

Avaliação da bioatividade de extratos de plantas e do seu potencial como ingredientes cosméticos, com vista à sua aplicação na pele

Carolina Proença Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Joana Rita Gonçalves Araujo Rolo Mateus
Coorientador: Mestre Ana Sofia Domingues Oliveira

Junho de 2022

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Carolina Proença Gomes, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10720 do Mestrado de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridade da Universidade da Beira Interior**.

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

Universidade da Beira Interior, Covilhã 01/06/2022

Carolina Proença Gomes

Carolina Proença Gomes

Folha em branco

Agradecimentos

Esta etapa não teria sido finalizada sem o apoio de todos aqueles que estiveram presentes ao longo do meu percurso.

Agradeço à minha orientadora, Professora Joana Rolo, por me ter aberto as portas a realização desta tese. Muito obrigada por toda ajuda, transmissão de conhecimentos, colaboração, pela energia positiva e confiança que sempre me transmitiu.

Agradeço à minha coorientadora, Ana Oliveira, pelos conhecimentos transmitidos, pela dedicação, pela confiança que teve em mim e acima de tudo pela amizade. Obrigada pela persistência, para que eu faça sempre mais e melhor.

Agradeço a todo o grupo, pela entreatajuda, oportunidades que me foram dadas e pelo despertar pelo conhecimento científico. Aos colegas de laboratório de Microbiologia II obrigada pela companhia e por toda a ajuda.

Agradeço também ao projeto com o qual esta dissertação contou com o apoio, nomeadamente o "projeto INOVEP – Inovação com Extratos de Plantas", projetos I&DT para empresas em colaboração com entidades científicas, projeto número 33815, Centro2020. Este trabalho foi também financiado por verbas do financiamento base (UIDB/00709/2020) e do financiamento programático (UIDP/00709/2020) do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), com fundos nacionais inscritos no orçamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, que todos os dias fazem de mim uma pessoa melhor e mais completa. Obrigada, pela confiança e amor que depositam em mim, não poderia ter tido mais sorte.

Agradeço também ao David, pela paciência, amor e dedicação.

Por fim agradeço aos meus amigos que me acompanharam ao longo destes anos, aos de sempre e em especial a quem me acompanhou nesta aventura Bárbara, Daniela, Margarida e Emanuel.

Folha em branco

Resumo

As mudanças que têm ocorrido no nosso planeta têm aumentado a consciência ambiental do consumidor. Este tem-se preocupado cada vez mais com a sustentabilidade e isso reflete-se, por exemplo, na escolha de cosméticos, sendo o consumo sustentável um conceito cada vez mais presente nas nossas vidas. Nesse sentido, o uso de hidrolatos de plantas aromáticas e medicinais tem ganho destaque na indústria, devido ao facto destes subprodutos possuírem diversas propriedades benéficas à saúde humana. No entanto, a bioatividade de hidrolatos não tem sido largamente estudada, sendo dada ênfase ao estudo dos óleos essenciais. Para valorizar o uso de hidrolatos como ingredientes cosméticos, durante o trabalho desta dissertação avaliámos as propriedades de oito hidrolatos distintos e um extrato aquoso, pertencentes a diversas famílias de plantas, relativamente ao seu potencial antifúngico, anti-inflamatório e à sua biocompatibilidade *in vitro* com células da pele.

Para isso avaliou-se a viabilidade celular em macrófagos de ratinho e queratinócitos humanos, quando expostos aos diferentes hidrolatos e extrato aquoso. A atividade anti-inflamatória foi avaliada nos macrófagos, através da quantificação da produção de óxido nítrico (NO) após estimulação com lipopolissacarídeo (LPS). A levedura *Candida albicans* e o fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis* foram utilizados para avaliar a atividade antifúngica dos extratos. A concentração mínima inibitória (CMI) foi avaliada pelo método de microdiluição e posteriormente a concentração mínima letal (CML) foi determinada.

Os resultados demonstraram que o hidrolato de *Helichrysum italicum* foi o mais biocompatível tendo o de *Thymbra capitata* sido o menos biocompatível, em ambas as linhas celulares. A diminuição da produção de NO foi semelhante para todos os extratos, apresentando resultados com perfil dose-resposta, o que ocorreu de forma semelhante nos testes de viabilidade celular. Nos ensaios de atividade antifúngica, apenas o hidrolato de *Thymbra capitata* apresentou CMI visual em ambos os microrganismos, ocorrendo inibição completa do crescimento nas maiores concentrações testadas.

Com este trabalho conclui-se que o estudo dos hidrolatos deve ser aprofundado devido às suas inúmeras propriedades, nomeadamente a atividade anti-inflamatória aliada a uma baixa toxicidade celular. O potencial antifúngico também foi demonstrado, mas apenas em concentrações mais altas.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Assim, conclui-se que os hidrolatos têm potencial como ingredientes cosméticos, uma vez que retêm algumas das bioatividades dos respectivos óleos essenciais, com a vantagem de apresentarem uma baixa citotoxicidade.

Palavras-chave

Atividade anti-inflamatória; Atividade antimicrobiana; Hidrolatos; Macrófagos; Queratinócitos; Viabilidade celular.

Folha em branco

Folha em branco

Abstract

The changes that have occurred on our planet have increased the environmental awareness of the consumer, which have become increasingly concerned with sustainability. Sustainable consumption is a concept increasingly present in our lives and this is reflected, for example, in the consumers' choice of cosmetic products. In this sense, the use of plant hydrolates has gained prominence in different fields, including the pharmaceutical and cosmetic industries, since these by-products can present many beneficial properties to our health. However, the bioactivity of hydrolates has not been widely studied, as the majority of the studies focus on the characterization of essential oils. During this dissertation we evaluated the bioactive properties of eight distinct hydrolates and one aqueous extract from several families, focusing on their antifungal, anti-inflammatory, and biocompatible potential, thus highlighting their potential use for skin applications.

Cell biocompatibility of the plant extracts was evaluated in macrophages and keratinocytes, through MTT assay. Anti-inflammatory activity was evaluated in macrophages, by measuring the production of NO, after a pro-inflammatory stimulus with LPS. *Candida albicans* yeast and filamentous fungus *Aspergillus brasiliensis* were used to evaluate the antifungal activity of the extracts. The minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated by the microdilution method and then the minimum lethal concentration (MLC) was determined.

Overall, the results showed that *Helichrysum italicum* was the most biocompatible hydrolate and the least biocompatible was the one from *Thymbra capitata* hydrolate, in both cell lines. The decrease in NO production was consensual in all extracts, presenting a dose-response profile, like cell viability results. Regarding antifungal activity, only *Thymbra capitata* hydrolate showed a visual MIC for both microorganisms, with the complete growth inhibition occurring only at the highest tested concentration.

The study of hydrolates should be deepened due to their numerous properties, as their anti-inflammatory activity combined with reduced cellular toxicity. Antifungal potential has also been demonstrated, but only at higher concentrations. It is then concluded that hydrolates have a great potential as cosmetic ingredients, since they retain some of the bioactivities present in essential oils combined with low cytotoxicity.

Keywords

Anti-inflammatory activity; Antimicrobial activity; Cell viability; Hydrolates; Keratinocytes; Macrophages

Folha em branco

Folha em branco

Índice

1. Introdução	1
1.1. Doenças tópicas causadas por fungos.....	2
1.2. Produtos terapêuticos e cosméticos à base de plantas	4
1.2.1. Aplicação como agentes antimicrobianos	5
1.2.2. Aplicação como agentes anti-inflamatórios	5
1.2.3. Atividade Citotóxica de extratos de plantas	6
1.3. Hidrolatos como subproduto da hidrodestilação	6
1.3.1. Aplicações dos hidrolatos	7
1.4. Espécies de plantas com interesse na terapêutica e/ou cosmética	7
1.4.1. Família Asteraceae.....	8
1.4.2. Família Lamiaceae	10
1.4.3. Família Hamamelidaceae	11
1.4.4. Família Cupressaceae	11
1.4.5. Família Cistaceae	12
1.4.6. Família Orobanchaceae	12
2. Objetivo.....	14
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Hidrolatos e extrato aquoso.....	17
3.2. Análise fitoquímica	17
3.2.1. Hidrolatos	17
3.2.2. Extrato aquoso	18
3.3. Determinação da viabilidade celular	18
3.3.1. Células.....	19
3.3.2. Cultura e manutenção das linhas celulares	19
3.3.3. Metodologia do ensaio de MTT	21
3.3.4. Tratamento de resultados	24
3.4. Determinação da atividade anti-inflamatória	25
3.4.1. Produção de Óxido Nítrico	25
3.4.1.1. Metodologia do ensaio de quantificação da produção de óxido nítrico	25
3.4.1.2. Tratamento de resultados	28
3.4.2. Determinação da Atividade <i>Scavenging</i>	28

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

3.4.2.1. Metodologia para a determinação da atividade <i>Scavenging</i>	29
3.4.3. Tratamento de resultados	30
3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	31
3.5.1. Microrganismos	31
3.5.2. Metodologia para determinação da atividade antifúngica.....	32
3.5.2.1. Contra <i>Aspergillus brasiliensis</i> – fungo filamentosos.....	32
3.5.2.2. Contra <i>Candida albicans</i> - levedura	33
3.5.3. Tratamento de resultados	35
4. Resultados	37
4.1. Análise fitoquímica	37
4.2. Atividade citotóxica dos hidrolatos e extrato aquoso	38
4.2.1. Biocompatibilidade em queratinócitos humanos (HaCaT)	38
4.2.2. Biocompatibilidade com macrófagos de ratinho (RAW 264.7)	41
4.3. Atividade anti-inflamatória dos hidrolatos e extrato aquoso	44
4.3.1. Influência dos extratos na produção de óxido nítrico.....	44
4.3.2. Atividade <i>Scavenging</i>	47
4.4. Comparação dos valores de EC ₅₀ e IC ₅₀	49
4.5. Atividade antimicrobiana.....	51
4.5.1. <i>Aspergillus brasiliensis</i>	51
4.5.2. <i>Candida albicans</i>	53
5. Discussão	56
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	69
7. Referências Bibliográficas	71
8. Apêndice I – Atividade <i>Scavenging</i>	83
9. Apêndice II – Concentração necessária de extrato para inibir 50 % da viabilidade celular	84
10. Apêndice III – Concentração de extrato para a qual 50% da população apresenta resposta após um período de tempo específico	88
11. Anexo I –Relatórios de Análise Cromatográfica	90

Folha em branco

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 - Imagem ilustrativa de todas as espécies de plantas estudadas durante a realização deste trabalho, imagens retiradas do site do projeto INOVEP: Inovação com Extratos de Plantas [114].

Figura 2- Digrama representativo da reação de conversão do sal tetrazólio (MTT) em formazan, adaptado de [74].

Figura 3 - Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de MTT, elaborado no programa BioRender.

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de quantificação da atividade anti-inflamatória.

Figura 5 - Representação esquemática da placa de 96 poços, utilizada no ensaio *Scavenging*.

Figura 6 - Representação esquemática dos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana

Figura 7- Efeito dos hidrolatos da família Lamiaceae na viabilidade celular de queratinócitos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controlo negativo e com SDS (2%) como controlo positivo de citotoxicidade. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 8 - Efeito dos hidrolatos da família Asteraceae na viabilidade celular de queratinócitos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controlo negativo e com SDS (2%) como controlo positivo de citotoxicidade. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 9 - Efeito dos hidrolatos da família Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidaceae e do extrato aquoso Orobanchaceae na viabilidade celular de queratinócitos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de hidrolatos com meio DMEM como controlo negativo e com SDS (2%) como controlo positivo de citotoxicidade. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 10 - Gráfico representativo dos valores de viabilidade nos controlos de solvente e ao controlo de viabilidade utilizado nos ensaios de citotoxicidade das células HaCaT.

Figura 11 - Efeito dos hidrolatos da família Lamiaceae na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controle negativo e com SDS a 1% como controle positivo (morte celular). * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 12 - Efeito dos hidrolatos da família Asteraceae na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controle negativo e com SDS a 1% como controle positivo (morte celular). * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 13 - Efeito dos hidrolatos da família Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidacea e do extrato aquoso Orobanchaceae na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controle negativo e com SDS a 1% como controle positivo (morte celular). * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 14 - Gráfico representativo dos valores de viabilidade nos controles de solvente e ao controle de viabilidade utilizado nos ensaios de citotoxicidade das células RAW 264.7.

Figura 15 - Efeito dos hidrolatos da família Lamiaceae na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de controle expostas ao LPS. Também foi incluído controle sem LPS para avaliar a produção basal de NO. * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 16 - Efeito dos hidrolatos da família Asteraceae na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de controle expostas ao LPS. Também foi incluído controle sem LPS para avaliar a produção basal de NO. * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 17 - Efeito dos hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidacea e do extrato aquoso Orobanchaceae na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de controle expostas ao LPS. Também foi incluído

controlo sem LPS para avaliar a produção basal de NO. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Figura 18 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Aspergillus brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Lamiaceae. O controlo contém apenas o fungo com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Figura 19- Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Aspergillus brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Asteraceae. O controlo contém apenas o fungo com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Figura 20 – Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Aspergillus brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e Hamamelidaceae. O controlo contém apenas o fungo com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Figura 21 - Representação de um ensaio de determinação de CML, em placa de PDA, onde foram plaqueada as suspensões obtidas com as concentrações do extrato imediatamente superiores e inferiores da CMI determinada visualmente. Verifica-se que ocorreu crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* para as concentrações plaqueadas, com exceção de 50% que foi assumida como CML.

Figura 23 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Asteraceae. O controlo contém apenas a levedura com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Figura 22 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Lamiaceae. O controlo contém apenas a levedura com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Figura 24 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos, hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e Hamamelidaceae. O controlo contém apenas a levedura com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Figura 25 – Representação de um ensaio de determinação de CML, em placa de SDA, onde foram plaqueada as suspensões obtidas com as concentrações do extrato imediatamente superiores e inferiores da CMI determinada visualmente. Verifica-se que

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

ocorreu crescimento da levedura, *Candida albicans* para a concentração de 12,5%, e não ocorreu crescimento a partir da concentração de 25% que foi assumida como CML.

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de doenças causadas por fungos, respetivos fungos causadores e principais manifestações clínicas [10,12].

Tabela 2 -Exemplos de mecanismos de ação que as plantas podem apresentar, assim como exemplos de alvos farmacológicos e respetivas aplicações cosméticas [17,19].

Tabela 3 – Tabela representativa das diferentes plantas, sua família e principais propriedades.

Tabela 4 – Constituintes dos meios de cultura celular completos para as linhas celulares RAW (macrófagos) e HaCaT (queratinócitos).

Tabela 5 - Estirpes fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, sua classificação e respetivos meios de cultura usados para promover o seu crescimento em laboratório.

Tabela 6 – Tabela representativa dos hidrolatos estudados, parte da planta utilizada na hidrodestilação e os compostos maioritários presentes em cada hidrolato, determinados por GC-MS.

Tabela 7 – Tabela representativa do extrato aquoso estudado, parte da planta utilizada na extração aquosa e os compostos maioritários presentes no extrato, determinados por HPLC.

Tabela 8 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Asteraceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo.; *p < 0,05 foi considerada uma redução significativa, ANOVA unidirecional.

Tabela 9 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Lamiaceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. p < 0,05 foi considerada uma redução significativa, ANOVA unidirecional.

Tabela 10 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas das famílias Cistaceae, Cupressaceae Hamamelidacea e do extrato aquoso Orobanchaceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. p < 0,05 foi considerada uma redução significativa, ANOVA unidirecional.

Tabela 11 - Tabela comparativa dos valores de IC₅₀ das RAW e HaCaT e EC₅₀ das células RAW.

Tabela 12 - Tabela representativa dos CMI (Concentração Mínima Inibitória) visuais determinados para o *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*. Os valores de CIM e MLC são expressos em % (v/v).

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Tabela 13 - Tabela representativa das CML (Concentrações Letal Mínima) para o *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans* com o hidrolato *Thymbra capitata*. Os valores de CMI e CML são expressos em % (v/v).

Folha em branco

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ATCC	American Type Culture Collection
CBP-BI	Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CML	Concentração Mínima Letal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FBS	Soro Fetal Bovino
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
ISO	International Standard Organization
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Metiltiazolildifenil-tetrazolio Bromido
NO	Óxido Nítrico
PBS	Solução Salina com Tampão Fosfato
PDA	<i>Potato-Dextrose Agar</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Sabouraud-Dextrose Agar</i>
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SNAP	<i>S-Nitroso-N-acetylpenicillamine</i>

Folha em branco

Comunicações científicas apresentadas ao longo do desenvolvimento da dissertação

Gomes C.P., Oliveira A.S., Rolo J., Gaspar C., Oliveira R.P., Oliveira J.M., Oliveira A.P., “The anti-inflammatory potential of hydrolates”. Comunicação em Poster. XVI Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal – 30 de setembro a 1 de outubro 2021.

Gomes C.P., Oliveira A.S., Rolo J., Gaspar C., Oliveira R.P., Oliveira J.M., Oliveira A.P., “Antifungal and anti-inflammatory potential of plant hydrolates”. Comunicação Oral. 7th Beauty INNOVATION Days, Barcelona, Espanha – 23 a 24 de fevereiro de 2022.

Folha em branco

1. Introdução

O aumento do consumo de recursos naturais levou a uma excessiva exploração do nosso planeta e à sua respetiva deterioração, resultando num vasto leque de consequências negativas como alterações climáticas, esgotamento de recursos naturais e poluição. Ao deparar-se com tais problemas, a consciencialização ambiental do consumidor tem vindo a aumentar ao longo dos anos, promovendo consequentemente a preferência por produtos mais ecológicos [1].

Os produtos sustentáveis, para serem considerados como tal, têm de seguir um certo padrão de produção, como por exemplo: utilização de menos água, menos matéria-prima e menos energia no seu desenvolvimento em relação à metodologia clássica. Devem ser produzidos a partir de recursos naturais não podem ser poluentes durante o seu processo de produção, e as suas embalagens têm de ser recicláveis [2]. Tais padrões de produção fazem com que estes produtos apresentem um preço superior.

Tendo sentindo cada vez mais uma maior necessidade de se reinventar para responder às necessidades do utilizador e do meio ambiente, diversas indústrias têm tentado adotar o conceito *eco-friendly*. O setor da cosmética não é diferente e tenta moldar a sua produção a estes parâmetros, tanto a nível dos produtos de beleza como a maquilhagem e cosméticos como em produtos de cuidados pessoais [3].

Os cosméticos por norma têm na sua composição uma vasta gama de produtos sintéticos como por exemplo parabenos, petroquímicos, laurilsulfato sódico, corantes artificiais e conservantes. Tais aditivos levam a que muitos dos consumidores tenham receio de que a exposição prolongada a tantos químicos possa originar efeitos adversos para a saúde e levar ao aparecimento de doenças na pele como alergias, dermatites e até cancro. Consequentemente, a procura por produtos “verdes” e naturais têm tido um crescimento exponencial. Em 2021, 49% dos consumidores afirmaram que estavam dispostos a pagar mais por produtos marcados como sustentáveis. Caracterizados por uma suposta menor toxicidade, baixo impacto ambiental e pelas diversas ações terapêuticas, os produtos “verdes” constituídos por extratos de origem natural ou concentrados de frutas ou plantas, são cada vez mais apelativos quando comparados com os que são constituídos exclusivamente por compostos sintéticos [3,4].

O interesse na produção de cosméticos e fármacos, que ajudem no combate às doenças de pele, é cada vez maior. O crescente investimento da indústria na produção de produtos com

aplicação na pele é também devido à sua facilidade de utilização, pois podem ser aplicados diretamente no local de interesse.

Sendo a pele o maior órgão do corpo humano, abriga um vasto microbioma, composto por diversos microrganismos comensais, que incluem bactérias, vírus e fungos, os quais, porém, podem tornar-se causadores de doenças em determinadas circunstâncias [5].

1.1. Doenças tópicas causadas por fungos

Dentro dos diferentes microrganismos que pertencem à microbiota cutânea encontram-se os fungos comensais, que estão alojados nas camadas superficiais da pele principalmente nas áreas mais húmidas do corpo. Contudo, estes microrganismos podem tornar-se causadores de doenças, particularmente quando o sistema imunológico se encontra comprometido. As infeções que ocorrem são usualmente superficiais e podem afetar não só a camada externa da pele, como também o cabelo e as unhas [6].

As doenças fúngicas podem ser bastante incomodativas e evoluir para quadros mais graves, quando não são tratadas. Estas afetam várias partes do nosso organismo e dividem-se em superficiais, subcutâneas e sistémicas. As doenças fúngicas superficiais ocorrem nas camadas mais externas da pele, unhas, cabelo e mucosas. As subcutâneas ocorrem maioritariamente na derme e tecidos subcutâneos, e a infeção geralmente ocorre após uma lesão que afeta a integridade da epiderme. As infeções fúngicas sistémicas, ou são iatrogénicas ou se iniciam nos pulmões através de inalação, são difíceis de diagnosticar e causam altas taxas de mortalidade [7,8].

As doenças causadas por fungos são das mais prevalentes, estimando-se que quase um bilião de pessoas no mundo sofra de dermatomicoses ou infeções fúngicas da pele, cabelo e unhas [9]. De entre as espécies mais prevalentes, associadas a este tipo de doenças, destacam-se as espécies pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Tricophyton* e *Malassezia* [10,11].

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Tabela 1 – Exemplos de doenças causadas por fungos, respectivos fungos causadores e principais manifestações clínicas [10,12].

Doenças Fúngicas	Fungo	Manifestação clínica
Superficial (Camadas mais externas de pele, unhas, cabelo, membranas mucosas)		
Pé de atleta	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes var. interdigitale</i>	Prurido; Vermelhidão; Descamação da pele; Mau cheiro; Pele mais dura e grossa na sola do pé.
Tinea capitis (coro cabeludo)	<i>T. tonsurans</i> , <i>Microsporum audouinii</i>	Perda e descamação de cabelo no couro cabeludo, com crostas e prurido.
Onicomicose (unhas)	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes var. Mentagrophytes</i> , <i>Candida spp.</i>	Unhas espessas, descoloridas e deformadas.
Tinea versicolor (peito, costas, pescoço e braços)	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Scopulariopsis spp.</i> , <i>Scytalidium spp.</i> , <i>Malassezia furfur</i>	Lesões individuais avermelhadas e escamosas na pele; hipo ou hiperpigmentação na pele.
Candidose genital ou oral	<i>C. albicans</i>	Prurido, vermelhidão, corrimento branco espesso e irritação ao urinar.
Subcutânea (pele e tecidos subcutâneos)		
Esporotricose	<i>Sporothrix schenckii</i>	Lesão cutânea ou subcutânea localizada, pode se espalhar pelo sistema linfático e formar outras lesões.
Cromoblastomicose Candidose mucocutânea crônica	<i>Candida spp.</i>	Lesões elevadas e crostas na pele, lesões brancas fissuradas.

1.2. Produtos terapêuticos e cosméticos à base de plantas

É cada vez mais difícil combater os microrganismos causadores de doença, sendo que estes se têm tornado resistentes aos tratamentos normalmente utilizados, como, por exemplo, aos antibióticos. As soluções disponíveis para o tratamento das infecções são cada vez mais escassas e, como tal, as indústrias farmacêuticas e cosméticas tem recorrido às primeiras formas de tratamento, as plantas, como fonte alternativa de compostos bioativos.

Existem diversos preparados à base de plantas que podem ser utilizadas para esta finalidade, desde preparações em pó, a tinturas, extratos ou óleos essenciais. Os óleos essenciais têm sido uma escolha bastante popular, por exemplo, no tratamento das infecções fúngicas, devido à sua conhecida atividade antimicrobiana [13,14].

Os estudos relativos às funcionalidades das plantas têm aumentado exponencialmente, e apesar de estes demonstrarem ser insuficientes como agentes terapêuticos, podem ser benéficas se usadas como adjuvantes quando aplicadas, por exemplo, num produto cosmético.

Um produto cosmético é qualquer substância ou mistura que tem o objetivo de limpar, perfumar, modificar o aspecto, proteger, ou corrigir os odores corporais das partes externas do corpo. Podem ser produtos de higiene corporal ou produtos de beleza. As preparações à base de plantas incluem o uso de apenas um dos seus constituintes ou uma mistura que inclui as diversas partes da planta. Estas preparações são destinadas a melhorar a aparência da pele, sendo que muitas delas já são utilizadas desde a antiguidade e evoluíram para os cosméticos modernos. Os cosméticos têm a conotação de natural se a sua eficácia for devida aos ingredientes da planta utilizada [15].

Por sua vez, segundo o Infarmed, como medicamento à base de plantas, entende-se “qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas”. As substâncias ativas presentes nas plantas são responsáveis pelas diversas ações terapêuticas dos diversos fármacos [16,17]. Temos como exemplo de medicamento à base de plantas o *Valdispert stress*, que ajuda no combate ao *stress* mental, o *RoterCysti*, utilizado em doenças do trato urinário, *Premkor* no síndrome pré-menstrual e *Pulmocap Thymus* como expetorante [18].

As plantas como agentes terapêuticos em doenças da pele ou como ingredientes cosméticos, podem atuar através de diversos mecanismos de ação, listados nas secções abaixo.

Tabela 2 -Exemplos de mecanismos de ação que as plantas podem apresentar, assim como exemplos de alvos farmacológicos e respetivas aplicações cosméticas [17,19].

Modo de ação	Farmacológicos/alvos	Aplicações cosméticas
Antimicrobiano	Acne, infeções, eczema e no combate da caspa;	Pele com impurezas
Anti-inflamatório	Dermatite atópica;	Pele sensível
Anti-proliferativo	Episódios de psoríase;	Pele sensível
Cura de feridas	Úlceras;	Pele frágil
Efeito fotoprotetor	Queimaduras solares e cancro de pele;	Pele madura

1.2.1. Aplicação como agentes antimicrobianos

A atividade antimicrobiana dos extratos de plantas tem sido estudada numa grande variedade de microrganismos. Ao surgirem cada vez mais bactérias multirresistentes, aumenta conseqüentemente a procura urgente de novas substâncias com propriedades antimicrobianas [20].

A exposição das plantas selvagens às doenças infecciosas é a razão de ser dos mecanismos de defesa que desenvolvem para sua própria proteção. As plantas devido aos seus compostos fenólicos, aldeídicos e terpénicos têm atividade antimicrobiana; que por vezes não é suficiente para debelar a infeção, mas ajuda no combate a proliferação microbiana [21, 22].

A *Candida albicans* e o *Aspergillus brasiliensis*, fungos estudados na realização desta dissertação, são agentes frequentes de infeções, servindo de modelo para testar a atividade antifúngica das preparações.

1.2.2. Aplicação como agentes anti-inflamatórios

A atividade anti-inflamatória das plantas tem sido demonstrada em diversos trabalhos. O estudo da atividade anti-inflamatória de extratos de plantas torna-se relevante pois a inflamação é a forma que o corpo utiliza para combater os agentes prejudiciais à sua integridade, como bactérias, parasitas, fungos e vírus quando causadores de lesão tecidual.

Os compostos maioritários das plantas atuam de forma a reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios como a interleucina (IL)-6, o fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, a IL-10 e a expressão induzível de óxido nítrico sintase (iNOS), diminuindo assim a inflamação. Uma dieta rica em frutas e ervas pode contribuir para uma diminuição da resposta inflamatória e doenças relacionadas [23,24].

1.2.3. Atividade Citotóxica de extratos de plantas

O potencial citotóxico das plantas tem vindo a ser sobretudo estudado para possível aplicação em tratamentos anticancerígenos. Os seus fitoconstituintes, como polifenóis, flavonóides e catequinas provocam a apoptose das células, e quando se trata de células cancerígenas a citotoxicidade é considerada como um *endpoint* positivo [25].

Os estudos de avaliação da toxicidade celular são essenciais para prever a toxicidade dos extratos de plantas em estudo, sendo uma forma bastante importante de avaliação de segurança e de classificação de compostos. Os hidrolatos são conhecidos pela sua baixa citotoxicidade, enquanto que os óleos essenciais, mais concentrados, tendem a apresentar uma maior citotoxicidade, o que confere segurança ao uso daqueles [26].

1.3. Hidrolatos como subproduto da hidrodestilação

Os hidrolatos, também conhecidos com hidrossóis ou águas aromáticas são obtidas através do processo de destilação a vapor das plantas, sendo considerados produtos secundários da obtenção de óleos essenciais. A sua constituição fitoquímica baseia-se essencialmente nos compostos voláteis mais hidrofílicos isolados no decorrer da destilação [27].

Os óleos essenciais, ao terem um baixo rendimento de produção, fazem com que seja benéfico para os produtores aproveitarem o seu subproduto, os hidrolatos, produzindo assim mais um produto de valor acrescentado para o mercado [28]. Apesar de os hidrolatos serem obtidos a partir dos óleos essenciais, diferem na composição e eficácia, sendo os hidrolatos menos tóxicos, menos bioativos e detentores de um cheiro mais suave. Contudo ao compartilharem algumas atividades biológicas com os respetivos óleos essenciais podem ter aplicações semelhantes [29]. A sua maior vantagem é serem fáceis de produzir e não requererem grande trabalho adicional, sendo compostos essencialmente pela água proveniente da condensação do vapor na produção dos óleos essenciais [30,31].

A sua utilização já vem desde a antiguidade e o Homem já há muito que lhes reconhece propriedades curativas tanto para a si próprio como para os seus animais. As suas utilidades variam conforme os costumes de cada povo. Por exemplo, na Turquia os hidrolatos são utilizados por via oral, através da sua ingestão, atuando como antibióticos naturais no combate a doenças bacterianas [32]. Os iranianos e persas consomem os hidrolatos como bebidas naturais, acreditando nas suas propriedades medicinais [33]. Apesar das possíveis utilizações dos hidrolatos serem diversas, a informação disponível é muito escassa e daí haver um crescente interesse em aumentar o número de dados disponíveis sobre estes subprodutos.

1.3.1. Aplicações dos hidrolatos

Devido às inúmeras propriedades, os hidrolatos têm cada vez mais aplicações. Possuem também vantagens, como a aplicação tópica sem necessitar de diluição.

Nos cosméticos, os hidrolatos têm substituído a água habitualmente utilizada na sua formulação, adicionado ingredientes ativos. São utilizados na fase aquosa de loções, cremes e sabonetes, ou de forma independente como tónicos [34]. As suas propriedades antimicrobianas fazem também, com que estes possam ser utilizados como forma de prevenir o odor corporal e auxiliar na cicatrização de feridas [28,35].

Outra das aplicações é a sua utilização em aromoterapia, onde o interesse tem sido crescente por parte da população em geral. Também podem ser aplicados em tecidos como lençóis, toalhas e roupas para eliminar cheiros desagradáveis [36].

1.4. Espécies de plantas com interesse na terapêutica e/ou cosmética

As plantas são utilizadas na terapêutica e/ou cosmética, através da utilização das suas folhas, raízes, flores, frutos, caule, e até da junção de diversas partes da planta como referido anteriormente. A destacar de entre as diversas famílias de plantas, a mais utilizada para fins cosméticos é a Lamiaceae, que se distingue pelas suas propriedades conservantes e antifúngicas [37].

Para a realização desta dissertação foram selecionadas diferentes espécies, pertencentes a diversas famílias, que se distinguem pelas suas distintas propriedades. Na Tabela 3 encontram-se representadas as principais propriedades bioativas associadas a cada uma

das espécies estudadas. Nas secções abaixo encontra-se uma breve descrição das características de cada espécie e principais utilizações na terapêutica.

Tabela 3 – Tabela representativa das diferentes plantas, sua família e principais propriedades.

Planta	Família	Propriedades	Referências
<i>Echinacea purpurea</i>	Asteraceae	Antisséptica, antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória.	[38,39]
<i>Helicrysum italicum</i>	Asteraceae	Anti-inflamatória e antialérgica.	[40]
<i>Matricharia camomila</i>	Asteraceae	Anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana.	[41]
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	Antimicrobiana, antioxidante, inseticida e anti-inflamatória.	[42]
<i>Thymbra capitata</i>	Lamiaceae	Antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária.	[43,44]
<i>Hamamelis virginiana</i>	Hamamelidaceae	Antioxidante, antibacteriana, antialérgica e anti-inflamatória	[45]
<i>Cupressus lusitanica</i>	Cupressaceae	Anti-inflamatória, antisséptica e antibiótica.	[46]
<i>Cistus ladanifer</i>	Cistaceae	Antidiarreica, antibacteriana e anti-inflamatória.	[47]
<i>Euphrasia officinalis</i>	Orobanchaceae	Anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, hipotensiva e antiepilética.	18]

1.4.1. Família Asteraceae

Echinacea purpúrea

A planta *Echinacea purpúrea* encontra-se distribuída pelo lado este dos Estados Unidos da América e a sua época de floração situa-se entre os meses de junho e agosto [49].

Esta espécie tem diversas ações terapêuticas e o seu perfil farmacológico permite que seja utilizada como desintoxicante do sistema circulatório, linfático e respiratório. É também utilizada no tratamento de feridas, queimaduras e na prevenção e tratamento de candidose genital recorrente [50]. Aliada à sua atividade anti-inflamatória, alivia os sintomas de

constipações como a tosse e febre, e auxilia no tratamento de infecções urinárias, inflamação da boca e faringe [38,39]. Esta planta tem como principais constituintes polissacarídeos, flavonóides, ácido chicórico, alquilamidas e poliacetilenos com atividade imunestimuladora[51]. Segundo a EMA os medicamentos à base desta planta encontram-se disponíveis na forma líquida ou sólida quando se trata de serem ingeridos e na forma semissólida quando o seu propósito é aplicação tópica [52,53].

Na cosmética pode ser utilizada como forma de prevenir manchas na pele, como proteção contra o aparecimento de rugas e no tratamento da acne [46].

Helichrysum italicum

O *Helichrysum italicum* é um arbusto lenhoso e distribui-se principalmente pelo Sul da Europa na área do Mediterrâneo. É usualmente conhecido por Erva-caril e Perpétuas-das-areias e a sua época de floração é entre maio e setembro [54].

As ações terapêuticas desta espécie incluem as anti-inflamatória, antimicrobiana e antialérgica. Os seus constituintes atuam de forma a proteger a pele delicada e irritada, como no caso da psoríase e eczema. Na sua constituição existem diversos polifenóis como os flavonoides que atuam como antioxidantes [40].

Esta planta também pode ser aplicada na cosmética durante a produção de fragâncias e formulações, mas a sua maior aplicação está relacionada com o seu óleo essencial [45]. Os seus óleos essenciais são utilizados diretamente na pele, como cicatrizantes por exemplo em queimaduras e também como agentes anti envelhecimento [46].

Matricharia camomila

A *Matricharia camomila* pertence à família Asteraceae e encontra-se distribuída por quase toda a Europa e região mediterrânica. O seu nome mais comum é camomila e a sua época de florescimento é entre abril e junho [55].

As propriedades desta planta são diversas, desde atividades anti-inflamatórias, antioxidantes a antimicrobianas. Tais propriedades fazem da *Matricharia camomila* uma planta com valor multiterapêutico. É muito utilizada em infusões devido ao seu sabor agradável e propriedades calmantes. Para além da conhecida ação como sedativo, por ser rica em flavonoides, terpenos e polissacarídeos, possui um vasto leque de outras propriedades [41].

As suas aplicações também passam pela cosmética. A apigenina, composto obtido a partir de extrato de camomila, tem um efeito protetor nos queratinócitos da pele, conferindo-lhe propriedades hidratantes e auxílio no alívio de queimaduras. Tal como outras plantas desta família, reduz também os sinais de envelhecimento [56].

1.4.2. Família Lamiaceae

Ocimum basilicum

O *Ocimum basilicum* pertence à família Lamiaceae e distribui-se pelas regiões da Ásia tropical, sul da Europa, Egito, Marrocos, Indonésia e Califórnia. É comumente conhecido por Manjerição e a sua época de floração situa-se entre julho e setembro [57].

As ações terapêuticas são diversas, como adjuvante no tratamento de infeções da pele e infeções das vias respiratórias. Devido à presença de compostos bioativos e voláteis, como estragol e linalol, apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e repelente de insetos [42][58].

É utilizado na indústria da perfumaria devido à sua agradável fragância. Os compostos antioxidantes presentes óleo essencial desta espécie tornam-na relevante também para o setor da cosmética, para a produção de preparações anti-envelhecimento. A sua ação antimicrobiana ajuda no combate da acne [46].

Thymbra capitata

A *Thymbra capitata*, também conhecida por Tomilho (uma das suas variedades), é uma espécie pertencente à família Lamiaceae que floresce entre abril e outubro. Apresenta uma larga área de distribuição, estendendo-se pelo oeste Mediterrâneo, Península Ibérica e noroeste de África [59,60].

Esta planta da família Lamiaceae tem na sua constituição compostos fenólicos, especificamente monoterpenos, responsáveis pelas suas características terapêuticas como a sua ação antioxidante, antibacteriana e antifúngica. É utilizada tradicionalmente para o tratamento de tosse e problemas de faringe [43].

As suas propriedades antimicrobianas despertam o interesse da indústria cosmética para a sua utilização em formulações tópicas, devido ao seu efeito conservante. O seu odor agradável também faz com que seja bastante utilizada em perfumes [61].

1.4.3. Família Hamamelidaceae

Hamamelis virginiana

A *Hamamelis virginiana* é nativa do Canadá e do Leste dos EUA, mas é atualmente cultivada na Europa. Os nomes pelos quais é conhecida habitualmente são hamamelis ou aveleira-de-bruxa e a sua época de floração situa-se entre outubro e novembro [62].

Esta planta é rica em compostos fenólicos que lhe conferem propriedades antioxidantes, antibacterianas, antialérgicas, anti-inflamatórias e anticancerígenas, fazendo com que seja bastante utilizada em problemas dermatológicos, como acne, queimaduras solares, eczema e cicatrização de feridas [63]. A utilização desta planta já provém de tempos antigos, sendo que a população nativa (índia) dos EUA já utilizava as suas folhas e cascas para curar hemorroidas, picadas de insetos, distúrbios gastrointestinais e condições inflamatórias da pele [45].

O óleo essencial da planta também é utilizado para a formulação de produtos cosméticos, como tónicos de limpeza, devido às suas propriedades bacteriostáticas [64].

1.4.4. Família Cupressaceae

Cupressus lusitanica

Cupressus lusitanae é uma árvore com cerca de 25 a 30 m de altura que cresce principalmente nas terras altas e encontra-se distribuído pelo litoral norte de Portugal. É comumente conhecida por Cedro-de-Goa, Cedro-do-Buçaco, Cipreste-do-Buçaco e a sua época de floração é em março [65,66].

Os compostos maioritários de algumas das suas preparações, como o toratol e abietadieno conferem-lhe propriedades anti-inflamatórias, antissépticas e antimicrobiana. O seu óleo essencial é utilizado para o tratamento de hemorroidas e reumatismo [46].

Extratos obtidos desta árvore da família Cupressaceae são utilizadas como conservantes em formulações cosméticas, devido às suas propriedades antioxidantes e anti radicais. As suas propriedades antimicrobianas fazem com que sejam utilizados em desinfetantes bucais e champôs contra a caspa [46].

1.4.5. Família Cistaceae

Cistus ladanifer

Caracterizado pelas suas flores brancas, o *Cistus ladanifer* é um arbusto da família Cistaceae que se encontra principalmente distribuído pelo Sul de Portugal, restante Península Ibérica, nordeste da África e Sul de França. O nome pelo qual é comumente conhecido é Esteva e a sua época floração situa-se entre maio e junho [67].

O *Cistus ladanifer* e outras espécies de Cistaceae são utilizadas como agentes terapêuticos na medicina popular para o tratamento de doenças de pele, devido à sua ação antibacteriana e anti-inflamatória [68][47].

Têm na sua constituição compostos polifenólicos com ingredientes bioativos utilizados em formulações cosméticas, protegendo as células da pele do *stress* oxidativo e dos efeitos nefastos da radiação UV. É uma planta muito perfumada, bastante utilizada na indústria dos perfumes sobretudo pela sua resina, o lábano [69].

1.4.6. Família Orobanchaceae

Euphrasia officinalis

A planta *Euphrasia officinalis* é conhecida pelo nome Consolo de vista. É uma planta nativa da Europa e a sua floração ocorre entre os meses de julho e setembro [70].

A sua principal aplicação é a nível ocular e as suas preparações são utilizadas em conjuntivites, fadiga ocular, inflamação e no caso de existirem alergias oculares. Várias investigações demonstraram as suas propriedades bioativas, como anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e antivirais. Na sua composição tem compostos altamente ativos como ridóides flavonóides e ácidos fenólicos [71] [48].

A sua utilização cosmética é essencialmente em cremes para o contorno de olhos com efeito revigorante ou anti-fadiga [46].



Figura 1 - Imagem ilustrativa de todas as espécies de plantas estudadas durante a realização deste trabalho, imagens retiradas do site do projeto INOVEP: Inovação com Extratos de Plantas [114].

Folha em branco

2. Objetivo

A realização deste trabalho teve como principal objetivo avaliar diferentes propriedades dos hidrolatos ou extratos aquosos obtidos a partir das seguintes plantas produzidas em Portugal: *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica*, *Echinacea purpurea*, *Euphrasia officinalis*, *Hamamelis virginiana*, *Helichrysum italicum*, *Matricaria chamomilla*, *Ocimum basilicum* e *Thymbra capitata*, a fim de determinar quais são os extratos com maior interesse como ingredientes bioativos no desenvolvimento de produtos cosméticos e/ou farmacêuticos para aplicação na pele. Para atingir este objetivo, foram avaliadas as seguintes propriedades dos extratos em estudo:

- Atividade citotóxica, através do ensaio colorimétrico do MTT em duas linhas celulares, queratinócitos humanos (HaCaT, CLS 300493) e macrófagos de ratinho (RAW 264.7, ATCC® TIB-71™);
- Atividade anti-inflamatória, avaliada através da medição da produção de óxido nítrico em macrófagos de ratinho (RAW 264.7, ATCC® TIB-71™), estimulados com LPS;
- Atividade antifúngica, pela avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima letal (CML) do fungo filamentosso *Aspergillus brasiliensis* e da levedura *Candida albicans*.

Folha em branco

3. Materiais e Métodos

3.1. Hidrolatos e extrato aquoso

Para a realização deste trabalho foram incluídos oito hidrolatos das seguintes espécies: *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica*, *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Helichrysum italicum*, *Matricaria chamomilla*, *Ocimum basilicum* e *Thymbra capitata*; e um extrato aquoso de *Euphrasia officinalis*. Os hidrolatos e o extrato aquoso utilizados foram produzidos pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI), da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, no âmbito da parceria do projeto *INOVEP*: Inovação com Extratos de Plantas.

3.2. Análise fitoquímica

A análise fitoquímica foi elaborada com o objetivo de conhecer os componentes maioritários presentes nos diferentes hidrolatos e extrato aquoso, e assim poder inferir sobre os seus diferentes perfis bioativos.

A caracterização foi feita igualmente pelo CBP-BI. Os hidrolatos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker), enquanto o extrato aquoso foi por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detetor Diode Array (HPLC). Todas as análises de caracterização fitoquímica foram realizadas em triplicado.

3.2.1. Hidrolatos

A separação dos compostos maioritários presentes em cada hidrolato foi feita através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), adicionando-se hélio como gás de arraste com um fluxo de 1 mL/min. Os hidrolatos foram injetados a diferentes concentrações utilizando-se um *split* de 1:5. A temperatura inicial foi programada para 45°C, aumentando 3°C/min até aos 175°C, e aumentando 15°C/min até aos 300°C, mantendo-se nesta temperatura 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

Como forma de identificar os compostos voláteis foram utilizados dois métodos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 e através da comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. A quantidade de cada composto é expressa em percentagem da área do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário. A respetiva informação encontra-se nos relatórios enviados pelo CBP-BI, que estão presentes no Anexo I –Relatórios de Análise Cromatográfica.

3.2.2. Extrato aquoso

A separação dos compostos do extrato foi conseguida através de uma coluna YMC-Triart PFP utilizando-se uma pré-coluna Triart PFP e um guard-c-holder Art-Nr XPGCH-Q1. A fase móvel foi constituída pelo solvente acetonitrilo e 0,1 % TFA/água com um fluxo corrente a 1 mL/m. O extrato foi injetado na coluna, a sua temperatura foi definida a 40 °C, o gradiente da fase móvel foi programado inicialmente 10 % A e 90 % B em 3 min, 15 % A e 85 % B dos 15-25 min, 18 % A e 82 % B dos 25-45min, 30 % A e 70 % B dos 45-50 min, 42 % A e 58 % B dos 50-54 min, 50 % A e 50 % B dos 54- 55 min, depois 100% A e 0% de B dos 55-60 min e por fim 10 % A e 90 % B nos 60 min.

Os compostos foram identificados a partir de curvas de calibração com padrões e, de seguida, foram quantificados consoante a concentração de amostra injetada.

3.3. Determinação da viabilidade celular

Durante este trabalho estudou-se a resposta celular de duas linhas celulares distintas (queratinócitos humanos e macrófagos de ratinho) quando expostas aos diferentes hidrolatos e extrato aquoso. O método utilizado para avaliar a atividade citotóxica foi o ensaio 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio, mais conhecido como ensaio MTT - *Microculture Tetrazolium Assay*.

Durante este ensaio o MTT, sal de tetrazólio de cor amarela é convertido em cristais violeta pela ação da redutase mitocondrial, existente nas células eucarióticas (Figura 2). Estes cristais, sendo insolúveis, acumulam-se no interior das células, sendo necessário um solvente (isopropanol) para os extrair e solubilizar, produzindo assim uma cor roxa. A quantidade de cristais de formazam formados, pode correlacionar-se assim com a viabilidade celular após a exposição aos estímulos, sendo que uma maior intensidade da cor

representa um maior número de células viáveis conversoras do MTT. De forma oposta, quando é observável uma diminuição da intensidade da cor estamos perante um número de células mais reduzido ou uma redução da viabilidade das mesmas. As diferentes intensidades da cor roxa são quantificadas através de leitura óptica de absorvâncias com recurso a um espectrofotómetro. As leituras foram efetuadas a 570_{nm} como comprimento teste e 650_{nm} como comprimento de referência, sendo estes valores posteriormente subtraídos durante o tratamento de resultados [72,73].

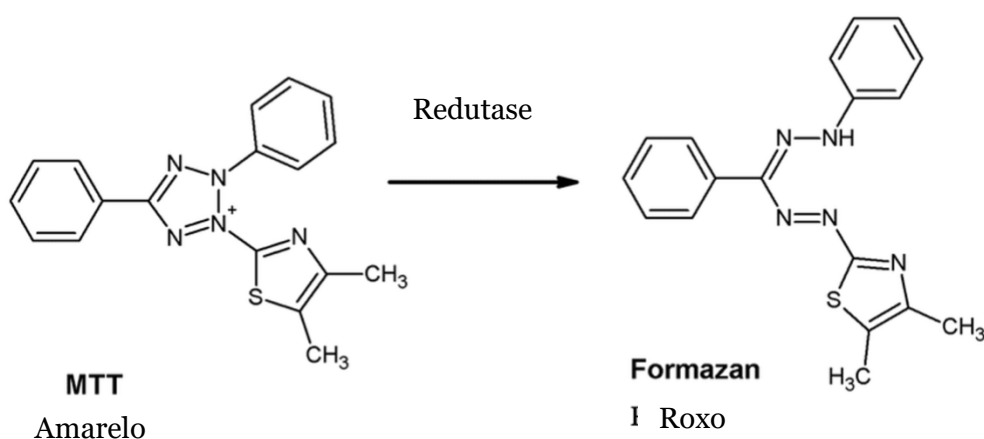


Figura 2- Digrama representativo da reação de conversão do sal tetrazólio (MTT) em formazan, adaptado de [74].

Através da utilização deste ensaio foi então avaliada a viabilidade celular das células em estudo, quando expostas aos hidrolatos ou extrato aquoso. Os ensaios foram realizados de acordo com a ISO/EN 10993-5 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [72], como detalhado nas secções abaixo.

3.3.1. Células

Durante o procedimento, utilizaram-se as linhas celulares de macrófagos de ratinho (RAW 264.7 ATCC® TIB-71™) como modelo de inflamação, e queratinócitos humanos HaCaT (ATCC-CCS-300493) representativos da epiderme.

3.3.2. Cultura e manutenção das linhas celulares

Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio completo, DMEM (Life technologies), com ligeiras alterações na sua suplementação mediante a linha celular, conforme descrito na Tabela 4.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Durante a sua preparação, os meios de cultura foram ajustados a um pH de 7,2-7,4 e, de seguida, esterilizados por filtração utilizando uma unidade de filtração com uma membrana de 0,22 μm .

Tabela 4 – Constituintes dos meios de cultura celular completos para as linhas celulares RAW (macrófagos) e HaCaT (queratinócitos).

	Macrófagos	Queratinócitos
Bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América)	17,95 mM	35,9 mM
D-glucose (Sigma-aldrich®)	25 mM	25 mM
Penicilina (Sigma- Aldrich®)	100 U/mL	100 U/mL
Estreptomomicina (Sigma- Aldrich®)	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
FBS não inativado (Life Technologies - Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América)	10 %	-
FBS inativado (Life technologies)	-	10 %

As linhas celulares foram mantidas em cultura numa incubadora (NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air- Jacketed Incubator) a 37 °C, 95 % de humidade e 5 % de CO₂.

De forma a manter as células RAW em cultura, estas foram subcultivadas a cada dois dias ou quando apresentavam uma confluência elevada (cerca de 80 %). Para a sua passagem, o meio de cultura foi removido, adicionado meio novo e estas foram raspadas com auxílio de um raspador celular, e transferidas para um novo frasco de cultura.

Para a realização dos ensaios, as células foram utilizadas entre as passagens 10 e 25. Quando o número de passagem se tornava elevado, era descongelado um novo criovial com uma passagem mais baixa, de forma a permitir a manutenção de um número de passagens baixo, conforme recomendado pela ATCC.

Relativamente as células HaCaT, quando se mostravam com uma confluência de aproximadamente 80 %, eram tripsinizadas com recurso a uma solução de Tripsina-EDTA [solução de protéase com tripsina a 0,05 % m/v e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 0,2 g/L – HyClone™]. Para tal, o meio era removido e a solução de tripsina era adicionada de forma a cobrir as células no frasco de cultura, e incubada a 37 °C na incubadora. Quando as células se encontravam soltas, e de forma a parar a ação da tripsina, adicionou-se meio de cultura completo. As células foram recolhidas por centrifugação a 125 RCF (Força Centrifuga Reativa), durante 5 minutos, de forma a ser possível remover o sobrenadante. O pellet composto pelas células recolhidas foi ressuscitado em meio

DMEM e parte da suspensão foi transferida para um novo frasco de cultura, dando origem a uma nova passagem. Para a realização dos ensaios, as células foram utilizadas entre as passagens 40 e 60.

3.3.3. Metodologia do ensaio de MTT

Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços

O procedimento iniciou-se com a verificação dos frascos de cultura de 75 cL previamente cultivados, e quando estes se mostravam na confluência ideal, iniciavam-se os ensaios.

Seguidamente ao processo de recolha das células, descrito anteriormente, a suspensão celular de ambas as linhas foi contada. Para tal, num *Eppendorf* foram adicionados 10 µL de suspensão celular a 10 µL de azul tripano a 0,4 % (Merk® - Darmstadt, Alemanha), que permitiu a marcação das células vivas. Após ressuspensão foram colocados 10 µL na câmara de *Neubauer*. Tendo a contagem concluída foi calculada a média do número de células por quadrante, multiplicada pelo fator de diluição (1:2) e por 10⁴, como demonstrado na seguinte Equação 1.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10000 \quad (1)$$

Dependendo do número de células contadas, a suspensão foi diluída de forma a se obter a densidade celular desejada para cada linha celular. As células foram semeadas numa placa estéril de 96 poços, com uma densidade de 5x10⁴ e 1x10⁴ células em cada poço, para o ensaio com RAW e HaCaT respetivamente, e num volume final de 100 µL por poço. Após semeadas, as placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C com 5 % de CO₂.

Exposição das células aos diferentes estímulos

Após o período de incubação de 24h, foram preparadas as gamas de concentrações de cada um dos extratos em meio DMEM, através da realização de diluições sucessivas, correspondendo às concentrações finais de 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %, 3,13 %, 1,57 %, 0,78 %.

As diluições foram feitas em tubos de *Eppendorf*, em que no primeiro foram colocados 700 µL de meio de cultura e 700 µL do extrato em estudo, e após homogeneização por agitação, foram transferidos 700 µL do primeiro tubo para o segundo. O processo repetiu-se para todas as concentrações (

Figura 3).

Adicionalmente foram também preparados três controlos:

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

- Controlo negativo de citotoxicidade (meio DMEM),
- Controlo positivo de citotoxicidade [(2 % SDS) (Dodecilsulfato de Sódio)(PanReac AppliChem)]
- Controlo de solvente na maior concentração utilizada (50 % água).

Para exposição das células aos estímulos (extratos ou controlos), o meio de cultura foi removido de forma a restarem apenas as células nos poços da placa e foram adicionadas 100 µL das diluições e respetivos controlos. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C, com 95 % de humidade do ar e 5 % de CO₂, de forma para permitir a atuação dos hidrolatos ou extrato aquoso.

Preparação e colocação do MTT nas células

No terceiro e último dia de ensaio, os estímulos foram removidos e as células foram lavadas uma vez com 150 µL de PBS (solução salina com tampão fosfato), [1.37 M de NaCl (FisherChemical - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) com 27 mM de KCl (ChemLab - Zedelgem, Bélgica), 100 mM de Na₂HPO₄ (FisherChemical) e 20 mM de KH₂PO₄ (ChemLab)], de forma a remover vestígios de extratos que possam interferir com o MTT.

Foram então adicionados 100 µL de uma solução de MTT (Alfa Aesa®- Haverhill, Massachusetts, EUA) a cada poço (na concentração final de 1 mg/mL em meio incompleto) e a placa foi colocada em incubação, protegida da luz, durante 3-4 horas nas condições normais de 37 °C, 95 % de humidade e 5 % de CO₂.

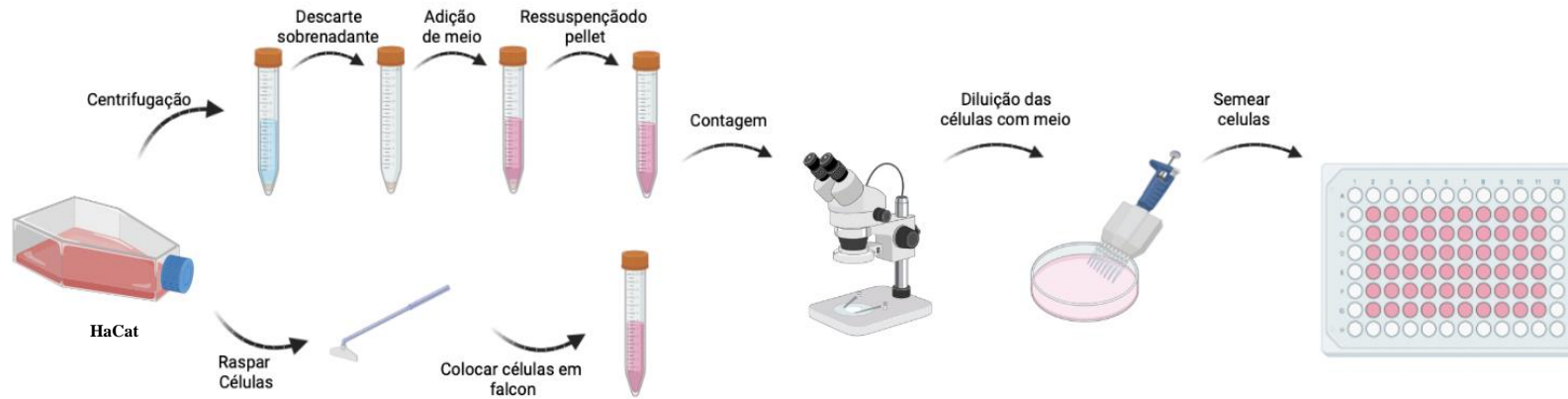
Terminado o período de incubação, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 100 µL de isopropanol (FisherChemical), seguido de uma ressuspensão, com o objetivo de dissolver os cristais de formazan. Procedeu-se então à leitura das absorvâncias a 570_{nm} e 650_m e ao respetivo tratamento de dados.

Representação esquemática da metodologia aplicada durante o ensaio de determinação da atividade citotóxica

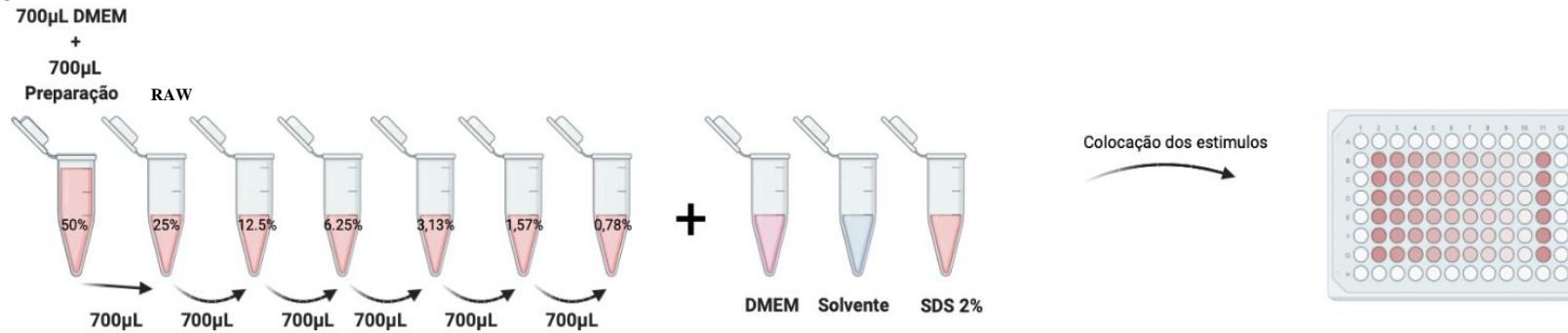
A

Figura 3 esquematiza a metodologia aplicada durante o ensaio de determinação da atividade citotóxica:

Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços



Colocação dos estímulos nas células



Preparação e colocação do MTT nas células

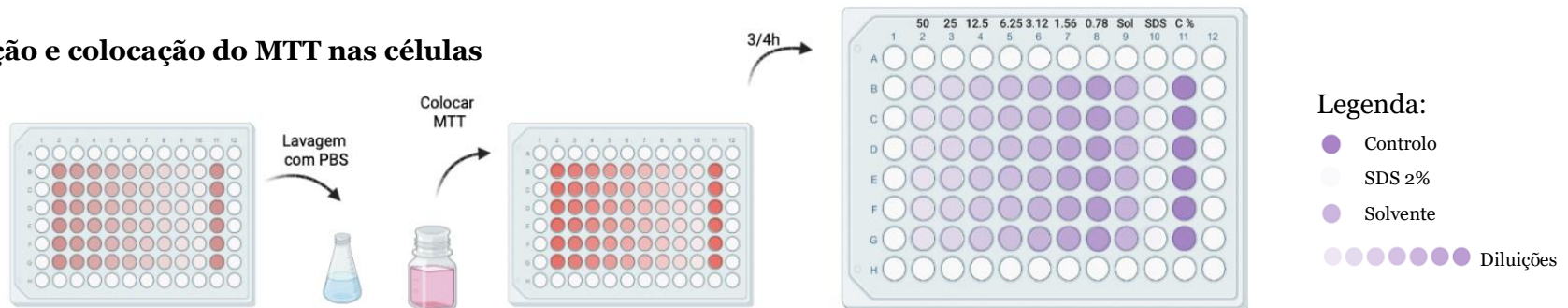


Figura 3 - Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de MTT, elaborado no programa BioRender.

3.3.4. Tratamento de resultados

Cada placa correspondeu a um ensaio para um extrato, sendo que foram realizados no mínimo dois ensaios independentes que para serem considerados válidos teriam de se mostrar concordantes, ao seja, com resultados semelhantes em ambos os ensaios (desvio padrão inferior a 20% em todas as condições em teste). Em cada ensaio foram incluídos 6 replicados de cada condição.

Os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e a respetiva análise estatística assim com a elaboração dos gráficos foi feita através do programa GraphPad (Prism 9.1.1 for mac OS, GraphPad Software, LLC). A análise foi feita pela seguinte ordem:

1. Os valores obtidos na leitura espectralométrica nas absorvâncias a 650_{nm} foram subtraídos aos valores da absorvância a 570_{nm}.
2. O valor obtido na subtração foi normalizado ao controlo, através da multiplicação por 100 e divisão pela média do controlo negativo (células expostas apenas a meio de cultura). Obtivemos então os valores relativos de viabilidade celular em relação ao controlo que representa o máximo de viabilidade celular (100 %).
3. No programa GraphPad foi elaborado gráfico de barras que relaciona a percentagem de viabilidade obtida para cada condição, com as diferentes concentrações de extrato estudadas. Com base no referido gráfico foi ainda feita uma análise estatística (ANOVA unidirecional).
4. Através da média de percentagem de viabilidade celular construiu-se uma curva sigmoidal e determinou-se a concentração inibitória capaz de inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) para cada preparação.

3.4. Determinação da atividade anti-inflamatória

3.4.1. Produção de Óxido Nítrico

No decorrer deste trabalho foi avaliada a atividade anti-inflamatória dos hidrolatos e extrato aquoso estudados, através da quantificação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos de ratinho (linha celular RAW 264.7; ATCC®, TIB -71TM).

Este ensaio baseia-se na capacidade destas células induzirem o processo inflamatório, quando expostas ao lipopolissacarídeo (LPS). Esta exposição leva a um aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e, conseqüentemente, a um aumento na produção de óxido nítrico, para níveis quantificáveis, *in vitro* [75]. Esta quantificação é feita através do reagente de Griess que é preparado pela adição de dois reagentes (A+B):

O reagente A, Sulfanilamida 1% (p/v) (Sigma-Aldrich®) em Ácido Fosfórico 5% (v/v) (Sigma-Aldrich®) foi elaborado da seguinte maneira:

Primeiramente foi preparado o ácido fosfórico e foram adicionados 2.485 mL de ácido fosfórico a 97.515 mL H₂O. Após a preparação do ácido foi adicionada 1g de Sulfanilamida e, após completa dissolução, a solução foi guardada a 4º num frasco opaco.

O reagente B, N-1-naftilenodiamina 0.1% (p/v) (Sigma-Aldrich®) foi preparado através da dissolução de 0.1 g em 100 mL água e a preparação foi também armazenada a 4ºC num frasco opaco.

A quantificação do conteúdo em nitritos realizou-se após a leitura da absorvâncias a 550_{nm} através de uma reta de calibração de nitrito de sódio (NaNO₂).

3.4.1.1. Metodologia do ensaio de quantificação da produção de óxido nítrico

Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços

Tal como nos ensaios da citotoxicidade, quando os frascos de cultura se mostravam confluentes, as células estavam prontas para a realização de ensaios. A preparação da placa de 96 poços foi feita conforme descrito anteriormente, com a diferença de que neste ensaio foi necessária uma densidade celular maior, correspondente a 1x10⁵ células por poço. Após semeada, a placa foi incubada durante 24 h a 37 °C com 5 % de CO₂.

Exposição das células aos estímulos

Após 24h, foram preparadas as diluições seriadas de forma semelhante ao descrito anteriormente para os ensaios de citotoxicidade, com um ajuste no volume final (350 μ L). Foram preparadas 7 concentrações (v/v) correspondentes a 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %, 3,13 %, 1,57 %, 0,78 %. Seguidamente foi feita a preparação dos três controlos, correspondentes ao controlo positivo (meio DMEM com adição de LPS), controlo negativo (meio DMEM) e controlo de solvente (50 % água). Após exposição das células aos estímulos e respetivos controlos, o LPS (Sigma-Aldrich®) foi pipetado para cada poço, com exceção do controlo negativo, ficando na concentração final de 1 μ g/mL. As células foram incubadas durante 24 h, permitindo a indução do processo inflamatório (Figura 4).

Ensaio colorimétrico de Griess

No terceiro dia do ensaio, os sobrenadantes de cada poço foram recolhidos para uma nova placa de 96 poços e foram adicionados volumes iguais de reagente de Griess. Após meia hora de incubação à temperatura ambiente, no escuro, as absorvâncias da placa foram lidas a 550_{nm}.

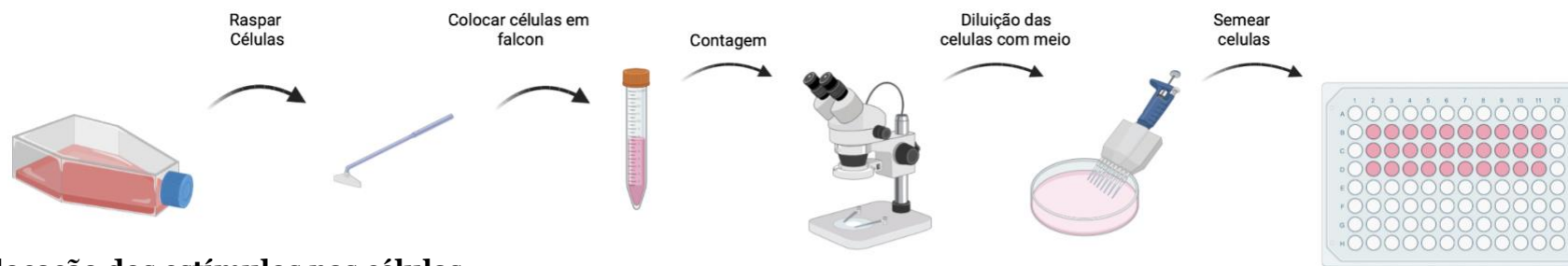
Os níveis de nitritos presentes do meio de cultura foram quantificados usando a reta de calibração, previamente contruída através da adição do reagente de Griess aos padrões de NaNO₂ a diferentes concentrações e posterior leitura no espectrofotómetro a 550_{nm} para construção da respetiva curva.

Esquema representativo da metodologia aplicada durante o ensaio de determinação da atividade anti-inflamatória

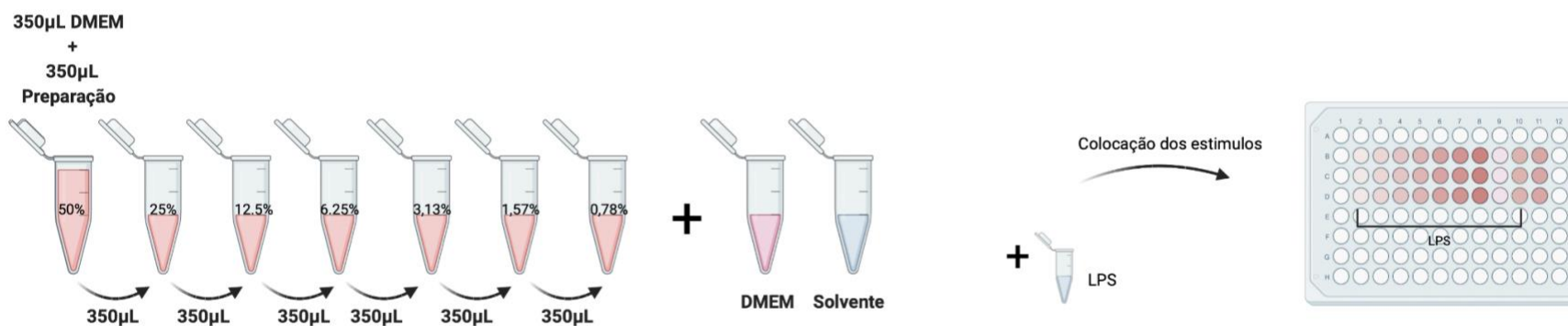
A Figura 4 esquematiza a metodologia aplicada durante o ensaio de determinação atividade da anti-inflamatória:

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços



Colocação dos estímulos nas células



Ensaio colorimétrico de Griess

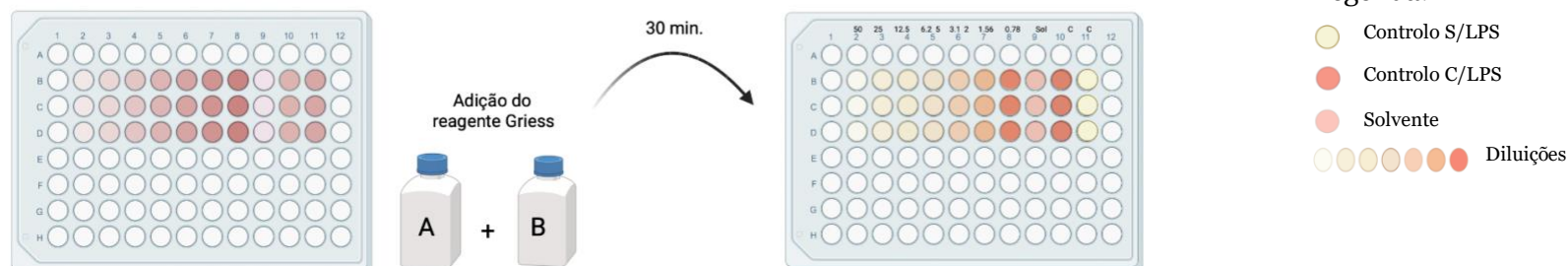


Figura 4 - Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de quantificação da atividade anti-inflamatória, elaborado no programa BioRender.

3.4.1.2. Tratamento de resultados

Os resultados foram obtidos através da realização de, no mínimo, dois ensaios independentes concordantes, ou seja, com valores semelhantes em ambos os ensaios (desvio padrão inferior a 20 % em todas as condições em teste), onde cada placa constitui um ensaio para o respetivo extrato. Cada condição foi testada em triplicado em cada ensaio.

Os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e a respetiva análise estatística assim como a construção dos gráficos foi feita através do programa GraphPad (Prism 9.1.1 for mac OS, GraphPad Software, LLC).

A análise foi feita seguindo os seguintes passos:

1. Os valores obtidos durante a leitura espectrofotométrica na absorvância a 550_{nm} foram aplicados na reta de calibração padrão.
2. Posteriormente foram normalizados ao controlo, através da multiplicação por 100 e divisão pela média do controlo positivo. Obtivemos então os valores de produção de óxido nítrico em relação ao controlo positivo (onde a produção de óxido nítrico é máxima) e o respetivo gráfico.
3. No programa GraphPad foi elaborado gráfico de barras que relacionava a percentagem de produção de óxido nítrico com diferentes concentrações de extrato estudadas. No referido gráfico foi ainda feita uma análise estatística (ANOVA unidirecional).
4. Através da média de percentagem de produção de óxido nítrico construiu-se uma curva sigmoideal e determinou-se a concentração necessária para reduzir, em metade, a produção máxima de óxido nítrico, ou seja, o EC₅₀ de cada preparação.

3.4.2. Determinação da Atividade Scavenging

Quando foi observada uma redução na quantidade de óxido nítrico produzido recorreu-se a uma avaliação adicional, conhecida como avaliação da atividade *Scavenging*.

Durante este ensaio *in chemico* (em que não foram utilizadas células), foi avaliada a capacidade dos hidrolatos em estudo removerem o óxido nítrico do meio libertado por um dador externo – o S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, Sigma-Aldrich).

Através de uma comparação destes resultados com os resultados obtidos nos ensaios celulares, consegue-se perceber se a redução dos níveis de óxido nítrico se deve à capacidade da própria preparação em removê-lo do meio e não a um verdadeiro efeito na redução da sua produção pelas células estimuladas com LPS.

3.4.2.1. Metodologia para a determinação da atividade *Scavenging*

Preparação das diluições

Foram preparadas 7 diluições de extrato em meio de cultura (v/v), especificamente 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %, 3,13 %, 1,57 %, 0,78 % e ainda dois controlos, compostos por meio de cultura (controlo negativo) e por meio de cultura com adição do reagente SNAP (controlo positivo), como representado na Figura 5.

Para a preparação das diluições seriadas, foram colocados 350 μ L de meio e 350 μ L de preparação no primeiro tubo de *Eppendorf*, a solução foi agitada e 350 μ L foram transferidos para o segundo tubo e assim sucessivamente para as restantes diluições.

Numa placa de 96 poços, foram colocados 300 μ L de cada diluição em cada poço e adicionados 0,9 μ L de SNAP a cada diluição e ao controlo positivo. A placa foi incubada durante 3 horas em incubadora a 37 °C e 5 % CO₂.

Ensaio colorimétrico de Griess

Passadas 3 horas, os 300 μ L foram distribuídos por 3 poços (100 μ L a cada poço) e foram colocados 100 μ L de reagente de Griess em cada poço, o que permitiu a quantificação de nitrito (NO₂⁻). Após 30 min. foi feita uma leitura da absorvância no espectrofotómetro de microplacas xMark™ (Bio-Rad) a um comprimento de onda de 550_{nm}.

Esquema representativo da organização da placa de 96 poços durante o ensaio de *Scavenging*

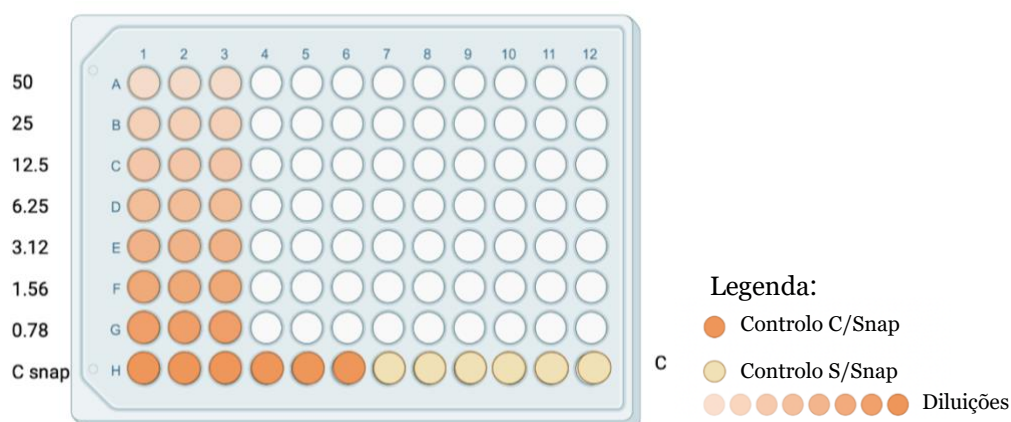


Figura 5 - Representação esquemática da placa de 96 poços, utilizada no ensaio *Scavenging*, elaborado no programa BioRender.

3.4.3. Tratamento de resultados

Os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e a respetiva análise estatística, assim como a construção de gráficos, foi feita através do programa GraphPad (Prism 9.1.1 for mac OS, GraphPad Software, LLC).

A análise foi feita seguindo os seguintes passos:

1. Os valores obtidos durante a leitura espectrofotométrica na absorvância a 550_{nm} foram aplicados na reta de calibração padrão de NaNO₂.
2. Posteriormente, foram normalizados ao controlo com SNAP, através da multiplicação por 100 e divisão pela média do controlo positivo. Obtivemos então os valores de óxido nítrico em relação ao controlo e o respetivo gráfico.
3. No programa GraphPad foi elaborado gráfico de barras que relacionava a percentagem de óxido nítrico presente por adição do dador SNAP, com diferentes concentrações de extrato estudadas. No referido gráfico foi ainda feita uma análise estatística (ANOVA unidirecional).

3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos hidrolatos e extrato aquoso foi determinada através do estudo do seu potencial antifúngico contra um fungo filamentoso e uma levedura. Foram utilizados dois testes, nomeadamente a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e determinação da concentração mínima letal (CML). A CMI é definida como a concentração mínima que inibe o crescimento de um microrganismo, determinada por avaliação visual do seu crescimento. A CML corresponde à menor concentração em que o composto é capaz de provocar a morte do microrganismo em estudo.

3.5.1. Microrganismos

Os microrganismos testados incluíram a *Candida albicans* ATCC 10231 e o *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Tabela 5). O protocolo foi adaptado das normas da NCCLS M38-A – Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos e M27-A2 – Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica [62-63].

Tabela 5 - Estirpes fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, sua classificação e respetivos meios de cultura usados para promover o seu crescimento em laboratório.

Espécie	Classificação	Estirpe	Meio
<i>Candida albicans</i>	Levedura	ATCC 10231	Sabouraud-Dextrose Agar, SDA (VWR Chemicals)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Fungo Filamentoso	ATCC 16404	Potato-Dextrose Agar, PDA (VWR Chemicals)

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, foi utilizado o meio de cultura líquido RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich®). A sua preparação foi feita através da adição de 10,4 g de RPMI, 34,53 g de tampão MOPS (ácido morfolinopropanesulfónico) (BioReagents™) e 900 mL de água desmineralizada. O pH foi acertado a 7,0 com a adição de NaOH 0,85 %, o volume foi ajustado a 1 L e o meio foi esterilizado por filtração (0,22 µM) e armazenado a 4°C no frigorífico, até à sua utilização.

3.5.2. Metodologia para determinação da atividade antifúngica

3.5.2.1. Contra *Aspergillus brasiliensis* – fungo filamentoso

Preparação do inóculo

Para a realização do ensaio, a cultura de *Aspergillus brasiliensis* foi repicada 4 a 7 dias antes do mesmo, numa placa de PDA e colocada na estufa (NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO₂ Air-Jacketed Incubator) a 25 °C, para permitir o crescimento do microrganismo.

Após o tempo de incubação, a placa foi utilizada para preparação do inóculo. Para isso, as colónias foram cobertas com 1 mL de NaCl estéril (0,85 %) e uma gota de Tween 20 (PanReac AppliChem, ITW Reagents), e a suspensão foi misturada com a ansa e transferida para um eppendorf. Dessa mistura, foram retirados 100 µL da suspensão e misturados com 900 µL de RPMI por forma a permitir a leitura de densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 600_{nm}. A suspensão foi acertada para um valor de DO₆₀₀ entre 0,09 e 0,11, por aplicação da fórmula $C_{ix}V_i = C_{fx}V_f$. Desta suspensão, foi ainda realizada uma diluição de 1:50, obtendo-se um valor final médio de $0,4 - 5 \times 10^4$ CFU/mL.

Inoculação da Placa de 96 Poços

As diluições seriadas das preparações em estudo foram feitas diretamente na placa de 96 poços, como representado na Figura 6. Para isso foram pipetados 200 µL de cada hidrolato, em duplicado, nos primeiros poços (linha A), e 100 µL de RPMI para os seguintes poços (linhas B-H). De seguida, 100 µL de hidrolato dos poços da linha A foram transferidos para a linha B, com o auxílio da multicanal, e após uma ressuspensão procedeu-se da mesma maneira para os restantes poços de forma que preparações ficassem nas concentrações de 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 %, 1,57 % e 0,78 %.

Foram por fim adicionados 100 µL da suspensão em cada poço da microplaca que continha as diluições, assim como no controlo positivo de crescimento (microrganismo em meio de cultura). O controlo negativo de crescimento microbiano foi composto só por meio de cultura, sem adição do microrganismo. Foi feita uma leitura das absorvâncias da placa a 600_{nm} (t=0 h) e posteriormente a placa foi incubada 48 h a 35 °C.

Avaliação dos resultados

Após as 48 h de incubação, foram lidas de novo as absorvâncias (t=48 h) e avaliados os CMI's por inspeção visual dos poços. Quando os extratos apresentavam CMI, procedeu-se à determinação da CML, transferindo 10 µL de cada suspensão onde não se verificava

crescimento para uma placa de Petri contendo meio PDA. As placas foram incubadas 48 h a 35 °C e avaliadas após este período de incubação. A concentração mais baixa onde não se verificou o crescimento de colónias, após as 48 horas de incubação, foi definida como a CML.

3.5.2.2. Contra *Candida albicans* - levedura

Preparação do inóculo

Cerca de 24 h antes do ensaio foi feita a repicagem da estirpe para uma placa de SDA e incubada numa estufa (BINDER) a 37 °C em aerobiose.

Para a preparação do inóculo foram escolhidas colónias isoladas que foram suspensas numa solução de NaCl a 0.85 %, seguindo-se de agitação durante 15 segundos. A densidade ótica (DO) foi acertada a 0.5 Macfarland ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) utilizando um densitómetro de bancada (Grant-bio). Foi por fim foram realizadas duas diluições sucessivas, 1:50 adicionando 10 µL a 490 µL de RPMI, seguida de 1:20, adicionando 80 µL da diluição anterior a 1520 µL de meio RPMI (concentração de $1 - 5 \times 10^3$ CFU/mL).

Inoculação da Placa de 96 Poços

As placas de 96 poços foram preparadas de forma semelhante ao escrito anteriormente para o fungo filamentosos, e como representado na Figura 6. A suspensão com levedura foi adicionada na quantidade de 100 µL em todo os poços que continham diluições, assim como no respetivo controlo positivo, obtendo-se a concentração de inóculo final desejada ($0.5 - 2.5 \times 10^3$ CFU/mL). Foi feita uma leitura das absorvâncias da placa a 600_{nm}, correspondente ao t=0h, e posteriormente a placa foi incubada durante 24 h a 35 °C.

Avaliação dos resultados

Passadas 24 h, as absorvâncias foram lidas no mesmo comprimento de onda e foram avaliados os CMI_s visuais, ou seja, as concentrações onde se verifica a ausência de crescimento. Quando foi possível determinar a CMI, era necessário determinar o CML transferido 10 µL de cada poço onde não se verificava turvação, para meio de cultura SDA. A placa foi incubada de novo por 48 h a 35 °C e, após o período de incubação, foi observado o crescimento na placa de SDA. A concentração mais baixa plaqueada onde se verificou a ausência de colónias após incubação, foi considerada como a CML.

Esquema representativo da metodologia aplicada durante o ensaio de determinação da atividade antimicrobiana

A Figura 6 esquematiza a metodologia aplicada durante o ensaio de determinação atividade da antimicrobiana:

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

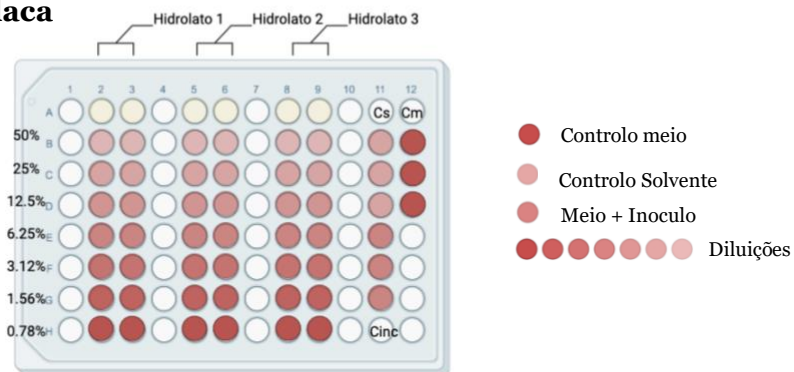
Preparação do inóculo



A. brasiliensis

PDA com 7 dias de crescimento a 35°C;
 1ml de NaCl a 0,85% e Tween 20;
 300µL do sobrenadante a 2,7mL de Meio RPMI;
 DO final entre 0,09 e 0,11
 Diluir 1:50 a suspensão com meio RPMI

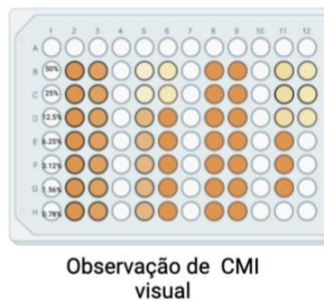
Inoculação da Placa



C. albicans

SDA com 24h de crescimento a 37°C;
 Suspender as colónias em NaCl a 0,85%;
 DO a 0,5 McFarland;
 Diluir 1: 50 da suspensão em RPMI;
 Diluir novamente 1: 20 em RPMI.

Avaliação dos resultados



● Crescimento
 ● Sem crescimento

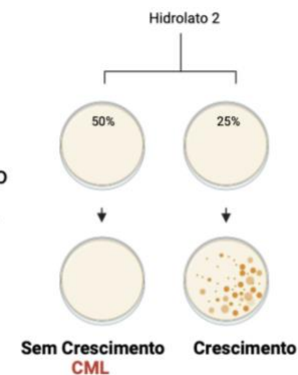


Figura 6 - Representação esquemática dos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana, elaborado no programa BioRender.

3.5.3. Tratamento de resultados

Para cada extrato foram realizados vários ensaios, e em cada um dos ensaios as condições foram repetidas em duplicado. Os ensaios foram considerados válidos quando mais que dois ensaios tinham resultados semelhantes, e desvios padrões inferiores a 20 %.

Os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e a respetiva análise estatística assim como a construção dos gráficos foi feita através do programa GraphPad (Prism 9.1.1 for mac OS, GraphPad Software, LLC).

A análise foi feita seguindo os seguintes passos:

1. Os valores das absorvâncias obtidos ao tempo zero ($t=0h$) foram subtraídos dos valores das absorvâncias obtidos às 24 h no caso da *C. albicans* e 48 h no caso do *A. brasiliensis*.
2. Os valores foram normalizados ao controlo, multiplicados por 100 e dividindo pela média do controlo positivo de crescimento microbiano (microrganismo em meio de cultura).
3. No programa GraphPad foi elaborado um gráfico de barras em função dos valores médios \pm DP, que relacionava a percentagem de crescimento microbiano com as diferentes concentrações das preparação estudadas.

Folha em branco

4. Resultados

4.1. Análise fitoquímica

Os hidrolatos em estudo foram obtidos através do processo de hidrodestilação, pela utilização do aparelho graduado *Clevenger*. Os tempos de destilação foram variáveis assim como o respetivo rendimento, dependendo de cada hidrolato. Por exemplo, 51,73 g de folhas de *Hamamelis virginiana* deram origem a 4 mL de hidrolato, enquanto que 50 g de *Echinacea purpúrea* permitiram obter 3,5 mL de hidrolato.

Os hidrolatos produzidos foram então analisados através de GC/MS, tendo-se identificado os seus compostos maioritários (Tabela 6).

Tabela 6 – Tabela representativa dos hidrolatos estudados, parte da planta utilizada na hidrodestilação e os compostos maioritários presentes em cada hidrolato, determinados por GC-MS.

Amostra	Parte da planta	Composto maioritário (%)
<i>Cistus ladanifer</i>	Parte aérea	4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído (21,58)
		D-Verbenona (9,81)
<i>Cupressus lusitanica</i>	Folha	Terpinen-4-ol (38,93)
<i>Hamamelis virginiana</i>	Folha	Carvacrol (26,80)
<i>Echinacea purpúrea</i>	Mix	Trans-Verbenol (11,70)
		Levoverbenone (9,49)
<i>Helichrysum italicum</i>	-	α -Terpineol (30,55)
<i>Matricaria chamomilla</i>	Inflorescência	Bisabolol oxide A (80,67)
<i>Ocimum basilicum</i>	-	Eugenol (52,53)
		Linalool (38,34)
<i>Thymbra capitata</i>	Mix	Carvacrol (98,11)

É de destacar (Tabela 6) a percentagem altamente significativa de carvacrol (98,11 %) na composição do hidrolato de *Thymbra capitata*

O extrato aquoso de *Euphrasia officinalis* foi obtido através da infusão dos seus ramos terminais. Neste extrato em específico 6,02g de material vegetal deram origem a uma massa de extrato total de 0,51 g.

Após produção do extrato aquoso, foi analisado por HPLC para a identificação dos seus compostos maioritários (Tabela 7).

Tabela 7 – Tabela representativa do extrato aquoso estudado, parte da planta utilizada na extração aquosa e os compostos maioritários presentes no extrato, determinados por HPLC.

Amostra	Parte da planta	Compostos maioritários ($\mu\text{G/mL}$)
<i>Euphrasia officinalis</i>	Ramos terminais	Epicatequina (5,093) Rutina (2,211)

4.2. Atividade citotóxica dos hidrolatos e extrato aquoso

O potencial citotóxico dos extratos em estudo, foi avaliado em duas linhas celulares distintas. Em primeiro lugar, avaliou-se a citotoxicidade em queratinócitos humanos, modelo que mimetiza o alvo de aplicação dos extratos, considerando uma futura utilização tópica. Secundariamente foi avaliada a toxicidade em linha celular de macrófagos de ratinho, de forma a estabelecer a gama de concentrações biocompatíveis, com interesse nos estudos seguintes de atividade anti-inflamatória. O estudo de duas linhas celulares distintas também possibilitou a comparação de resultados entre ambas as linhas celulares, permitindo a análise da sensibilidade de cada uma delas à preparação em questão.

4.2.1. Biocompatibilidade em queratinócitos humanos (HaCaT)

Relativamente aos resultados obtidos para os queratinócitos humanos, podemos observar que, por exemplo na Lamiacea, apesar de alguns hidrolatos pertencerem à mesma família, apresentam perfis de biocompatibilidade distintos.

Dos hidrolatos das plantas pertencentes a esta família, o hidrolato de *Thymbra capitata* apresentou um perfil bastante citotóxico, contrariamente ao hidrolato de *Ocimum basilicum* que demonstrou ser um dos mais biocompatíveis (Figura 7). Pela análise da figura, podemos verificar que o hidrolato da *Thymbra capitata* apresenta biocompatibilidade apenas nas últimas 3 concentrações em estudo (0.78 % a 3.13 %), e o hidrolato de *Ocimum basilicum* apresenta biocompatibilidade em todas as concentrações estudadas, já que os valores de viabilidade celular se encontram acima de 70 %, para todas as concentrações.

Por outro lado, todos os hidrolatos na família Asteraceae (Figura 8) se demonstraram bastante biocompatíveis com a linha celular de queratinócitos. Dentro destes, o hidrolato de *Helichrysum italicum* destacou-se pela sua biocompatibilidade, sendo apenas citotóxico na concentração mais elevada (50 %). Contrariamente, o hidrolato de *E. purpúrea* demonstrou-se biocompatível apenas nas concentrações 0,78 % e 1,56 %, apresentando-se como o hidrolato menos biocompatível dentro da família Asteraceae.

Dos extractos pertencentes às restantes famílias Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidacea e Orobanchacea, verificou-se que apresentaram perfis bastante distintos de citotoxicidade (Figura 9). O extrato aquoso da *Euphrasia officinalis*, destacou-se dos restantes pois foi o único que demonstrou um aumento da viabilidade celular, apesar de não significativo, em todas as concentrações em relação ao controlo.

Para avaliar se a redução da viabilidade observada nas concentrações mais elevadas, se devia a uma ação direta dos extratos, ou apenas ao efeito gerado pela privação de metade do meio de cultura, incluiu-se um controlo adicional (controlo de solvente), composto por água ultrapura, na mesma proporção à presente na maior concentração. Através da observação do gráfico comparativo do controlo de solvente com o controlo negativo (Figura 10) conseguimos observar que a privação de metade do meio DMEM através da adição do solvente, neste caso água, não afeta a viabilidade dos queratinócitos, pois a sua viabilidade é cerca de 85% em comparação com o controlo.

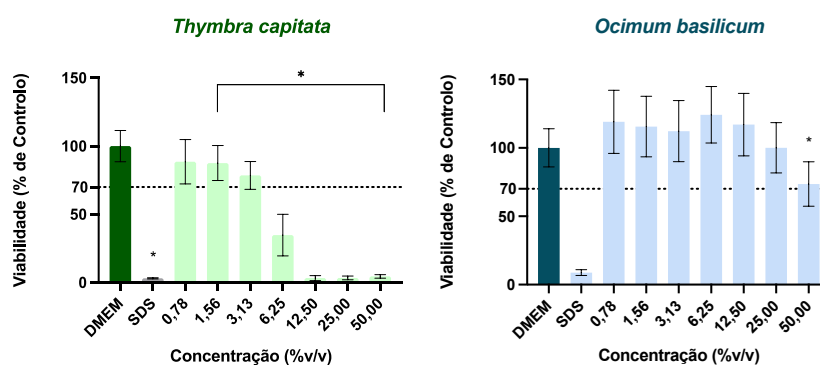


Figura 7- Efeito dos hidrolatos da família Lamiaceae na viabilidade celular de queratinócitos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controlo negativo e com SDS (2 %) como controlo positivo de citotoxicidade. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

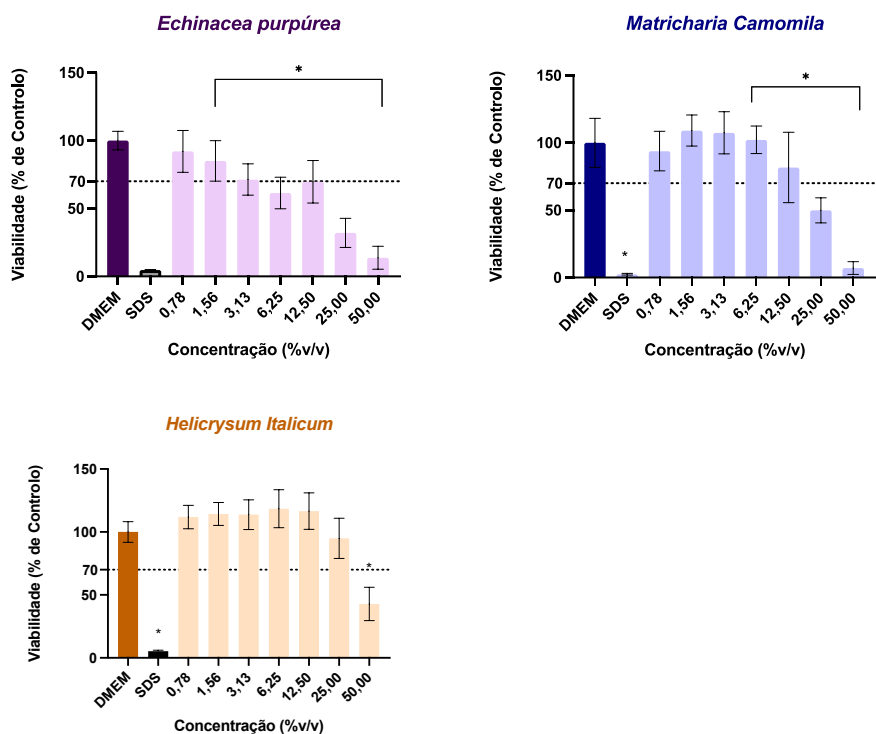


Figura 8 - Efeito dos hidrolatos da família Asteraceae na viabilidade celular de queratinócitos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controle negativo e com SDS (2 %) como controle positivo de citotoxicidade. * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

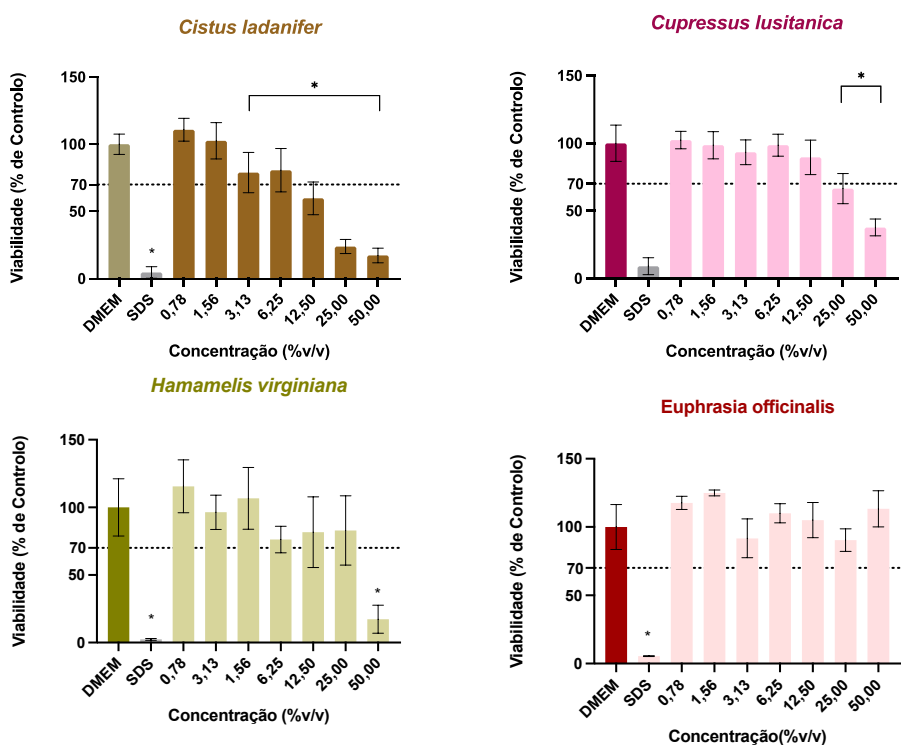


Figura 9 - Efeito dos hidrolatos da família Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidaceae e do extrato aquoso Orobanchaceae na viabilidade celular de queratinócitos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de hidrolatos com meio DMEM como controle negativo e com SDS (2 %) como controle positivo de citotoxicidade. * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

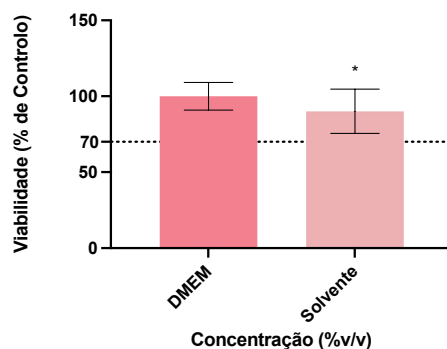


Figura 10 - Gráfico representativo dos valores de viabilidade nos controles de solvente e ao controle de viabilidade utilizado nos ensaios de citotoxicidade das células HaCaT. * representam significância estatística quando comparados com o controle, calculadas através da análise estatística *t*-Test.

4.2.2. Biocompatibilidade com macrófagos de ratinho (RAW 264.7)

Os resultados a seguir representados referem-se à biocompatibilidade dos extratos com a linha celular de macrófagos de ratinho (RAW 264.7).

De uma forma geral, estes demonstraram que, na maioria das preparações, a diminuição da viabilidade foi proporcional ao aumento da concentração de extrato utilizada. Em todos os gráficos se verifica que nas concentrações mais elevadas a viabilidade celular diminui em relação ao controle.

Relativamente aos resultados obtidos para os hidrolatos das plantas pertencentes à família Lamiaceae, o hidrolato de *Thymbra capitata* apresentou um perfil bastante citotóxico, com valores de viabilidade significativamente baixos em todas as concentrações. Contrariamente, o hidrolato de *Ocimum basilicum*, demonstra-se pouco citotóxico (Figura 11).

Pela análise da figura, podemos verificar que o hidrolato de *Thymbra capitata* não apresenta biocompatibilidade em nenhuma das concentrações em estudo. Apesar de pertencer à mesma família, o hidrolato de *Ocimum basilicum* apresenta biocompatibilidade na maioria das concentrações estudadas, (0,78 % - 6,25 %), já que os valores de viabilidade celular se encontram acima de 70 %, para esta gama de concentrações.

Dos hidrolatos das plantas pertencentes à família Asteraceae, o hidrolato de *Helichrysum italicum* destacou-se novamente pela elevada biocompatibilidade. Contrariamente os hidrolatos de *E. purpúrea* e *M. camomila* apresentaram maior citotoxicidade e perfis semelhantes entre si. No caso do hidrolato de *Helichrysum italicum* apenas na concentração de 50,00 %, a percentagem de viabilidade celular está abaixo de 70 %, comparativamente ao controle. Os restantes hidrolatos pertencentes à mesma família, são

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

ambos biocompatíveis a partir da quarta concentração estudada, nomeadamente 6,25 % (Figura 12).

O extrato aquoso de *Euphrasia officinalis* é novamente o único que demonstra um aumento, apesar de pouco significativo, da viabilidade celular (%) nas menores concentrações testadas de hidrolato (0,78 % - 6,25 %).

Os restantes hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidacea representados na Figura 13, apresentam um perfil dose-resposta, aumentando a viabilidade à medida que a concentração de hidrolato diminui.

De forma semelhante ao realizado para os queratinócitos, estudou-se o efeito gerado pela privação de metade do meio de cultura na linha celular de macrófagos de ratinho. Através da observação do gráfico representativo dos valores de viabilidade do controlo de solvente e controlo DMEM (Figura 14), verificamos que na linha celular em questão, a privação de 50% de meio DMEM, afetou a viabilidade celular. No controlo de solvente a viabilidade ficou reduzida a cerca de 40% em comparação com o controlo de viabilidade.

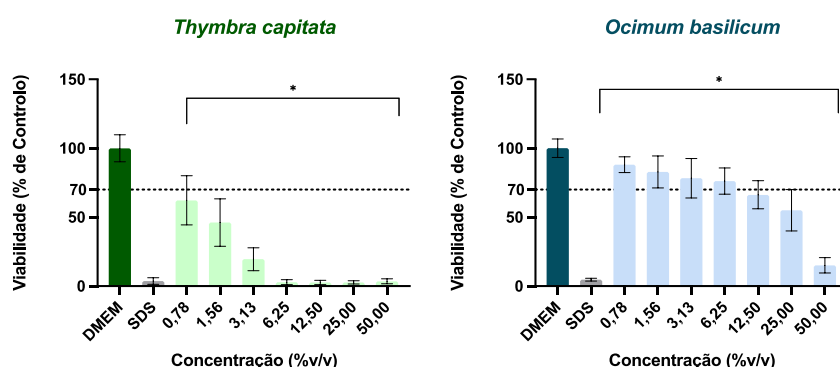


Figura 11 - Efeito dos hidrolatos da família Lamiaceae na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controlo negativo e com SDS a 2 % como controlo positivo (morte celular). * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

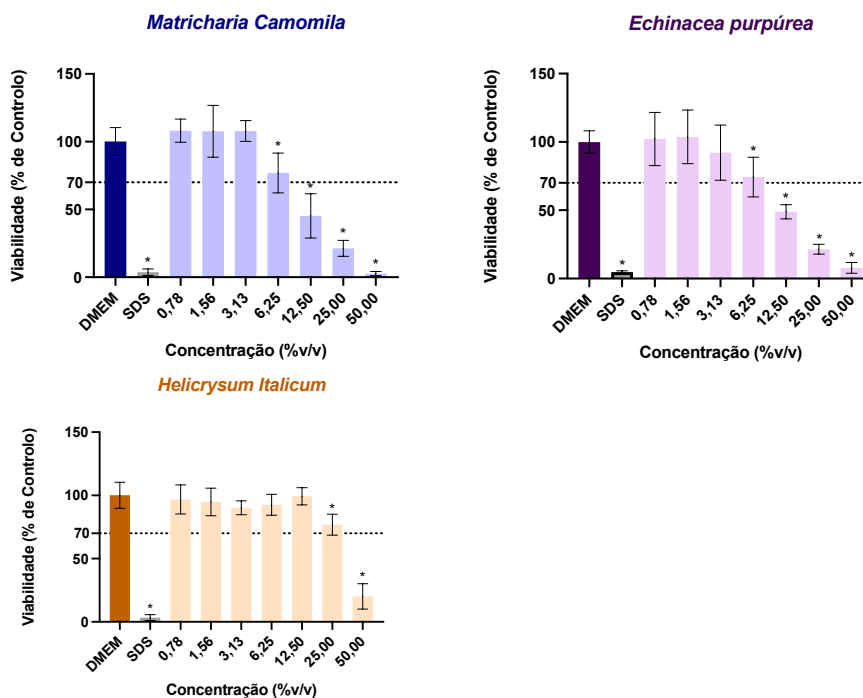


Figura 12 - Efeito dos hidrolatos da família Asteraceae na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controle negativo e com SDS a 2 % como controle positivo (morte celular). * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

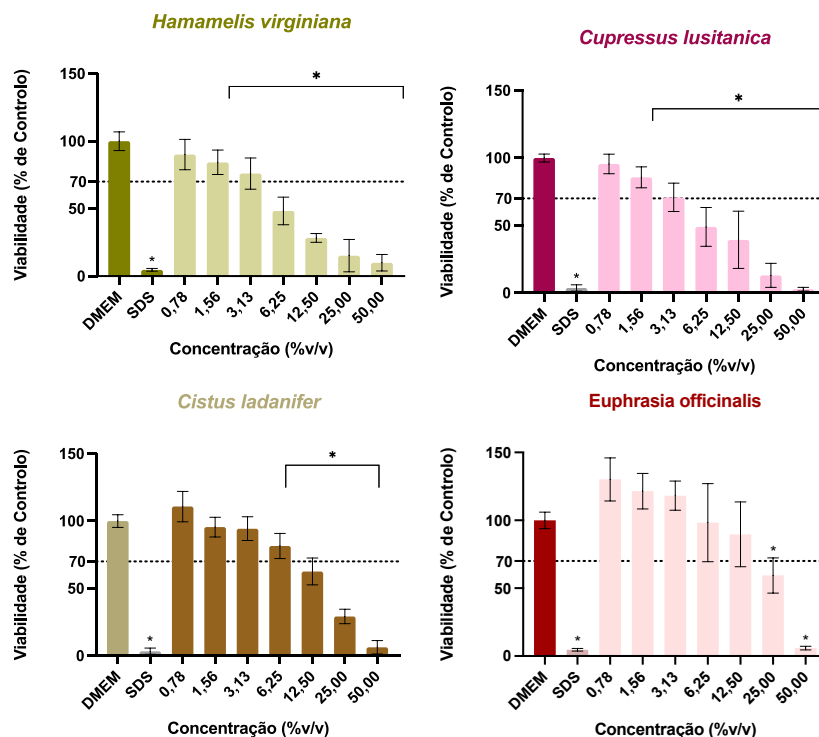


Figura 13 - Efeito dos hidrolatos da família Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidacea e do estrato aquoso Orobanchaceae na viabilidade celular de macrófagos (ensaio do MTT). As células de macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a diferentes concentrações de hidrolatos, com meio DMEM como controle negativo e com SDS a 2 % como controle positivo (morte celular). * representam significância estatística quando comparados com o controle, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

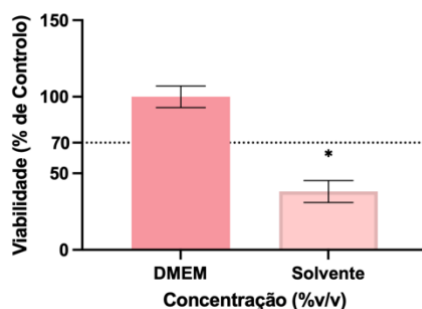


Figura 14 - Gráfico representativo dos valores de viabilidade nos controlos de solvente e ao controlo de viabilidade utilizado nos ensaios de citotoxicidade das células RAW 264.7. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, calculadas através da análise estatística *t*-Test.

4.3. Atividade anti-inflamatória dos hidrolatos e extrato aquoso

O potencial anti-inflamatório dos extratos em estudo foi avaliado na linha celular RAW. Os macrófagos de ratinho foram expostos a um estímulo inflamatório (LPS) na presença dos extratos. Através da adição deste estímulo foi possível observar a diminuição da produção de NO provocada pelos hidrolatos e extrato aquoso. O estudo da atividade citotóxica e anti-inflamatória nas células RAW permite que posteriormente seja possível uma comparação entre ambos os resultados, de forma a percebermos se a diminuição da produção de NO foi influenciada pela viabilidade celular na concentração de extrato utilizada.

4.3.1. Influência dos extratos na produção de óxido nítrico

Os gráficos seguintes são referentes à produção de óxido nítrico pelos macrófagos quando expostos a diferentes concentrações de hidrolatos e após estimulação com LPS, um conhecido indutor de resposta inflamatória a nível celular. De forma geral, verificámos que os macrófagos apresentam redução na produção de NO comparativamente aos valores de controlo quando expostos a altas concentrações de extratos.

Relativamente aos resultados obtidos para os hidrolatos das plantas pertencentes à família Lamiaceae, o hidrolato de *Thymbra capitata* apresentou uma grande redução no nível de NO (Figura 15). Com base nos resultados apresentados anteriormente, relativos ao seu efeito na viabilidade celular (Figura 11), o hidrolato de *Thymbra capitata* não apresenta biocompatibilidade em nenhuma das concentrações em estudo. A elevada redução de NO,

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

em determinadas concentrações (3,13 % - 50,00 %), pode ser justificada pela elevada citotoxicidade nessas concentrações.

Na família Asteraceae (Figura 16) os hidrolatos de *Helichrysum italicum* e de *Matricaria camomila* apresentaram perfil dose-resposta, e a diminuição da produção de NO foi proporcional ao aumento da concentração de extrato. O hidrolato de *Echinacea purpurea* apresentou uma acentuada descida na produção de NO nas primeiras concentrações, correspondendo às concentrações mais elevadas (6,25 % - 50,00 %).

Do grupo de hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidaceae e do extrato aquoso da família Orobanchaceae, a *Euphrasia officinalis* foi o extrato que apresentou um perfil mais distinto, com uma redução muito pronunciada na produção de óxido nítrico na concentração de 50 %. Nos restantes hidrolatos, nas concentrações mais altas (6,25 % - 50,00 %) a produção de NO foi bastante baixa (Figura 17).

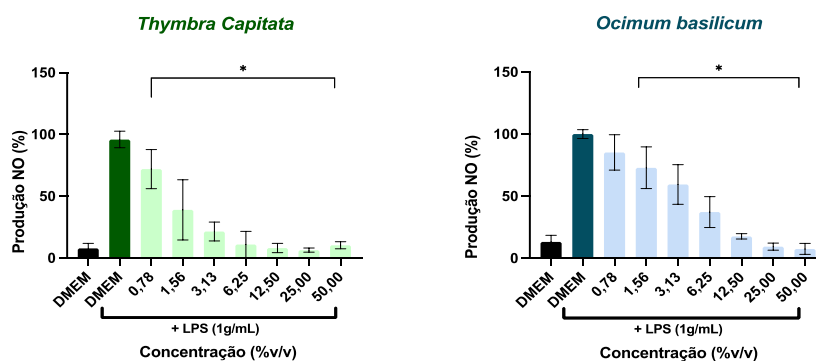


Figura 15 - Efeito dos hidrolatos da família Lamiaceae na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 µg/mL). Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de controlo expostas ao LPS. Também foi incluído controlo sem LPS para avaliar a produção basal de NO. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

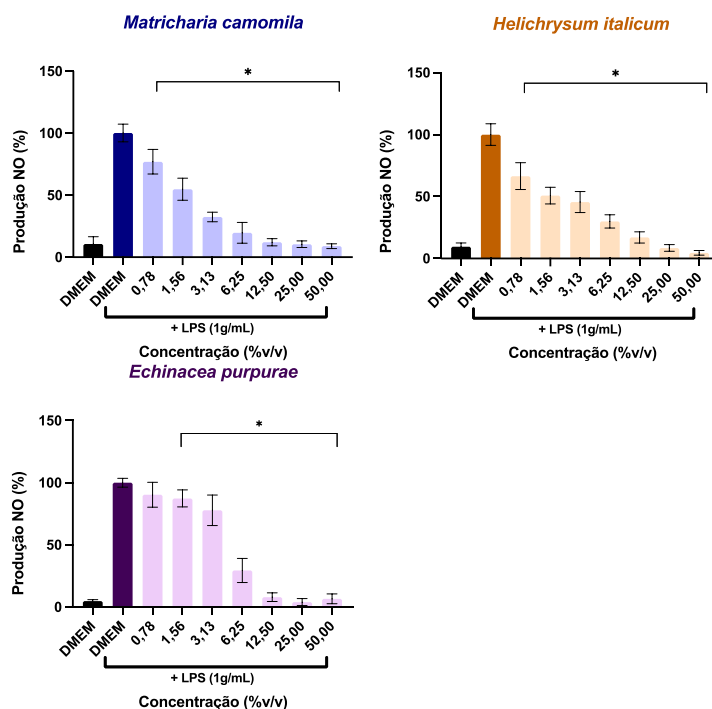


Figura 16 - Efeito dos hidrolatos da família Asteraceae na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de controlo expostas ao LPS. Também foi incluído controlo sem LPS para avaliar a produção basal de NO. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

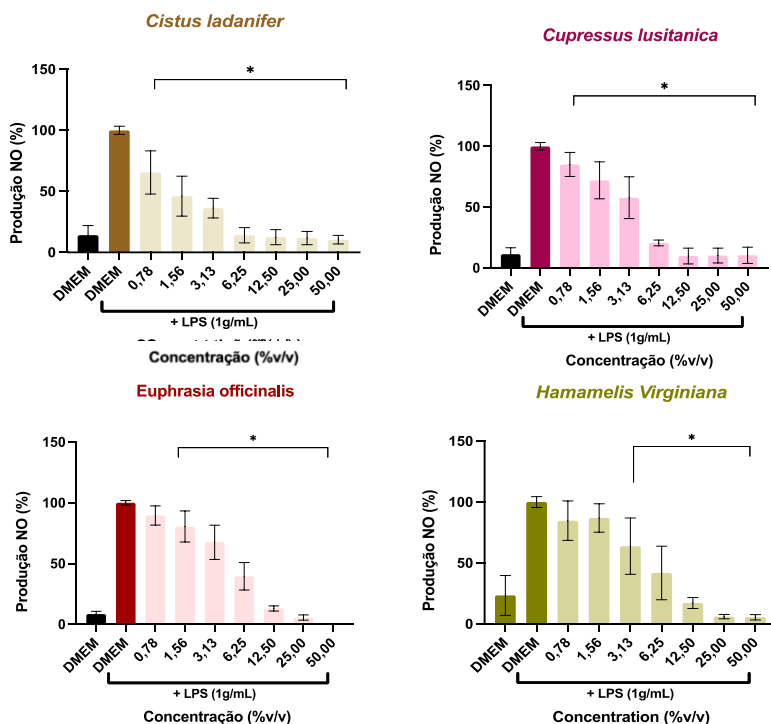


Figura 17 - Efeito dos hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Hamamelidacea e do extrato aquoso Orobanchaceae na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de controlo expostas ao LPS. Também foi incluído controlo sem LPS para avaliar a produção basal de NO. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

4.3.2. Atividade *Scavenging*

Quando se verificou uma diminuição da produção de NO nos ensaios de atividade anti-inflamatória, recorreu-se ao ensaio de atividade *Scavenging* de forma a percebermos se a redução observada anteriormente foi devida à diminuição na produção celular de NO ou se os extratos estavam a interferir diretamente na quantificação de nitritos. Foi então realizada uma reação entre um doador de NO (reagente SNAP) e diferentes concentrações de extratos.

De uma forma geral, podemos verificar que os hidrolatos em estudo não apresentaram atividade *Scavenging*, na maioria das concentrações testadas, sendo que apenas na concentração de 50 % ocorreu diminuição significativa dos níveis de NO quantificados em todos os hidrolatos. As diferenças mais significativas ocorreram quando se utilizou o hidrolato do *Helichrysum italicum* (Tabela 8 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Asteraceae.) e o extrato da *Euphrasia officinalis* (Tabela 10) em que ocorreu uma descida mais pronunciada dos níveis de NO, indicadora da capacidade *Scavenging* destes hidrolatos, para determinadas concentrações.

Tabela 8 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Asteraceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo.; *p < 0,05 foi considerada uma redução significativa, ANOVA unidirecional.

Asteraceae			
Concentração	<i>Echinacea purpurea</i>	<i>Matricharia camomila</i>	<i>Helichrysum italicum</i>
0,78	100,5 ± 0,9994	95,17 ± 3,321	79,29 ± 9,432
1,56	93,51 ± 2,257	99,09 ± 1,912	78,11 ± 8,652*
3,13	94,85 ± 1,778	95,12 ± 0,8524	78,8 ± 7,753
6,25	93,04 ± 1,456*	92,95 ± 3,244	77,07 ± 5,573*
12,5	94,1 ± 2,796	94,23 ± 3,244	66,65 ± 7,855*
25	85,38 ± 1,864*	77,86 ± 1,281*	58,2 ± 9,003*
50	72,65 ± 2,458*	72,44 ± 2,748*	48,9 ± 7,148*

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Tabela 9 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Lamiaceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. $p < 0,05$ foi considerada uma redução significativa, ANOVA unidirecional.

Lamiaceae		
Concentração	<i>Thymbra capitata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>
0,78	95,37 ± 3,316	98,35 ± 2,198
1,56	96,1 ± 2,235	98,1 ± 1,969
3,13	89,93 ± 4,179	86,14 ± 6,064
6,25	91,47 ± 3,605	93,34 ± 4,766
12,5	86,57 ± 1,012*	88,34 ± 3,494*
25	86,97 ± 3,756*	80 ± 2,701*
50	81,29 ± 2,713*	66,37 ± 3,555*

Tabela 10 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas das famílias Cistaceae, Cupressaceae Hamamelidaceae e do extrato aquoso Orobanchaceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. $p < 0,05$ foi considerada uma redução significativa, ANOVA unidirecional.

	Cistaceae	Cupressaceae	Orobanchaceae	Hamamelidaceae
Concentração	<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Cupressus lusitânica</i>	<i>Euphrasia officinalis</i>	<i>Hamamelis virginiana</i>
0,78	100,4 ±1,680	99,84 ±1,604	85,29±2,110*	102,3±2,426
1,56	99,73 ±4,842	99,21 ±1,394	76,67±3,923*	93,69±3,047
3,13	96,55 ±4,476	100,9 ±2,885	72,77±2,211*	94,93±2,624
6,25	98,19 ±6,600	91,51 ±1,959	64,53±1,469*	92,32±2,700
12,5	93,14 ±5,942	88,77±3,209*	55,18±1,862*	87,6±2,621*
25	92,33 ±7,992	78,74±2,927*	34,64±3,515*	81,49±3,106*
50	81,81 ±8,421*	68,8±6,913*	18,16±5,747*	66,39±1,882*

4.4. Comparação dos valores de EC₅₀ e IC₅₀

Com a finalidade de percebermos qual a preparação que se demonstrava mais interessante, fizemos uma comparação entre os valores de EC₅₀ e IC₅₀ obtidos nos ensaios realizados. Através desta tabela é possível estabelecer uma comparação IC₅₀/EC₅₀, na qual se considerou que quanto maior a diferença de resultados mais atraente seria o possível uso da planta em aplicações cosméticas, uma vez que se verificaria uma maior viabilidade aliada a baixos valores de produção de NO.

Tabela 11 - Tabela comparativa dos valores de IC₅₀ das RAW e HaCaT e EC₅₀ das células RAW.

	Produção NO	Viabilidade celular	
	EC ₅₀	IC ₅₀ RAW	IC ₅₀ HaCaT
<i>Euphrasia officinalis</i>	4,487	20,46	-
<i>Echinacea purpurea</i>	4,977	11,63	12,86
<i>Ocimum basilicum</i>	3,870	29,90	>50
<i>Thymbra capitata</i>	1,306	1,307	5,054
<i>Cupressus lusitânica</i>	3,117	8,620	30,85
<i>Hamamelis virginiana</i>	4,661	5,845	36,69
<i>Helicrysum italicum</i>	1,924	36,14	42,00
<i>Matricharia camomila</i>	1,903	11,20	27,58
<i>Cistus ladanifer</i>	1,411	14,62	11,49

Pela observação geral da Tabela 11 podemos concluir que o hidrolato que mostra melhor perfil de resultados é o de *Helicrysum italicum* devido ao grande intervalo entre estes valores sendo o de *Thymbra capitata* o que revela menos interesse (Tabela 11).

No que diz respeito a viabilidade celular, quanto menor for a concentração necessária para inibir 50 % da viabilidade celular (IC₅₀) maior é a atividade citotóxica de um extrato. Analisando os gráficos de curva dose-resposta (Apêndice II – Concentração necessária de extrato para inibir 50 % da viabilidade celular) gerados para a obtenção dos IC₅₀ acima representados (Tabela), verificamos que o hidrolato de *Helicrysum italicum* apresenta uma baixa atividade citotóxica nas duas linhas celulares, apresentando um elevado valor de IC₅₀ (36.14 % e 42 % para Raw e HaCaT, respetivamente). O hidrolato de *Thymbra capitata* apresenta baixos valores de IC₅₀, (1,307 % e 5,054 % para Raw e HaCaT, respetivamente), apresentando então uma elevada citotoxicidade nas linhas celulares em estudo.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Através de uma observação geral (Tabela 11) verificamos que os valores de IC_{50} são, para grande generalidade dos hidrolatos, superiores nas células HaCaT. Querendo isto dizer que a linha celular RAW se mostrou mais sensível à ação dos hidrolatos, apresentando uma menor viabilidade celular na sua presença.

Quanto à atividade anti-inflamatória, quanto menor o valor de EC_{50} (concentração para qual 50 % da população mostra resposta após um período de tempo especificado) maior é a capacidade do extrato reduzir a produção de NO. Analisando os gráficos de curva dose-resposta (Apêndice III – Concentração de extrato para a qual 50% da população apresenta resposta após um período de tempo específico) observamos que os hidrolatos de *Helicrysum italicum* e de *Thymbra capitata* são os que demonstram maior capacidade de redução do óxido nítrico (1,924 % e 1,306 % para *Helicrysum italicum* e *Thymbra capitata*, respetivamente). O hidrolato que se distingue com maiores valores de produção de NO é o de *Echinacea purpurea* (4,977 %).

Os baixos valores de produção de NO do hidrolato da *Thymbra capitata* também podem ser justificados com os baixos valores de viabilidade do mesmo, retirando o interesse deste hidrolato no que toca a ação anti-inflamatória, devido a poder ser justificado pela sua citotoxicidade.

4.5. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos em estudo foi avaliada através da sua exposição a dois microrganismos diferentes, o fungo filamentososo *Aspergillus brasiliensis* e a levedura *Candida albicans*. Durante estes ensaios foram avaliados os seus crescimentos através dos gráficos efetuados pela leitura das absorvâncias e pela inspeção visual da turvação dos poços, assim como do posterior crescimento do microrganismo em meio de cultura sólido, aquando da determinação da CML.

Tabela 12 - Tabela representativa dos CMI (Concentração Mínima Inibitória) visuais determinados para o *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*. Os valores de CIM e MLC são expressos em % (v/v).

Extratos	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Euphrasia officinalis</i>	N.O.	N.O.
<i>Echinacea purpurea</i>	N.O.	N.O.
<i>Ocimum basilicum</i>	N.O.	N.O.
<i>Thymbra capitata</i>	12,50 (%v/v)	12,50 (%v/v)
<i>Cupressus lusitanica</i>	N.O.	N.O.
<i>Hamamelis virginiana</i>	N.O.	N.O.
<i>Helicrysum italicum</i>	N.O.	N.O.
<i>Matricharia camomila</i>	N.O.	N.O.
<i>Cistus ladanifer</i>	N.O.	N.O.

N.O. – Não foi possível observar na gama de concentrações estudadas.

Tabela 13 - Tabela representativa das CML (Concentrações Letal Mínima) para o *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans* com o hidrolato *Thymbra capitata*. Os valores de CMI e CML são expressos em % (v/v).

	CML Visual (%v/v)	
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Thymbra capitata</i>	50,00	25,00

4.5.1. *Aspergillus brasiliensis*

Os valores de CMI e CML observados durante a realização dos ensaios estão representados nas tabelas

e Tabela 13. O hidrolato de *Thymbra capitata* foi o único hidrolato em que foi possível determinar a CMI visual (), por observação da ausência de turvação nas maiores concentrações (12,50 % - 50,00 %). Como foi determinada a CMI para este hidrolato, feito um outro ensaio de determinação da

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

CML. Verificou-se que o seu valor foi de 50 % (Figura 20), que corresponde a 4 vezes o valor de CMI.

Através da observação dos seguintes gráficos, verificámos que o hidrolato em que foi observável uma redução mais acentuada de crescimento microbiano foi o de *Thymbra capitata* (Figura 19).

Como é visível nos gráficos para os restantes hidrolatos, o crescimento microbiano ocorreu em todas as concentrações estudadas, que corrobora os resultados determinados por inspeção visual da placa (Figura 21). Apesar de existir uma redução do crescimento microbiano para algumas concentrações em estudo, através dos gráficos efetuados, é observável que o decréscimo de crescimento não foi muito elevado.

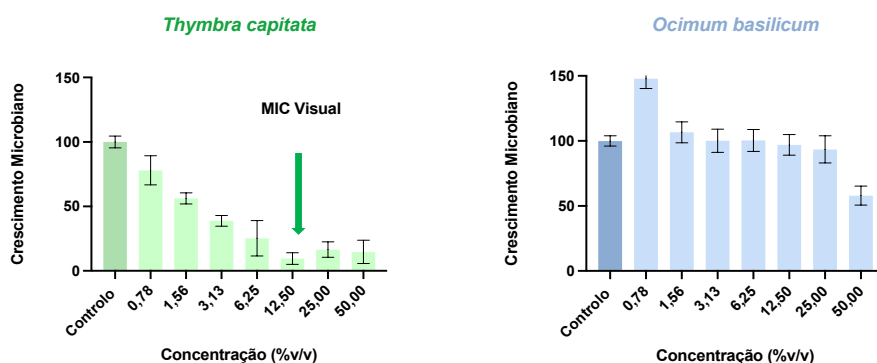


Figura 18 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Aspergillus brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Lamiaceae. O controlo contém apenas o fungo com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

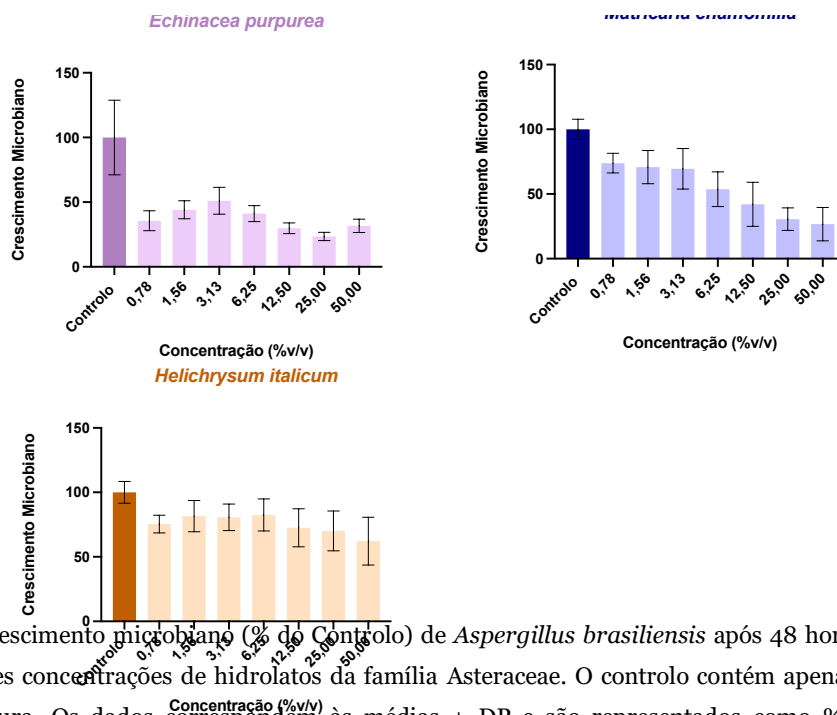


Figura 19- Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Aspergillus brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Asteraceae. O controlo contém apenas o fungo com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

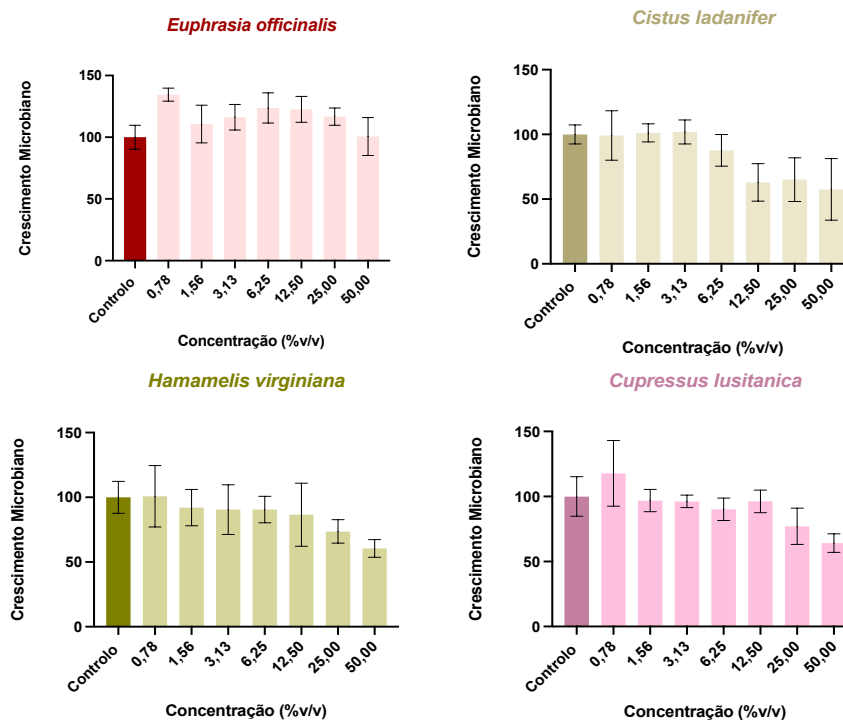


Figura 20 –Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Aspergillus brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e Hamamelidaceae. O controlo contém apenas o fungo com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

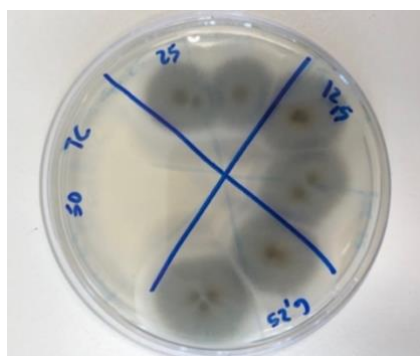


Figura 21 - Representação de um ensaio de determinação de CML, em placa de PDA, onde foram plaqueadas as suspensões obtidas com as concentrações do extrato imediatamente superiores e inferiores da CMI determinada visualmente. Verifica-se que ocorreu crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis* para as concentrações plaqueadas, com exceção de 50 % que foi assumida como CML.

4.5.2. *Candida albicans*

Os valores de CMI e CML observados durante a realização dos ensaios estão representados nas tabelas

e Tabela 13. O hidrolato de *Thymbra capitata* foi, tal como no fungo *Aspergillus brasiliensis*, de novo o único hidrolato em que foi possível determinar a CMI visual (

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

), por observação da ausência de turvação nas maiores concentrações (12,50 % - 50,00 %). Como foi confirmada a não turvação nas concentrações mais elevadas deste hidrolato, foi feito um outro ensaio, de determinação CML. Verificou-se que o seu valor foi de 25 % (Figura 25), que corresponde a 2 vezes o valor de CMI. Através da observação dos seguintes gráficos, verificámos que o hidrolato em que foi observável uma redução mais acentuada de crescimento microbiano foi o de *Thymbra capitata* (Figura 22).

Através da observação do gráficos restantes hidrolatos (Figura 22, Figura 23 e Figura 24), verificamos que o decréscimo do crescimento microbiano não foi considerável, diminuído apenas nas maiores concentrações testadas, mas não o suficiente para provocar a inibição da *Candida albicans*.

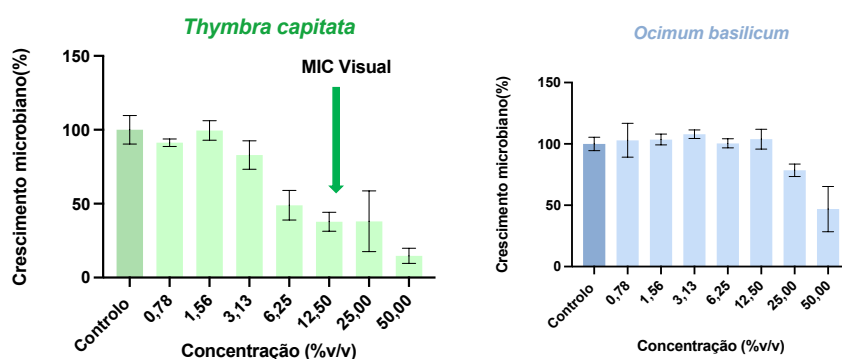


Figura 23 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Lamiaceae. O controlo contém apenas a levedura com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

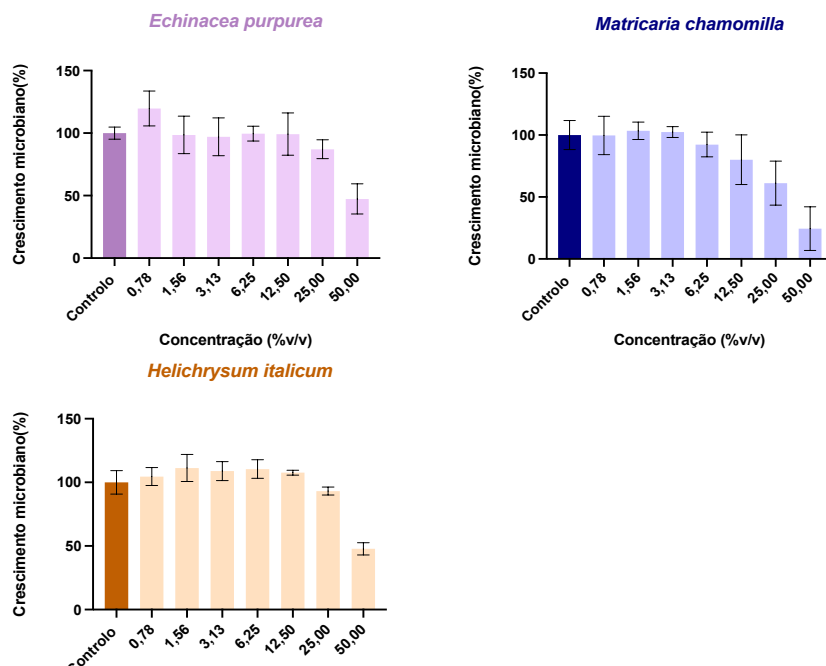


Figura 22 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos da família Asteraceae. O controlo contém apenas a levedura com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

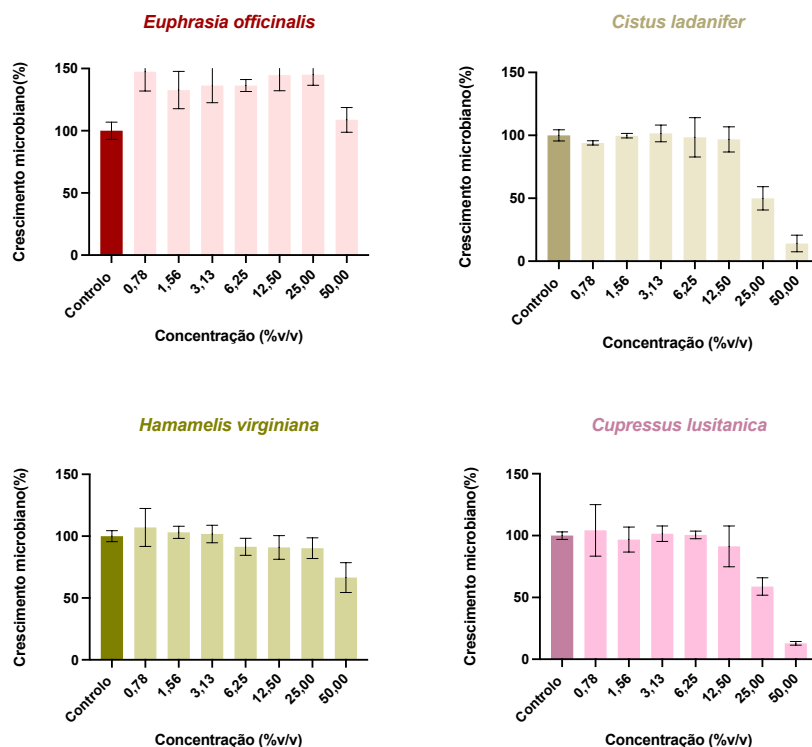


Figura 24 - Crescimento microbiano (% do Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de hidrolatos, hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e Hamamelidaceae. O controlo contém apenas a levedura com meio de cultura. Os dados correspondem às médias \pm DP e são representados como % de células de crescimento microbiano.



Figura 25 – Representação de um ensaio de determinação de CML, em placa de SDA, onde foram plaqueada as suspensões obtidas com as concentrações do extrato imediatamente superiores e inferiores da CMI determinada visualmente. Verifica-se que ocorreu crescimento da levedura, *Candida albicans* para a concentração de 12,5%, e não ocorreu crescimento a partir da concentração de 25% que foi assumida como CML.

Folha em branco

5. Discussão

As diversas alterações climáticas que temos vindo a enfrentar despertaram o lado mais ecológico dos consumidores, e como tal, tem aumentado a compra de produtos mais “verdes”, com utilização de plantas na sua constituição e com menos aditivos sintéticos [1]. Os cosméticos e fármacos com aplicação na pele são dos que têm despertado mais interesse, pois, as doenças tópicas têm tido um crescimento exponencial, sendo já uma das doenças mais prevalentes, tendo sido estimado que afetem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo [5,76].

As plantas demonstram ter cada vez mais aplicações no que toca ao combate por via tópica das doenças nas quais a bioatividade de extratos de plantas se demonstra relevante. Os hidrolatos ao serem um subproduto proveniente da produção de óleos essenciais por hidrodestilação são muitas vezes esquecidos e daí a pouca informação acerca dos mesmos. Durante esta dissertação demos atenção às suas bioatividades e tentámos demonstrar o seu interesse no combate de doenças de pele causadas por fungos, aliando a sua ação antifúngica ao seu potencial para modelar a resposta inflamatória, habitualmente presente nestes quadros clínicos [77].

De forma a estudar mais aprofundadamente a ação dos hidrolatos no tratamento tópico de doenças cutâneas, durante a realização do presente trabalho, foram investigados vários hidrolatos pertencentes a diferentes famílias, especificamente as espécies *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica*, *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Helichrysum italicum*, *Matricaria chamomilla*, *Ocimum basilicum* e *Thymbra capitata* e o extrato aquoso de *Euphrasia officinalis*. A ação dos extratos foi estudada em duas linhas celulares distintas (macrófagos e queratinócitos) e em dois fungos que serviram de modelo preditivo para a sua possível ação contra este grupo de microrganismos, nomeadamente o fungo filamentosso *Aspergillus brasiliensis* e a levedura *Candida albicans*.

Inicialmente os hidrolatos e extrato aquoso foram caracterizados em relação aos seus compostos maioritários, de forma a inferir sobre o possível contributo destes compostos para as diferentes bioatividades mostradas.

Como descrito na secção dos resultados, de forma geral, os hidrolatos que mais se evidenciaram pela sua bioatividade foram o de *Thymbra capitata* e o de *Helichrysum italicum*, por se terem mostrado mais bioativos, numa maior gama de ensaios.

Diversos estudos confirmam ser o Carvacrol o principal componente do hidrolato de *Thymbra capitata*, com percentagens que variam entre os 75,14 % e 98,5 %, na parte volátil

do hidrolato. A quantidade de carvacrol na amostra em estudo está compreendida entre o intervalo descrito na literatura por Moukhles et al. (2018) e Paolini et al. (2008) [78,79]. Quanto ao hidrolato de *Helichrysum italicum*, a bibliografia que descreve a composição química do mesmo é muito escassa, existindo apenas um artigo que refere o 6-etil-2,2-dimetiloctano-3,5-diona e α -terpineol como compostos maioritários, com quantidades relativas de 16,7 % e 15,6 %, respetivamente [80]. Relativamente ao hidrolato de *Helichrysum italicum* em estudo, este apresenta como compostos maioritários o α -terpineol (30,55 %) e o carvacrol (29,58 %). Tais diferenças quantitativas e qualitativas nos compostos maioritários de diferentes hidrolatos são expectáveis, sendo que existem diversos fatores que podem contribuir para esta variação, que vão desde o método de extração até ao local e condições climáticas durante o crescimento da planta [81].

Relativamente aos restantes hidrolatos, as informações à cerca da composição química dos mesmos são muito escassas, sendo que a maioria dos estudos se foca nos óleos essenciais. Como tal não foram encontradas informações relativas aos hidrolatos de *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Matricaria chamomilla* e ao extrato aquoso de *Euphrasia officinalis*.

A informação disponível à cerca da composição do hidrolato de *Cistus ladanifer* é também muito limitada, mas segundo a literatura encontrada, os principais constituintes deste hidrolato são trans-pinocarveol, borneol, terpinen-4-ol e verbenona. Na amostra em estudo, dos compostos maioritários descritos na literatura apenas coincide a verbanona, que se encontra presente na concentração de 9,81 %, percentagem relativamente próxima aos 7,8 % retratados na literatura [82].

A composição fitoquímica do hidrolato de *Cupressus lusitanica* encontrada na literatura apresentou uma composição semelhante à amostra em estudo. Os compostos maioritários que estão descritos são o *p*-cymen-8-ol, o terpinen-4-ol e α -terpineol. Estudos reportam que o *p*-Cymen-8-ol pode estar presente em hidrolatos desta espécie numa quantidade que varia entre os 10,5 % e 15,7 %. No hidrolato em estudo, este composto encontra-se em menor quantidade numa percentagem de 2,7 %. Pelo contrário, os compostos terpinen-4-ol e α -terpineol estão presentes em maior quantidade, sendo que o terpinen-4-ol está descrito numa quantidade variável entre os 21% e 31,4 % e o α -terpineol entre 5,9 % e 9,7 %. na amostra em estudo, estes compostos correspondem a 38,93 % e 14,67 % dos compostos totais, respetivamente [82].

O hidrolato de *Ocimum basilicum* estudado apresenta os mesmos compostos maioritários descritos na literatura, nomeadamente o linalool, o eucaliptol e o eugenol. o linalool encontra-se descrito na literatura, em quantidades relativas de 66,5 % dos compostos totais

do hidrolato, em valor que é, significativamente maior do que o presente na amostra analisada (38,34 %). O eucaliptol está presente também em maior quantidade em estudos com hidrolato desta espécie previamente reportados (cerca de 7,1 % comparado com a amostra em estudo - 3,35 %). Já o eugenol, contrariamente aos restantes compostos, representa uma maior quantidade da amostra em estudo, cerca de 52,53 % do que a quantidade reportada na literatura (18,9 %) relativamente aos compostos totais analisados [83].

Após a caracterização dos compostos maioritários dos extratos em estudo, foi avaliada a sua citotoxicidade em duas linhas celulares, nomeadamente macrófagos e queratinócitos, que serviram de modelo para o estudo da atividade anti-inflamatória e biocompatibilidade celular.

O estudo da viabilidade celular como resposta a diferentes fatores é bastante importante, não só de forma a prever, *in vitro*, a segurança dos extratos enquanto ingredientes em produtos cosméticos como farmacêuticos; como também para determinar a gama de concentrações biocompatíveis a utilizar durante a realização de diferentes ensaios, de forma a correlacionar a eficiência do extrato com a sua segurança.

A escolha da linha celular HaCaT para avaliação da biocompatibilidade dos extratos baseou-se no objetivo final de aplicação dos mesmos, em produtos de aplicação tópica na pele, e como tal foi essencial observar como é que os queratinócitos reagem à exposição aos extratos [84]. A linha celular HaCaT é representativa das células epidérmicas que são responsáveis pela função estrutural e de barreira da epiderme. Estão também envolvidas na cicatrização de feridas e nas respostas imunológicas e inflamatórias da pele [85].

Durante os ensaios de citotoxicidade na linha celular HaCaT, verificou-se que os hidrolatos que promoviam uma maior viabilidade celular foram os de *Ocimum basilicum*, *Helichrysum italicum* e o extrato da *Euphrasia officinalis*. Estas preparações demonstraram-se bastante biocompatíveis, inclusive apresentando viabilidades superiores a 70 % na maioria das concentrações testadas.

Contrariamente aos hidrolatos anteriormente anunciados, o hidrolato de *Thymbra capitata* quando adicionado aos queratinócitos provocou uma diminuição considerável da viabilidade celular nas maiores concentrações. Verificamos, contudo, que apesar de apresentar um perfil citotóxico, o hidrolato demonstrou-se biocompatível nas concentrações mais baixas (0,78 % - 3,12 %).

No caso dos macrófagos, ao fazerem parte do sistema imunológico, desempenham um papel fundamental, fornecendo uma defesa imediata contra agentes estranhos e levam à produção de vários mediadores pró-inflamatórios [19]. Quando se encontram ativados, secretam diversos mediadores tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO, que quando produzidos em abundância, estão envolvidos em diversas doenças inflamatórias. Assim sendo, torna-se importante estudar formas de inibir a ativação dos macrófagos e produção dos seus mediadores pró-inflamatórios, quando avaliamos o potencial inflamatório de extratos ou ingredientes [74].

Como descrito anteriormente na seção de resultados, durante os ensaios de avaliação de citotoxicidade, os hidrolatos que se mostraram menos citotóxicos para a linha celular RAW foram o *Ocimum basilicum* e o *Helichrysum italicum*. Estes hidrolatos demonstraram-se bastante biocompatíveis, com o hidrolato de *Helichrysum italicum* a apresentar inclusive viabilidades acima de 70 %, em seis das sete concentrações testadas.

Na linha celular RAW foi também possível verificar um aumento da viabilidade celular, para um dos extratos em estudo, nomeadamente o de *Euphrasia officinalis*. Esse aumento pode ser devido a uma maior produção de compostos biologicamente ativos relacionados com a proliferação celular. Este extrato aquoso é maioritariamente constituído por flavonoides, contudo, a literatura existente acerca do efeito destes metabolitos nas células RAW é bastante escassa. Segundo Ajayi et al. (2017) os flavonoides não provocaram redução da viabilidade em concentrações mais baixas por períodos de exposição de 24 h, aumentado apenas a citotoxicidade quando o tempo de exposição aumenta para as 72 h [86]. O facto de as células terem sido expostas ao extrato aquoso de *Euphrasia officinalis* por períodos de 24 h, pode justificar os resultados observados.

De forma oposta, a preparação que se demonstrou mais citotóxica em ambas as linhas celulares, foi o hidrolato de *Thymbra capitata*. Nesta linha celular RAW, o hidrolato não se mostrou biocompatível em nenhuma das concentrações testadas, provocando um grande efeito citotóxico sobre esta linha celular.

Considerando a composição química destes extratos e a sua influência no perfil de citotoxicidade dos mesmos, a elevada biocompatibilidade do *Helichrysum italicum* em ambas as linhas celulares pode estar relacionada com a sua composição em α -terpineol, que já este foi reportado em vários estudos como não tóxico e seguro tanto para os seres vivos como para o ambiente [87,88]. Referente ao hidrolato de *Ocimum basilicum*, também compatível

nas duas linhas celulares, apesar da citotoxicidade de um dos seus compostos maioritários, especificamente o eugenol, estar estabelecida na literatura, a sua atividade foi maioritariamente estudada em células cancerígenas, onde se verificou eficaz na indução da apoptose. Contudo, os autores também demonstraram que a apoptose celular e a fragmentação do DNA foram dependentes da dose aplicada [89], podendo justificar assim a ausência de toxicidade verificada quando presente no hidrolato.

O extrato aquoso de *Euphrasia officinalis* apresentou um perfil diferente dos restantes estudados, apresentando uma elevada biocompatibilidade para todas as concentrações. Este extrato, por ser aquoso, possui um método de produção distinto dos restantes extratos, apresentando também um diferente perfil ao nível da sua composição química, como discutido acima.

Considerando a caracterização fitoquímica do hidrolato de *Thymbra capitata* observamos que o carvacrol está presente como composto maioritário, com uma quantidade relativa de 98,11%, na parte volátil do hidrolato. Estudos anteriores já reportaram o efeito deste composto na viabilidade celular em diferentes linhas, atribuindo a sua elevada toxicidade ao efeito sobre a membrana celular[90,91].

Estudos acerca do hidrolato de *Thymbra capitata*, e dos seus efeitos ao nível da viabilidade celular são escassos na literatura, não permitindo assim uma comparação direta entre os resultados obtidos. Contudo, estudos anteriores realizados por Delgado-Adámez et al. (2017) e Fitsiou E. et al. (2016) já reportaram diversas atividades do seu constituinte maioritário, o carvacrol, sobretudo em células cancerígenas [92,93].

De forma a testar se a citotoxicidade avaliada foi devida ao verdadeiro efeito citotóxico do extrato e não apenas ao efeito da privação do meio de cultura, sobretudo nas concentrações mais elevadas, foi feita uma análise do solvente utilizado na maior concentração, substituindo os extratos por 50 % de água ultra pura.

No estudo com as células HaCaT verificamos que a privação de 50 % de meio de cultura DMEM não afetou as células, visto que a viabilidade celular foi semelhante ao controlo. No caso das RAW verificamos que as células são mais afetadas pela privação de meio, tendo uma viabilidade inferior a 45 % quando exposta a este controlo. Contudo, o facto de em alguns dos hidrolatos o potencial citotóxico se mostrar superior ao do solvente, na maior concentração, parece corroborar que o efeito dos hidrolatos em questão se deve à sua própria citotoxicidade e não ao solvente utilizado.

Verificamos também que, de forma geral, o aumento da concentração dos hidrolatos provoca uma diminuição da viabilidade em ambas as linhas celulares. Observamos, contudo, diversas diferenças na sensibilidade entre os queratinócitos e os macrófagos à ação dos extratos, como podemos verificar pela análise dos respectivos IC_{50} s. Um extrato ou hidrolato é tanto mais biocompatível quanto maior for a concentração necessária para inibir 50 % da viabilidade celular da linha celular em estudo (IC_{50}). Através da análise dos respectivos IC_{50} verificamos então que a linha celular HaCaT se demonstrou menos suscetível à ação dos hidrolatos e extrato aquoso. Os queratinócitos, quando expostos ao hidrolato de *Thymbra capitata* (hidrolato que se demonstrou mais citotóxico) apresentam um valor de IC_{50} de 5,054 % (v/v), valor que é notoriamente superior ao encontrado na linha celular RAW (1,307 % (v/v)). A menor sensibilidade dos queratinócitos em relação aos macrófagos foi comprovada nos estudos realizados por Duangyod et al. (2021), em que quando adicionado, neste caso calcário vermelho, os queratinócitos demonstraram menor diminuição da viabilidade e os macrófagos demonstraram-se mais sensíveis [94]. Também foram encontrados estudos, nomeadamente o estudo por Khaleel et al. (2015), em que foi relatado o oposto e os macrófagos se apresentaram mais resistentes que os queratinócitos, quando adicionado óleo essencial de *Artemisia herba-alba* [95]. Não foram encontrados estudos que relacionem ambas as linhas celulares quando sofriam ambas a ação de hidrolatos. A variação dos resultados encontrados pode ser dependente do tipo de composto em estudo e das condições utilizadas. Neste caso, tendo em conta que as condições de teste foram as mesmas, as diferenças de suscetibilidade entre as linhas celulares poderão estar relacionada com as disparidades metabólicas intrínsecas entre elas, bem como devido às diferenças nos seus mecanismos inerentes, que eliminam os danos [96].

Resumindo, verificámos que os hidrolatos de *Thymbra capitata* e de *Helichrysum italicum*, se destacaram nas diferentes linhas celulares por razões opostas, nomeadamente a *Thymbra Capitata* devido aos seus efeitos citotóxicos em ambas as linhas celulares e o *Helichrysum italicum* pelo facto de apresentar uma elevada biocompatibilidade.

Após o estudo da citotoxicidade percebemos que algumas das plantas demonstravam interesse para uma futura aplicação na pele, devido ao sua compatibilidade, o que nos levou a prosseguir com o estudo da atividade anti-inflamatória em macrófagos. Para isso, usamos a linha celular anteriormente estudada, a qual estimulámos com o LPS como indutor de inflamação, na presença ou ausência dos extratos em estudo. O LPS é um dos componentes da membrana exterior das bactérias gram-negativas que estimula a produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico. Através da sua adição é possível medir os

níveis de óxido nítrico produzidos pelas células, sendo a redução deste mediador um indicador da possível atividade anti-inflamatória de um extrato ou composto [97].

Durante este trabalho, verificamos que os baixos valores de atividade anti-inflamatória de alguns dos hidrolatos e extrato aquoso em estudo pode ser justificada pela citotoxicidade dos extratos, para determinadas concentrações. Um exemplo desta influência é evidente no hidrolato de *Thymbra capitata*. Quando analisamos os resultados da atividade anti-inflamatória, podemos verificar uma grande descida na produção de NO na grande maioria das concentrações (1,56 % - 50,00 %). Contudo, como vimos anteriormente, o respectivo hidrolato também demonstra bastante atividade citotóxica, sendo a viabilidade reduzida quase a zero nas altas concentrações (6,25 % - 50,00 %). Ou seja, os baixos valores de produção de NO são influenciados pela baixa viabilidade nessas concentrações.

Nos restantes hidrolatos estudados também foi observável uma descida na produção de NO nas maiores concentrações, apresentando um perfil dose-resposta. Na concentração de 50,00 % (V/V) a produção de NO é nula em todos os hidrolatos, mas como está referido anteriormente, essa concentração afeta a viabilidade celular na grande maioria das preparações. Ao existir uma grande redução no número de células viáveis, a produção de NO destas vai ser logicamente menor.

Entre os hidrolatos da família Asteraceae, o hidrolato de *Helichrysum italicum* foi o hidrolato que demonstrou uma maior redução da produção de NO, de forma independente do seu perfil de citotoxicidade. Como já foi referido anteriormente, o seu constituinte principal é o α -terpineol, composto que já foi descrito na literatura e pela sua atividade anti-inflamatória nomeadamente pela diminuição dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α observadas após os estímulos com este composto em macrófagos [98]. Esta atividade do composto maioritário nos mediadores pró-inflamatórios pode justificar os resultados obtido para este hidrolato.

O extrato aquoso de *Euphrasia officinalis* não exibiu o mesmo perfil que os hidrolatos, apresentando uma baixa redução dos níveis de NO. Este resultado levou-nos a questionar que, sendo este o único extrato com cor, poderia estar a ocorrer uma interferência da cor na leitura das absorvâncias. Para combater esta adversidade, a leitura das absorvâncias foi feita previamente à adição do LPS e esses valores posteriormente foram retiradas à leitura final com a adição de LPS. Conseguimos assim eliminar a interferência da cor do extrato das leituras da produção do NO.

Ao verificarmos que a maioria dos extratos em estudo causava uma redução da produção de NO, foi realizado um ensaio adicional para determinar a atividade *Scavenging*, de forma a perceber se a diminuição da produção de óxido nítrico se devia à ação dos extratos nas células ou à capacidade do próprio extrato remover o NO do meio de cultura. Esta avaliação foi conseguida através da adição de um doador de NO, o SNAP num ensaio realizado sem células.

Pela observação das tabelas presentes nos resultados e dos respetivos gráficos (em anexo) verificámos que, na família Asteraceae, o *Helichrysum italicum* foi o único hidrolato que demonstrou atividade *Scavenging*.

Por sua vez, o extrato aquoso de *Euphrasia officinalis*, foi o extrato que causou uma redução mais acentuada na concentração de nitritos, e, portanto, uma maior capacidade *Scavenging*. Estes resultados ajudaram-nos a concluir que então que a redução da produção de NO nos ensaios de atividade anti-inflamatória poderá ter sofrido influência da capacidade *Scavenging* do próprio extrato. Consideramos assim que este extrato não demonstra grande interesse quando se trata da sua aplicação em produtos com atividade anti-inflamatória, visto que a redução apresentada não está relacionada com uma inibição da produção de NO pelas células RAW, mas sim pelo próprio extrato.

Nos extratos em que não se verificou uma redução considerável da atividade *Scavenging*, a redução do NO apresentada acontece ao nível celular através de mecanismo intracelulares, o que torna estes extratos interessantes para uma possível aplicação em produtos com atividade anti-inflamatória. Tal atividade pode ser devida a redução da expressão da enzima responsável pela produção de NO, a iNOS (Óxido Nítrico Sintetase) [99].

Através da comparação entre os valores de IC₅₀ e EC₅₀ conseguimos então concluir que o hidrolato que se demonstrou mais interessante para a possível aplicação na pele foi o de *Helicrysum italicum* devido à maior diferença de magnitude destes dois indicadores, quando comparado com os restantes hidrolatos. Quanto maior o intervalo de valores entre os valores de IC₅₀ e EC₅₀ mais interessante se torna o hidrolato, pois os elevados valores de viabilidade aliados à capacidade de diminuir a produção de NO tornam-no eficaz enquanto possível anti-inflamatório, em concentrações consideradas como seguras.

O *Helicrysum italicum* já foi reconhecido anteriormente na literatura como uma espécie bastante interessante devido à sua bioatividade. Neste estudo foi o hidrolato mais biocompatível com a linha celular HaCaT, validando a sua utilização em produtos de aplicação tópica; e revelou-se como o hidrolato com atividade anti-inflamatória mais

revelante. O α -terpineol, composto maioritário presente no hidrolato, já foi reportado anteriormente como potenciador de penetração na cutânea, aplicação bastante interessante neste caso de estudo. Tem também um aroma agradável, aumentando o interesse da sua utilização no fabrico de perfumes, cosméticos e sabonetes [100].

A planta *Helicrysum italicum* é também autóctone da flora portuguesa, assim sendo, é mais adaptada às condições do solo, mais resistente a pragas e doenças, ou seja, uma planta mais fácil de manter e cultivar [101]. Tais características tornam a sua utilização ainda mais interessante e benéfica, pois ao ser uma planta de fácil acessibilidade no nosso território e com uma distribuição muito extensa sobre a nossa costa faz com que esteja disponível para a indústria uma grande quantidade de matéria-prima [54].

De forma a aprofundar o conhecimento sobre o potencial bioativo dos hidrolatos em estudo, avaliou-se também a capacidade dos hidrolatos de inibirem o crescimento de determinados microrganismos de relevância clínica em infeções fúngicas cutâneas, nomeadamente da *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*. Estes microrganismos causam infeções recorrentes e ao serem um fungo filamentosos e uma levedura, os seus resultados são também representativos do seu potencial contra outros fungos causadores de infeções na pele.

Relativamente aos resultados para o *Aspergillus brasiliensis*, fungo omnipresente no solo e um contaminante alimentar muito comum, este não se mostrou sensível à atividade dos hidrolatos e extrato aquoso. Este microrganismo apresenta-se como um fungo oportunista, tornando-se causador de doença quando o sistema imunológico se encontra comprometido, e a sua transmissão é feita através de esporos [102,103].

De todos os extratos estudados, apenas o hidrolato da *Thymbra capitata* provocou uma diminuição considerável do crescimento deste microrganismo. Este foi também o único hidrolato para o qual se determinou uma CMI visual. Verificou-se também que para a concentração de CMI este hidrolato apresentou-se como fungistático, sendo que CMI obtido foi superior a valor de CMI.

Relativamente à *Candida albicans*, este é um dos patógenos mais prevalentes dos humanos [104–106], que se caracteriza por ser um fungo dimórfico que prolifera tanto na forma de levedura como em forma de hifa [107]. A *Candida albicans* pode causar infeções superficiais como a candidose oral ou vaginal ou/e infeções sistémicas, apresentando-se estas como quadros clínicos graves. Os episódios provocados por esta levedura tendem a ocorrer nas áreas húmidas na pele, causando erupções cutâneas, prurido e descamação da pele [108,109].

Este microrganismo mostrou-se menos sensível à ação das preparações quando comparável com o *Aspergillus brasiliensis*, não sendo observável quase nenhuma diminuição relevante do crescimento entre o controlo e as várias concentrações testadas, para a maioria dos hidrolatos. À semelhança do que se verificou para o fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis*, o hidrolato de *Thymbra capitata* foi o único extrato onde se observou CMI visual para a *Candida albicans*. Verificou-se, contudo, uma diferença da eficácia deste hidrolato nos dois microrganismos. Apesar se apresentarem o mesmo valor de CMI, para a *Candida albicans* a CML ocorreu para um valor de duas vezes a CMI, mostrando-se mais eficaz quando comparado com *Aspergillus brasiliensis* onde o MLC foi de quatro vezes a CMI.

Estudos existentes na literatura como, Faleiro et al. (2005) descrevem a ação do hidrolato de *Thymbra capitata*, os mesmos atribuem a sua forte atividade à presença de compostos fenólicos, sobretudo ao seu composto maioritário - o carvacrol - e ao seu possível sinergismo com os restantes compostos que constituem o hidrolato [110].

As propriedades antimicrobianas dos fenóis já estão bem descritas na literatura e podem ser explicadas por interações dos mesmos com a membrana celular dos microrganismos. A maior atividade antimicrobiana do carvacrol, segundo a bibliografia (Arfa et al. 2006), pode ser resultado da sua hidrofobicidade, aumentando a interação e o acumular de compostos na membrana celular. A sua capacidade de ligação ao hidrogénio e sua capacidade de libertação de prótons podem induzir modificação conformacional da membrana, resultando em morte celular [111].

Esta planta, *Thymbra capitata*, tal como o *Helicrysum italicum* é uma planta autóctone de Portugal continental, ocorrendo naturalmente no território português [112]. Esta característica, como foi referido anteriormente, aumenta exponencialmente o interesse dos produtores nesta planta, devido à maior facilidade no acesso e produção.

Durante a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana não era esperada uma redução acentuada do crescimento microbiano, tal como se verificou durante a análise dos mesmos. Quando comparados com os óleos essenciais, os hidrolatos tendem a ser menos eficazes pois a sua bioatividade é menor. Considerando a sua ação como antifúngicos, o único hidrolato que se demonstrou interessante para possível aplicação num produto cosmético ou farmacêutico foi o hidrolato da *Thymbra capitata*.

Apesar dos estudos que relatam a atividade antifúngica dos hidrolatos serem escassos, estes reportam que a atividade destes é muito moderada, tendo uma eficácia muito menor

quando comparados com os respectivos óleos essenciais [113]. Contudo, apesar da maior atividade antifúngica que apresentam, os óleos essenciais apresentam também uma menor margem de segurança. Os hidrolatos, por serem menos tóxicos, apresentam a vantagem de poderem ser usados sem diluição e ser aplicados diretamente no local de interesse ou serem até bebidos [29]. Esta característica aumenta o seu interesse como compostos bioativos para diferentes aplicações, onde se inclui a sua inclusão em produtos cosméticos.

Folha em branco

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

A utilização dos hidrolatos tem se demonstrado cada vez mais interessante, apesar da sua eficácia mais reduzida quando comparados com os seus respetivos óleos essenciais.

As vantagens da utilização dos hidrolatos já estão a ser aproveitadas por algumas empresas, e já podem ser encontrados no mercado em formulações cosméticas, ou puros para utilização cosmética e até alimentar como era efetuado na antiguidade.

Entre as diferentes aplicações que podem ser atribuídas a estes produtos, a sua elevada biocompatibilidade, aliada ao potencial bioativo de alguns deles, tornam-nos particularmente interessantes como ingredientes em formulações de aplicação tópica, nomeadamente em produtos cosméticos.

Dos hidrolatos e extrato aquoso que foram estudados ao longo deste trabalho, todos apresentaram a capacidade de reduzir a viabilidade celular. Ainda assim, todos possuem concentrações em que são biocompatíveis, com exceção do hidrolato de *Thymbra capitata*, apresentando-se este como o hidrolato mais citotóxico. Através da comparação dos diferentes resultados, descobrimos que o hidrolato mais biocompatível foi *Helichrysum italicum*. Este, juntamente com o hidrolato de *Ocimum basilicum*, apresentaram valores IC_{50} muito mais elevados do que os correspondentes EC_{50} s, e foram por isso considerados os melhores candidatos como ingredientes bioativos para aplicação em produtos com ação anti-inflamatória. Verificou-se também que, para a maioria dos extratos, esta ação anti-inflamatória se deveu a uma verdadeira diminuição dos níveis de NO produzidos e não ao seu potencial de atuarem como antioxidantes (*Scavenging*), corroborando assim o seu potencial anti-inflamatório.

Relativamente ao potencial dos hidrolatos em atuarem como antifúngicos, apenas o hidrolato de *Thymbra capitata* apresentou CMIs visuais para ambos os microrganismos, sendo fungistático nessas concentrações. Contudo, as concentrações necessárias para se conseguir esta atividade foram muito superiores aos limites de biocompatibilidade em ambas as linhas celulares. Estudos adicionais, em modelos mais robustos, são necessários para aferir a verdadeira citotoxicidade deste subproduto.

Conclui-se assim que os hidrolatos de *Helichrysum italicum* e *Thymbra capitata* se destacaram pela capacidade anti-inflamatória e antimicrobiana, respetivamente. Sendo estes subprodutos da hidrodestilação de óleos essenciais, os resultados obtidos contribuem

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

para a valorização dos hidrolatos, particularmente dos provenientes de plantas autóctones portuguesas.

As potenciais aplicações destes hidrolatos poderiam incluir champôs, cremes ou desodorizantes que atuassem como adjuvantes em casos de infeção fúngica ou de doenças com grande componente inflamatória, contribuindo para a manutenção da saúde da pele. A sua utilização diária poderia contribuir para prevenção do aparecimento de doenças fúngicas mais prevalentes. Uma outra possível aplicação seria também, por exemplo, como antioxidantes com ação anti-aging ou como conservantes em formulações cosméticas graças à atividade antioxidante que alguns hidrolatos apresentaram.

Contudo, é indispensável a realização de mais estudos que avaliem tanto outros potenciais efeitos bioativos com vista a outras aplicações, como também estudos que avaliem a sua segurança, como o estudo do seu potencial mutagénico e genotóxico.

7. Referências Bibliográficas

1. Biswas, A.; Roy, M. Green Products: An Exploratory Study on the Consumer Behaviour in Emerging Economies of the East. *Journal of Cleaner Production* 2015, 87, 463–468, doi:10.1016/J.JCLEPRO.2014.09.075.
2. Amberg, N.; Fogarassy, C. Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. *Resources* 2019, Vol. 8, Page 137 2019, 8, 137, doi:10.3390/RESOURCES8030137.
3. Liobikienė, G.; Bernatoniene, J. Why Determinants of Green Purchase Cannot Be Treated Equally? The Case of Green Cosmetics: Literature Review. *Journal of Cleaner Production* 2017, 162, 109–120, doi:10.1016/J.JCLEPRO.2017.05.204.
4. 2022 Sustainability Consumer Research: Sustainability and Profitability | IBM Available online: <https://www.ibm.com/thought-leadership/institute-business-value/report/2022-sustainability-consumer-research> (accessed on 14 April 2022).
5. Wheeler, M.L.; Limon, J.J.; Underhill, D.M. Immunity to Commensal Fungi: Detente and Disease. *Annu Rev Pathol* 2017, 12, 359, doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-052016-100342.
6. Tabassum, N.; Hamdani, M. Plants Used to Treat Skin Diseases. *Pharmacognosy Reviews* 2014, 8, 52, doi:10.4103/0973-7847.125531.
7. Hay, R.J. Fungal Infections. *Clinics in Dermatology* 2006, 24, 201–212, doi:10.1016/J.CLINDERMATOL.2005.11.011.
8. Richardson, M.; Lass-Flörl, C. Changing Epidemiology of Systemic Fungal Infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2008, 14, 5–24, doi:10.1111/J.1469-0691.2008.01978.X.
9. Urban, K.; Chu, S.; Scheufele, C.; Giesey, R.L.; Mehrmal, S.; Uppal, P.; Delost, G.R. The Global, Regional, and National Burden of Fungal Skin Diseases in 195 Countries and Territories: A Cross-Sectional Analysis from the Global Burden of Disease Study 2017. *JAAD International* 2021, 2, 22–27, doi:10.1016/J.JDIN.2020.10.003.
10. Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.O.; Denning, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi* 2017, Vol. 3, Page 57 2017, 3, 57, doi:10.3390/JOF3040057.
11. Limon, J.J.; Skalski, J.H.; Underhill, D.M. Commensal Fungi in Health and Disease. *Cell Host Microbe* 2017, 22, 156, doi:10.1016/J.CHOM.2017.07.002.
12. Garber, G. An Overview of Fungal Infections. *Drugs* 2001, 61 Suppl 1, 1–12, doi:10.2165/00003495-200161001-00001.
13. Orchard, A.; van Vuuren, S. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* 2017, 2017, doi:10.1155/2017/4517971.

14. Medicamentos à Base de Plantas - INFARMED, I.P. Available online: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/campanhas/-/journal_content/56/15786/1463126?tagName=outras-campanhas (accessed on 13 April 2022).
15. Cosméticos - INFARMED, I.P. Available online: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos> (accessed on 4 May 2022).
16. Medicamentos à Base de Plantas - INFARMED, I.P. Available online: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/medicamentos_a_base_de_plantas (accessed on 4 May 2022).
17. Reuter, J.; Merfort, I.; Schempp, C.M. Botanicals in Dermatology. *American Journal of Clinical Dermatology* 2010 11:4 2012, 11, 247–267, doi:10.2165/11533220-000000000-00000.
18. Infomed Available online: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml#> (accessed on 16 May 2022).
19. More Evidence Is Needed to Confirm the Benefits and Risks of Many Botanicals in Dermatology. *Drugs and Therapy Perspectives* 2011, 27, 24–26, doi:10.2165/11206640-000000000-00000/FIGURES/TAB1.
20. Murbach Teles Andrade, B.F.; Nunes Barbosa, L.; da Silva Probst, I.; Fernandes Júnior, A. Antimicrobial Activity of Essential Oils. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409> 2013, 26, 34–40, doi:10.1080/10412905.2013.860409.
21. Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A.K.; Doble, M. Synergism between Natural Products and Antibiotics against Infectious Diseases. *Phytomedicine* 2008, 15, 639–652, doi:10.1016/J.PHYMED.2008.06.008.
22. Okoh, O.O.; Sadimenko, A.P.; Afolayan, A.J. Comparative Evaluation of the Antibacterial Activities of the Essential Oils of Rosmarinus Officinalis L. Obtained by Hydrodistillation and Solvent Free Microwave Extraction Methods. *Food Chemistry* 2010, 120, 308–312, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.09.084.
23. Schinella, G.R.; Tournier, H.A.; Prieto, J.M.; Mordujovich De Buschiazzo, P.; Ríos, J.L. Antioxidant Activity of Anti-Inflammatory Plant Extracts. *Life Sciences* 2002, 70, 1023–1033, doi:10.1016/S0024-3205(01)01482-5.
24. Mueller, M.; Hobiger, S.; Jungbauer, A. Anti-Inflammatory Activity of Extracts from Fruits, Herbs and Spices. *Food Chemistry* 2010, 122, 987–996, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.041.

25. Akter, R.; Uddin, S.J.; Grice, I.D.; Tiralongo, E. Cytotoxic Activity Screening of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. *Journal of Natural Medicines* 2014, 68, 246–252, doi:10.1007/S11418-013-0789-5/TABLES/2.
26. Tolosa, L.; Donato, M.T.; Gómez-Lechón, M.J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Methods in Molecular Biology* 2015, 1250, 333–348, doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
27. D’Amato, S.; Serio, A.; López, C.C.; Paparella, A. Hydrosols: Biological Activity and Potential as Antimicrobials for Food Applications. *Food Control* 2018, 86, 126–137, doi:10.1016/J.FOODCONT.2017.10.030.
28. Kunicka-Styczyńska, A.; Śmigielski, K.; Prusinowska, R.; Rajkowska, K.; Kuśmider, B.; Sikora, M. Preservative Activity of Lavender Hydrosols in Moisturizing Body Gels. *Letters in Applied Microbiology* 2015, 60, 27–32, doi:10.1111/LAM.12346.
29. di Vito, M.; Smolka, A.; Proto, M.R.; Barbanti, L.; Gelmini, F.; Napoli, E.; Bellardi, M.G.; Mattarelli, P.; Beretta, G.; Sanguinetti, M.; et al. Is the Antimicrobial Activity of Hydrolates Lower than That of Essential Oils? *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 88 2021, 10, 88, doi:10.3390/ANTIBIOTICS10010088.
30. Vito, M. di; Smolka, A.; Proto, M.R.; Barbanti, L.; Gelmini, F.; Napoli, E.; Bellardi, M.G.; Mattarelli, P.; Beretta, G.; Sanguinetti, M.; et al. Is the Antimicrobial Activity of Hydrolates Lower than That of Essential Oils? *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 88 2021, 10, 88, doi:10.3390/ANTIBIOTICS10010088.
31. Prusinowska, R.; Śmigielski, K.; Stobiecka, A.; Kunicka-Styczyńska, A. Hydrolates from Lavender (*Lavandula Angustifolia*) – Their Chemical Composition as Well as Aromatic, Antimicrobial and Antioxidant Properties. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1016939> 2015, 30, 386–393, doi:10.1080/14786419.2015.1016939.
32. D’Amato, S.; Serio, A.; López, C.C.; Paparella, A. Hydrosols: Biological Activity and Potential as Antimicrobials for Food Applications. *Food Control* 2018, 86, 126–137, doi:10.1016/J.FOODCONT.2017.10.030.
33. Kahar, M.; Fauzi, M.; Mamat, R. Properties and Potential of Agarwood Hydrosol as a Drink: A Review 1. *MINI REVIEW Food Research* 2021, 5, 29–35, doi:10.26656/fr.2017.5(3).382.
34. Edris, A.E. Identification and Absolute Quantification of the Major Water-Soluble Aroma Components Isolated from the Hydrosols of Some Aromatic Plants. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2009, 12, 155–161, doi:10.1080/0972060X.2009.10643705.

35. Lante, A.; Tinello, F. Citrus Hydrosols as Useful By-Products for Tyrosinase Inhibition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2015, 27, 154–159, doi:10.1016/J.IFSET.2014.11.001.
36. Aćimović, M.G.; Tešević, V. v; Smiljanić, K.T.; Cvetković, M.T.; Stanković, J.M.; Kiprovski, B.M.; Sikora, V.S. HYDROLATES-BY-PRODUCTS OF ESSENTIAL OIL DISTILLATION: CHEMICAL COMPOSITION, BIOLOGICAL ACTIVITY AND POTENTIAL USES., doi:10.5937/savteh2002054A.
37. Cunha, C.; Ribeiro, H.M.; Rodrigues, M.; Araujo, A.R.T.S. Essential Oils Used in Dermocosmetics: Review about Its Biological Activities. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2022, 21, 513–529, doi:10.1111/JOCD.14652.
38. Paulsen, E. Contact Sensitization from Compositae-Containing Herbal Remedies and Cosmetics. *Contact Dermatitis* 2002, 47, 189–198, doi:10.1034/J.1600-0536.2002.470401.X.
39. Raina, P.; Agarwal, A.; Wagh, N.; Kaul-Ghanekar, R. Comparative Analysis of Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of Ocimum Basilicum (Basil) in RAW264.7, SW1353 and Human Primary Chondrocytes in Respect of the Management of Osteoarthritis. 2016, doi:10.1016/j.hermed.2016.01.002.
40. Sala, A.; Recio, M. del C.; Giner, R.M.; Máñez, S.; Tournier, H.; Schinella, G.; Ríos, J.-L. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Helichrysum Italicum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010, 54, 365–371, doi:10.1211/0022357021778600.
41. Curra, M.; Martins, M.A.T.; Lauxen, I.S.; Pellicoli, A.C.A.; Sant’Ana Filho, M.; Pavesi, V.C.S.; Carrard, V.C.; Martins, M.D. Effect of Topical Chamomile on Immunohistochemical Levels of IL-1 β and TNF- α in 5-Fluorouracil-Induced Oral Mucositis in Hamsters. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013, 71, 293–299, doi:10.1007/S00280-012-2013-9.
42. OCIMUM BASILICUM OIL Cosmetic Ingredient (INCI) Available online: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/ocimum-basilicum-oil> (accessed on 7 February 2022).
43. Sabater-Jara, A.B.; Funes, M.P.; Pedreño, M.A.; Belchí-Navarro, S. Essential Oils of *Thymbra Capitata* and *Thymus Hyemalis* and Their Uses Based on Their Bioactivity. *Thymus* 2019, doi:10.5772/INTECHOPEN.89309.
44. ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial Activity of Carvacrol Related to Its Chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology* 2006, 43, 149–154, doi:10.1111/J.1472-765X.2006.01938.X.

45. Engel, R.; Gutmann, M.; Hartisch, C.; Kolodziej, H.; Nahrstedt, A. Study on the Composition of the Volatile Fraction of Hamamelis Virginiana. *Planta Medica* 1998, 64, 251–258, doi:10.1055/S-2006-957420.
46. PLANTAS E SUAS CARACTERÍSTICAS – INOVEP Available online: <https://inovep.pt/plantas-aromaticas-medicinais/index.php/projeto/plantas-e-suas-caracteristicas/> (accessed on 25 April 2022).
47. Jardim Botânico UTAD | Cistus Ladanifer Subesp. Ladanifer Available online: https://jb.utad.pt/especie/Cistus_ladanifer_subesp_ladanifer (accessed on 7 February 2022).
48. Singh, H.; Du, J.; Singh, P.; Yi, T.H. Ecofriendly Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by Euphrasia Officinalis Leaf Extract and Its Biomedical Applications. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1362417> 2017, 46, 1163–1170, doi:10.1080/21691401.2017.1362417.
49. Jardim Botânico UTAD | Echinacea Purpurea Available online: https://jb.utad.pt/especie/Echinacea_purpurea (accessed on 25 April 2022).
50. Novel Hamamelis Virginiana Serum Reduces Post-Filler Bruising Incidence and Duration. *J Am Acad Dermatol* 2008, 58, AB66, doi:10.1016/J.JAAD.2007.10.298.
51. Palanisamy, T.; Sharifi-Rad, J.; Salehi, B. International Journal of Pharma and Bio Sciences PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF ECHINACEA PURPUREA.
52. medicines Agency, E. Herbal Medicine: Summary for the Public Purple Coneflower Herb, Echinacea Purpurea (L.) Moench., Herba Recens.
53. Echinaceae Purpureae Herba | European Medicines Agency Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/echinaceae-purpureae-herba> (accessed on 5 May 2022).
54. Jardim Botânico UTAD | Helichrysum Italicum Subesp. Picardi Available online: https://jb.utad.pt/especie/Helichrysum_italicum_subesp_picardi (accessed on 7 February 2022).
55. Srivastava, J.K.; Shankar, E.; Gupta, S. Chamomile: A Herbal Medicine of the Past with a Bright Future (Review). *Molecular Medicine Reports* 2010, 3, 895–901, doi:10.3892/mmr.2010.377.
56. T. Nobrega, A.; A. L. Wagemaker, T.; M. B. G. Maia Campos, P. Antioxidant Activity of Matricaria Chamomilla L. Extract and Clinical Efficacy of Cosmetic Formulations Containing This Extract and Its Isolated Compounds. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research* 2013, 10, 249–261, doi:10.19277/BBR.10.2.69.
57. Jardim Botânico UTAD | Ocimum Basilicum Available online: https://jb.utad.pt/especie/Ocimum_basilicum (accessed on 7 February 2022).

58. Volpe, V.; Nascimento, D.S.; Insausti, M.; Grünhut, M. Octyl P-Methoxycinnamate Loaded Microemulsion Based on Ocimum Basilicum Essential Oil. Characterization and Analytical Studies for Potential Cosmetic Applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2018, 546, 285–292, doi:10.1016/J.COLSURFA.2018.02.070.
59. Jardim Botânico UTAD | Thymbra Capitata Available online: https://jb.utad.pt/especie/Thymbra_capitata (accessed on 7 February 2022).
60. Merino, N.; Berdejo, D.; Bento, R.; Salman, H.; Lanz, M.; Maggi, F.; Sánchez-Gómez, S.; García-Gonzalo, D.; Pagán, R. Antimicrobial Efficacy of Thymbra Capitata (L.) Cav. Essential Oil Loaded in Self-Assembled Zein Nanoparticles in Combination with Heat. *Industrial Crops and Products* 2019, 133, 98–104, doi:10.1016/J.INDCROP.2019.03.003.
61. Merino, N.; Berdejo, D.; Bento, R.; Salman, H.; Lanz, M.; Maggi, F.; Sánchez-Gómez, S.; García-Gonzalo, D.; Pagán, R. Antimicrobial Efficacy of Thymbra Capitata (L.) Cav. Essential Oil Loaded in Self-Assembled Zein Nanoparticles in Combination with Heat. *Ind. crops prod.* 2019, 133, 98–104, doi:10.1016/J.INDCROP.2019.03.003.
62. Tundis, R.; Statti, G.A.; Conforti, F.; Bianchi, A.; Agrimonti, C.; Sacchetti, G.; Muzzoli, M.; Ballero, M.; Menichini, F.; Poli, F. Influence of Environmental Factors on Composition of Volatile Constituents and Biological Activity of Helichrysum Italicum (Roth) Don (Asteraceae). <http://dx.doi.org/10.1080/1478641042000261969> 2006, 19, 379–387, doi:10.1080/1478641042000261969.
63. Anderson, G.J.; Hill, J.D. Many to Flower, Few to Fruit: The Reproductive Biology of Hamamelis Virginiana (Hamamelidaceae). *Am J Bot* 2002, 89, 67–78, doi:10.3732/AJB.89.1.67.
64. Rostami-Vartooni, A.; Nasrollahzadeh, M.; Alizadeh, M. Green Synthesis of Perlite Supported Silver Nanoparticles Using Hamamelis Virginiana Leaf Extract and Investigation of Its Catalytic Activity for the Reduction of 4-Nitrophenol and Congo Red. *Journal of Alloys and Compounds* 2016, 680, 309–314, doi:10.1016/J.JALLCOM.2016.04.008.
65. Jardim Botânico UTAD | Cupressus Lusitanica Available online: https://jb.utad.pt/especie/Cupressus_lusitanica (accessed on 7 February 2022).
66. Teke, G.N.; Elisée, K.N.; Roger, K.J. Chemical Composition, Antimicrobial Properties and Toxicity Evaluation of the Essential Oil of Cupressus Lusitanica Mill. Leaves from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013, 13, 1–9, doi:10.1186/1472-6882-13-130/TABLES/5.

67. Jardim Botânico UTAD | Cistus Ladanifer Subesp. Ladanifer Available online: https://jb.utad.pt/especie/Cistus_ladanifer_subesp_ladanifer (accessed on 25 April 2022).
68. Barros, L.; Dueñas, M.; Alves, C.T.; Silva, S.; Henriques, M.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. Antifungal Activity and Detailed Chemical Characterization of Cistus Ladanifer Phenolic Extracts. *Industrial Crops and Products* 2013, *41*, 41–45, doi:10.1016/J.INDCROP.2012.03.038.
69. Gawel-Bęben, K.; Kukula-Koch, W.; Hoian, U.; Czop, M.; Strzypek-Gomółka, M.; Antosiewicz, B. Characterization of Cistus × Incanus L. and Cistus Ladanifer L. Extracts as Potential Multifunctional Antioxidant Ingredients for Skin Protecting Cosmetics. *Antioxidants* 2020, *9*, doi:10.3390/ANTIOX9030202.
70. Eufrásia | Plantas Medicinais - Aromáticas - Condimentares Available online: <https://www.ppmac.org/content/eufrasia> (accessed on 16 May 2022).
71. Bigagli, E.; Cinci, L.; D'Ambrosio, M.; Luceri, C. Pharmacological Activities of an Eye Drop Containing Matricaria Chamomilla and Euphrasia Officinalis Extracts in UVB-Induced Oxidative Stress and Inflammation of Human Corneal Cells. *J Photochem Photobiol B* 2017, *173*, 618–625, doi:10.1016/J.JPHOTOBIOB.2017.06.031.
72. *Biological Evaluation of Medical Devices-from IHS COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT from IHS*; 2009;
73. Berridge, M. v.; Tan, A.S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993, *303*, 474–482, doi:10.1006/ABBI.1993.1311.
74. de Virgilio, M.; Lombardi, A.; Caliandro, R.; Fabbrini, M.S. Ribosome-Inactivating Proteins: From Plant Defense to Tumor Attack. *Toxins (Basel)* 2010, *2*, 2699–2737, doi:10.3390/TOXINS2112699.
75. Salim, T.; Sershen, C.L.; May, E.E. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of INOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLOS ONE* 2016, *11*, e0153289, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0153289.
76. Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.O.; Denning, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi* 2017, *Vol. 3*, Page 57 2017, *3*, 57, doi:10.3390/JOF3040057.
77. Gu, Y.; Han, J.; Jiang, C.; Zhang, Y. Biomarkers, Oxidative Stress and Autophagy in Skin Aging. *Ageing Research Reviews* 2020, *59*, 101036, doi:10.1016/J.ARR.2020.101036.

78. Moukhles, A.; Mansour, A.I.; Ellaghdach, A.; Abrini, J. Chemical Composition and in Vitro Antibacterial Activity of the Pure Essential Oils and Essential Oils Extracted from Their Corresponding Hydrolats from Different Wild Varieties of Moroccan Thyme. *Journal of Materials and Environmental Science* 2018, 9, 235–244, doi:10.26872/JMES.2018.9.1.27.
79. Moukhles, A.; Mansour, A.I. The Effect of Drying Time on the Yield and the Chemical Composition of Essential Oil and Dissolved Oil in Hydrolat from Aerial Parts of Moroccan Thymbra Capitata (L.) Cav. *Mediterranean Journal of Chemistry* 2020, 2020, 716–722, doi:10.13171/mjc10702008061491am.
80. Paolini, J.; Leandri, C.; Desjobert, J.M.; Barboni, T.; Costa, J. Comparison of Liquid–Liquid Extraction with Headspace Methods for the Characterization of Volatile Fractions of Commercial Hydrolats from Typically Mediterranean Species. *Journal of Chromatography A* 2008, 1193, 37–49, doi:10.1016/J.CHROMA.2008.04.021.
81. Oliveira, A.S.; Rolo, J.; Gaspar, C.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Palmeira-de-Oliveira, R.; Ferraz, C.; Coelho, S.; Pastorinho, M.R.; Sousa, A.C.; et al. Chemical Characterization and Bioactive Potential of Thymus × Citriodorus (Pers.) Schreb. Preparations for Anti-Acne Applications: Antimicrobial, Anti-Biofilm, Anti-Inflammatory and Safety Profiles. *Journal of Ethnopharmacology* 2022, 287, 114935, doi:10.1016/J.JEP.2021.114935.
82. Tavares, C.S.; Martins, A.; Faleiro, M.L.; Miguel, M.G.; Duarte, L.C.; Gameiro, J.A.; Roseiro, L.B.; Figueiredo, A.C. Bioproducts from Forest Biomass: Essential Oils and Hydrolates from Wastes of Cupressus Lusitanica Mill. and Cistus Ladanifer L. *Industrial Crops and Products* 2020, 144, 112034, doi:10.1016/J.INDCROP.2019.112034.
83. Traka, C.K.; Petrakis, E.A.; Kimbaris, A.C.; Polissiou, M.G.; Perdikis, D.C. Effects of Ocimum Basilicum and Ruta Chalepensis Hydrosols on Aphis Gossypii and Tetranychus Urticae. *Journal of Applied Entomology* 2018, 142, 413–420, doi:10.1111/JEN.12486.
84. Wilson, V.G. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. 2013, 33–41, doi:10.1007/7651_2013_42.
85. Colombo, I.; Sangiovanni, E.; Maggio, R.; Mattozzi, C.; Zava, S.; Corbett, Y.; Fumagalli, M.; Carlino, C.; Corsetto, P.A.; Scaccabarozzi, D.; et al. HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation* 2017, 2017, doi:10.1155/2017/7435621.
86. Ajayi, A.M.; Martins, D.T. de O.; Balogun, S.O.; Oliveira, R.G. de; Ascêncio, S.D.; Soares, I.M.; Barbosa, R. dos S.; Ademowo, O.G. Ocimum Gratissimum L. Leaf

- Flavonoid-Rich Fraction Suppress LPS-Induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Macrophages and Peritonitis in Mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2017, 204, 169–178, doi:10.1016/J.JEP.2017.04.005.
87. Sales, A.; Felipe, L. de O.; Bicas, J.L. Production, Properties, and Applications of α -Terpineol. *Food and Bioprocess Technology* 2020, 13, 1261–1279, doi:10.1007/S11947-020-02461-6.
88. Khaleel, C.; Tabanca, N.; Buchbauer, G. α -Terpineol, a Natural Monoterpene: A Review of Its Biological Properties. *Open Chemistry* 2018, 16, 349–361, doi:10.1515/CHEM-2018-0040/ASSET/GRAPHIC/J_CHEM-2018-0040_FIG_002.JPG.
89. Mohammadi Nejad, S.; Özgüneş, H.; Başaran, N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017, 14, 201, doi:10.4274/TJPS.62207.
90. Sharifi-Rad, M.; Varoni, E.M.; Iriti, M.; Martorell, M.; Setzer, W.N.; del Mar Contreras, M.; Salehi, B.; Soltani-Nejad, A.; Rajabi, S.; Tajbakhsh, M.; et al. Carvacrol and Human Health: A Comprehensive Review. *Phytotherapy Research* 2018, 32, 1675–1687, doi:10.1002/PTR.6103.
91. ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial Activity of Carvacrol Related to Its Chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology* 2006, 43, 149–154, doi:10.1111/J.1472-765X.2006.01938.X.
92. Delgado-Adámez, J.; Garrido, M.; Bote, M.E.; Fuentes-Pérez, M.C.; Espino, J.; Martín-Vertedor, D. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oils from Flower and Fruit of *Thymbra Capitata* and *Thymus* Species. *Journal of Food Science and Technology* 2017, 54, 1857–1865, doi:10.1007/S13197-017-2617-5/FIGURES/3.
93. Fitsiou, E.; Anastopoulos, I.; Chlichlia, K.; Galanis, A.; Kourkoutas, I.; Panayiotidis, M.I.; Pappa, A. Antioxidant and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Satureja Thymbra* and *Satureja Parnassica* and Their Major Constituents. *Anticancer Res* 2016, 36, 5757–5763, doi:10.21873/ANTICANRES.11159.
94. Duangyod, T.; Rujanapan, N.; Champakam, S.; Charoensup, R. Anti-Inflammatory Activity and Chemical Constituents of Red Limestone. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2021, 12, 185, doi:10.4103/JAPTR.JAPTR_55_21.
95. Abu-Darwish, M.S.; Cabral, C.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M.T.; Efferth, T.; Salgueiro, L. *Artemisia Herba-Alba* Essential Oil from Buseirah (South Jordan): Chemical Characterization and Assessment of Safe Antifungal and Anti-Inflammatory Doses. *Journal of Ethnopharmacology* 2015, 174, 153–160, doi:10.1016/J.JEP.2015.08.005.

96. Emanuel, J.; Barbosa, V. Universidade de Aveiro 2020 Toxic and Biochemical Impacts of Primextra® Gold TZ and S-Metolachlor on Human Skin and Liver Cells Impactos Tóxicos e Bioquímicos de Primextra® Gold TZ e S-Metolachlor Em Células Humanas Da Pele e Do Fígado.
97. Khaleel, C.; Tabanca, N.; Buchbauer, G. α -Terpineol, a Natural Monoterpene: A Review of Its Biological Properties. *Open Chemistry* 2018, 16, 349–361, doi:10.1515/CHEM-2018-0040/ASSET/GRAPHIC/J_CHEM-2018-0040_FIG_002.JPG.
98. de Oliveira, M.G.B.; Marques, R.B.; de Santana, M.F.; Santos, A.B.D.; Brito, F.A.; Barreto, E.O.; de Sousa, D.P.; Almeida, F.R.C.; Badauê-Passos, D.; Antonioli, Â.R.; et al. α -Terpineol Reduces Mechanical Hypernociception and Inflammatory Response. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2012, 111, 120–125, doi:10.1111/J.1742-7843.2012.00875.X.
99. Basu, S.; Hazra, B. Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity, in Vitro and Ex Vivo, of Selected Medicinal Plants Traditionally Used in Inflammatory Diseases. *Phytotherapy Research* 2006, 20, 896–900, doi:10.1002/PTR.1971.
100. Khaleel, C.; Tabanca, N.; Buchbauer, G. α -Terpineol, a Natural Monoterpene: A Review of Its Biological Properties. *Open Chemistry* 2018, 16, 349–361, doi:10.1515/CHEM-2018-0040/ASSET/GRAPHIC/J_CHEM-2018-0040_FIG_002.JPG.
101. Monteiro-Henriques, T.; Martins, M.J.; Cerdeira, J.O.; Silva, P.; Arsénio, P.; Silva; Bellu, A.; Costa, J.C. Bioclimatological Mapping Tackling Uncertainty Propagation: Application to Mainland Portugal. *International Journal of Climatology* 2016, 36, 400–411, doi:10.1002/JOC.4357.
102. Patterson, T.F.; Thompson, G.R.; Denning, D.W.; Fishman, J.A.; Hadley, S.; Herbrecht, R.; Kontoyiannis, D.P.; Marr, K.A.; Morrison, V.A.; Nguyen, M.H.; et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2016, 63, e1–e60, doi:10.1093/CID/CIW326.
103. Aspergillus Brasiliensis: How It Contaminates Humans | BioMérieux Industrial Microbiology Available online: <https://www.biomerieux-industry.com/pharma-healthcare/resources/pharma-microorganisms-library/2020-02-21-aspergillus-brasiliensis-how> (accessed on 19 April 2022).
104. Berman, J. Candida Albicans. 2012, doi:10.1016/j.tig.2012.01.004.
105. Lohse, M.B.; Johnson, A.D. White-Opaque Switching in Candida Albicans. *Curr Opin Microbiol* 2009, 12, 650, doi:10.1016/J.MIB.2009.09.010.

106. Calderone, R.A.; Fonzi, W.A. Virulence Factors of *Candida Albicans*. *Trends in Microbiology* 2001, 9, 327–335, doi:10.1016/S0966-842X(01)02094-7.
107. Whiteway, M.; Bachewich, C. Morphogenesis in *Candida Albicans**. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093341> 2007, 61, 529–553, doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093341.
108. Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms. <https://doi.org/10.4161/viru.22913> 2013, 4, 119–128, doi:10.4161/VIRU.22913.
109. Tsui, C.; Kong, E.F.; Jabra-Rizk, M.A. Pathogenesis of *Candida Albicans* Biofilm. *Pathogens and Disease* 2016, 74, ftw018, doi:10.1093/FEMSPD/FTW018.
110. Faleiro, L.; Miguel, G.; Gomes, S.; Costa, L.; Venâncio, F.; Teixeira, A.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra Capitata* L. (Cav.) and *Origanum Vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 8162–8168, doi:10.1021/JFO510079.
111. ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. Antimicrobial Activity of Carvacrol Related to Its Chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology* 2006, 43, 149–154, doi:10.1111/J.1472-765X.2006.01938.X.
112. *Thymbra Capitata* | Flora-On Available online: <https://flora-on.pt/?q=Thymbra> (accessed on 22 May 2022).
113. Boyraz, N.; Özcan, M. Antifungal Effect of Some Spice Hydrosols. *Fitoterapia* 2005, 76, 661–665, doi:10.1016/J.FITOTE.2005.08.016.
114. PLANTAS E SUAS CARACTERÍSTICAS – INOVEP Available online: <https://inovep.pt/plantas-aromaticas-medicinais/index.php/projeto/plantas-e-suas-caracteristicas/> (accessed on 16 May 2022).

Folha em branco

8. Apêndice I – Atividade Scavenging

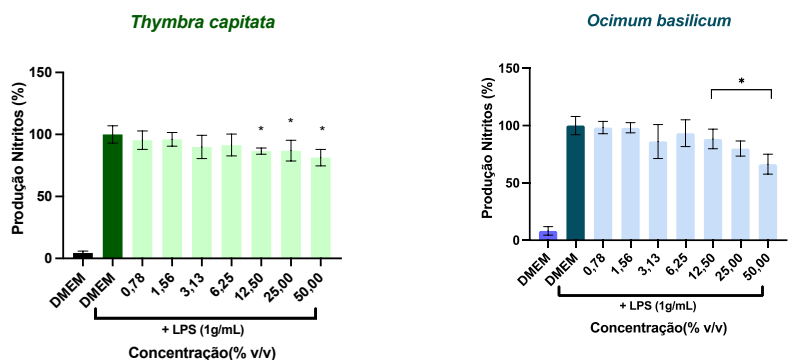


Figura A1 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Lamiaceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

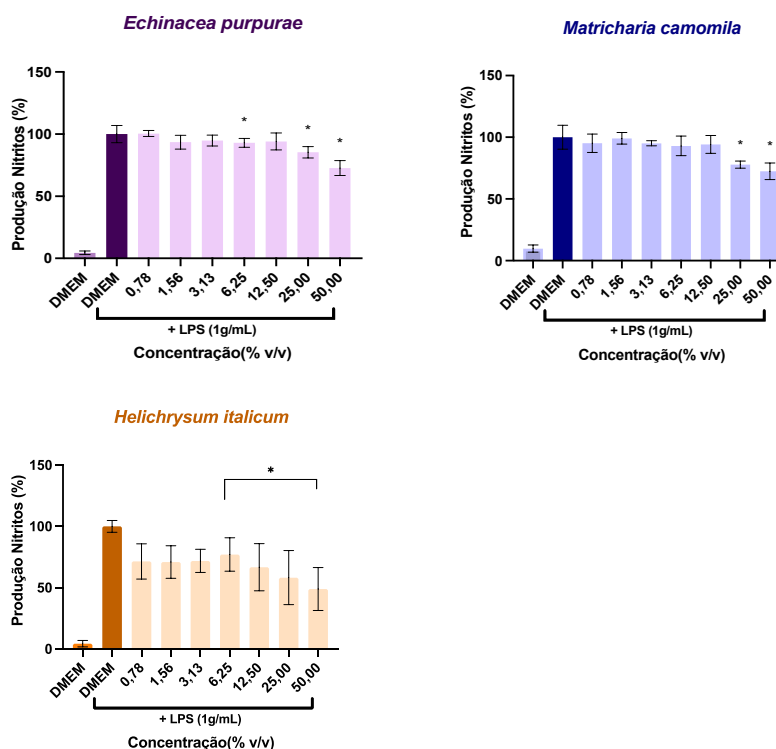


Figura A2 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Asteraceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

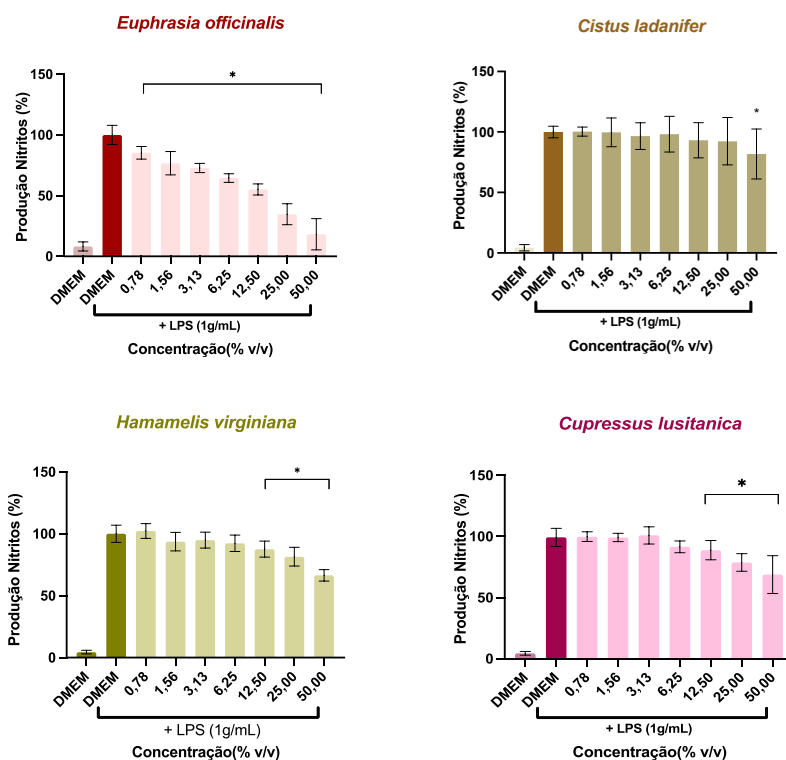


Figura A3 - Capacidade de eliminação de NO dos hidrolatos das plantas da família Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e extrato aquosos da família Hamamelidaceae. Os resultados são expressos em percentagem de libertação NO ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. * representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de $p < 0,05$ usando ANOVA unidirecional.

9. Apêndice II – Concentração necessária de extrato para inibir 50 % da viabilidade celular

IC₅₀ - Concentração Inibitória Média na linha celular HaCaT

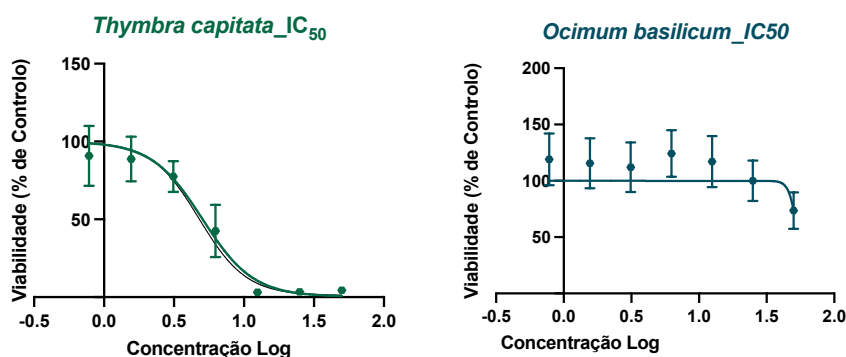


Figura A4 - Curvas de dose-resposta IC₅₀ (Concentração Inibitória Média) dos hidrolatos da família Lamiaceae pela linha celular HaCaT.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

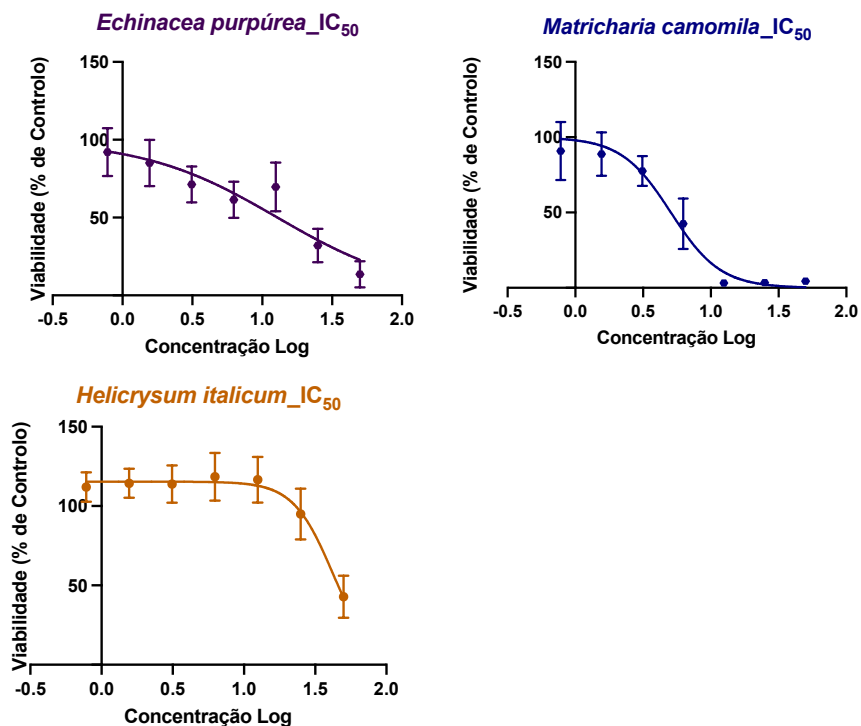


Figura A5 - Curvas de dose-resposta IC₅₀ (Concentração Inibitória Média) dos hidrolatos da família Asteraceae pela linha celular HaCaT.

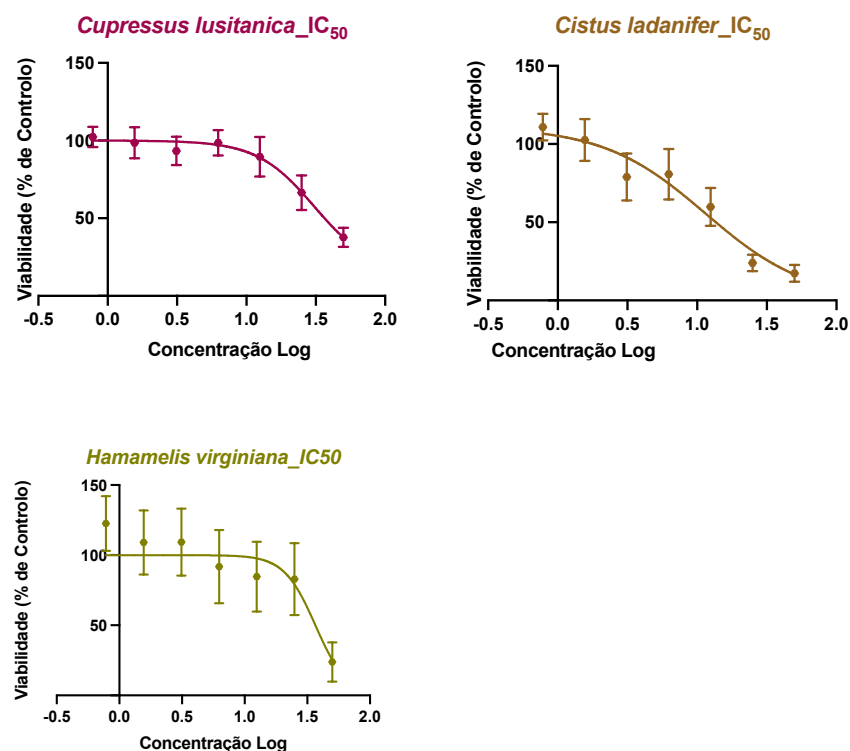


Figura A6 - Curvas de dose-resposta IC₅₀ (Concentração Inibitória Média) dos hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae e Hamamelidaceae pela linha celular HaCaT.

IC₅₀ - Concentração Inibitória Média na linha celular RAW

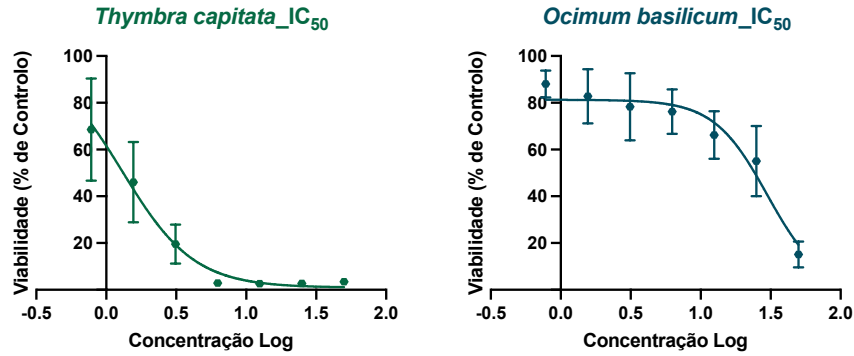


Figura A7 - Curvas de dose-resposta IC₅₀ (Concentração Inibitória Média) dos hidrolatos da família Lamiaceae pela linha celular RAW.

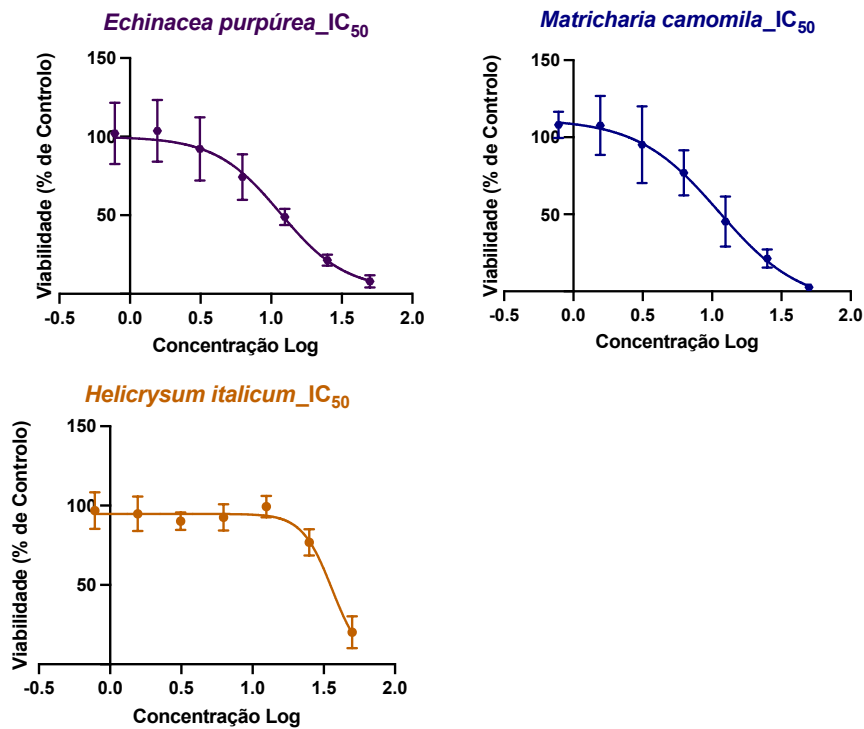


Figura A8 - Curvas de dose-resposta IC₅₀ (Concentração Inibitória Média) dos hidrolatos da família Asteraceae pela linha celular RAW.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

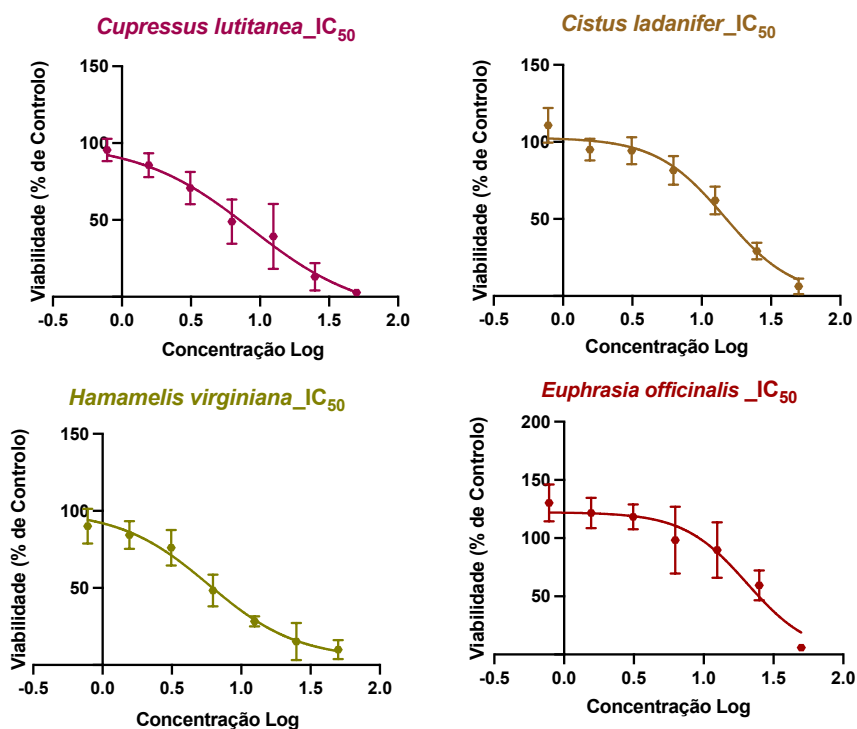


Figura A9 - Curvas de dose-resposta IC₅₀ (Concentração Inibitória Média) dos hidrolatos da família hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e Hamamelidaceae pela linha celular RAW.

Tabela A1- Tabela com os valores de IC₅₀, intervalo de confiança e R² para cada um dos hidrolatos e extrato aquoso.

	IC ₅₀	Intervalo de Confiança	R ²
<i>Euphrasia officinalis</i>	20,46	15,26 t- 25,98	0,8308
<i>Echinacea purpúrea</i>	11,63	9,374 - 15,74	0,8751
<i>Ocimum basilicum</i>	29,90	26,23 - 33,64	0,7988
<i>Thymbra capitata</i>	1,307	1,154 - 1,477	0,8344
<i>Cupressus lutitanea</i>	8,620	5,756 - 18,25	0,8801
<i>Hamamelis virginiana</i>	5,845	4,592 - 8,316	0,9204
<i>Helicrysum italicum</i>	36,14	33,79 - 38,67	0,8928
<i>Matricharia camomila</i>	11,20	8,819 - 17,40	0,8798
<i>Cistus ladanifer</i>	14,62	12,99 - 16,31	0,9362

10. Apêndice III – Concentração de extrato para a qual 50% da população apresenta resposta após um período de tempo específico

EC₅₀ - Concentração que induz metade do efeito máximo na linha celular RAW

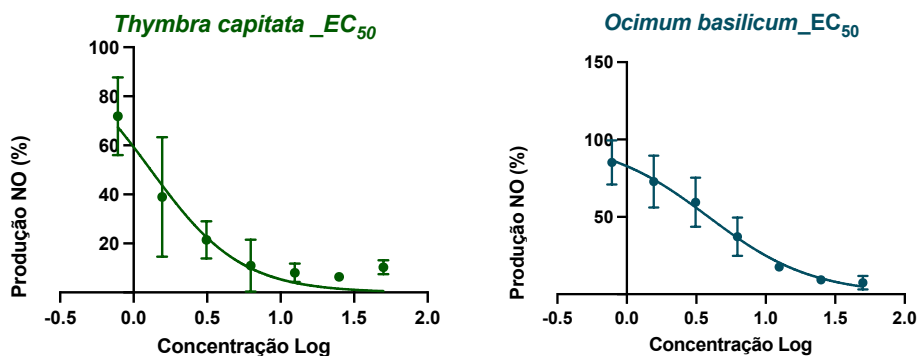


Figura A10- Curvas de dose-resposta EC₅₀ dos hidrolatos da família Lamiaceae na linha celular RAW.

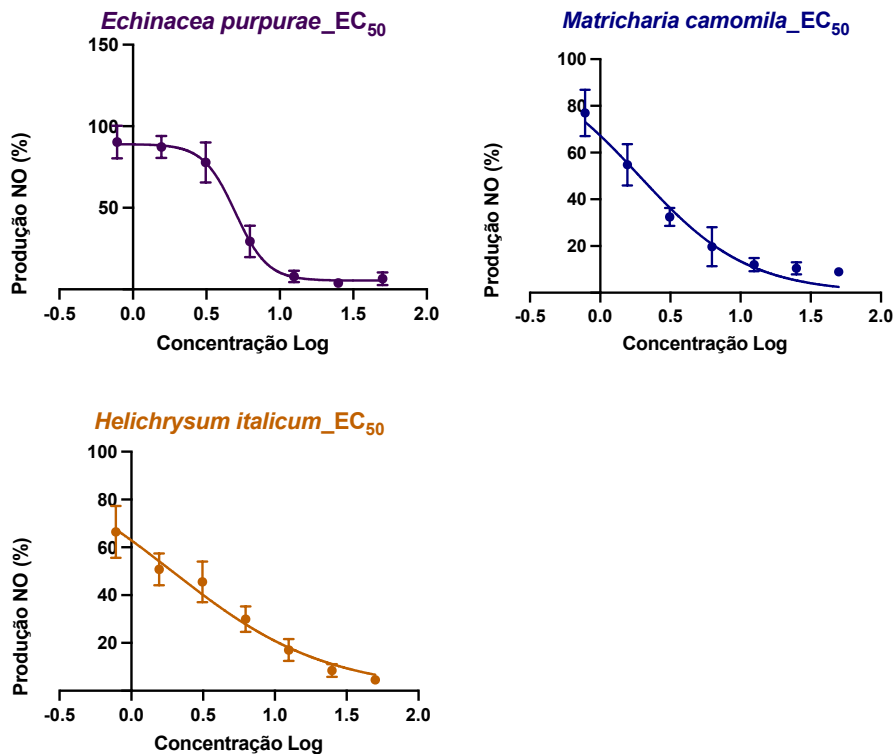


Figura A11 - Curvas de dose-resposta EC₅₀ dos hidrolatos da família Asteraceae pelas linha celular RAW.

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

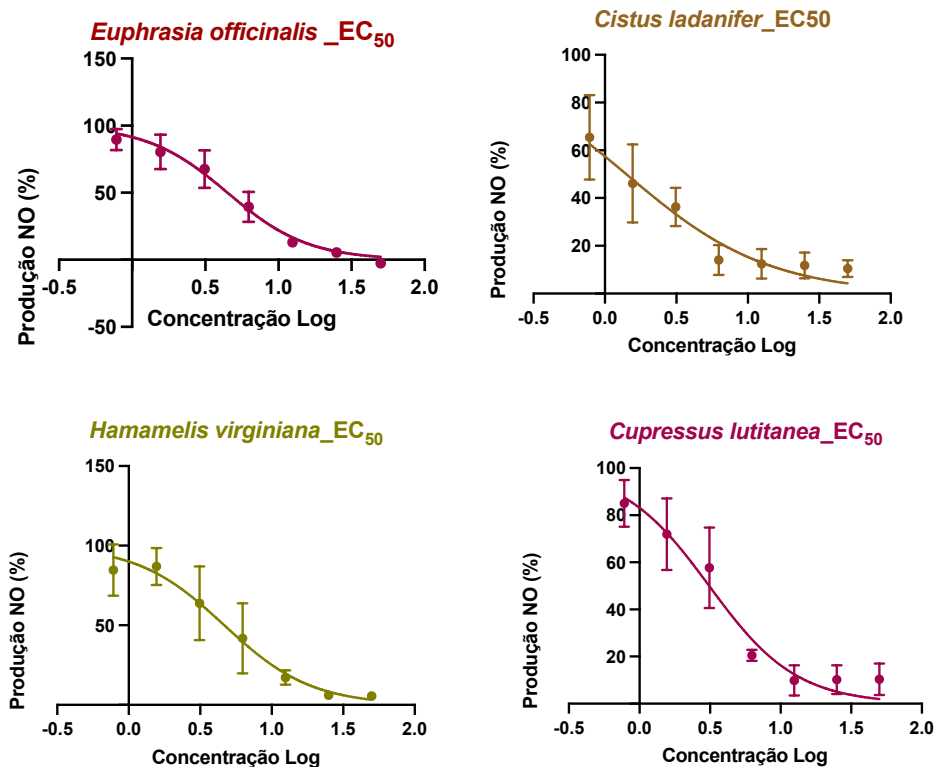


Figura A12 - Curvas de dose-resposta EC₅₀ dos hidrolatos dos hidrolatos da família hidrolatos das famílias Cistaceae, Cupressaceae, Orobanchaceae e Hamamelidaceae na linha celular RAW.

Tabela A2 - Tabela com os valores de EC₅₀, intervalo de confiança e R² para cada um dos hidrolatos/extrato aquoso.

	EC ₅₀	Intervalo de Confiança	R ²
<i>Euphrasia officinalis</i>	4,487	3,961 - 5,072	0,9385
<i>Echinacea purpúrea</i>	4,977	4,486 - 5,490	0,9649
<i>Ocimum basilicum</i>	3,870	3,222 - 4,633	0,8804
<i>Thymbra capitata</i>	1,306	1,050- 1,576	0,7594
<i>Cupressus lutitanea</i>	3,117	2,646 - 3,664	0,8869
<i>Hamamelis virginiana</i>	4,661	3,932 -5,504	0,8427
<i>Helicrysum italicum</i>	1,924	1,639 - 2,231	0,9148
<i>Matricharia camomila</i>	1,903	1,681 - 2,143	0,9220
<i>Cistus ladanifer</i>	1,411	1,036 - 1,789	0,7750

11. Anexo I – Relatórios de Análise Cromatográfica

Cistus ladanifer



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Cistus ladanifer*

Aromas de Valado

Data da análise: 13/12/2018

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Cistus ladanifer* (Aromas de Valado) foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 1mg/mL (0,5µL), utilizando-se um split de 1:10. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa com os espectros de massa da biblioteca NIST incluída no software do equipamento. A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados da amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.

#	T.R.	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Área	% Composto maioritário	% Composto total
1	4,966	4-Hidroxi-4-metilpentan-2-one	C ₈ H ₁₂ O ₂	9870000	5,14	1,11
3	17,496	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	75200000	39,17	8,45
4	18,431	<i>p</i> -Cimen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	95100000	49,53	10,69
5	18,928	(-)-Mirtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	99400000	51,77	11,17
6	19,499	D-Verbenona	C ₁₀ H ₁₄ O	87300000	45,47	9,81
7	19,953	<i>trans</i> -Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	51300000	26,72	5,77
8	20,095			12500000	6,51	1,40
9	20,460			35000000	18,23	3,93
10	21,473			31400000	16,35	3,53
11	22,151			20100000	10,47	2,26
12	22,436			16100000	8,39	1,81
13	23,135	<i>p</i> -Cimen-7-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	18400000	9,58	2,07
14	23,305			30500000	15,89	3,43
15	23,805	4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído	C ₉ H ₁₀ O ₂	19200000	100,00	21,58
16	24,130			10500000	5,47	1,18
17	24,801			24400000	12,71	2,74
18	25,636			17700000	9,22	1,99
19	28,103			12400000	6,46	1,39
20	31,487			25600000	13,33	2,88
21	32,441	2,5-Di(1,1-dimetiletil)-fenol	C ₁₄ H ₂₂ O	16000000	8,33	1,80

% Total de compostos identificados:	73,45
-------------------------------------	-------

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Cupressus lusitânica



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Cupressus lusitânica*
Folha
Data da análise: 30/01/2020

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Cupressus lusitânica* (folha) foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 6 mg/mL (1,6 µL), utilizando-se um split de 1:5. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se três métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. Alguns dos compostos, nomeadamente o linalool e o terpinen-4-ol foram ainda confirmados através da comparação com padrões (Sigma-Aldrich). A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

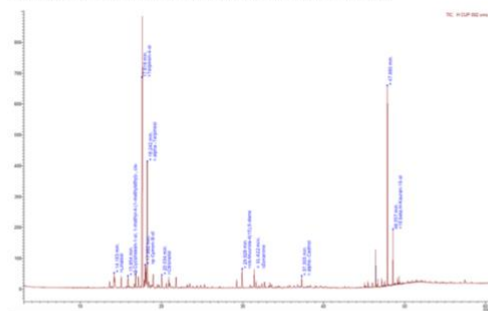
cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcib.pt/>



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Cupressus lusitânica*
Folha
Data da análise: 30/01/2020

Cromatograma do hidrolato de *Cupressus lusitânica* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

T.R.	Nome do Composto	Fórm. Mol.	G. de Conf.	Área	% Composto maioritário	% Composto total	IRL NIST	Série de Alcanos
1	13,64 trans-Linalool oxide	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	94,0	5,82E+07	1,61	0,63	1086	1066,32
2	14,21 Linalool	C ₁₅ H ₂₄ O	95,6	1,37E+08	3,80	1,48	1099	1080,56
3	14,28 2-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	95,3	9,19E+07	2,55	0,99	1102	1082,35
4	15,08 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-	C ₁₂ H ₂₀ O	94,7	1,25E+08	3,47	1,35	1122	1102,40
5	15,90 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-		92,2	1,25E+08	3,47	1,35		
6	16,85 p-Mentha-1,5-dien-8-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	95,1	1,89E+08	5,25	2,04	1167	1147,10
7	17,16 p-Mentha-1,5-dien-8-ol		92,5	1,25E+08	3,46	1,35		
8	17,67 Terpinen-4-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	93,6	3,61E+09	100,00	38,93	1177	1167,76
9	17,88 m-Cymen-8-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	91,1	8,75E+07	2,43	0,94	1180	1173,08

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcib.pt/>

10	18,01 p-Cymen-8-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	91,5	2,50E+08	6,93	2,70	1183	1176,40
11	18,11 α-Terpineol		89,2	2,08E+08	5,78	2,25		
12	18,26 α-Terpineol	C ₁₅ H ₂₄ O	94,6	1,36E+09	37,69	14,67	1189	1182,77
13	18,43 4,7,7-Trimethylbicyclo[4.1.0]hept-3-en-2-one			7,73E+07	2,14	0,83		1187,04
14	19,00 Citronellol	C ₁₅ H ₂₆ O	93,4	2,00E+08	5,54	2,16		1201,37
15	20,05 Citronellol	C ₁₅ H ₂₆ O	93,4	1,25E+08	3,46	1,35	1228	1227,87
16	20,92 Trimethylbicyclo[4.1.0]hept-3-en-2-one	C ₁₀ H ₁₆ O	92,5	1,11E+08	3,07	1,19	1314	1249,85
17	21,81 4,7,7-Trimethylbicyclo[4.1.0]hept-3-en-2-one			1,15E+08	3,18	1,24		1272,18
18	29,28 Cadina-3,5-diene	C ₁₅ H ₂₄	92,8	8,37E+07	2,32	0,90	1458	1460,47
19	29,93 cis-Muurola-4(15),5-diene	C ₁₅ H ₂₄	94,8	1,99E+08	5,52	2,15	1463	1477,03
20	31,43 Zonarene	C ₁₅ H ₂₄	94,2	1,81E+08	5,02	1,95	1527	1514,65
21	31,67 Zonarene			6,38E+07	1,77	0,69	1653	1520,84
22	32,74 Zonarene			5,96E+07	1,65	0,64	1228	1547,80
23	37,30 α-Cadinol	C ₁₆ H ₃₀ O	92,5	1,25E+08	3,46	1,35	1653	1662,79
24	46,43 α-Cadinol			2,05E+08	5,68	2,21		1909,38
25	46,70 α-Cadinol			5,03E+07	1,40	0,54		1952,64
26	47,88 16βH-Kauran-16-ol	C ₂₀ H ₃₈ O	86,7	1,03E+09	28,69	11,17		2138,67
27	48,56 16βH-Kauran-16-ol	C ₂₀ H ₃₈ O	86,7	2,72E+08	7,55	2,94	2266	2245,64

% Total de compostos identificados: 83,27

Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,5%.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcib.pt/>

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Echinacea purpurea



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Echinacea purpurea*
Mix
Data da análise: 20/02/2020

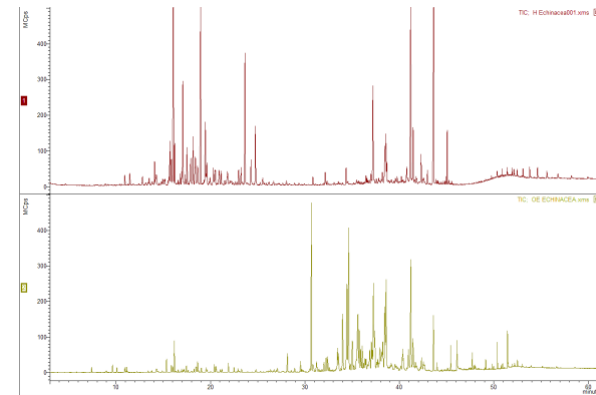
Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Echinacea purpurea* (Mix) foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 1 mg/mL (2 µL), utilizando-se um split de 1:5. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se dois métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. Relativamente ao linalool, este foi ainda confirmado através da comparação com padrões (Sigma-Aldrich). A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.

Cromatograma do hidrolato (em cima) e do óleo essencial (em baixo) da *Echinacea purpurea*.



Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpb@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpb.ipcb.pt>

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpb@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpb.ipcb.pt>

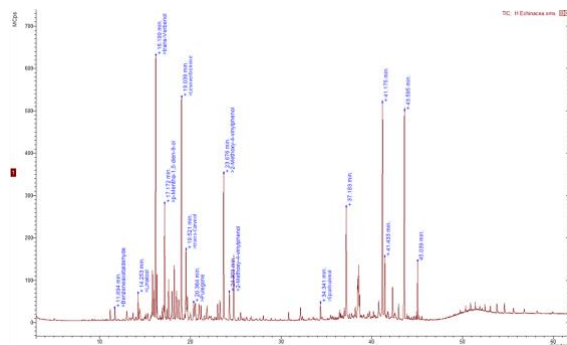
Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Echinacea purpurea*
Mix
Data da análise: 20/02/2020

Cromatograma do hidrolato de *Echinacea purpurea* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

T.R.	Nome do Composto	Fórm. Mol.	Grau de Conf	Área	% Composto maioritário	% Composto total	IRL NIST	Série de Alcanos
1	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	96,0	9,56E+07	4,67	0,55	1045	1015,11
2	Linalool	C ₁₅ H ₁₈ O	95,7	1,69E+08	8,26	0,97	1099	1080,17
3	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1α,3α,5α)]-	C ₁₀ H ₁₆ O	94,7	3,39E+08	16,59	1,94	1139	1119,78
4	cis-Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	95,8	2,39E+08	11,68	1,37	1142	1123,82
5	trans-Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	96,2	2,05E+09	100,00	11,70	1144	1129,38
6	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₆ O	89,3	3,09E+08	15,12	1,77	1167	1132,91
7	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₆ O	89,3	1,03E+08	5,04	0,59	1167	1151,57

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>

8	17,13	p-Menta-1,5-dien-8-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	89,7	7,55E+08	36,92	4,32	1167	1154,32
9	17,58				2,68E+08	13,08	1,53		
10	17,96	p-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	93,6	2,55E+08	12,48	1,46	1183	1175,25
11	18,20	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₆ O	94,4	3,82E+08	18,65	2,18	1189	1181,29
12	18,46	Myrtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	93,8	2,44E+08	11,90	1,39	1195	1187,61
13	18,69				87,8	2,20E+08	10,73	1,26	
14	19,00	Levoverbenone	C ₁₀ H ₁₆ O	96,7	1,66E+09	81,16	9,49	1204	1201,31
15	19,50	trans-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	95,1	4,96E+08	24,25	2,84	1217	1213,84
16	19,66				1,81E+08	6,71	0,96		1218,08
17	20,35	Pulegone	C ₁₀ H ₁₆ O	93,4	1,48E+08	8,86	1,04	1237	1235,45
18	20,56	D-Carvone	C ₁₀ H ₁₆ O	93,8	1,13E+08	7,23	0,85	1246	1240,59
19	20,93				1,35E+08	5,53	0,65		1250,13
20	21,17	Geraniol	C ₁₅ H ₂₄ O	92,9	9,10E+07	4,45	0,52	1255	1255,99
21	21,84	Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	90,7	1,28E+08	6,28	0,73	1276	1272,96
22	23,01	p-Menta-1,8-dien-7-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	93,1	1,23E+08	6,03	0,71	1296	1302,42
23	23,25	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	91,9	1,34E+08	6,53	0,76	1299	1308,62
24	23,67	2-Methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	94,4	1,01E+09	49,56	5,80	1317	1319,01
25	24,31	Phenol, 5-ethenyl-2-methoxy-(2-Methoxy-4-vinylphenol)	C ₉ H ₁₀ O ₂	91,5	2,17E+08	10,59	1,24	1337	1335,18
26	24,77	p-Menta-1,4(8)-dien-3-one (Piperitenone)	C ₁₀ H ₁₆ O	95,8	4,39E+08	21,43	2,51	1340	1346,91
27	32,14				1,15E+08	5,61	0,66		1532,69
28	34,35	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	94,2	1,23E+08	6,02	0,70	1576	1588,40
29	37,19				9,15E+08	44,73	5,23		1659,95
30	38,19				9,88E+07	4,83	0,56		1685,21
31	38,46				3,42E+08	16,71	1,95		1692,01
32	38,54				4,69E+08	22,92	2,68		1694,05
33	38,65				1,60E+08	7,84	0,92		1696,88
34	40,76				1,63E+08	7,95	0,93		1750,00
35	41,17				1,91E+09	93,57	10,94		1760,33
36	41,44				4,68E+08	22,90	2,68		1767,12
37	42,29				2,50E+08	12,23	1,43		1788,51
38	42,96				1,12E+08	5,47	0,64		1805,42
39	43,59				1,80E+09	87,80	10,27		1821,38
40	45,05				2,61E+08	12,75	1,49		1858,23

% Total de compostos identificados: 53,25

Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,5%.

Em comparação com o óleo essencial da *Echinacea purpurea*, o hidrolato apresenta uma maior variabilidade e quantidade de compostos.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Euphrasia officinalis



Relatório de análise HPLC

Amostra: *Euphrasia officinalis*
Data da análise: 20/05/2021

Detalhes da amostra:

A amostra foi processada segundo a overview feita inicialmente pelo projeto, depois foi liofilizada e por fim dissolvida em metanol de forma a obter-se uma concentração de 20 mg/mL. A amostra foi armazenada no frio a 6-8 °C.

Data de extração: 06/05/2021

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil químico do extrato aquoso obtido por infusão de *Euphrasia officinalis* foi obtido através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector *Diode Array*. A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna YMC-Triart PFP (150 m x 4,6 mm, D 5 µm, 12 nm) utilizando-se uma pré-coluna Triart PFP (10 x 3,0 mm I.D., 5-5 µm, 12 nm) e um *guard-c-holder* Art-Nr XPGCH-Q1 (10 x1-4,0 mm I.D.). A fase móvel consistia em um solvente A (acetonitrilo) e um solvente B (0,1% TFA/água) com um fluxo corrente a 1 mL/min.

A amostra foi injetada com uma concentração de 20 mg/mL (50 µL). A temperatura da coluna foi definida a 40 °C. O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: inicialmente 10% A e 90% B em 3min, 15% A e 85% B dos 15-25 min, 18% A e 82% B dos 25-45min, 30% A e 70% B dos 45-50min, 42% A e 58% B dos 50-54min, 50% A e 50% B dos 54-55min, depois 100% A e 0% de B dos 55-60min e por fim 10% A e 90% B nos 60min.

A identificação dos compostos foi feita a partir de curvas de calibração com padrões adquiridos e depois foram quantificados (C calculado) consoante a concentração de amostra injetada. Segundo o método definido verificou-se que:

- Ácido Gálico absorve aos 280nm
- Ácido clorogenico absorve aos 322nm – tempo de retenção =10,70min
- Rutina absorve aos 255nm
- Ácido cafeico absorve aos 322nm – tempo de retenção =13,50min
- Camferol absorve aos 360nm
- Epicatequina absorve aos 263nm
- Resveratrol absorve aos 291nm

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

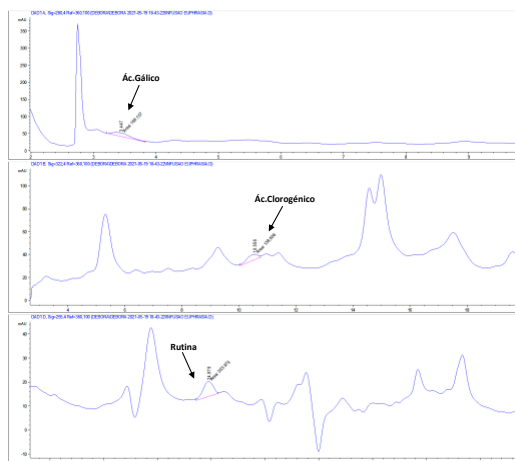
cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>



Relatório de análise HPLC

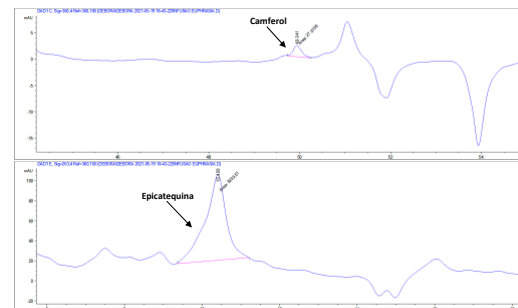
Amostra: *Euphrasia officinalis*
Data da análise: 20/05/2021

Cromatogramas do extrato aquoso de *Euphrasia officinalis* obtidos por HPLC:



Relatório de análise HPLC

Amostra: *Euphrasia officinalis*
Data da análise: 20/05/2021



Análise cromatográfica – identificação e quantificação dos compostos químicos presentes na amostra:

	T.R. (min)	Nome do Composto	Área	C CALC (µg/mL)	C CALC (µg/mg extrato)
1	3,44	Ácido gálico	188,157	7,992	0,399
2	10,40	Epicatequina	3239,51	101,878	5,093
3	10,55	Ácido clorogenico	138,606	11,927	0,596
4	24,88	Rutina	203,975	44,230	2,211
5	49,94	Camferol	27,510	19,273	0,963

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>



Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Hamamelis virginiana



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Hamamelis virginiana*
Data da análise: 20/04/2021

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Hamamelis virginiana* foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

A amostra de hidrolato foi injetada com uma concentração de 4 mg/mL (1 µL), utilizando-se um split de 1:10. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

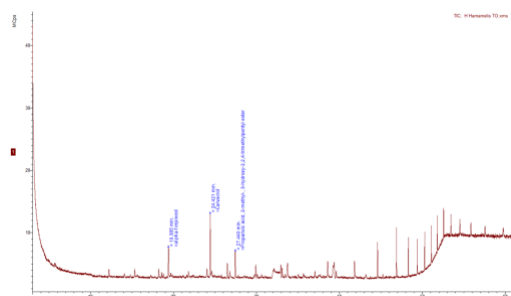
A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se dois métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário. Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,5%.



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Hamamelis virginiana*
Data da análise: 20/04/2021

Cromatograma do hidrolato de *Hamamelis virginiana* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

T.R.	Nome do Composto	Fórmula Mol.	Grau de Conf.	Área	% Composto maioritário	% Composto total	IRL NIST	Série de Alcanos
1				2,66E+06	15,83	4,24		
2				2,63E+06	15,66	4,20		
3				2,33E+06	13,87	3,72		
4	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	90,5	9,28E+06	55,22	14,80	1189	1188,85
5	Carvacrol	C₁₀H₁₄O	91,5	1,68E+07	100,00	26,80	1299	1311,51
6				4,51E+06	26,82	7,19		
7	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-, 2,2,4-trimethylpentyl ester	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	92,0	6,81E+06	40,57	10,87	1380	1384,91



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Hamamelis virginiana*
Data da análise: 20/04/2021

8	32,94	4,49E+06	26,71	7,16
9	33,75	5,11E+06	30,41	8,15
10	38,58	4,18E+06	24,88	6,67
11	39,39	3,88E+06	23,11	6,19

% Total de compostos identificados:	52,48
-------------------------------------	-------

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcib.pt/>



Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcib.pt/>



Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcib.pt/>



Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Helichrysum italicum



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Helichrysum italicum*
Data da análise: 08/10/2020

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Helichrysum italicum* foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1ml/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 9 mg/ml (1 µL), utilizando-se um split de 1:50. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

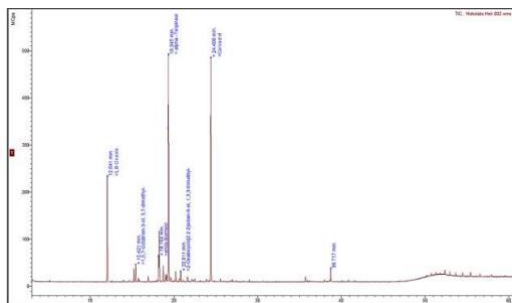
A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se dois métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. Alguns dos compostos nomeadamente, o 1,8-Cineole e o linalool foram ainda confirmados através da comparação com padrões (Sigma-Aldrich). A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Helichrysum italicum*
Data da análise: 08/10/2020

Cromatograma do hidrolato de *Helichrysum italicum* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

T.R.	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de Conf.	Área	% Composto maioritário	% Composto total	IRL NIST	Série de Alcanos
1	1,8-Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	96,2	8,97E+08	50,28	15,36	1032	1011,97
2	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	94,8	8,62E+07	4,83	1,48	1099	1088,93
3	1,5,7-Octatrien-3-ol, 3,7-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O	96,3	1,23E+08	6,88	2,10	1107	1093,80
4	L-Pinocarveol	C ₁₀ H ₁₈ O	93,0	4,46E+07	2,50	0,76	1139	1129,83
5	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	95,4	1,74E+08	9,73	2,97	1167,2	1160,22
6	δ-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	96,0	3,85E+08	21,55	6,58	1166,3	1162,25
7	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	92,0	1,15E+08	6,43	1,96	1177	1173,69
8				5,39E+07	3,02	0,92		
9	p-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	90,4	4,60E+07	2,57	0,79	1183	1182,99

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>

10	19,35	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	94,7	1,78E+09	100,00	30,55	1189	1188,76
11	19,61	(-)-Myrtenol	C ₁₀ H ₁₈ O	88,8	3,27E+07	1,83	0,56	1213	1195,21
12	20,20	exo-2-Hydroxycineole	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	85,1	8,42E+07	4,72	1,44	1224	1209,49
13	20,82	2-Hydroxy-1,8-cineole	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	91,7	8,60E+07	4,82	1,47	1228	1224,36
14	21,62	(1S,4R,5R)-1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2,2,2]octan-5-ol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	87,3	4,14E+07	2,32	0,71	1250	1243,82
15	24,40	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	92,8	1,73E+09	96,82	29,58	1299	1311,14
16	35,69	(-)-Spathulenol	C ₁₅ H ₂₂ O	87,2	4,51E+07	2,53	0,77	1577	1584,49
17	38,72				1,15E+08	6,46	1,97		
% Total de compostos identificados:								93,62	

Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,5%.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Matricaria chamomilla



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Matricaria chamomilla*
 Inflorescência
 Data da análise: 31/01/2020

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Matricaria chamomilla* (inflorescência) foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 6 mg/mL (1,2 µL), utilizando-se um split de 1:5. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se dois métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
 Escola Superior Agrária
 Quinta da Srª de Mércules
 6001-909 Castelo Branco

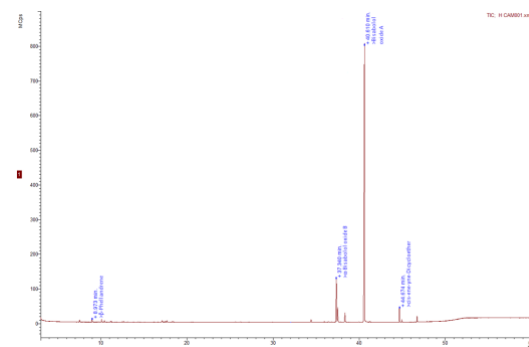
cbpbj@ipcb.pt
 Telef. 272 339 900
<http://cbpbj.ipcb.pt/>



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Matricaria chamomilla*
 Inflorescência
 Data da análise: 31/01/2020

Cromatograma do hidrolato de *Matricaria chamomilla* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

T.R.	Nome do Composto	Fórm. Mol.	Grau de Conf.	Área	% Composto maioritário	% Composto total	IRL NIST	Série de Alcanos	
1	8,86	β-Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	90,0	2,26E+07	0,67	0,54	1031	945,59
2	9,97				2,28E+07	0,68	0,54		973,59
3	34,40				2,48E+07	0,74	0,59		1589,68
5	37,34	α-Bisabolol oxide B	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	96,3	4,00E+08	11,87	9,58	1655	1663,71
6	37,49				1,39E+08	4,13	3,33		
7	38,34	Bisabolone oxide A	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	95,6	8,91E+07	2,64	2,13	1679	1689,07
8	40,60	Bisabolol oxide A	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	97,2	3,37E+09	100,00	80,67	1745	1745,94
9	44,67	cis-ene-yne-Dicycloether	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	93,5	8,39E+07	2,49	2,01	1849	1848,71
10	46,72				2,53E+07	0,75	0,61		1900,39
% Total de compostos identificados:						94,92			

Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,5%.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
 Escola Superior Agrária
 Quinta da Srª de Mércules
 6001-909 Castelo Branco

cbpbj@ipcb.pt
 Telef. 272 339 900
<http://cbpbj.ipcb.pt/>

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Ocimum basilicum



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Ocimum basilicum*
Data da análise: 07/05/2019

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Ocimum basilicum* foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 1mg/mL (1 µL), utilizando-se um split de 1:50. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se três métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. Alguns dos compostos, nomeadamente o α-Pineno, o eucalyptol, a cânfora e o linalool, foram ainda confirmados através da comparação com padrões (Sigma-Aldrich). A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

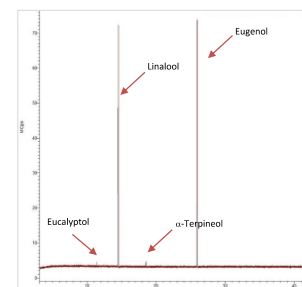
cbpb@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpb.ipcb.pt/>



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Ocimum basilicum*
Data da análise: 07/05/2019

Cromatograma do hidrolato de *Ocimum basilicum* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

#	T.R.	Nome do Composto	Fórmula Molecular	% Composto maioritário	% Composto total
1	7,540	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	1,80	0,95
2	11,386	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	6,38	3,35
3	14,525	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	72,98	38,34
4	16,371	Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	2,15	1,13
5	18,531	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	5,96	3,13
6	21,498	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,09	0,57
7	25,930	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	100,00	52,53

% Total de compostos identificados: 100,00

Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,5%.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpb@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpb.ipcb.pt/>

Avaliação da bioatividade de extratos e do seu potencial como ingredientes cosméticos

Thymbra capitata



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Thymbra capitata*
Mix
Data da análise: 29/01/2020

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do hidrolato de *Thymbra capitata* (mix) foi obtido, em triplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC/MS SCION-SQ 456 GC, Bruker). A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura (Agilent J&W GC Columns), utilizando-se o hélio como gás de arraste com um fluxo de 1mL/min.

O hidrolato foi injetado com uma concentração de 1 mg/mL (1 µL), utilizando-se um split de 1:20. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até aos 300°C com uma razão de aquecimento de 15°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente.

A identificação dos compostos voláteis presentes na amostra foi realizada utilizando-se três métodos analíticos distintos: comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento, bem como atendendo aos índices de Kovats (NIST 17) e à comparação destes com os índices de Kovats experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra. Alguns dos compostos, nomeadamente o linalool, o eucalyptol, o p-cymene e o terpinen-4-ol foram ainda confirmados através da comparação com padrões (Sigma-Aldrich). A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra, bem como em percentagem da área relativa do pico de cada composto relativamente à área do pico do composto maioritário.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

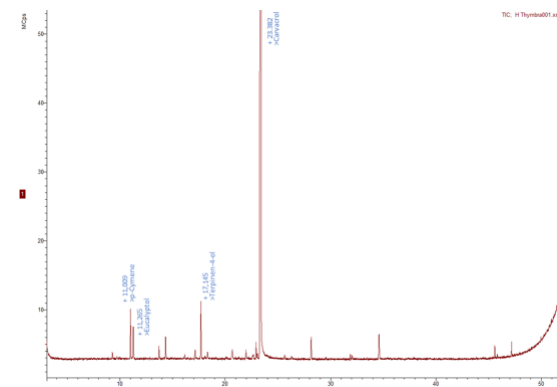
cbpbi@ipcbr.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcbr.pt/>



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Hidrolato de *Thymbra capitata*
Mix
Data da análise: 29/01/2020

Cromatograma do hidrolato de *Thymbra capitata* obtido por GC-MS:



Análise cromatográfica – identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra:

T.R.	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de Conf.	Área	% Composto maioritário	% Composto total	IRL NIST	Série de Alcanos
1	10,84	p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	95,3	1,76E+07	0,39	0,38	1025 995,53
2	11,10	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	94,9	1,83E+07	0,41	0,40	1032 1002,11
3	17,61	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	91,0	3,46E+07	0,77	0,75	1177 1166,34
4	23,37	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₂ O	93,1	4,52E+09	100,00	98,11	1299 1311,52
5	34,59				1,65E+07	0,36	0,36	1581 1594,53

% Total de compostos identificados: 99,64

Apenas são considerados compostos cuja área relativa ao composto maioritário seja > 0,3%.

Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
Escola Superior Agrária
Quinta da Srª de Mércules
6001-909 Castelo Branco

cbpbi@ipcbr.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcbr.pt/>