

**Discussão sobre diferentes técnicas utilizadas
na determinação da atividade antioxidante na
*Mentha spicata L.***

Versão final após defesa

Mamadú Sanhá

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Sandra da Costa Henriques Soares
Co-orientadora: Mestre Lígia Cibeles Malavolta De Los Rios Lopes

Dezembro de 2024

Declaração de Integridade

Eu, Mamadú Sanhá, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11197 do curso de 2º ciclo no Mestrado em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

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

Universidade da Beira Interior, Covilhã, Dezembro de 2024.

Mamadú Sanhá

Dedicatória

Dedico este mestrado aos meus avós, que partiram, mas cujos ensinamentos e amor permanecerão sempre comigo. Agradeço pela força e inspiração que me deram ao longo da minha vida. Que esta conquista também seja uma forma de homenagear a sua memória.

E à minha mãe, Dala Sambú, cujo amor incondicional, apoio constante e sabedoria me guiaram em cada passo desta jornada. A sua força e determinação foram uma fonte de inspiração, e sou eternamente grato por tudo que fez por mim. Esta conquista é tão sua quanto minha.

Agradecimentos

Querida Professora Sandra Soares e Lígia Lopes.

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a ambas pelo apoio e orientação inestimáveis durante o desenvolvimento da minha dissertação. A vossa disponibilidade, encorajamento e feedback foram fundamentais para que eu pudesse alcançar os meus objetivos académicos.

Agradeço, de coração, por toda a dedicação e pelo conhecimento partilhado. Sinto-me privilegiado por ter tido a oportunidade de aprender com vocês e por toda a orientação que me proporcionaram ao longo deste processo.

Também agradeço de coração a minha querida madrinha, Dona Ermelinda, por todo o apoio, carinho e inspiração que me ofereceu ao longo desta jornada. Sua crença em meu potencial e suas palavras de incentivo foram fundamentais para que eu alcançasse essa importante conquista. Agradeço não apenas pela ajuda prática, mas também por ser um exemplo de força e determinação em minha vida. Sou imensamente grato por ter você ao meu lado.

Resumo

Como é bastante conhecido, os seres humanos usam plantas há séculos para um amplo espectro de aplicações, como culinária ou até mesmo medicina. Algumas plantas têm, de facto, propriedades que podem ajudar com a saúde de vários sistemas do corpo humano devido aos seus componentes. No caso da hortelã, mais especificamente, a *Mentha spicata* L. estes componentes são fenóis, flavonoides entre outros, os quais desempenham um papel importante na inibição do *stress* oxidativo, ao eliminar espécies reativas de oxigénio (ROS) e essa capacidade de proteger do *stress* oxidativo é chamada de capacidade antioxidante. Neste trabalho, o *stress* oxidativo foi causado nas plantas a partir da exposição a um elemento radioativo, o radão (^{222}Rn). Portanto, neste estudo, três grupos de *Mentha spicata* foram expostos a diferentes ambientes para que, posteriormente, a sua capacidade antioxidante fosse comparada. Um grupo de plantas foi exposto a uma atmosfera rica em radão (amostra A), outro, nas mesmas condições, exceto o aerossol radioativo (amostra B), e outro grupo colocado num ambiente sem qualquer intervenção (amostra C). Após duas semanas de exposição, mediou-se a concentração do radionuclídeo ^{222}Rn , nas câmaras e no ambiente, colocaram-se as plantas a secar após o que se procedeu à extração dos seus componentes antioxidantes. Para a avaliação da capacidade antioxidante, foram realizados testes com o radical DPPH utilizando dois protocolos diferentes, o que nos permitiu, também, identificar qual o melhor a utilizar nestas condições específicas. As atividades antioxidantes encontradas nos três grupos de plantas foram calculadas pelos métodos de percentagem de sequestro do radical (%RSA) e através do IC_{50} . As plantas da amostra A revelaram uma capacidade antioxidante muito comprometida, uma vez que apresentaram uma percentagem de sequestro mais baixa e o IC_{50} mais alto em comparação com as da amostra C. Por outro lado, no caso das plantas da amostra B, verificou-se que a capacidade antioxidante apresentava um valor intermédio quando comparado com a capacidade antioxidante das outras duas amostras. É relevante referir, que também foi possível determinar que o melhor protocolo, para esse ensaio e para estas condições, é o teste 1, ressaltando a importância da padronização do estudo e da realização de ensaios complementares, não só para avaliar as propriedades antioxidantes como também a morfologia e a quantificação de compostos químicos nos grupos de plantas estudados.

Palavras-chave

Radão; antioxidante; hortelã; saúde.

Abstract

As is widely known, humans have used plants for centuries for a wide range of applications, such as cooking or even medicine. Some plants indeed have properties that can benefit the health of various systems in the human body due to their components. In the case of spearmint, more specifically *Mentha spicata L.*, these components include phenols, flavonoids, among others, which play an important role in inhibiting oxidative stress by eliminating Reactive Oxygen Species (ROS). This ability to protect against oxidative stress is referred to as antioxidant capacity. In this study, oxidative stress was induced in plants through exposure to a radioactive element, radon (^{222}Rn). Therefore, in this study, three groups of *Mentha spicata* were exposed to different environments so that their antioxidant capacities could be compared afterwards. One group of plants was exposed to an atmosphere rich in radon (sample A), another under the same conditions except for the radioactive aerosol (sample B), and a third group placed in an environment without any intervention (sample C). After two weeks of exposure, the concentration of the radionuclide ^{222}Rn in the chambers and the environment was measured, and the plants were dried before their antioxidant components were extracted. To evaluate the antioxidant capacity, DPPH radical tests were carried out using two different protocols, which also allowed us to identify the most suitable protocol to use under these specific conditions. The antioxidant activities found in the three groups of plants were calculated using the percentage of Radical Scavenging Activity (%RSA) and the IC_{50} . The plants in sample A showed a highly compromised antioxidant capacity, as they exhibited a lower percentage of radical scavenging and a higher IC_{50} compared to those in sample C. On the other hand, the plants in sample B demonstrated an intermediate antioxidant capacity when compared to the antioxidant capacities of the other two samples. It is important to highlight that it was also possible to determine the most appropriate protocol for this assay and for these conditions, is test 1, emphasising the importance of standardising the study and conducting complementary tests, not only to assess antioxidant properties but also the morphology and quantification of chemical compounds in the studied plant groups.

Keywords

Radon; antioxidant; spearmint; health

Índice

Resumo.....	ix
Abstract	xi
Índice.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Acrónimos.....	xix
Introdução.....	1
1. Planta aromática como objeto de estudo: <i>Mentha spicata L.</i>	1
1.1 Atividades antioxidantes	4
1.2 Avaliação da atividade antioxidante da <i>MS</i>	5
1.3 Propriedades do radão.....	6
Materiais e Métodos.....	9
2. Exposição da <i>MS</i> a uma atmosfera rica em radão.....	9
2.1 Materiais	9
2.1.1 Lote de plantas utilizadas	9
2.1.2 Câmaras	10
2.1.3 Equipamentos.....	10
2.1.4 Reagentes.....	10
2.1.5 Análise estatística	10
2.2 Métodos	10
2.2.1 Preparação das plantas e período de exposição	10
2.2.2 Exposição ao radão	12
2.2.3 Preparação das plantas após exposição e extração.....	13
2.2.4 Ensaio de avaliação da capacidade antioxidante	14
Análise dos resultados	16
3. Resultados.....	16
3.1. Observações diretas das plantas e medição da exposição ao radão	16
3.2. Resultados da atividade antioxidante.....	17
Conclusão	21
Referências bibliográficas	23

Lista de Figuras

Figura 1 - Planta <i>MS</i> utilizada na investigação para este trabalho. Fonte: LabExpoRad..	2
Figura 2 - Resumo do ensaio DPPH. Fonte: https://shorturl.at/AmSNa	5
Figura 3 - Cadeia de decaimento do urânio (^{238}U). Fonte: https://shorturl.at/ngSNS ...	7
Figura 4 - Vias de entrada de radão em edifícios e residências. Fonte: https://shorturl.at/hYMrN	8
Figura 5 - Exemplos dos vasos da <i>MS</i> utilizadas neste trabalho. Fonte: LabExpoRad...	11
Figura 6 - Disposição do material em argila dentro da câmara. Fonte: LabExpoRad	11
Figura 7 – Exemplo de um detetor passivo RadTrack3 do laboratório Radonova, Inc e utilizado neste trabalho. Fonte: https://radonovalaboratories.com/product/radtrak3/	12
Figura 8 - Equipamento de deteção ativa RAD7 Durrigde USA. Fonte: (“RAD7 - Electronic Radon Detector - User Manual,” 2023)	13
Figura 9 - Plantas do grupo A e C colocadas para secagem ao ar. Fonte: LabExpoRad.....	13
Figura 10 - Diluições das soluções dos extratos das plantas. Fonte: LabExpoRad	14
Figura 11 - Aspeto dos tubos após a adição do reagente DPPH. Fonte: LabExpoRad. ...	15
Figura 12 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 1 para as respetivas concentrações analisadas da amostra A2.	18
Figura 13 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 1 para as respetivas concentrações analisadas da amostra B2.	18
Figura 14 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 1 para as respetivas concentrações analisadas da amostra C2.	18
Figura 15 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 2 para as respetivas concentrações analisadas da amostra A2.	19
Figura 16 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 2 para as respetivas concentrações analisadas da amostra B2.	19
Figura 17 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 2 para as respetivas concentrações analisadas da amostra C2.	20

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados da massa das amostras antes e depois da extração. Incerteza do equipamento: $\pm 0,01$ g.....	13
Tabela 2 - Concentração (atividade específica) de radão	17
Tabela 3 – Percentagem média de radical sequestrado (%RSA) e o IC ₅₀ obtidos em cada teste.....	17

Lista de Acrónimos

UBI	Universidade da Beira Interior
MS	<i>Mentha spicata L.</i>
OE	Óleo essencial
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
RSA	Radical Scavenging Activity
IC ₅₀	Inhibitory Concentration
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPH-H	difenilpicrilhidrazina
FRAP	Ferric Reducing Antioxidante Power
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
LabExpoRad	Laboratório de Estudo dos Efeitos da Exposição ao Radão
ANOVA	Analisis of Variance
SSNTD	Solid-State Nuclear Track Detector
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra-Violeta
ADN	Ácido desoxirribonucleico

Capítulo 1

Introdução

1. Planta aromática como objeto de estudo: *Mentha spicata* L.

A família *Lamiaceae* possui vários membros, o género *Mentha*, pertencente a esta família, inclui aproximadamente 30 espécies que podem ser encontradas nas regiões temperadas da Europa, Ásia, Austrália e África (Dhifi et al., 2013). A menta pode ser utilizada como condimento na culinária, como agente aromatizante em certos produtos alimentícios, ou para a extração de seu óleo essencial. Por vezes simplesmente apreciada como planta ornamental, é uma das mais utilizadas em todo o mundo (Lubbe & Verpoorte, 2011).

A *Mentha spicata* L. (*MS*), também conhecida como hortelã ou hortelã-verde (Figura 1), é uma planta perene caracterizada pela cor verde, com crescimento até 100 cm, apresenta caules ramificados com folhas dentadas e inflorescência, ou seja, a ramificação termina em um conjunto de flores (Mahendran et al., 2021) é de uso comum como planta medicinal, sendo incluída nas farmacopeias de diversos países europeus. De entre as muitas aplicações que lhe são atribuídas, destacam-se suas propriedades estimulantes, digestivas e carminativas, sendo empregada no tratamento de problemas digestivos, gases, dispepsias nervosas, palpitações, tremores nervosos, vômitos, cólicas uterinas, além de auxiliar na expetoração de catarros brônquicos. Apresenta ainda, entre outras, características antifúngicas, antivirais, antimicrobianas, inseticidas, antioxidantes, anti hemolíticas, diuréticas, estimulantes (Ebrahimzadeh et al., 2010; Mahendran et al., 2021; M. R. Martins et al., 2012; Nickavar et al., 2008).

A *MS* é frequentemente consumida como chá ou infusão, mas também pode ser aplicada topicamente na forma de óleo essencial (OE) (Mahendran et al., 2021). É importante notar que a composição química do óleo essencial da *MS* pode variar dependendo da região onde é cultivada, o que pode afetar as suas propriedades medicinais (El Menyiy et al., 2022).



Figura 1 - Planta *MS* utilizada na investigação para este trabalho. Fonte: LabExpoRad

Dos compostos secundários encontrados na *MS* podemos destacar os fenóis e os flavonoides:

- ▮ **Fenóis:** são alguns dos compostos ativos mais importantes encontrados na *MS*. O ácido rosmarínico e o ácido cafeico são os principais metabólitos encontrados na hortelã-verde. Outros ácidos fenólicos importantes incluem o ácido clorogénico, ácido p-cumárico e ácido siríngico (Mahendran et al., 2021).
- ▮ **Flavonoides:** são importantes polifenóis dietéticos (Mahendran et al., 2021). A apigenina foi identificada como um importante flavonoide encontrado em extratos de *MS* (El Menyiy et al., 2022; Mahendran et al., 2021). Outros flavonoides importantes incluem diosmina e luteolina (Mahendran et al., 2021). Os extratos etanólicos de folhas de *MS* contêm uma grande quantidade de compostos fenólicos, incluindo naringenina, epicatequina, catequina, rutina, miricetina e luteolina (El Menyiy et al., 2022).

Nos OEs da *MS* a composição pode variar significativamente dependendo da região onde esta é cultivada. No entanto, a carvona é frequentemente relatada como o constituinte predominante do OE de *MS* (Mahendran et al., 2021), assim como o limoneno, o óxido de piperitona, a mentona, a isomentona, a pulegona, o 1,8-cineol, a cânfora, o p-cimeno, a di-hidrocarvona, o β -cariofileno, o germacreno D, o α -pineno e o linalol (Mahendran et al., 2021). A diferença na quantidade dos compostos fenólicos e/ou flavonoides, entre outros compostos bioativos encontrados nos OE, pode ser atribuída a fatores genéticos, ambientais e à sua interação (Mahendran et al., 2021).

Vários estudos demonstram que extratos e óleos essenciais de *MS* possuem uma atividade antioxidante significativa. Os compostos fenólicos são uma classe importante de antioxidantes naturais encontrados em diferentes plantas (Abootalebian et al., 2016; Ebrahimzadeh et al., 2010; Scherer et al., 2013). A sua estrutura química, caracterizada por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo, confere-lhes a capacidade de fornecer eletrões ou átomos de hidrogénio a

radicais livres, neutralizando-os (Ebrahimzadeh et al., 2010; Scherer et al., 2013). Este tópico, será abordado com mais detalhes na secção 1.1.

Os compostos fenólicos desempenham várias funções importantes na vida das plantas, contribuindo para a sua capacidade de se adaptarem e prosperarem em diversos ambientes (Boudet, 2007; Cheynier et al., 2013). As plantas aumentam a produção de compostos fenólicos, muitos dos quais antioxidantes, em resposta a *stress* abiótico como seca, salinidade, temperaturas extremas, radiação ultra-violeta e metais pesados (Sharma et al., 2019). Alguns desses mesmos fatores também podem levar a um aumento de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS), no entanto, neste âmbito, não há estudos sobre qual o comportamento devido à exposição ao gás radão. As ROS são moléculas muito reativas que podem danificar componentes celulares vitais como proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ADN (Shao et al., 2008).

O objetivo central deste estudo, é utilizar a planta *MS* para a comparação de dois protocolos distintos de avaliação da sua capacidade antioxidante após exposição a um ambiente rico em gás radão. A capacidade antioxidante de plantas é um parâmetro fundamental para entender a sua resposta a fatores de *stress*, sendo esta característica de grande importância, particularmente em espécies de interesse medicinal e alimentar, uma vez que os compostos antioxidantes desempenham um papel crucial na proteção das plantas contra os efeitos prejudiciais do *stress* oxidativo, causado por um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante das células (Shao et al., 2008).

O estudo será realizado com três grupos distintos de plantas: dois grupos de controlo (B e C), que não serão submetidos a qualquer intervenção, e um grupo experimental (A). No grupo experimental, será introduzida uma rocha radioativa, exaladora de radão, de modo a submeter as plantas à exposição contínua deste gás radioativo, enquanto os grupos de controlo seguirão o mesmo protocolo sem a presença da rocha.

Nesta investigação pretende-se avaliar o impacto da exposição ao radão nas propriedades antioxidantes da *MS*, comparando as plantas expostas a este gás radioativo com as não expostas. Espera-se, por isso, que seja possível identificar diferenças significativas na capacidade antioxidante entre os grupos, o que poderá fornecer dados importantes sobre as possíveis alterações metabólicas ou fisiológicas desencadeadas pela exposição ao radão, nomeadamente ao nível da sua defesa contra o *stress* oxidativo.

Para os ensaios da atividade antioxidante, as partes aéreas das plantas pertencentes aos três grupos, serão colhidos, secos e submetidos à extração. Os métodos de extração utilizados para obter compostos secundários de *MS* variam de acordo com o tipo de composto desejado. Neste trabalho, foi utilizado o método de extração por solvente. Uma vez que a escolha do solvente depende da polaridade dos compostos a serem extraídos, no caso deste trabalho, foi utilizado o metanol pois é excelente para extrair compostos fenólicos (Abootalebian et al., 2016).

A motivação central deste estudo reside no facto de a *MS* poder contribuir para a compreensão dos efeitos do radão em organismos vegetais e para o aprofundamento do conhecimento sobre as respostas antioxidantes de plantas expostas a agentes radioativos. Este estudo tem implicações tanto ao nível ecológico como nas áreas da saúde pública e da biotecnologia.

1.1 Atividades antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas que inibem as reações provocadas por radicais livres e a oxidação celular, através da sua redução em compostos neutros e oxidam-se elas próprias em moléculas não tóxicas (Singh et al., 2017). Isso significa que atuam fornecendo eletrões a radicais livres, neutralizando-os e minimizando os danos oxidativos nos processos biológicos (Gulcin & Alwasel, 2023).

A distribuição de compostos bioativos, como os antioxidantes, varia entre diferentes partes de uma mesma planta, daí que raízes, folhas, flores, caules, frutos e sementes possam apresentar perfis antioxidantes distintos. A biossíntese de metabólitos secundários, como os antioxidantes, está frequentemente ligada a estágios específicos do desenvolvimento da planta (Ranjbar et al., 2020).

O método de extração, como já foi referido, influencia diretamente a quantidade de compostos antioxidantes presentes no extrato e, conseqüentemente, a sua atividade (Ranjbar et al., 2020), do mesmo modo que o processamento do extrato, particularmente a secagem, as concentrações utilizadas nos ensaios e as condições de armazenamento, como a temperatura, a luz e a humidade, podem afetar a estabilidade e a atividade antioxidante (Sánchez-Moreno, 2002).

Estudos indicam que a espécie e a variedade da planta têm um papel significativo na composição química, incluindo a presença e a concentração de compostos fenólicos (antioxidantes). Por exemplo, Scherer (2013) destaca que diferentes espécies de *Mentha* apresentam diversidade na composição do seu óleo essencial. Já El Menyiy (2022) menciona a existência de diferentes quimiotipos em *MS*, com o óleo essencial variando em composição de acordo com a predominância de determinados compostos, como a carvona, o carvacrol e outros. A época de colheita é outro fator que pode levar a variações de concentração de compostos bioativos da planta uma vez que diferentes épocas de colheita influenciam o rendimento e a composição do óleo essencial da *MS* (M. B. G. Martins, 2002).

Todos esses estudos identificaram, não apenas, alterações na composição química da *MS*, mas também, registaram modificações nas suas atividades antioxidantes. Daí que, como já foi anteriormente referido, o presente estudo tenha como principal objetivo avaliar as alterações na *MS* após a sua exposição a um ambiente tóxico, analisando de forma rigorosa a influência dessas modificações na sua composição química e na sua capacidade antioxidante.

1.2 Avaliação da atividade antioxidante da MS

Na literatura existem diversos métodos químicos e bioquímicos que permitem avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, de substâncias puras, frações e extratos orgânicos (Ahmad et al., 2012; Mahendran et al., 2021; Özer, 2018; Tomé & Silva, 2020). Um desses métodos envolve a utilização do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um composto químico amplamente utilizado em ensaios *in vitro* para a avaliação da capacidade antioxidante.

O DPPH[•] é um radical livre estável devido à deslocalização do elétron livre por toda a molécula o que lhe confere uma maior estabilidade química. Essa deslocalização eletrônica também resulta numa coloração violeta intensa, com uma absorção máxima de comprimento de onda em torno dos 517 nm, característica que facilita a sua utilização em ensaios de atividade antioxidante, uma vez que a redução do DPPH[•] resulta numa mudança de cor mensurável (Gulcin & Alwasel, 2023; Molyneux, 2004). Este composto é solúvel em solventes orgânicos polares, como metanol e etanol, mas praticamente insolúvel em água (Gulcin & Alwasel, 2023; Munteanu & Apetrei, 2021).

O ensaio com DPPH baseia-se na capacidade dos antioxidantes doarem átomos de hidrogénio ou elétrons ao radical DPPH[•], neutralizando-o e resultando na formação de DPPH-H (difenilpicrilhidrazina), um composto de coloração amarelo-claro (Figura 2). Este processo de redução do DPPH[•] é acompanhado por uma diminuição da absorvância a 517 nm, que pode ser medida por espectrofotometria (Abootalebian et al., 2016; Gulcin & Alwasel, 2023; Molyneux, 2004; Scherer et al., 2013), uma vez que quanto menor o valor obtido, mais do radical foi sequestrado pelos compostos antioxidantes contidos na amostra.

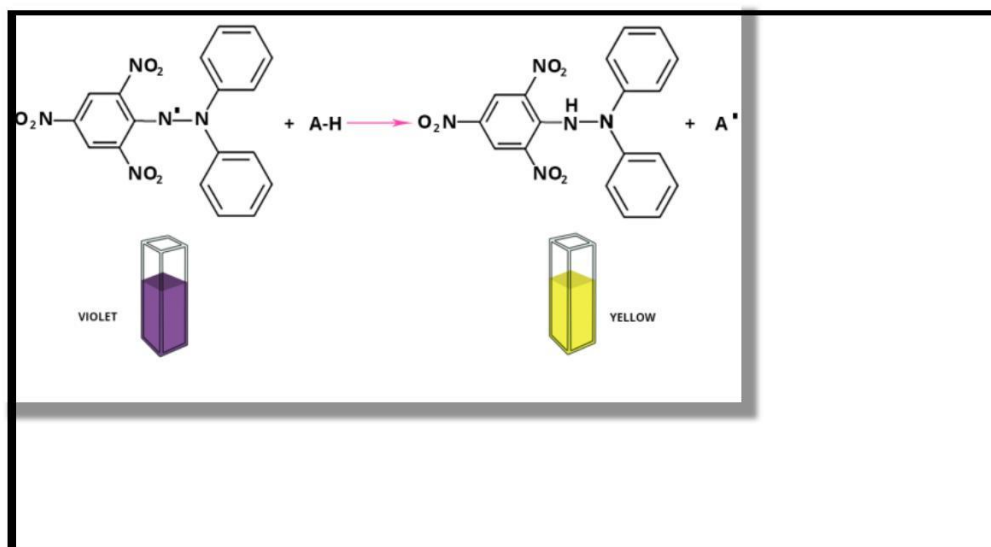


Figura 2 - Resumo do ensaio DPPH. Fonte: <https://shorturl.at/AmSNa>

As principais vantagens da utilização deste método residem na sua simplicidade, baixo custo e rapidez, permitindo obter resultados em apenas alguns minutos. Além disso, o ensaio DPPH é capaz de detetar a atividade antioxidante em baixas concentrações e apresenta uma elevada

consistência entre diferentes ensaios tornando-o uma ferramenta fiável e amplamente aplicada na investigação científica (Gulcin & Alwasel, 2023; Molyneux, 2004; Munteanu & Apetrei, 2021).

O ensaio DPPH é, portanto, uma ferramenta útil para elucidar se a atividade antioxidante da *MS* se deve essencialmente à sua capacidade de eliminação de radicais livres. Alguns estudos têm demonstrado uma forte correlação entre o conteúdo fenólico total nos extratos desta planta e a sua capacidade de sequestrar radicais DPPH[•], sugerindo que os compostos fenólicos são os principais responsáveis por essa atividade antioxidante (Kanatt et al., 2007; Nickavar et al., 2008). Também é possível comparar a atividade antioxidante em diferentes extratos de *MS*, obtidos com solventes distintos, ou a partir de diferentes partes da planta (Abootalebian et al., 2016; Choudhury et al., 2006; Kanatt et al., 2007). Por exemplo, estudos demonstraram que extratos metanólicos de *MS* apresentaram uma maior atividade antioxidante em comparação com extratos obtidos através de outros solventes (Choudhury et al., 2006; Scherer et al., 2013).

É importante salientar que a utilização de uma única abordagem para a avaliação da capacidade antioxidante de uma planta não pode ser considerada eficaz, uma vez que não capta a complexidade dos mecanismos antioxidantes (Munteanu & Apetrei, 2021; Nickavar et al., 2008). Soluções etanólicas ou metanólicas de diferentes graus são as mais comumente utilizadas pois conseguem extrair quase todos os tipos de flavonoides e compostos fenólicos (Cunha, 2009, p. 245), porém, alguns compostos antioxidantes presentes nas plantas são solúveis em água e, o ensaio FRAP (Poder Antioxidante Redutor Férrico, da sigla em inglês), por exemplo, é particularmente útil na avaliação de antioxidantes hidrossolúveis (Munteanu & Apetrei, 2021). Outro ensaio à semelhança do DPPH é a utilização do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), que também compreende uma reação colorimétrica, neste caso medida a 734 nm, e deve-se à uma captura de um radical, neste caso o catiónico ABTS^{•+} (Kaddour et al., 2022; Munteanu & Apetrei, 2021; Nickavar et al., 2008).

Justifica-se assim que o ensaio DPPH é uma ferramenta para a avaliação preliminar da atividade antioxidante em extratos metanólicos de *MS*, fornecendo informações essenciais sobre a capacidade de eliminação de radicais livres por essa planta.

1.3 Propriedades do radão

Uma vez que o gás radão é o elemento químico presente na atmosfera à qual a *MS* estará exposta, é fundamental apresentar algumas das suas propriedades para melhor se compreender o seu potencial efeito na saúde e no ambiente.

O radão é um gás nobre radioativo que ocorre naturalmente na natureza e possui várias propriedades importantes. É gerado a partir do decaimento do urânio (²³⁸U) presente, em diferentes quantidades, em rochas graníticas, em solos e na água. A cadeia de decaimento inclui

o rádio (^{226}Ra) que possui uma semivida bastante longa (cerca de 1620 anos). O radão (^{222}Rn) é um descendente direto do ^{226}Ra (Figura 3) e tem uma semivida de 3,8 dias (Cecil & Green, 2000).

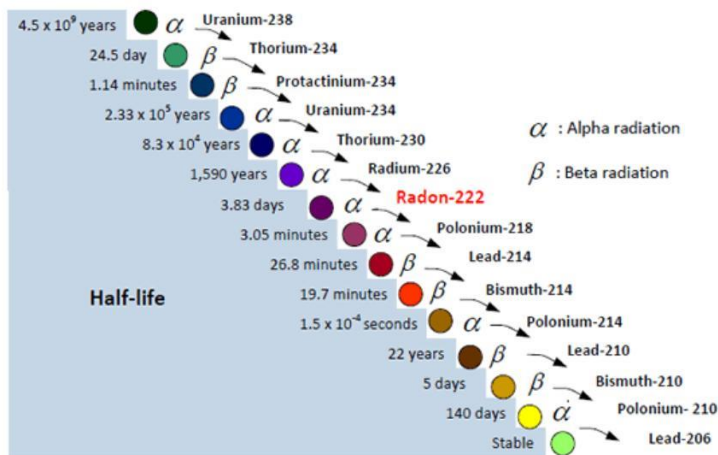


Figura 3 - Cadeia de decaimento do urânio (^{238}U). Fonte: <https://shorturl.at/ngSNS>

Por ser um gás nobre, é praticamente inerte. Apesar de ser ligeiramente solúvel em água, a sua solubilidade diminui com o aumento da temperatura. Devido à sua natureza inerte, a migração do radão no solo é principalmente influenciada por processos físicos, como a difusão e o fluxo de água subterrânea (Cecil & Green, 2000). O radão é responsável por cerca de 50% da dose total média anual, da radiação ionizante natural, a que as populações estão expostas (Soares et al., 2020).

A principal preocupação relacionada com a exposição humana ao radão surge, sobretudo, em espaços fechados como, por exemplo, o interior das habitações. O radão proveniente do solo pode infiltrar-se nos edifícios através de fissuras nas fundações, juntas de canalizações mal vedadas e outros orifícios de entrada, como pode ser observado na Figura 4. As concentrações de radão nestes locais podem variar significativamente, influenciadas por fatores como o tipo de solo, materiais de construção, ventilação e época do ano (Soares et al., 2020). As concentrações de radão em residências tendem a ser mais elevadas durante o inverno, devido à menor ventilação, particularmente em algumas regiões onde os invernos são mais rigorosos, uma vez que, nestes casos, as janelas são frequentemente mantidas fechadas para mitigar o frio. Além disso, este aumento nas concentrações de radão pode ser particularmente significativo em áreas onde, por motivos de poupança energética, o isolamento é ainda maior, contribuindo para a acumulação do gás nocivo no interior das habitações (Bahu et al., 2021).

A exposição prolongada a altas concentrações de radão é a segunda principal causa de cancro de pulmão, a seguir ao tabagismo (Kim et al., 2016; Soares et al., 2014). No entanto, para indivíduos não fumadores, o radão torna-se a principal causa dessa patologia, uma vez que, após ser inalado, o radão pode decair, libertando energia que se pode depositar em órgãos como o pulmão e o estômago, potenciando o desenvolvimento de neoplasias (Soares et al., 2014). Este gás radioativo não tem cheiro, cor ou sabor, mistura-se com o ar ambiente e não é perceptível pelos nossos sentidos, tornando-o um perigo silencioso e invisível. Não existe um limite, seguro e conhecido para a exposição ao radão, abaixo do qual seja possível garantir que não haverá dano, sendo que o risco de desenvolvimento de cancro de pulmão aumenta de forma proporcional à exposição cumulativa ao longo do tempo (Riudavets et al., 2022).

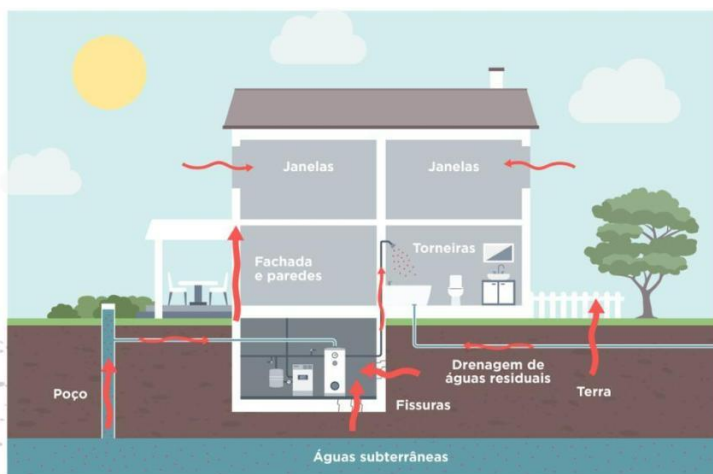


Figura 4 - Vias de entrada de radão em edifícios e residências. Fonte: <https://shorturl.at/hYMrN>

Uma vez que o gás radão é ligeiramente mais denso do que o ar, a ventilação adequada dos edifícios é fundamental para reduzir a concentração, especialmente em áreas suscetíveis à sua acumulação, como caves e pisos inferiores. Além disso, a selagem de fundações, paredes e pisos, com materiais apropriados, pode impedir a entrada do radão nos edifícios (Bahu et al., 2021; Soares et al., 2020). Essas medidas são essenciais para proteger a saúde dos ocupantes e minimizar os riscos associados à exposição a este gás radioativo.

Outra abordagem para a redução da concentração de radão em ambientes fechados é a biorremediação, que envolve o uso de organismos vivos, principalmente microrganismos e plantas, para transformar ou degradar contaminantes em substâncias menos tóxicas ou mesmo não tóxicas (Leung, 2004). Este método pode oferecer uma alternativa sustentável e eficaz para mitigar os riscos associados à presença de radão e deverá ser desenvolvido em trabalhos futuros.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2. Exposição da *MS* a uma atmosfera rica em radão

Sendo o objetivo desta experiência realizar uma discussão aprofundada sobre as diferentes técnicas utilizadas para a determinação da atividade antioxidante da *MS*, a avaliação desta capacidade, é fundamental para compreender o potencial bioativo das plantas, especialmente no que diz respeito à sua aptidão de neutralizar radicais livres e prevenir danos celulares associados ao *stress* oxidativo.

Neste contexto, a *MS*, como já foi referido, uma planta amplamente reconhecida pelas suas propriedades terapêuticas, serve como um modelo adequado para investigar a eficácia de vários métodos analíticos, tais como o ensaio DPPH, ABTS e outros. A comparação entre estas técnicas permitirá não apenas identificar quais são as mais apropriadas para a análise da atividade antioxidante desta espécie, mas também contribuir para o avanço do conhecimento sobre os compostos fenólicos e outros metabolitos secundários presentes na planta.

A relevância deste estudo reside na sua capacidade de fornecer informações valiosas que podem ser aplicadas em diversas áreas como por exemplo, na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, onde o uso de extratos naturais ricos em antioxidantes tem uma crescente procura. Por outro lado, a compreensão dos mecanismos de ação e dos métodos de avaliação da atividade antioxidante pode orientar futuras investigações sobre o potencial terapêutico da *MS* e outras espécies de interesse.

2.1 Materiais

2.1.1 Lote de plantas utilizadas

As plantas utilizadas neste trabalho têm origem em Portugal e são da espécie *Mentha spicata L.*, pertencente à família *Lamiaceae*. Foram adquiridos doze vasos da planta viva num supermercado da cidade da Covilhã. Após a chegada ao Laboratório de Estudo dos Efeitos da Exposição ao Radão

(LabExpoRad), localizado na UBIMedical, Covilhã, Portugal, estas plantas foram imediatamente preparadas para o início da experiência.

2.1.2 Câmaras

As câmaras utilizadas neste trabalho foram construídas em acrílico. As suas dimensões são $30,5 \pm 0,05$ cm de altura, $28,7 \pm 0,05$ cm de largura e $28,5 \pm 0,05$ cm de profundidade, sendo o volume total das câmaras de $24947,48 \pm 128,13$ cm³. As câmaras possuem orifícios em duas das suas faces laterais, que podem ser abertos e fechados, de forma a permitir que sejam efetuadas as medições da concentração de radão no seu interior.

2.1.3 Equipamentos

O equipamento utilizado na medição do radão no interior das câmaras foi o RAD7 SN 3507. (Durrigde USA). Os espectrofotómetros utilizados nos ensaios da avaliação da capacidade antioxidante foram o Thermo Spectronic V 4.60 (Helios) para o teste 1 e o UV-6300PC Double Beam Spectrophotometer (VWR) para o teste 2.

2.1.4 Reagentes

Os principais reagentes utilizados nos testes 1 e 2 foram o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) da Sigma-Aldrich e o metanol PA da LABCHEM.

2.1.5 Análise estatística

Todos os cálculos e a respetiva média foram obtidos através de medições em triplicado. Os resultados são expressos em valores *média ± erro padrão*. As análises estatísticas foram obtidas através da regressão linear dos valores medidos e através da ANOVA no Microsoft Excel, com intervalo de confiança de 95%.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação das plantas e período de exposição

Doze vasos da planta *MS* (Figura 5) foram separadas em três grupos. O grupo A consiste em vasos com as plantas que serão expostas a um ambiente rico em radão, encerrado numa câmara em acrílico devidamente selada para evitar fugas do gás exalado pela rocha disposta no interior da câmara. O grupo B, considerado controlo, nas mesmas condições do grupo A, dentro de uma câmara de acrílico fechada, sem qualquer alteração dos vasos ou exposição ao radão. Por fim, o grupo C, também considerado controlo, mas os vasos das plantas deste grupo foram mantidos no laboratório sem ter sido encerrados em nenhuma câmara nem alterado os seus vasos. A disposição

das plantas dos grupos A e B podem ser verificadas na Figura 1. Para simular o ambiente com radão, foram utilizadas rochas compostas essencialmente por quartzo e jaspes com mineralizações de pecheblenda, um mineral que contém urânio e rádio, que através do seu decaimento irá gerar o gás radão.



Figura 5 - Exemplos dos vasos da MS utilizadas neste trabalho. Fonte: LabExpoRad.

Os grupos A e B, que estavam encerradas nas câmaras, foram supridas de água o suficiente para manterem-se vivas durante o período de exposição (Figura 6). O método utilizado para tal foi através de um dispositivo em argila, com água no interior, que difunde água para o solo onde as plantas se encontram conforme a humidade diminui, como uma espécie de “rega automática”. As plantas do grupo C recebiam regas periódicas para manter a humidade do solo. A humidade média relativa durante o período de exposição no ambiente do laboratório foi de 56%.

As plantas permaneceram nestas condições entre os dias 28 de março de 2024 e 12 de abril de 2024.



Figura 6 - Disposição do material em argila dentro da câmara. Fonte: LabExpoRad

2.2.2 Exposição ao radão

Neste trabalho, para a determinação da concentração de radão, tanto no interior como no exterior das câmaras de exposição das plantas da espécie *MS*, foram utilizados detetores passivos CR-39 (carbonato de polialildiglicol), também conhecidos como detetores sólidos de traços nucleares (SSNTD, da sigla em inglês) juntamente com o detetor ativo RAD7 e uma monitorização constante com o RadonEye Plus2 (Korea).

Os detetores passivos, ao serem expostos ao radão presente no ambiente, funcionam sem a necessidade de energia externa. No caso do CR-39, o radão difunde-se para dentro do detetor, e as partículas alfa, emitidas pelo radão e pelos seus produtos de decaimento, geram traços microscópicos no material do detetor. Após um determinado período de exposição, o detetor é submetido a um processo de gravação química, que torna os traços visíveis e contáveis através de um microscópio ótico (Bahu et al., 2021; Soares et al., 2020). Após a revelação química dos detetores, é possível efetuar a avaliação da concentração de radão. Essa análise permite quantificar a presença do gás e, conseqüentemente, avaliar os níveis de exposição ao radão no ambiente onde a *MS* foi colocada.



Figura 7 – Exemplo de um detetor passivo RadTrack3 do laboratório Radonova, Inc e utilizado neste trabalho. Fonte: <https://radonovalaboratories.com/product/radtrak3/>

Para este trabalho foram utilizados 3 detetores passivos do modelo RadTrack3 (Figura 7), dispostos um em cada câmara dos grupos A e B e um na bancada do laboratório onde as plantas permaneceram até ao fim da exposição (grupo C).

Os detetores ativos requerem energia externa para operar e usam métodos eletrônicos para detetar e medir o radão em tempo real (Soares et al., 2020). O RAD7 (Figura 8), por exemplo, utiliza um método de espectroscopia alfa, onde as partículas alfa emitidas pelo radão são detetadas e a sua energia é analisada para determinar a concentração de radão. A principal vantagem deste método de deteção reside na sua maior sensibilidade, na obtenção de resultados mais rápidos e na capacidade de medir as concentrações de radão de forma contínua e instantânea (“RAD7 - Electronic Radon Detector - User Manual,” 2023).



Figura 8 - Equipamento de detecção ativa RAD7 Durrigde USA. Fonte: (“RAD7 - Electronic Radon Detector - User Manual,” 2023)

Os valores de concentração de radão no interior das câmaras de cada grupo e no ambiente são expressos em Bq/m³.

2.2.3 Preparação das plantas após exposição e extração

A preparação para a extração envolve inicialmente a secagem, ao ar, da parte aérea das plantas (Figura 9), caules e folhas, seguida pela trituração das plantas de cada um dos grupos. As amostras A, B e C, foram tratadas, armazenadas e identificadas separadamente. Na Tabela 1 estão representados os valores das massas e correspondente rendimento das plantas estudadas.



Figura 9 - Plantas do grupo A e C colocas para secagem ao ar. Fonte: LabExpoRad.

Tabela 1 - Dados da massa das amostras antes e depois da extração. Incerteza do equipamento: $\pm 0,01$ g.

Amostra	Massa planta seca triturada (꺾)	Massa após a extração (꺾)	Rendimento (%)
A	2,01	0,42	20,90
B	2,01	0,56	27,86
C	2,08	0,48	23,08

Após a trituração, a cada uma das amostras colocadas num erlenmeyer devidamente identificado como A, B e C, foram adicionados 20 mL de metanol por grama de planta seca e triturada. Os erlenmeyers foram colocados em banho-maria a 40°C com ultrassons para a dissolução dos compostos de interesse. Com o auxílio de funil de Büchner e papel filtro, filtraram-se as soluções obtidas e o filtrado é transferido para balões de fundo redondo previamente pesados. Os balões foram posteriormente levados para um evaporador rotativo Buchi-R-251 até completa evaporação do solvente.

Para se obter uma concentração conhecida, do extrato de cada amostra, após o uso do evaporador rotativo, a massa do extrato foi registada e é apresentada na Tabela 1. Com base na massa de cada extrato obtido, calculou-se o volume necessário de metanol, a adicionar num frasco limpo e devidamente identificado, de forma a atingir a concentração de 50 mg/mL. Estas soluções dos extratos foram armazenadas a 4°C até serem utilizadas nos ensaios de avaliação da capacidade antioxidante.

2.2.4 Ensaios de avaliação da capacidade antioxidante

Os ensaios das atividades antioxidantes, realizados neste trabalho, foram adaptados a partir de Brand-Williams et al. (1995) designados como teste 1, e de Luís (2009), identificados como teste 2. Os resultados obtidos em ambos os ensaios serão discutidos no Capítulo 3. Para ambos os testes, realizaram-se as diluições dos extratos das plantas (Figura 10). Esta etapa é crucial, pois se a concentração da amostra estiver fora da faixa linear de detecção do espectrofotómetro, as leituras não serão precisas, o que poderá resultar na necessidade de realização de novos ensaios com concentrações de extratos diferentes.



Figura 10 - Diluições das soluções dos extratos das plantas. Fonte: LabExpoRad

Para cada concentração de extrato, tanto no teste 1 como no teste 2, foram adicionados 3,9 mL de DPPH 0,1 nM. No controlo, a mesma quantidade de extrato foi substituída por metanol. Todas as preparações foram realizadas em triplicado (Figura 11).

Os preparados foram mantidos ao abrigo da luz e, após 30 minutos para o teste 1 e 90 minutos para o teste 2, as leituras foram realizadas no espectrofotómetro a 517 nm, sendo a leitura do controlo efetuada a cada alteração das concentrações dos extratos.

A percentagem do radical DPPH sequestrado (%RSA) foi calculada utilizando a equação (1) em que os resultados indicam que quanto maior for a percentagem encontrada, maior é a atividade antioxidante.

$$\%RSA = \left| \frac{A_c - A_s}{A_c} \right| \times 100 \quad (1)$$

Onde %RSA (Radical Scavenging Activity) – é a percentagem de radical que foi sequestrado na solução do extrato, A_c - média das absorvâncias do controlo e A_s - média das absorvâncias para cada concentração das amostras.

Outra forma de se avaliar a atividade antioxidante é através do IC_{50} (Concentração Inibitória, da sigla em inglês) que representa a concentração de um antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%, numa determinada unidade de concentração. Um valor de IC_{50} mais baixo indica uma maior capacidade antioxidante, pois significa que uma menor concentração do antioxidante é necessária para neutralizar a mesma quantidade de radicais DPPH (Gulcin & Alwasel, 2023; Molyneux, 2004; Munteanu & Apetrei, 2021; Nickavar et al., 2008).

Após a realização dos procedimentos descritos anteriormente, os resultados são expressos em IC_{50} e em percentagem de RSA médio os quais necessitam de uma análise e interpretação cuidadosa.

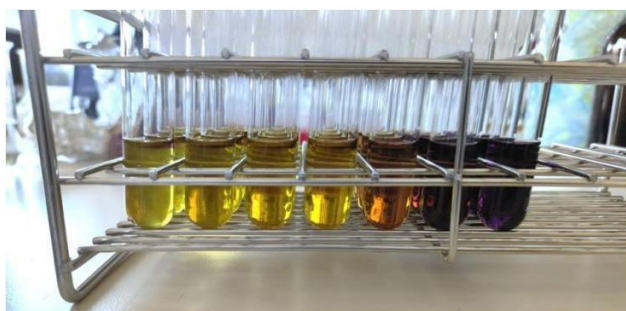


Figura 11 - Aspeto dos tubos após a adição do reagente DPPH. Fonte: LabExpoRad.

Capítulo 3

Análise dos resultados

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a determinação da atividade antioxidante na *MS*, utilizando dois protocolos distintos de extração e análise: o método adaptado de (Brand-Williams et al., 1995) e o de (Luís, 2009). A análise dos resultados foca-se na eficácia dos diferentes protocolos, bem como na influência da exposição ao radão nas amostras.

3. Resultados

3.1. Observações diretas das plantas e medição da exposição ao radão

Após uma semana, já se podiam observar diferenças significativas entre as duas câmaras identificadas como grupos A e B. As plantas do grupo B não apresentava alterações visíveis em relação ao momento da selagem da câmara, enquanto as do grupo A exibiam um leve tom acastanhado. Após duas semanas de exposição, procedeu-se à determinação da concentração de radão dentro e fora das câmaras, utilizando para isso o detetor RAD7. Subsequentemente, as câmaras foram abertas, as plantas retiradas do seu interior e colocadas em recipientes adequados, perfeitamente identificados, de forma a poderem secar ao ar. Os detetores passivos foram cuidadosamente armazenados para posterior envio para a contagem dos traços no laboratório Radonova, Inc. Durante a preparação das plantas, para se proceder à secagem, observou-se uma diferença significativa entre os grupos: no grupo A, as plantas apresentavam-se acastanhadas, murchas e com um odor desagradável, enquanto nos grupos B e C, as plantas mantinham uma coloração viva e o aroma característico da hortelã.

Os resultados obtidos das medições da concentração de radão utilizando-se os métodos ativo e passivo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração (atividade específica) de radão

Método	Grupo	Concentração de radão ($\mu\text{Ci}/\text{kg}$)
Passivo	A	> 138900
	B	7000 ± 1100
	C	6460 ± 980
Ativo	A	323000 ± 2800
	B	2950 ± 230
	C	37 ± 3

3.2. Resultados da atividade antioxidante

Os resultados das atividades antioxidantes obtidos nos testes 1 e 2 estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Percentagem média de radical sequestrado (%RSA) e o IC_{50} obtidos em cada teste

Grupo	Teste 1		Teste 2	
	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%RSA	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%RSA
A	342,4 ± 7,4	34,7 ± 26,6	1649,9 ± 0,8	80,7 ± 3,7
B	263,3 ± 7,2	44,3 ± 24,2	1056,1 ± 2,0	83,5 ± 6,7
C	47,1 ± 13,8	74,9 ± 20,2	1797,8 ± 0,9	86,4 ± 3,6

Para cada grupo, após a leitura das absorvâncias de cada diluição e dos respectivos controlos, determinou-se a capacidade antioxidante com o cálculo da percentagem de sequestro do radical (%RSA) para a cada concentração de amostra a partir da equação (1). Com os valores de %RSA, procedeu-se à determinação da concentração de inibição em 50% (IC_{50}) de cada amostra. Este cálculo é fundamental, pois permite determinar a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH para metade, ou seja, para medir a capacidade antioxidante de uma amostra.

Para o IC_{50} é necessário a construção de um gráfico de concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$ em função da percentagem de sequestro do radical para cada amostra, como está indicado nas figuras 12 a 17.

É a partir da equação da regressão linear, de cada gráfico, que se procede ao cálculo da IC_{50} segundo a equação (2). A variável a representa 50% de sequestro do radical DPPH e o b representa a concentração da amostra para atingir o IC_{50} .

$$a = \frac{50 - b}{m} \quad (2)$$

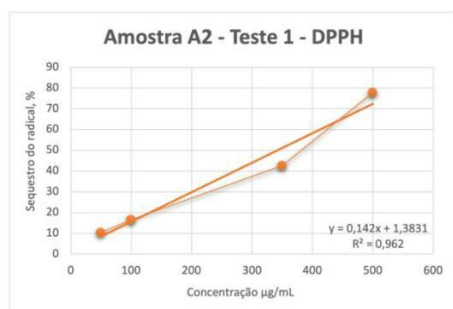


Figura 12 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 1 para as respectivas concentrações analisadas da amostra A2.

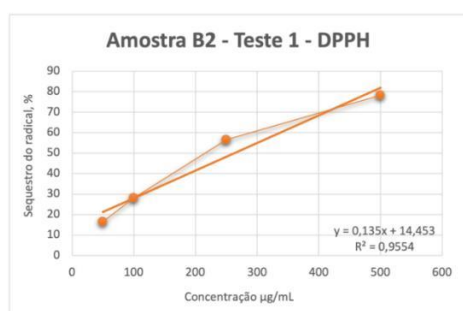


Figura 13 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 1 para as respectivas concentrações analisadas da amostra B2.

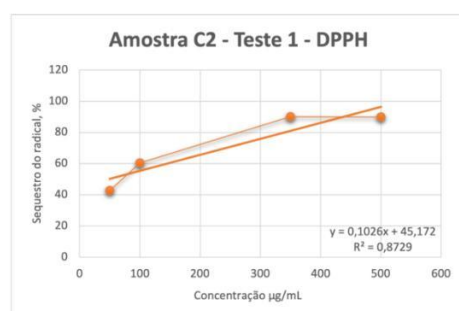


Figura 14 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 1 para as respectivas concentrações analisadas da amostra C2.

A análise dos resultados obtidos demonstra que a utilização de métodos diferentes influencia, significativamente, os valores observados. Uma vez que a percentagem de radical sequestrado (%RSA) reflete a capacidade dos antioxidantes em reduzir o DPPH, em comparação com uma amostra de referência, o tempo de reação desempenha um papel crucial nos resultados. Esta variação pode ser atribuída à cinética da reação entre os compostos antioxidantes e o DPPH, resultando em valores de atividade antioxidante medidos em diferentes momentos. Diferentes compostos antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH a velocidades distintas (Brand-Williams et al., 1995; Gulcin & Alwasel, 2023; Munteanu & Apetrei, 2021). Verifica-se, portanto, que o tempo de incubação pode refletir-se na precisão do resultado da capacidade antioxidante total, quando se comparam os dois testes.

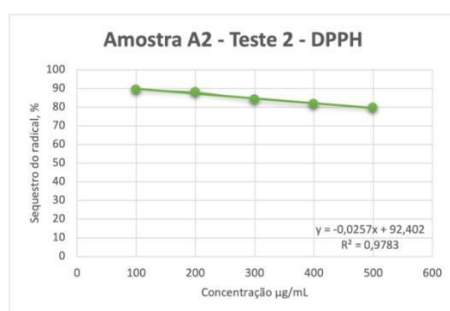


Figura 15 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 2 para as respectivas concentrações analisadas da amostra A2.

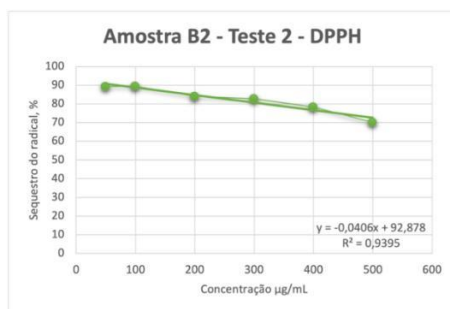


Figura 16 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 2 para as respectivas concentrações analisadas da amostra B2.

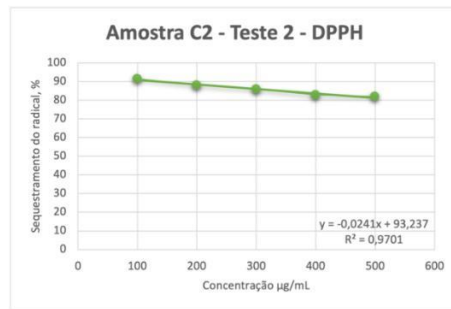


Figura 17 - Gráfico obtido com os valores de %RSA do teste 2 para as respectivas concentrações analisadas da amostra C2.

Outra possível causa para as discrepâncias nos resultados são as leituras de absorvância obtidas entre diferentes equipamentos. Idealmente, deveria ser utilizado o mesmo dispositivo, caso isso não seja possível, os equipamentos deveriam ser calibrados com um padrão comum, o que não foi efetuado neste estudo. Além disso, salienta-se a importância da padronização do protocolo experimental, que deve abranger as condições de reação, o tempo de incubação e o método de expressão dos resultados.

Embora o ensaio DPPH seja uma ferramenta valiosa, oferece apenas uma visão parcial da capacidade antioxidante das amostras, como referido no Capítulo 2. Para obter um perfil mais abrangente da atividade antioxidante, é aconselhável complementar este método com outros ensaios antioxidantes. A investigação e o desenvolvimento de métodos padronizados, assim como uma compreensão aprofundada dos mecanismos subjacentes à reação DPPH, são essenciais para melhorar a fiabilidade e a comparabilidade dos resultados obtidos.

No desenvolvimento deste estudo, foram identificadas algumas limitações metodológicas, nomeadamente as variações nas leituras de absorvância entre equipamentos, sublinhando a importância da padronização dos ensaios para garantir a comparabilidade dos resultados. Embora o ensaio DPPH tenha fornecido uma indicação inicial da capacidade antioxidante da planta, destaca-se a necessidade de se complementar esta análise com outros ensaios que permitam um perfil mais abrangente da atividade antioxidante.

Estes resultados sugerem que é essencial um protocolo experimental bem definido e replicável para a obtenção de dados fiáveis e comparáveis, contribuindo para uma melhor compreensão do potencial antioxidante da *MS*.

Capítulo 4

Conclusão

Dos resultados obtidos é possível concluir que a exposição ao radão teve um efeito negativo na capacidade antioxidante das amostras de *Mentha spicata L.*

A amostra do grupo A, exposta a um ambiente enriquecido com radão, apresentou uma capacidade antioxidante significativamente inferior quando comparada com a amostra mantida em condições não expostas a este gás radioativo e colocada fora da câmara (amostra do grupo C), que exibiu a maior atividade antioxidante. Por outro lado, a amostra do grupo B, submetida a condições idênticas às do grupo A, mas sem a presença de rochas radioativas, apresentou uma capacidade antioxidante intermédia.

Estes resultados sugerem que a presença de radão nos ambientes de exposição parece comprometer a capacidade antioxidante das plantas, indicando uma possível degradação dos compostos fenólicos ou outros antioxidantes naturais presentes na *MS*.

Esta observação é consistente com a hipótese de que a exposição a ambientes tóxicos, como aqueles com elevadas concentrações de radão, pode induzir stress oxidativo nas plantas, reduzindo a sua capacidade de neutralizar radicais livres. No entanto, para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes a esta redução na atividade antioxidante, seria necessário realizar análises adicionais, incluindo estudos microscópicos para avaliar alterações morfológicas e celulares que possam ter ocorrido devido à exposição ao radão.

Adicionalmente, é crucial reconhecer que a comparação direta dos resultados deste estudo com outros relatórios existentes na literatura deve ser realizada com cautela, uma vez que cada estudo pode seguir protocolos experimentais diferentes, o que pode levar a variações significativas nos resultados obtidos. Neste contexto, a padronização dos protocolos experimentais revela-se essencial para garantir a reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados.

O protocolo utilizado no teste 1 demonstrou ser o mais promissor para avaliar a atividade antioxidante das amostras de *MS* expostas ao radão, contudo, novos estudos com diferentes concentrações de radão e tempos de exposição, poderão contribuir para uma padronização mais robusta, permitindo extrapolar os resultados a outros contextos e estabelecer uma correlação mais clara entre a exposição a ambientes radioativos e a capacidade antioxidante das plantas.

Outro aspeto a ser considerado é a sobrevivência das plantas durante o período de exposição (16 dias), uma vez que fatores ambientais, como a temperatura e a humidade, desempenham um papel significativo na manutenção das condições no interior das câmaras.

Observou-se, por exemplo, que as plantas do grupo A começaram a apresentar sinais de degradação antes do final do tempo pré-estabelecido para se iniciar a análise experimental, sugerindo que a exposição prolongada, a elevadas concentrações de radão, pode comprometer a vitalidade das amostras.

A colocação das plantas no interior das câmaras e a gestão das condições ambientais devem ser cuidadosamente controladas em futuros estudos para minimizar variáveis que possam influenciar os resultados.

Este trabalho destaca a necessidade de desenvolver metodologias padronizadas e adaptadas às condições específicas de exposição para melhor avaliar a influência de ambientes tóxicos, como o radão, na capacidade antioxidante de espécies vegetais.

Com base nos resultados obtidos, recomenda-se que futuras investigações explorem a análise microscópica e histológica das amostras expostas ao radão para identificar possíveis alterações celulares e estruturais.

Paralelamente, são necessários estudos que variem as concentrações de radão e os tempos de exposição para estabelecer uma correlação mais precisa entre a dose de radão e a capacidade antioxidante da *MS*. Além disso, seria vantajoso complementar o ensaio DPPH com outros testes de capacidade antioxidante, para obter um perfil mais abrangente dos efeitos do radão. Ainda de acordo com esta linha de pensamento uma ideia de trabalho futuro poderia ser a expansão desta investigação a outras espécies vegetais, a fim de verificar se o efeito observado é específico da *MS* ou generalizável a outras plantas. Adicionalmente, a análise do perfil de compostos fenólicos e flavonoides nas amostras expostas ao radão, utilizando técnicas como a HPLC, ajudaria a compreender melhor o impacto do radão na composição fitoquímica das plantas. A definição de protocolos padronizados para futuros estudos é essencial para garantir a reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados.

No entanto, os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados, com especial destaque para a validação dos protocolos experimentais. Além disso, a implementação rigorosa das metodologias permitiu não apenas a obtenção de resultados consistentes, mas também a possibilidade de replicação futura do estudo em contextos semelhantes. A validação dos protocolos foi fundamental para garantir a fiabilidade dos dados e a comparabilidade entre os diferentes grupos analisados, reforçando a relevância e a aplicabilidade dos métodos utilizados neste tipo de investigação.

Referências bibliográficas

- Abootalebian, M., Keramat, J., Kadivar, M., Ahmadi, F., & Abdinian, M. (2016). Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.10.002>
- Ahmad, N., Fazal, H., Ahmad, I., & Abbasi, B. H. (2012). Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1), 83–89. <https://doi.org/10.1177/0748233711407238>
- Bahu, Y., Kessongo, J., Peralta, L., & Soares, S. (2021). Exposure to radon in buildings in the municipality of Lubango, Angola, during winter months. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 327(2), 635–642. <https://doi.org/10.1007/s10967-020-07570-2>
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. In *Phytochemistry* (Vol. 68, Issues 22–24, pp. 2722–2735). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cecil, L. D., & Green, J. R. (2000). Radon-222. In P. G. Cook & A. L. Herczeg (Eds.), *Environmental Tracers in Subsurface Hydrology* (pp. 175–194). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4557-6_6
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 72, pp. 1–20). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Choudhury, R. P., Kumar, A., & Garg, A. N. (2006). Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 825–832. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.048>
- Cunha, A. P. da. (2009). *Farmacognosia e fitoquímica* (2ª). Fundação Calouste Gulbenkian.
- Dhifi, W., Jelali, N., Mnif, W., Litaiem, M., & Hamdi, N. (2013). Chemical composition of the essential oil of *mentha spicata* L. from tunisia and its biological activities. *Journal of Food Biochemistry*, 37(3), 362–368. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00656.x>
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., & Nabavi, S. F. (2010). Biological Activities of *Mentha spicata* L. *Pharmacologyonline*, 1, 841–848.
- El Menyiy, N., Mrabti, H. N., El Omari, N., Bakili, A. E. I., Bakrim, S., Mekkaoui, M., Balahbib, A., Amiri-Ardekani, E., Ullah, R., Alqahtani, A. S., Shahat, A. A., & Bouyahya, A. (2022). Medicinal Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of *Mentha spicata*. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/7990508>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. In *Processes* (Vol. 11, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Kaddour, A., Ghemam-Amara, D. G., Moussaoui, Y., Chemsas, A. E., Alia, Z., & Kamarchou, A. (2022). Total phenolic and flavonoid contents of *Mentha spicata* leaves aqueous extracts in different regions of Algeria and their antioxidant, and

- antidiabetic activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 21(9), 1907–1913. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v21i9.14>
- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100(2), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.066>
- Kim, S. H., Hwang, W. J., Cho, J. S., & Kang, D. R. (2016). Attributable risk of lung cancer deaths due to indoor radon exposure. In *Annals of Occupational and Environmental Medicine* (Vol. 28, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40557-016-0093-4>
- Leung, M. (2004). Bioremediation: Techniques for Cleaning up a mess. *BioTeach Journal*, 2, 18–22. www.bioteach.ubc.ca
- Lubbe, A., & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 785–801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>
- Luís, Â. F. dos S. (2009). *Avaliação das atividades antioxidante e anti-microbiana de extractos de resíduos florestais*. <http://hdl.handle.net/10400.6/3776>
- Mahendran, G., Verma, S. K., & Rahman, L. U. (2021). The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata* L.): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114266>
- Martins, M. B. G. (2002). Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *suaveolens* (Lamiaceae). *Botânica e Fisiologia Vegetal • Bragantia*, 61(3), 205–218.
- Martins, M. R., Tinoco, M. T., Almeida, A. S., & Cruz-Morais, J. (2012). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Three Essential Oils from Portuguese Flora. *Journal of Pharmacognosy*, 3(1), 39–44. <http://www.bioinfo.in/contents.php?id=70>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26(2), 211–219. <https://www.researchgate.net/publication/237620105>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nickavar, B., Alinaghi, A., & Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 203–209.
- Özer, Z. (2018). Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of *mentha spicata* subsp. *Spicata* and *M. longifolia* subsp. *typhoides* (briq.) Harley decoction and infusion. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(2), 445–456. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.350089>
- RAD7 - Electronic Radon Detector - User Manual. (2023). In *Durridge Company Inc.*
- Ranjbar, M., Kiani, M., & Nikpey, A. (2020). Antioxidant and scolicidal activities of four Iranian *Mentha* species (Lamiaceae) in relation to phenolic elements. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 9(3), 200–208. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.26>
- Riudavets, M., Garcia de Herreros, M., Besse, B., & Mezquita, L. (2022). Radon and Lung Cancer: Current Trends and Future Perspectives. *Cancers*, 14(13). <https://doi.org/10.3390/cancers14133142>
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. In *Food Science and Technology International* (Vol. 8, Issue 3, pp. 121–137). <https://doi.org/10.1106/108201302026770>

- Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L., & da Silva, A. G. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.007>
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Lu, Z.-H., & Kang, C.-M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4(1), 8–14. www.biolsci.org
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Singh, P., Kesharwani, R. K., & Keservani, R. K. (2017). Antioxidants and Vitamins: Roles in Cellular Function and Metabolism. Roles in Cellular Function and Metabolism. In *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity* (pp. 385–407). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805413-0.00024-7>
- Soares, S., Inácio, M., & Almeida, P. (2014). Determinação da concentração de radão na água da Serra da Pena. In *Conference: Física 2014: 19ª Conferência Nacional de Física e 24º Encontro Ibérico para o Ensino da Física*.
- Soares, S., Kessongo, J., Bahu, Y., & Peralta, L. (2020). Comparison of Radon Mass Exhalation Rate Measurements from Building Materials by two Different Methods. *Radiation Protection Dosimetry*, 191(2), 255–259. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncaa163>
- Tomé, A. C., & Silva, F. A. (2020). Potencial antioxidante em diferentes extratos de plantas Lamiaceae: um estudo comparativo focado no solvente extrator. In *7º Simpósio de Segurança Alimentar*.