colony counting techniques, NP 4137, 1991, Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- [223] J. A. Teixeira da Silva *et al.*, “Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions,” *Planta*, vol. 252, pp. 1-35, 2020.
- [224] M. A. Ramírez-Mosqueda, L. G. Iglesias-Andreu, and J. R. Bautista-Aguilar, “The Effect of Light Quality on Growth and Development of In Vitro Plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni,” *Sugar Tech*, vol. 19, no. 3, pp. 331-336, 2016.
- [225] M. Z. Rahman, S. M. Shahinul Islam, A. N. Chowdhury, and S. Subramaniam, “Efficient microtuber production of potato in modified nutrient spray bioreactor system,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 192, pp. 369-374, 2015.
- [226] I. Crişan *et al.*, “Current Trends for Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Crops and Products with Emphasis on Essential Oil Quality,” *Plants*, vol. 12, no. 2, 2023.
- [227] I. Spiridon, S. Colceru, N. Anghel, C. A. Teaca, R. Bodirlau, and A. Armatu, “Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 25, no. 17, pp. 1657-1661, 2011.
- [228] S. Robu, A. C. Aprotosoiaie, A. Miron, O. Cioancă, U. Stănescu, and M. Hăncianu, “*In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species cultivated in Romania,” *Farmacía*, vol. 60, no. 3, pp. 394-401, 2012.
- [229] A. Mammeri *et al.*, “Total phenolic contents, in vitro antioxidant activity, enzymes inhibition and anti-inflammatory effect of the selective extracts from the Algerian *Lavandula multifida*,” *Acta Pharm. Sci.*, vol. 60, no. 1, pp. 1-23, 2022.
- [230] I. Mansinhos, S. Gonçalves, R. Rodríguez-Solana, J. L. Ordóñez-Díaz, J. M. Moreno-Rojas, and A. Romano, “Impact of Temperature on Phenolic and Osmolyte Contents in *In Vitro* Cultures and Micropropagated Plants of Two Mediterranean Plant Species, *Lavandula viridis* and *Thymus lotocephalus*,” *Plants*, vol. 11, no. 24, 2022.
- [231] Â. Luís, F. Domingues, C. Gil, and A. P. Duarte, “Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica*

- spp.," *J. Med. Plants Res.*, vol. 3, no. 11, pp. 886-893, 2009.
- [232] S. Piccolella, G. Crescente, F. Pacifico, and S. Pacifico, "Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly)phenol seasonality? A case study from Mediterranean area," *Phytochem. Rev.*, vol. 17, no. 4, pp. 785-799, 2018.
- [233] I. Smetanska, "Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures," in *Stahl, U., Donalies, U.E., Nevoigt, E. (eds) Food Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 111.*, Springer, Ed. Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 187-228.
- [234] M. F. Lemos *et al.*, "Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*," *Ind. Crops Prod.*, vol. 95, pp. 543-548, 2017.
- [235] A. K. Jugran, S. Rawat, I. D. Bhatt, and R. S. Rawal, "Essential oil composition, phenolics and antioxidant activities of *Valeriana jatamansi* at different phenological stages," *Plant Biosyst.*, vol. 155, no. 4, pp. 891-898, 2021.
- [236] I. H. Sellami, E. Maamouri, T. Chahed, W. A. Wannes, M. E. Kchouk, and B. Marzouk, "Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 30, no. 3, pp. 395-402, 2009.
- [237] B. Héral, É. Stierlin, X. Fernandez, and T. Michel, "Phytochemicals from the genus *Lavandula*: a review," *Phytochem. Rev.*, vol. 20, no. 4, pp. 751-771, 2020.
- [238] J. Domingues, F. Delgado, J. C. Gonçalves, M. Zuzarte, and A. P. Duarte, "Mediterranean Lavenders from Section *Stoechas*: An Undervalued Source of Secondary Metabolites with Pharmacological Potential," *Metabolites*, vol. 13, no. 3, 2023.
- [239] L. Zhang, Q. F. Su, L. S. Wang, M. W. Lv, Y. X. Hou, and S. S. Li, "Linalool: A ubiquitous floral volatile mediating the communication between plants and insects," *J. Syst. Evol.*, vol. 61, no. 3, pp. 538-549, 2022.
- [240] R. Nurzyńska-Wierdak and G. Zawiślak, "Chemical Composition And Antioxidant Activity Of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) aboveground parts," *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, vol. 15, no. 5, pp. 225-241, 2016.
- [241] O. Toncer, S. Karaman, E. Diraz, and S. Tansi, "Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different phenological stages in semi-arid environmental conditions," *Fresenius Environ. Bull.*, vol. 26, no. 8, pp. 5441-5446, 2017.
- [242] W. Aidi Wannes, B. Mhamdi, and B. Marzouk, "GC comparative analysis of leaf essential oils from two myrtle varieties at different phenological stages," *Chromatographia*, vol. 69, no. 1-2, pp. 145-150, 2009.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [243] S. Kholiya *et al.*, “Essential oil yield and composition of *Ocimum basilicum* L. at different phenological stages, plant density and post-harvest drying methods,” *South African J. Bot.*, vol. 151, pp. 919-925, 2022.
- [244] J. K. Zhu, “Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants,” *Cell*, vol. 167, no. 2, pp. 313-324, 2016.
- [245] D. A. T. Boncan *et al.*, “Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 19, pp. 1-19, 2020.
- [246] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M. R. Sussman, and H. Wu, “The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 148, no. January, pp. 80-89, 2020.
- [247] Y. Guitton *et al.*, “Lavender inflorescence: A model to study regulation of terpenes synthesis,” *Plant Signal. Behav.*, vol. 5, no. 6, pp. 749-751, 2010.
- [248] V. R. Lopes, F. Rocha, C. Gaspar, and A. M. Barata, “Contribution to *ex situ* conservation of wild *Lavandula* populations in Portugal,” no. May 2017, pp. 1-2, 2015.
- [249] K. Yazaki, G. I. Arimura, and T. Ohnishi, “‘Hidden’ terpenoids in plants: Their biosynthesis, localization and ecological roles,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 58, no. 10, pp. 1615-1621, 2017.
- [250] A. Krol *et al.*, “Evaluation of the yield, chemical composition and biological properties of essential oil from bioreactor-grown cultures of *Salvia apiana* microshoots,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 1-15, 2023.
- [251] D. Andrys and D. Kulpa, “*In Vitro* propagation affects the composition of narrow-leaved lavender essential oils,” *Acta Chromatogr.*, vol. 30, no. 4, pp. 225-230, 2018.
- [252] P. Avato, I. M. Fortunato, C. Ruta, and R. D’Elia, “Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L.,” *Plant Sci.*, vol. 169, no. 1, pp. 29-36, 2005.
- [253] N. Mokhtarzadeh, S. Demirci, B. Agalar, H. Khawar, and K. Kirimer, “*In vitro* propagation and volatile compound characterization of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas*-an economically important source of essential oil.,” *Rec. Nat. Prod.*, vol. 13, no. 2, 2019.
- [254] K. A. Wojtunik-Kulesza, “Toxicity of Selected Monoterpenes and Essential Oils Rich in These Compounds,” *Molecules*, vol. 27, no. 5, 2022.
- [255] H. Kirmizibekmez, B. Demirci, E. Yeşilada, K. H. C. Başer, and F. Demirci, “Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Growing Wild in Turkey,” *Nat. Prod.*

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- Commun.*, vol. 4, no. 7, p. 1934578X0900400, Jul. 2009.
- [256] O. Tzakou, I. Bazos, and A. Yannitsaros, “Essential Oil Composition and Enantiomeric Distribution of Fenchone and Camphor of *Lavandula cariensis* and *L. stoechas* subsp. *stoechas* grown in Greece,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 4, no. 8, p. 1934578X0900400, Aug. 2009.
- [257] A. Carrasco, V. Ortiz-Ruiz, R. Martinez-Gutierrez, V. Tomas, and J. Tudela, “*Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography-mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 73, pp. 16-27, 2015.
- [258] S. La Bella *et al.*, “Composition and variability of the essential oil of the flowers of *Lavandula stoechas* from various geographical sources,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 10, no. 11, pp. 2001-2004, 2015.
- [259] G. Farré-Armengol, M. Fernández-Martínez, I. Filella, R. R. Junker, and J. Peñuelas, “Deciphering the Biotic and Climatic Factors That Influence Floral Scents: A Systematic Review of Floral Volatile Emissions,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, no. July, pp. 1-16, 2020.
- [260] S. Mehalaine and H. Chenchouni, “Quantifying how climatic factors influence essential oil yield in wild-growing plants,” *Arab. J. Geosci.*, vol. 14, no. 13, 2021.
- [261] C. Messaoud, H. Chograni, and M. Boussaid, “Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula* L. species,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 26, no. 21, pp. 1976-1984, 2012.
- [262] K. Dobros, N. Zawada, and K. Paradowska, “Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of *Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia* Cultivars Extracted with Different Methods,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 4, p. 711, 2022.
- [263] H. H. Orak, H. Yagar, S. S. Isbilir, A. Ş. Demirci, T. Gümüş, and N. Ekinçi, “Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1249-1256, 2011.
- [264] Y. Huang, S. H. Flint, and J. S. Palmer, “*Bacillus cereus* spores and toxins - The potential role of biofilms,” *Food Microbiol.*, vol. 90, no. March, p. 103493, 2020.
- [265] C. M. B. S. Pintado, M. A. S. S. Ferreira, and I. Sousa, “Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin,” *Food Control*, vol. 21, no. 3, pp. 240-246, 2010.

## Capítulo 5 - Referências bibliográficas

---

- [266] Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity, ISO 10993-5, 2009, International Organization for Standardization, Suíça.
- [267] R. Awaluddin, D. A. A. Nugrahaningsih, E. N. Solikhah, and L. Chabib, "The Effect of Asiatic Acid and Metformin on the Viability Percentage of Mouse Macrophage Cell Lines RAW264.7 and Mouse Fibroblast Cell Lines NIH3T3," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 448, no. 1, 2020.
- [268] D. S. Han, J. H. Seo, G. H. Park, I. M. Kim, and G. N. Lee, "Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions," *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 6, pp. E290-E296, 2006.
- [269] M. Anker, J. Berntsen, A. M. Hermansson, and M. Stading, "Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 3, no. 1, pp. 81-92, 2002.
- [270] L. Farris, S. Introzzi, and L. Piergiovanni, "Evaluation of a bio-coating as a solution to improve barrier, friction and optical properties of plastic films," *Packag. Technol. Sci. An Int. J.*, vol. 22, no. 2, pp. 69-83, 2009.
- [271] M. Chiumarelli and M. D. Hubinger, "Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid," *Food Hydrocoll.*, vol. 38, pp. 20-27, 2014.
- [272] G. Yuan, X. Chen, and D. Li, "Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems," *Food Res. Int.*, vol. 89, pp. 117-128, 2016.
- [273] M. I. Perdana, J. Ruamcharoen, S. Panphon, and M. Leelakriangsak, "Antimicrobial activity and physical properties of starch/chitosan film incorporated with lemongrass essential oil and its application," *Lwt*, vol. 141, no. July 2020, 2021.
- [274] J. Domingues, M. Goulão, M. Coelho, J. Gonçalves, and C. S. Pintado, "Different postharvest storage conditions of *Arbutus unedo* L. fruits, and their physicochemical and microbiological characterisation," *Int. Food Res. J.*, vol. 29, no. 1, pp. 32-41, 2022.
- [275] T. Blessington, E. J. Mitcham, and L. J. Harris, "Growth and survival of enterobacteriaceae and inoculated *Salmonella* on walnut hulls and maturing walnut fruit," *J. Food Prot.*, vol. 77, no. 9, pp. 1462-1470, 2014.
- [276] L. M. Johnston, L. A. Jaykus, D. Moll, J. Anciso, B. Mora, and C. L. Moe, "A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 112, no. 2, pp. 83-95, 2005.
- [277] M. O. Moss, "Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables," *J.*

- Appl. Microbiol.*, vol. 104, no. 5, pp. 1239-1243, 2008.
- [278] K. R. Aneja, R. Dhiman, N. K. Aggarwal, and A. Aneja, “Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices,” *Int. J. Microbiol.*, vol. 2014, 2014.
- [279] A. Robiglio, M. C. Sosa, M. C. Lutz, C. A. Lopes, and M. P. Sangorrín, “Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 147, no. 3, pp. 211-216, 2011.
- [280] B. Ramos, F. A. Miller, T. R. S. Brandão, P. Teixeira, and C. L. M. Silva, “Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 20, pp. 1-15, 2013.
- [281] G. T. Gündüz, A. Korkmaz, Z. Öztürk, and I. Emenli, “Fungal microflora in dried persimmon fruits,” *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods*, vol. 12, no. 1, pp. 50-56, 2020.
- [282] R. A. Samson, J. A. M. P. Houbroken, A. F. A. Kuijpers, J. M. Frank, and J. C. Frisvad, “New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*,” *Stud. Mycol.*, vol. 50, no. 1, pp. 45-61, 2004.
- [283] T. C. Vesth *et al.*, “Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*,” *Nat. Genet.*, vol. 50, no. 12, pp. 1688-1695, 2018.
- [284] N. A. Matrose, K. Obikeze, Z. A. Belay, and O. J. Caleb, “Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review,” *Food Biosci.*, vol. 41, no. December 2020, pp. 100840, 2021.
- [285] F. E. Vega, F. Posada, S. W. Peterson, T. J. Gianfagna, and F. Chaves, “*Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production ,” *Mycologia*, vol. 98, no. 1, pp. 31-42, 2006.
- [286] P. Tryfinopoulou, A. Chourdaki, G. J. E. Nychas, and E. Z. Panagou, “Competitive yeast action against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 317, no. April 2019, p. 108460, 2020.
- [287] L. R. Cardoso, B. Silvério, S. I. C. Abrunhosa, L. Teixeira, and J. A. Rodrigues, “B-galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: production, characterization and potential application in prebiotic synthesis.,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 257, pp. 67-74, 2016.
- [288] D. Bozoudi and D. Tsaltas, “The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector,” *Fermentation*, vol. 4, no. 4, pp. 1-15,

- 2018.
- [289] I. S. Pantelides, O. Christou, M. D. Tsolakidou, D. Tsaltas, and N. Ioannou, “Isolation, identification and *in vitro* screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes,” *Biol. Control*, vol. 88, pp. 46-53, 2015.
- [290] L. Parafati, A. Vitale, C. Restuccia, and G. Cirvilleri, “Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape,” *Food Microbiol.*, vol. 47, pp. 85-92, 2015.
- [291] G. J. Li *et al.*, “Fungal diversity notes 253-366: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa,” *Fungal Divers.*, vol. 78, no. 1, pp. 1-237, 2016.
- [292] M. Mirabdollahi Shamsi, M. Akbarinia, M. Mirabolfathy, S. Manzari, and A. Ahmadikhah, “Dieback and decline of wild almond (*Amygdalus scoparia* Spach) in the Harat protected forest of Yazd Province, Iran,” *For. Pathol.*, vol. 49, no. 5, pp. 1-14, 2019.

**Capítulo 6 - Apêndices**

---



## Apêndice 1

Tabela 31. Formulação e constituintes do meio Murashige e Skoog (MS) usado na fase de multiplicação de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *P. tridentatum*.

Constituintes (mg/L)	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	<i>P. tridentatum</i>
<b>Macronutrientes</b>		
KNO <sub>3</sub>	1900	1900
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	1650	1650
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
<b>Micronutrientes</b>		
SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O	27,850	27,850
Na <sub>2</sub> EDTA	37,250	37,250
SO <sub>4</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O	22,300	22,300
SO <sub>4</sub> Zn.7H <sub>2</sub> O	8,600	8,600
SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Cl <sub>2</sub> Co.6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
KI	0,830	0,830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	6,200
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250	0,250
<b>Vitaminas</b>		
m-Inositol	100	100
Tiamina	1	0,1
Ácido nicotínico	1	0,5
Piridoxina	1	0,5
Glicina	-	2
Ácido ascórbico	1	-
Pantotenato de cálcio	1	-
<b>Reguladores de crescimento</b>		
BAP	0,2	1
AIB	-	0,5



## Apêndice 2

Tabela 32. Caracterização das variáveis bioclimáticas selecionadas.

Local	Índice de continentalidade <sup>1</sup>	Índice ombrotérmico <sup>1</sup>	Precipitação anual (mm) <sup>2</sup>	Isotermalidade <sup>2</sup>	Temperatura máxima (°C) <sup>2</sup>	Altitude (m)
Serra da Malcata	16,00	5,07	871	35	28,3	558
Penha Garcia	16,00	4,26	784	35	30,6	492
Castelo Branco	15,6	4,3	862	36	31,2	336
Oleiros	14,37	7,71	1102	36	28,5	654
Proença-a-Nova	14,43	6,59	944	37	29,9	410
Vila de Rei	13,77	6,86	943	39	29,2	425
Vila Velha de Ródão	15,44	3,90	772	38	31,9	141
Ocreza	15,55	4,28	842	36	31,5	318

Índice de continentalidade= Temperatura média do mês mais quente - Temperatura média do mês mais frio; Índice ombrotérmico=  $10 \times (\text{Precipitação positiva anual} / \text{Temperatura positiva anual})$ ; Precipitação anual: soma da precipitação total dos meses do ano; Isotermalidade=  $(\text{temperatura média máxima mensal} - \text{temperatura média mínima mensal}) / (\text{temperatura máxima do mês mais quente} - \text{temperatura máxima do mês mais frio}) \times 100$ . <sup>1</sup>Monteiro-Henriques T, Martins MJ, Cerdeira JO, Silva PC, Arsénio P, Silva Á, Bellu A, Costa JC 2016. Bioclimatological mapping tackling uncertainty propagation: application to mainland Portugal. *International Journal of Climatology* 36(1): 400-411. doi:10.1002/joc.4357. <sup>2</sup>Fick, S.E. and R.J. Hijmans, 2017. WorldClim 2: new 1km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 37 (12): 4302-4315.



## Apêndice 3

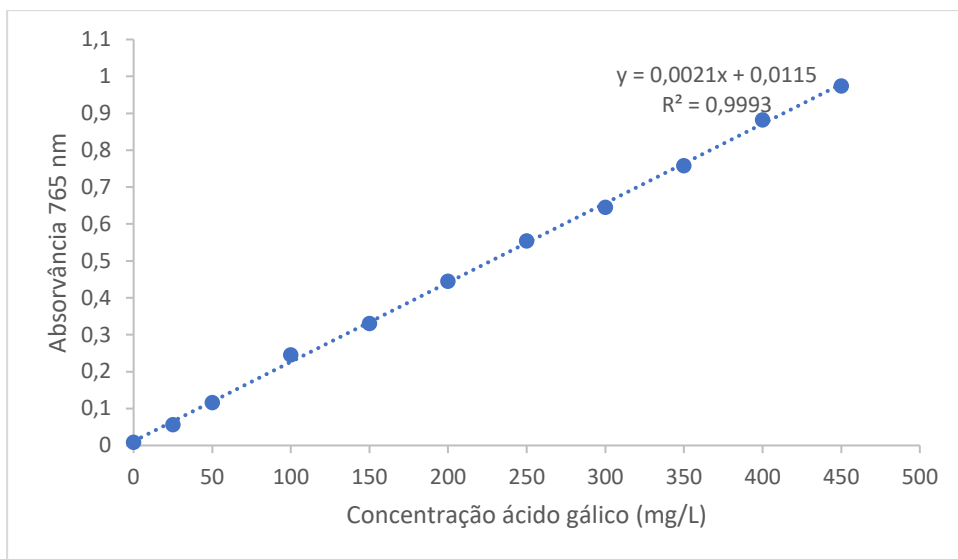


Figura 48. Curva de calibração do ácido gálico.

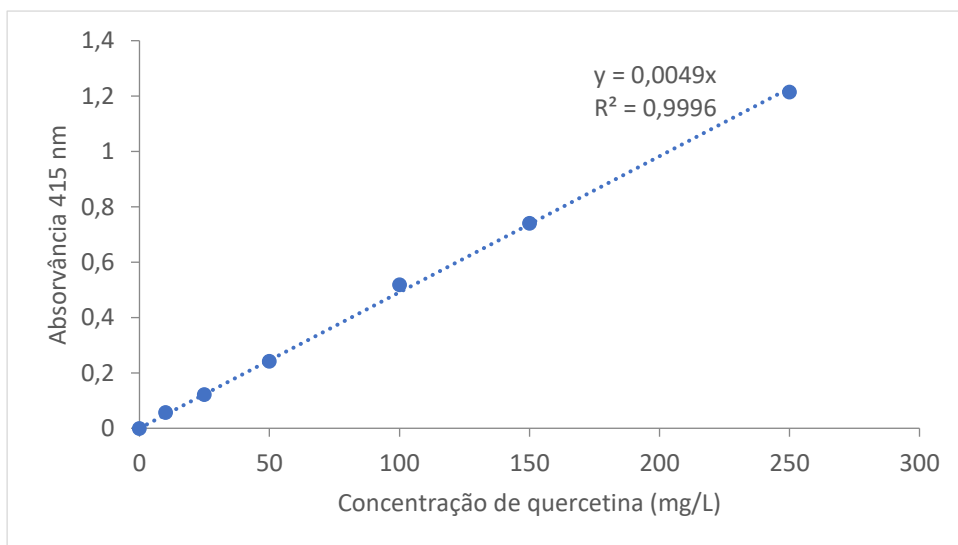


Figura 49. Curva de calibração da quercetina.

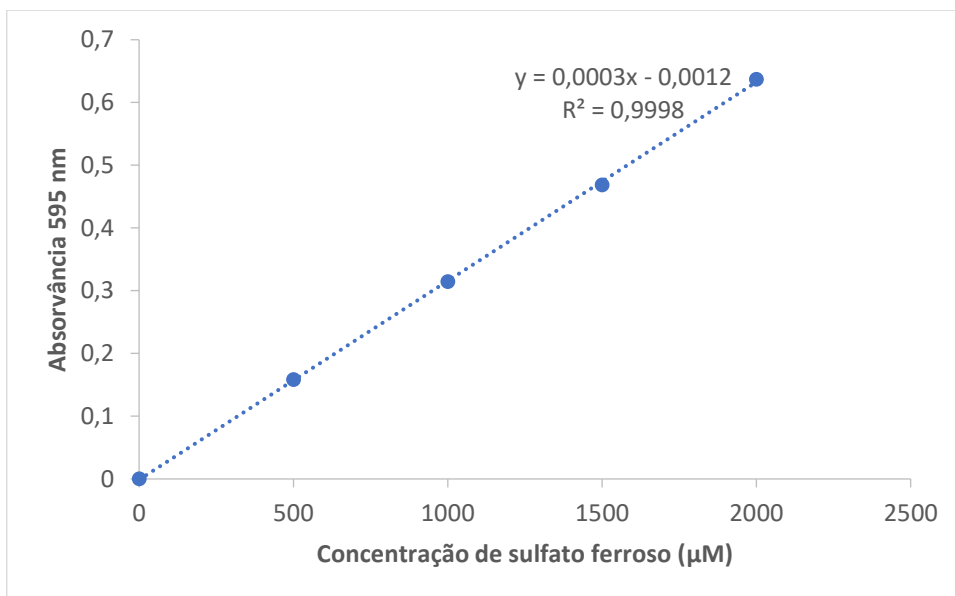


Figura 50. Curva de calibração do sulfato ferroso.

## Apêndice 4

Tabela 33. Screening da atividade antimicrobiana inibitória de extratos e OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *P. tridentatum*.

Microrganismos	OEF		EALsl50		EALsl100		EAPt50		EAPt100		CP*		CN	
	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G	D
<i>Aeromonas hydrophila</i>	IT	IT	SI	SI	IP	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
<i>Bacillus cereus</i>	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
<i>Burkholderia</i> sp.	IT	IP	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>Chromobacterium violaceum</i>	IT	IT	IT	IT	IT	IT	SI	SI	IT	IT	IT	IT	SI	SI
<i>Listeria monocytogenes</i>	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	IP	IP	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
<i>P. aeruginosa</i> isolado	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>Salmonella</i> sp.	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
<i>Serratia marcescens</i>	IP	IP	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
<i>Staphylococcus coagulase+</i>	IT	IT	SI	SI	IP	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
<i>Candida albicans</i>	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.11	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.13	IT	IT	IP	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.38	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.45	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.47	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.48	IT	IT	IP	SI	SI	SI	SI	SI	IP	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.54	IT	IT	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.64	IT	IT	SI	SI	IP	SI	SI	SI	IP	SI	IT	IT	SI	SI
ESA.M.99	IT	IT	SI	SI	IP	SI	SI	SI	IP	SI	IT	IT	SI	SI

OEF: óleo essencial de Lsl floração; EALsl50: extrato aquoso de Lsl [50 mg/mL]; EALsl100: extrato aquoso de Lsl [100 mg/mL]; EAPt50: extrato aquoso de Pt [50 mg/mL]; EAPt100: extrato aquoso de Pt [100 mg/mL]; IT: inibição total; IP: inibição parcial; SI: sem inibição; CP\*: cloranfenicol 0,1% (bactérias) e natamicina 0,2% (fungos); CN: soro fisiológico.



## Apêndice 5

Tabela 34. Identificação e correspondência dos microrganismos isolados de medronho com a referência ESA-IPCB e número MUM.

Microorganismos	Referência ESA-IPCB	Access number MUM
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.11	19.92
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.28	19.93
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.52	19.95
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.59	19.96
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.29	19.100
<i>Alternaria</i> secção <i>Alternata</i>	ESA.M.86	19.102
<i>Alternaria</i> secção <i>Infectoriae</i>	ESA.M.84	19.101
<i>Alternaria</i> secção <i>Ulocladioides</i>	ESA.M.50	19.94
<i>Aspergillus carbonarius</i>	ESA.M.51	19.99
<i>Aspergillus carbonarius</i>	ESA.M.55	19.116
<i>Aspergillus</i> sp.	ESA.M.45	19.98
<i>Aspergillus</i> sp.	ESA.M.38	19.97
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	ESA.M.15	19.122
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.35	19.03
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.64	19.04
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.04	19.121
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.24	19.123
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.33	19.124
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.34	19.125
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.36	19.126
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.46	19.127
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.57	19.128
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.68	19.129
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.72	19.130
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.75	19.131
<i>Aureobasidium</i> sp.	ESA.M.79	19.132
<i>Caprinopsis spilospora</i>	ESA.M.91	20.36
<i>Caprinopsis spilospora</i>	ESA.M.93	20.37
<i>Cladosporium</i> complexo <i>cladosporioides</i>	ESA.M.20	20.01
<i>Cladosporium</i> complexo <i>cladosporioides</i>	ESA.M.25	20.02
<i>Cladosporium</i> complexo <i>cladosporioides</i>	ESA.M.87	20.04
<i>Cladosporium</i> complexo <i>cladosporioides</i>	ESA.M.96	20.05
<i>Cladosporium halotolerans</i>	ESA.M.61	20.03
<i>Epicoccum</i> sp.	ESA.M.10	20.39
<i>Epicoccum</i> sp.	ESA.M.32	20.40
<i>Epicoccum</i> sp.	ESA.M.88	20.41
<i>Hanseniaspora</i> sp.	ESA.M.93	20.06
<i>Hanseniaspora</i> sp.	ESA.M.95	20.07
<i>Hanseniaspora</i> sp.	ESA.M.98	20.08
<i>Hanseniaspora</i> sp.	ESA.M.99	20.09

## Capítulo 6 - Apêndices

---

<i>Metschnikowia sinensis</i>	ESA.M.62	20.95
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ESA.M.47	20.96
<i>Mucor racemosus</i>	ESA.M.65	20.34
<i>Mucor racemosus</i>	ESA.M.67	20.35
<i>Penicillium brevicompactum</i>	ESA.M.60	19.06
<i>Penicillium crustosum</i>	ESA.M.42	19.118
<i>Penicillium crustosum</i>	ESA.M.48	19.119
<i>Penicillium glabrum</i>	ESA.M.54	19.120
<i>Penicillium simile</i>	ESA.M.13	19.117
<i>Phoma</i> sp.	ESA.M.09	20.38
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ESA.M.44	19.02
<i>Sacrothecium rubi</i>	ESA.M.05	20.51
<i>Sacrothecium rubi</i>	ESA.M.06	20.52
<i>Sacrothecium rubi</i>	ESA.M.37	20.53
<i>Sacrothecium rubi</i>	ESA.M.73	20.54
<i>Sacrothecium rubi</i>	ESA.M.89	19.01
<i>Stemphylium</i> sp.	ESA.M.31	20.97

---