

Avaliação de segurança *in vitro* de extratos de plantas: potencial citotóxico e genotóxico

Após realização da prova pública

Margarida Solange Casquilho Vinhas Maria

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

Orientador(a): Prof.^a Doutora Ana Cristina Palmeira de Oliveira

Coorientador(a): Doutora Joana Rita Gonçalves Rolo

fevereiro de 2023

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Margarida Solange Casquilho Vinhas Maria, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10491 do Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências, 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 10 / 02 / 2023

Margarida Solange Casquilho Vinhas Maria

Folha em branco

Agradecimentos

Esta etapa não poderia ser finalizada sem um especial agradecimento àqueles que estiveram presentes ao longo de todo o meu percurso académico, àqueles que me acompanharam na realização dos meus objetivos e, em especial, àqueles que não me deixaram desistir.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira, por me ter dado a oportunidade de integrar este projeto e desenvolver o presente trabalho de investigação de um enorme carácter inovador. Obrigada pela transmissão de conhecimentos, tanto a nível científico como prático.

À minha coorientadora, Professora Joana Rolo, agradeço também por todo o enriquecimento profissional mas, principalmente, por todo o apoio, otimismo e disponibilidade demonstrados. Muito obrigada por toda a confiança que colocou em mim ao longo da realização deste trabalho de investigação.

Agradeço a todo o grupo de investigação, pela entreaajuda e pelas oportunidades de desenvolvimento, a nível pessoal e profissional, que me foram proporcionadas. Aos meus colegas de laboratório, obrigada por toda a ajuda prestada e pelas horas de companhia no laboratório. E em especial, obrigada à minha colega Ana Oliveira, por toda a cooperação tão necessária, pela incansável entreaajuda demonstrada e por todos os conselhos, ao longo deste ano.

Agradeço também ao projeto que apoiou o desenvolvimento desta Dissertação, designado por "Projeto INOVEP – Inovação com Extratos de Plantas", projetos I&DT para empresas em colaboração com entidades científicas, projeto número 33815, Centro2020.

Agradeço a toda a minha família por todo o apoio e ajuda, desde sempre. Em especial, quero agradecer aos meus pais por todos os esforços que fizeram para eu conseguir alcançar os meus objetivos. Com um carinho extra, quero demonstrar todo o agradecimento que tenho à minha mãe, por nunca ter deixado de acreditar em mim e por ter sido um dos meus grandes apoios ao longo de toda esta difícil jornada, bem como um exemplo a seguir.

À minha irmã, quero agradecer por toda a paciência que tem comigo e por conseguir sempre transmitir-me um sentimento de orgulho e de um apoio incondicional. Obrigada por seres a minha companheira para a vida.

Durante todo o percurso académico, fiz amigos que tenho a certeza que levarei para a vida, mesmo com os diferentes caminhos que se possam seguir. Agradeço por me terem acompanhado durante estes anos, pela vossa amizade e por todos os momentos que vivemos juntos, ficando estes guardados nas nossas memórias.

Aos meus amigos que se tornaram família (Ricardo e Joana), obrigada por todas as horas que me ouviram e por todos os momentos que passamos juntos. Mesmo à distância, sempre estiveram presentes e só vos tenho a agradecer por isso.

Na vida, por vezes, é preciso ter-se pessoas que proporcionem o equilíbrio que é necessário. Tenho a sorte de ter pessoas ao meu lado que o façam e tenho muito a agradecer por isso e por toda a força que, constantemente, me transmitem como forma de eu acreditar nas minhas capacidades.

Obrigada de coração.

Resumo

A sociedade atual tem se preocupado cada vez mais com a sustentabilidade, principalmente a nível ambiental, o que se tem refletido no aumento da procura de produtos naturais por parte dos consumidores. Aliado a isso, a aplicação de extratos de plantas em produtos consumidos na vida quotidiana da população tem sido um dos grandes focos das diversas indústrias, em todo o mundo.

Dentro dos diversos extratos de plantas, desde há vários séculos, os óleos essenciais encontram-se num lugar de destaque, devido às suas propriedades biológicas extensamente estudadas. Contudo, mais recentemente, os subprodutos do seu processo de destilação, designados por hidrolatos, têm suscitado interesse nas indústrias, por serem misturas diluídas com uma menor complexidade e, por isso, teoricamente, com uma maior tolerância a nível da segurança para o consumidor. No entanto, os estudos por parte da comunidade científica acerca destes últimos extratos ainda são escassos, pelo que se torna necessário promover o aumento do conhecimento relativamente à sua composição e respetivas propriedades biológicas, bem como ao seu nível de segurança.

As plantas, embora tenham inúmeros benefícios para a saúde humana, podem promover toxicidade, o que levou a uma significativa consciencialização quanto à necessidade de se avaliar a sua eficácia e segurança, bem como dos seus extratos, antes da sua possível aplicação em produtos de consumo humano. Nesse sentido, o presente trabalho visa, então, caracterizar quimicamente cinco extratos de plantas, dentro dos quais se encontravam dois tipos de extratos, nomeadamente: o hidrolato de *Hamamelis virginiana*, o hidrolato de *Matricaria chamomilla*, o hidrolato e o óleo essencial de *Ocimum basilicum* e o óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

Para além disso, procedeu-se ao estudo do respetivo potencial genotóxico e citotóxico dos cinco extratos de plantas, com o objetivo de poderem vir a ser incorporados em formulações farmacêuticas e cosméticas, em especial de aplicação tópica.

Assim, no decorrer deste trabalho, realizou-se o teste de Ames, com o intuito de se avaliar o potencial mutagénico. Além disso, avaliou-se a citotoxicidade dos extratos, através do ensaio MTT com uma linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT). Os resultados obtidos neste ensaio bacteriano foram classificados, com base nos três seguintes critérios: relação dose-resposta, rácio de mutagenicidade e aumento fora do histórico de controlo.

Os resultados obtidos permitiram concluir que os três hidrolatos podem ser considerados seguros em baixas concentrações, o que, em conjunto com as suas atividades biológicas continuamente em estudo, lhes confere um lugar de valorização e destaque quanto à potencialidade de serem utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos.

Dentro dos óleos essenciais em estudo, ainda que não tenham apresentado atividade mutagénica nas condições de teste utilizadas, o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, em comparação com o de *Cupressus lusitanica*, demonstrou uma citotoxicidade superior, sendo apenas biocompatível em concentrações baixas.

Este estudo constitui uma avaliação primária da segurança deste extratos, pelo que, futuramente, outros parâmetros toxicológicos devam ser avaliados, para uma determinação completa do perfil de segurança dos extratos de plantas.

Palavras-chave

Citotoxicidade; *Cupressus lusitanica*; Genotoxicidade; *Hamamelis virginiana*; Hidrolato; *Matricaria chamomilla*; *Ocimum basilicum*; Óleo essencial

Abstract

Today's society has been increasingly concerned with sustainability, especially at an environmental level, which has been reflected in the increased demand for natural products by consumers. Allied to this, the application of plant extracts in products consumed in the daily life of the population has been one of the major focuses of various industries around the world.

Within the different plant extracts, essential oils have been in a prominent place for several centuries, due to their extensively studied biological properties. However, more recently, the by-products of its distillation process, known as hydrolates, have attracted interest in industries, as they are diluted mixtures with a lower complexity and, therefore, theoretically, with a greater tolerance in terms of safety for the consumer. However, studies by the scientific community about these last extracts are still scarce, so it is necessary to promote the increase of knowledge regarding their composition and respective biological properties, as well as their level of safety.

Plants, although they have numerous benefits for human health, can promote toxicity, which has led to a significant awareness of the need to evaluate their efficacy and safety, as well as their extracts, before their possible application in human consumer products. In this sense, the present work aims to chemically characterize five plant extracts, within which two types of extracts were found, namely: *Hamamelis virginiana* hydrolate, *Matricaria chamomilla* hydrolate, *Ocimum basilicum* hydrolate and essential oil and *Cupressus lusitanica* essential oil.

In addition, the respective genotoxic and cytotoxic potential of the five plant extracts was studied, with the aim of being able to incorporate them into pharmaceutical and cosmetic formulations, especially for topical application.

In the course of this work, the Ames test was performed in order to assess the mutagenic potential. In addition, the cytotoxicity of the extracts was evaluated through the MTT assay with a human keratinocyte cell line (HaCaT). The results obtained in this bacterial assay were classified based on the following three criteria: dose-response relationship, mutagenicity ratio and increase outside the control history.

The results obtained allowed us to conclude that the three hydrolates can be considered safe in low concentrations, which, together with their biological activities, which are

continuously being studied, gives them a place of appreciation and prominence regarding their potential to be used in pharmaceuticals and cosmetics products.

Among the essential oils under study, although they did not show mutagenic activity under the test conditions used, the essential oil of *Ocimum basilicum*, in comparison with that of *Cupressus lusitanica*, showed superior cytotoxicity, being only biocompatible at low concentrations.

This study constitutes a primary evaluation of the safety of these extracts, therefore, in the future, other toxicological parameters must be evaluated, for a complete determination of the safety profile of the plant extracts.

Keywords

Cytotoxicity; *Cupressus lusitanica*; Essential oil; Genotoxicity; *Hamamelis virginiana*; Hydrolates; *Matricaria chamomilla*; *Ocimum basilicum*

Índice

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1. Extratos de Plantas	1
I. Óleos Essenciais	2
II. Hidrolatos (subproduto do processo de hidrodestilação dos OE)	4
III. Extração de óleos essenciais e hidrolatos	5
1.2. Extratos de plantas como ingredientes de produtos de saúde.....	9
I. Medicamentos	10
II. Cosméticos.....	15
1.3. Segurança dos extratos de plantas.....	19
I. Caracterização fitoquímica dos extratos de plantas	25
II. Teste de Mutação Reversa Bacteriana	26
III. Toxicidade aguda.....	29
1.4. Espécies botânicas em estudo.....	31
I. <i>Hamamelis virginiana</i>	31
i. Taxonomia e Filogenia.....	32
ii. Distribuição geográfica	33
iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva	33
iv. Tipos de extratos.....	34
v. Constituição Química	34
vi. Atividades Biológicas	35
II. <i>Matricaria chamomilla</i>	36
i. Taxonomia e Filogenia.....	37
ii. Distribuição Geográfica	39
iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva	39
iv. Tipos de extratos.....	40
v. Constituição Química	40
vi. Atividades Biológicas	41
III. <i>Ocimum basilicum L.</i>	42
i. Taxonomia e Filogenia.....	43
ii. Distribuição Geográfica	44
iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva	44
iv. Tipos de extratos.....	45
v. Constituição Química	46
vi. Atividades Biológicas	47

IV. <i>Cupressus lusitanica</i>	48
i. Taxonomia e Filogenia.....	48
ii. Distribuição geográfica	49
iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva	49
iv. Tipos de extratos.....	50
v. Constituição Química	51
vi. Atividades Biológicas	51
1.5. Objetivo Geral	53
2. COMPONENTE EXPERIMENTAL.....	54
2.1. Extratos em estudo	54
2.2. Caracterização Fitoquímica	54
I. Objetivo	54
II. Materiais e Métodos	54
III. Resultados e Discussão	55
2.3. Teste de Mutação Reversa Bacteriana	58
I. Objetivo	58
II. Materiais e Métodos	58
i. Consumíveis e Equipamentos	58
ii. Reagentes	59
iii. Condições de Assepsia	61
iv. Preparação de Soluções	61
v. Estirpes Bacterianas	65
a. Armazenamento e manutenção das estirpes.....	66
b. Curvas de crescimento microbiano das estirpes	67
c. Confirmação do genótipo das estirpes bacterianas	69
d. Descongelamento das estirpes	70
e. Execução dos ensaios.....	71
1.1. Ensaio de verificação da toxicidade dos controlos	73
1.2. Ensaio de verificação da toxicidade dos extratos de plantas	76
1.3. Método por pré-incubação, sem ativação metabólica	79
III. Esquema representativo da metodologia realizada.....	80
1. Crescimento do inóculo bacteriano	80
2. Confirmação do genótipo das estirpes bacterianas	81
3. Preparação das concentrações dos extratos	82
4. Estudo da toxicidade dos extratos de plantas	84
5. Método por pré-incubação, sem ativação metabólica	85

IV.	Tratamento de resultados	86
V.	Resultados e Discussão	88
2.4.	Citotoxicidade dos extratos.....	115
I.	Objetivo	115
II.	Materiais e Métodos	115
i.	Linha celular	115
a.	Cultura de células	116
b.	Congelamento e descongelamento de células	116
ii.	Consumíveis e Equipamentos	117
iii.	Reagentes	118
iv.	Condições de assepsia.....	119
v.	Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i>: Ensaio MTT.....	120
1.	Tratamento e contagem de células para preparação da placa	66
2.	Preparação e adição dos estímulos às células	121
3.	Realização do ensaio MTT	123
III.	Esquema representativo da metodologia realizada.....	124
1.	Tratamento e contagem de células para preparação das placas	124
2.	Preparação e adição dos estímulos às células	125
3.	Realização do ensaio MTT	127
IV.	Tratamento de resultados	129
V.	Resultados e Discussão	131
3.	DISCUSSÃO GERAL	15239
4.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	16450
5.	BIBLIOGRAFIA.....	152
6.	ANEXOS	164

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo do processo de hidrodestilação do OE e o respetivo subproduto (hidrolato)	7
Figura 2 - Esquema representativo do processo de destilação a vapor do OE e o respetivo subproduto (hidrolato)	8
Figura 3 - Procedimento de autorização dos medicamentos à base de plantas, para comercialização no mercado	14
Figura 4 - Reação de redução do composto MTT em formazano	30
Figura 5 - Fotografia da espécie botânica <i>Hamamelis virginiana</i>	32
Figura 6 - Fotografia da espécie botânica <i>Matricaria chamomilla</i>	37
Figura 7 - Fotografia da espécie botânica <i>Ocimum basilicum</i>	43
Figura 8 - Fotografia da espécie botânica <i>Cupressus lusitanica</i>	48
Figura 9 – Esquema representativo do passo de crescimento do inóculo bacteriano, a partir de uma única colónia	80
Figura 10 - Esquema representativo do passo de confirmação do genótipo das estirpes bacterianas, a partir do inóculo bacteriano obtido	81
Figura 11 – Esquema representativo da preparação das concentrações de teste dos extratos, em específico dos hidrolatos	82
Figura 12 – Esquema representativo da preparação das concentrações de teste dos extratos, em específico dos OE	83
Figura 13 – Esquema representativo do estudo de toxicidade das concentrações de teste dos extratos de plantas, tanto dos hidrolatos como dos OE	84
Figura 14 – Esquema representativo do método por pré-incubação, sem ativação metabólica, para ambos os extratos de plantas	85
Figura 15 - Curva de crescimento da estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA98, por um período de 15 horas, equivalente a 900 minutos	89
Figura 16 - Curva de crescimento da estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA100, por um período de 15 horas, equivalente a 900 minutos	90
Figura 17 – Fotografias representativas das placas obtidas no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA98	94
Figura 18 - Fotografias representativas das placas obtidas no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA100	94
Figura 19 – Gráficos dos números de colónias revertentes obtidos para os controlos positivos com especificidade estirpes bacterianas de <i>S. typhimurium</i>	96

Figura 20 – Gráficos dos números de colónias revertentes espontâneas obtidas pelo DMSO, para ambas as estirpes bacterianas de <i>S. typhimurium</i>	96
Figura 21 – Fotografias representativas das placas do teste de mutação reversa bacteriana, onde as culturas bacterianas foram expostas com o respetivo controlo positivo na concentração de teste adotada (5 µg/placa)	97
Figura 22 – Fotografias representativas das placas do teste de mutação reversa bacteriana, onde as culturas bacterianas foram expostas com o controlo de solvente dos OE (DMSO) na concentração de teste adotada (5 µL/placa)	97
Figura 23 - Gráfico de controlo, num conjunto de 13 ensaios realizados ao longo do estudo com os dois tipos de extratos de plantas, para o controlo negativo (tampão fosfato de sódio) na estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA98	98
Figura 24 - Gráfico de controlo, num conjunto de 15 ensaios realizados ao longo do estudo com os dois tipos de extratos de plantas, para o controlo negativo (tampão fosfato de sódio) na estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA100	99
Figura 25 - Gráfico de controlo, num conjunto de 9 ensaios realizados ao longo do estudo com os hidrolatos, para o respetivo controlo de solvente (água) na estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA98	99
Figura 26 - Gráfico de controlo, num conjunto de 8 ensaios realizados ao longo do estudo com os hidrolatos, para o respetivo controlo de solvente (água) na estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA100	100
Figura 27 - Gráfico de controlo, num conjunto de 8 ensaios realizados ao longo do estudo com os OE, para o respetivo controlo de solvente (DMSO) na estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA98	100
Figura 28 - Gráfico de controlo, num conjunto de 9 ensaios realizados ao longo do estudo com os OE, para o respetivo controlo de solvente (DMSO) na estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA100	101
Figura 29 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de <i>Hamamelis virginiana</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98	104
Figura 30 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de <i>Hamamelis virginiana</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100	104
Figura 31 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de <i>Matricaria chamomilla</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98	106
Figura 32 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de <i>Matricaria chamomilla</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100	106
Figura 33 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de <i>Ocimum basilicum</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98	108

Figura 34 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de <i>Ocimum basilicum</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100	108
Figura 35 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de <i>Cupressus lusitanica</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98	111
Figura 36 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de <i>Cupressus lusitanica</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100	111
Figura 37 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de <i>Ocimum basilicum</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98	113
Figura 38 - Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de <i>Ocimum basilicum</i> na estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100	113
Figura 39 – Esquema representativo de uma das etapas principais do ensaio de MTT, nomeadamente o tratamento e a contagem de células para a subsequente preparação das placas para o cultivo	124
Figura 40 – Esquema representativo da preparação e adição dos estímulos às células, tanto dos hidrolatos como dos OE	125
Figura 41 - Esquema representativo da etapa correspondente à realização do ensaio de MTT, após a exposição das células aos extratos de plantas e respetivos controlos	127
Figura 42 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT, no caso dos hidrolatos	128
Figura 43 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT, no caso dos OE	128
Figura 44 - Efeito citotóxico do hidrolato de <i>Hamamelis virginiana</i> para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato	133
Figura 45 - Efeito citotóxico do hidrolato de <i>Matricaria chamomilla</i> para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato	134
Figura 46 - Efeito citotóxico do hidrolato de <i>Ocimum basilicum</i> para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato	134
Figura 47 - Efeito citotóxico do Dimetilsulfóxido (DMSO) para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste composto	136
Figura 48 - Efeito citotóxico do OE de <i>Cupressus lusitanica</i> para a linha celular HaCaT após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato	137
Figura 49 - Efeito citotóxico do OE de <i>Ocimum basilicum</i> para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato	138

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de mutação existentes nas estirpes bacterianas utilizadas no ensaio, de acordo com a literatura	28
Tabela 2 - Organização taxonómica da planta <i>Hamamelis virginiana</i>	33
Tabela 3 - Tabela representativa de algumas propriedades biológicas da espécie <i>Hamamelis virginiana</i>	36
Tabela 4 - Organização taxonómica da planta <i>Matricaria chamomilla</i>	38
Tabela 5 - Tabela representativa de algumas propriedades biológicas da espécie <i>Matricaria chamomilla</i>	41
Tabela 6 - Organização taxonómica da planta <i>Ocimum basilicum</i>	44
Tabela 7 - Tabela representativa de algumas propriedades biológicas da espécie <i>Ocimum basilicum</i>	47
Tabela 8 - Organização taxonómica da planta <i>Cupressus lusitanica</i>	49
Tabela 9 - Tabela representativa de possíveis propriedades biológicas da espécie <i>Cupressus lusitanica</i>	52
Tabela 10 - Compostos maioritários presentes em cada um dos extratos de plantas em estudo	55
Tabela 11 - Compostos mutagénicos padrão utilizados como controlos positivos no ensaio sem ativação metabólica, a partir de uma solução <i>stock</i> com uma concentração de 1 mg/mL	72
Tabela 12 - Intervalos dos números de revertentes espontâneos característicos de cada estirpe bacteriana, no ensaio sem ativação metabólica	73
Tabela 13 - Valores de DO _{600 nm} e do número de UFC/mL para a estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA98, ao longo da respetiva curva de crescimento	89
Tabela 14 - Valores de DO _{600 nm} e do número de UFC/mL para a estirpe bacteriana de <i>S. typhimurium</i> TA100, ao longo da respetiva curva de crescimento	90
Tabela 15 - Resumo dos resultados esperados e dos respetivos resultados obtidos para cada característica fenotípica em estudo, no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98	93
Tabela 16 - Resumo dos resultados esperados e dos respetivos resultados obtidos para cada característica fenotípica em estudo, no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100	93

Tabela 17 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98 nas diferentes condições de teste do hidrolato de <i>Hamamelis virginiana</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	103
Tabela 18 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100 nas diferentes condições de teste do hidrolato de <i>Hamamelis virginiana</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	103
Tabela 19 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98 nas diferentes condições de teste do hidrolato de <i>Matricaria chamomilla</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	105
Tabela 20 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100 nas diferentes condições de teste do hidrolato de <i>Matricaria chamomilla</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	105
Tabela 21 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98 nas diferentes condições de teste do hidrolato de <i>Ocimum basilicum</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	107
Tabela 22 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100 nas diferentes condições de teste do hidrolato de <i>Ocimum basilicum</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	107
Tabela 23 - Combinação dos três critérios para classificação dos resultados, relativamente aos hidrolatos: relação dose-resposta, rácio de mutagenicidade (R.M.) e aumento fora do histórico de controlo (>HC)	109
Tabela 24 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98 nas diferentes condições de teste do OE de <i>Cupressus lusitanica</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	110
Tabela 25 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100 nas diferentes condições de teste do OE de <i>Cupressus lusitanica</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	110

Tabela 26 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA98 nas diferentes condições de teste do OE de <i>Ocimum basilicum</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	112
Tabela 27 - Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de <i>S. typhimurium</i> TA100 nas diferentes condições de teste do OE de <i>Ocimum basilicum</i> e, conseqüentemente, os respetivos valores de média ± desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.)	112
Tabela 28 - Combinação dos três critérios para classificação dos resultados, relativamente aos OE: relação dose-resposta, rácio de mutagenicidade (R.M.) e aumento fora do histórico de controlo (>HC)	114
Tabela 29 - Resumo das concentrações utilizadas na avaliação de citotoxicidade dos diferentes extratos	123
Tabela 30 - Valores de IC ₅₀ (µL/mL) para a linha celular HaCaT, na presença dos hidrolatos em estudo	135
Tabela 31 - Valores de IC ₅₀ (µL/mL) para a linha celular HaCaT, na presença dos OE em estudo	138

Folha em branco

Lista de Acrónimos

AIM	Autorização de introdução no mercado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BPL	Boas práticas de laboratório
CBP-BI	Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
CCM	<i>Czech Collection of Microorganisms</i>
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DTC	Documento Técnico Comum
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMA	Agência Europeia do Medicamento (do inglês, <i>European Medicines Agency</i>)
EU	União Europeia (do inglês, <i>European Union</i>)
FBS	Soro Fetal Bovino (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIP	Ficheiro de Informação de Produto
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (do inglês, <i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GM	<i>Glucose Minimal</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (do inglês, <i>Generally Recognized As Safe</i>)
HMPC	Comité de Medicamentos à Base de Plantas (do inglês, <i>Committee on Herbal Medicinal Products</i>)
H-HV	Hidrolato de <i>Hamamelis virginiana</i>
H-MC	Hidrolato de <i>Matricaria chamomilla</i>
H-OB	Hidrolato de <i>Ocimum basilicum</i>
IC	Índice de citotoxicidade

ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFRA	<i>International Fragrance Association</i>
IPP	Pirofosfato de isopentenilo (do inglês, <i>Isopentenyl pyrophosphate</i>)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LPS	Lipopolissacáridos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NA DEV	<i>Nutrient Agar DEV</i>
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico
OE	Óleo essencial
OE-CL	Óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i>
OE-OB	Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Plantas aromáticas e medicinais
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa (do inglês, <i>Relative Centrifugal Force</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
R.M.	Rácio de Mutagenicidade
rpm	Rotações por minuto
RPS	Relatórios periódicos de segurança
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
UFC	Unidades formadoras de colónias
UV	Ultravioleta

1. Introdução Teórica

1.1. Extratos de Plantas

A partir das plantas, conseguem-se obter diversas preparações à base de plantas, as quais, segundo a Diretiva 2004/24/CE de 31 de Março de 2004, são descritas como “preparações obtidas submetendo as substâncias derivadas de plantas a tratamentos, como extração, destilação, expressão, fracionamento, purificação, concentração ou fermentação. São disso exemplo as substâncias derivadas de plantas pulverizadas ou em pó, as tinturas, os extratos, os óleos essenciais, os sucos espremidos e os exsudados transformados” (1,2). Deste modo, segundo a Farmacopeia Europeia, existem diferentes tipos de preparações, de acordo com o seu estado físico, as quais são frequentemente utilizadas, mesmo de forma direta, em diversas formulações, devido a serem, de um modo geral, consideradas ativas na sua totalidade de compostos (3). As substâncias derivadas de plantas, mencionadas nessa mesma diretiva, encontram-se reportadas como “quaisquer plantas inteiras, fragmentadas ou cortadas, partes de plantas, algas, fungos e líquenes não transformados, geralmente secos mas, por vezes, frescos. São igualmente considerados substâncias derivadas de plantas, alguns exsudados não sujeitos a tratamento específico. Estas substâncias são definidas de forma exata através da parte da planta utilizada e da taxonomia botânica, de acordo com o sistema binomial (género, espécie, variedade e autor)” (1,2).

Os diferentes tipos de extratos de plantas contêm numerosos compostos bioativos e, conseqüentemente, uma vasta gama de atividades biológicas (4). Quanto aos métodos tradicionais para a extração de materiais vegetais, estes podem incluir os seguintes: hidrodestilação, destilação a vapor e extração por solvente orgânico (5). A otimização dos fatores básicos de extração (como tipo de solvente, temperatura e a respetiva técnica) tem sido fundamental para a obtenção de extratos com maior teor de metabolitos (6). Antes disso, é de salientar que o carácter aromático e morfológico das plantas, nomeadamente dos seus extratos, é significativamente influenciado pelas condições ambientais e técnicas agronómicas a que são sujeitas (7). Nesse sentido, o processo de extração e subsequente preparação dos extratos de plantas tem um impacto extremamente importante na qualidade de uma preparação à base de plantas, a qual, por sua vez, é primordial para a sua possível aplicação em produtos consumidos pela população humana (3).

I. Óleos Essenciais

A população humana tem conhecimento dos óleos essenciais (OE) há vários séculos, principalmente devido ao seu carácter odorífero. Nos dias de hoje, estes extratos continuam a ser, sistematicamente, estudados, tendo-se como principal foco o seu elevado potencial em diversas indústrias (como farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentar) (8,9). Esta diversidade de áreas de aplicação advém do facto de o mercado europeu ser um dos maiores, a nível global, no âmbito dos OE, onde, até à data, são conhecidos aproximadamente 30 000 OE (9,10). Os extratos em questão resultam do metabolismo secundário das plantas, sendo misturas tipicamente voláteis, hidrofóbicas, odoríferas, complexas e multicomponentes. Por isto, encontram-se no estado líquido à temperatura ambiente e apresentam solubilidade em solventes orgânicos, devendo-se isso também à sua menor densidade, comparativamente com a água (7,11-16). Os OE são constituídos por substâncias químicas, principalmente de baixo peso molecular, que, combinadas com a sua lipofilicidade, resultam numa elevada eficiência quanto à sua capacidade de atravessar as membranas (12).

A definição de OE mais desenvolvida, em termos de aplicação à saúde da população, adveio da área farmacêutica, sendo que ainda não existe uma definição relacionada com os cosméticos. Neste sentido, embora com algumas diferenças, a *International Organization for Standardization* (ISO) e a Farmacopeia Europeia (7ª edição) têm vindo a definir OE como um produto odorífero, obtido a partir de uma matéria-prima natural de origem vegetal, normalmente extraído por vapor de água, destilação a seco ou processos mecânicos adequados. Em geral, este extrato é separado da fase aquosa, através de processos físicos que não afetem significativamente a sua composição química, amplamente conhecida pela sua complexidade (9,12,16).

No material vegetal, estes extratos podem ser encontrados em todos os tipos de órgãos, mas, normalmente, o seu processo de biossíntese e acumulação está geralmente associado à presença de estruturas histológicas especializadas (como células ou canais secretores, ductos resinosos, células epidérmicas ou tricomas glandulares), as quais estão comumente localizadas na superfície da planta ou nas suas proximidades (12,15). Estes extratos existem quase exclusivamente em plantas superiores, estando, por isso, distribuídos num número limitado de famílias, entre as quais se encontram a Asteraceae, Cupressaceae e Lamiaceae. Dependendo da localização dos OE na planta, a composição qualitativa e quantitativa de certas espécies pode variar (12).

A maioria dos OE contém cerca de 20 a 60 componentes em concentrações diferentes, embora possam conter até aproximadamente 100 componentes (10,17,18). A sua constituição apresenta as frações volátil e não volátil, de onde se destaca a primeira fração mencionada que consiste principalmente em moléculas lipofílicas, pequenas e não polares, nas quais estão incluídos os terpenos em quantidades maioritárias (80%), mas também os seus derivados oxigenados (terpenóides) e compostos aromáticos e alifáticos (19). Apresentam diversas propriedades biológicas, resultantes do sinergismo dos efeitos de todos os componentes, ou apenas dos dominantes, presentes nos OE (15,20,21). Desse modo, os principais componentes destes extratos são, normalmente, aqueles dos quais dependem as suas propriedades químicas, biofísicas e biológicas, devido a pertencerem a diversas classes com origens biossintéticas diferentes (13,15,16,20-22). Consoante a espécie, a proporção de OE na matéria-prima vegetal pode ser extremamente variável, entre 0,02% e 20% (9,11,12,16,23). No entanto, entre as espécies botânicas distribuídas mundialmente, apenas 10% contêm OE, sendo, em geral, designadas por “plantas aromáticas” (19).

Desde há muito tempo, os OE são utilizados em fragâncias e na medicina tradicional, tendo como principais finalidades: melhorar a saúde e a aparência física, proteger o corpo contra danos causados pelo meio ambiente. Contudo, a importância destes aumentou nos últimos anos, devido à sua disponibilidade e às suas propriedades biológicas, o que levou a serem utilizados como alternativas aos produtos químicos sintéticos, com o intuito de reduzir custos, proteger o equilíbrio ecológico e, principalmente, minimizar os efeitos colaterais no organismo humano (7,15,24).

Nos dias de hoje, os OE continuam presentes na vida quotidiana da população humana, ao serem amplamente incorporados em diversas categorias de produtos cosméticos e perfumes, tal como na aromaterapia, tendo o seu odor agradável como principal causa. Para além disso, devido à vasta gama de propriedades biológicas que apresentam, os OE são ainda comumente utilizados em múltiplos tipos de formulações farmacêuticas, tal como na indústria alimentar. Ainda assim, mesmo com o crescente interesse pelos OE, essas indústrias continuam a apostar na investigação dos seus modos de ação biológica e na sua possível aplicação nos processos de formulação de produtos à base destes extratos, com mais eficiência, segurança e qualidade (9,11,15,19). Contudo, é de salientar que existem algumas limitações quanto a estes extratos, tais como: natureza lipofílica, propensão para a degradação e oxidação e a sua alta volatilidade, sendo estas últimas limitações responsáveis pelo período de vida útil curto dos OE (15,16,24).

II. Hidrolatos (subproduto do processo de hidrodestilação dos OE)

No início do século XX, a perda de certas quantidades dos constituintes de OE na fase aquosa, durante a destilação das plantas, foi reconhecida. Posto isto, a partir desse reconhecimento, começou-se a estudar os possíveis benefícios dessa água, posteriormente denominada por hidrolato. O termo “hidrolato” deriva das duas seguintes palavras de origem: *hydro* (água) e *lactes* (leite) (25). Os hidrolatos, também designados por hidrossóis ou águas florais, são definidos, segundo as Farmacopeias Europeias, como “produtos obtidos pelo processo de destilação de diferentes partes das plantas, os quais sofrem separação do OE no final do processo de extração” (13,23). Assim, são os extratos aquosos que permanecem, após a destilação e subsequente separação do OE, sempre que possível. Em plantas com um baixo conteúdo de OE, o hidrolato normalmente é o único produto de extração com valor, resultante do respetivo processo de destilação (26).

Os hidrolatos normalmente apresentam um pH ácido a neutro, com valores entre 3 e 7, o que faz com que possam ser utilizados em produtos para rotinas diárias de cuidados da pele (por exemplo, como tónico). Contrariamente ao OE, o hidrolato é caracterizado como uma solução hidrofílica, contendo os compostos terpénicos presentes no OE correspondente, num teor máximo de aproximadamente 1 g/L, devido a esta classe de compostos apresentar uma significativa hidrofobicidade. Contudo, os componentes maioritários do OE podem não corresponder aos que estão presentes no hidrolato (4). Nesse sentido, estes extratos consistem na água condensada do processo de destilação que, normalmente, apresenta uma pequena quantidade dos constituintes hidrofílicos do OE (como os compostos oxigenados e polares), juntamente com outros metabolitos secundários das plantas, os quais proporcionam propriedades organolépticas específicas, muitas vezes menos intensas, tal como atividades biológicas. Embora os hidrolatos sejam biologicamente menos ativos do que os OE, as suas potenciais atividades biológicas tornam-os potenciais candidatos, promissores e valiosos, para serem utilizados como matéria-prima em diversas indústrias (4,23). Além disso, os hidrolatos têm ainda outras vantagens, entre as quais se encontra a facilidade de obtenção, o baixo custo de produção e, normalmente, a menor toxicidade, em comparação com os OE (25).

A qualidade dos hidrolatos, quando produzidos, deve ser determinada com base na quantidade dos seus componentes voláteis e hidrofílicos, os quais são principalmente: álcoois monoterpénicos e sesquiterpénicos, aldeídos e cetonas. Estes extratos, obtidos no início e no final do processo de destilação, normalmente diferem na intensidade do odor e na composição química (25). Para além disso, o conhecimento do quimiotipo do

material vegetal utilizado para a extração dos diversos extratos, tanto o OE como o hidrolato, é fundamental para permitir o estudo preciso dos mecanismos das suas atividades biológicas e, conseqüentemente, direcionar a sua utilização para uma aplicação específica (23,25).

Na medicina popular, os hidrolatos têm sido principalmente aplicados como bebidas para fins medicinais, no tratamento de diversas doenças. Nos últimos anos, as suas potenciais aplicações têm sido cada vez mais estudadas e a sua popularidade está em constante crescimento, tendo já sido relatado a sua utilização nas indústrias alimentar, farmacêutica, cosmética e perfumaria, tal como na aromaterapia (23).

Em específico, na indústria cosmética, os hidrolatos, como soluções aquosas, são amplamente utilizados em formulações para aplicação tópica, como *sprays* faciais e corporais, em muitas das quais têm o objetivo de proporcionar uma sensação de frescor. Além disso, esses tipos de formulações podem também incluir produtos para prevenir o odor corporal, principalmente devido às suas propriedades antimicrobianas, e produtos para o tratamento de diversas condições dérmicas. Para além das possíveis atividades biológicas dos hidrolatos, estes extratos estão a ser cada vez mais utilizados como fase aquosa na produção de diversos produtos cosméticos (loções, cremes e sabonetes), ou como tónico e aromatizante (23).

III. Extração de óleos essenciais e hidrolatos

Geralmente, recorre-se a um método físico para a extração e subsequente separação do OE da fase aquosa. Contudo, o método escolhido não deve influenciar, negativamente, a composição química do extrato. O principal aspeto, para garantir a qualidade dos extratos, é o método de extração utilizado, uma vez que procedimentos inadequados podem causar a degradação e alterar as ações dos compostos fitoquímicos presentes (16). Por isto, a escolha do tipo de extração está relacionada com a aplicação pretendida dos OE e, subsequentemente, dos hidrolatos, devendo-se ter sempre em conta o facto de ser necessário a demonstração prévia de que a técnica não altera os constituintes da planta, tal como não deixa resíduos nocivos (12,15). O método de extração determina certas características dos OE, tal como: viscosidade, cor, solubilidade e volatilidade, o que pode causar enriquecimento ou, como desvantagem, esgotamento de alguns componentes, visto que estas características estão, normalmente, relacionadas com as classes de mono- e sesquiterpenos (9,12,15). Para além disso, após o processo de extração, é necessário a realização de uma extensa análise físico-química, onde ainda se encontra incluída a avaliação das suas propriedades organolépticas (9).

Já há várias décadas, várias técnicas de extração são aplicadas para o processo de extração, contudo, os OE são principalmente extraídos por técnicas convencionais, as quais se baseiam na destilação da água pelo processo de aquecimento, como: método de hidrodestilação ou destilação a vapor, a partir de algumas partes (como cascas, folhas, flores), ou da totalidade das plantas aromáticas (13,16). Destes, o primeiro mencionado é normalmente considerado como o método oficial padrão para a extração, a nível laboratorial, dos OE (27). Nesses processos de extração e isolamento, podem também ser subproduzidos os hidrolatos (23).

Para a produção do hidrolato, normalmente pode-se utilizar material vegetal que não atenda às necessidades do consumidor (5-20% do produto), como, por exemplo, quando a planta apresenta altura inadequada ou falta de rigidez. Desta forma, pode-se reduzir a quantidade de material vegetal desperdiçado, mas também obter-se um efeito económico positivo para cada ciclo de produção do extrato (28).

O processo de hidrodestilação (figura 1) é o método de extração de OE mais antigo e simples, descoberto por Avicena, sendo este conhecido por ter sido a primeira pessoa a desenvolver o processo de extração recorrendo ao alambique. A hidrodestilação é considerada como um método único para extração do material vegetal, principalmente aquele que seja natural e hidrofóbico com um alto ponto de ebulição. Como os OE encontram-se envolvidos pela fase aquosa na planta, este método tem a capacidade de protegê-los em certo grau, sem que estes sofram superaquecimento. Para além disso, este método é adequado para a extração, a partir das flores, devido a evitar a compactação e aglomeração do material vegetal. O procedimento de hidrodestilação envolve a imersão direta do material vegetal na água, no interior do alambique, seguida pela ebulição de toda a mistura (16,19). Esta técnica é frequentemente realizada no aparelho de Clevenger. Contudo, os OE obtidos devem ainda ser sujeitos ao processo de secagem para remoção da mistura aquosa (10). Desse modo, após o processo da condensação da fase aquosa, simultaneamente com o OE, os componentes liquefeitos são separados em duas fases no interior do frasco coletor, nomeadamente: o OE e o hidrolato (23).

A principal vantagem da hidrodestilação é a capacidade de isolamento dos diversos extratos, a uma temperatura abaixo de 100°C. Além disso, outra vantagem recai pelo facto de a água ser imiscível com a maioria das moléculas terpénicas dos OE, o que permite que estes extratos, após o processo de condensação, possam ser facilmente separados da fase aquosa. Este método, através do sistema Clevenger, encontra-se recomendado na Farmacopeia Europeia, para determinação dos rendimentos de OE. Porém, apresenta certas desvantagens, como: longo tempo de extração e alterações

químicas, ou artefactos, das moléculas terpénicas por exposição prolongada com água em ebulição (como hidrólise) (16,19).

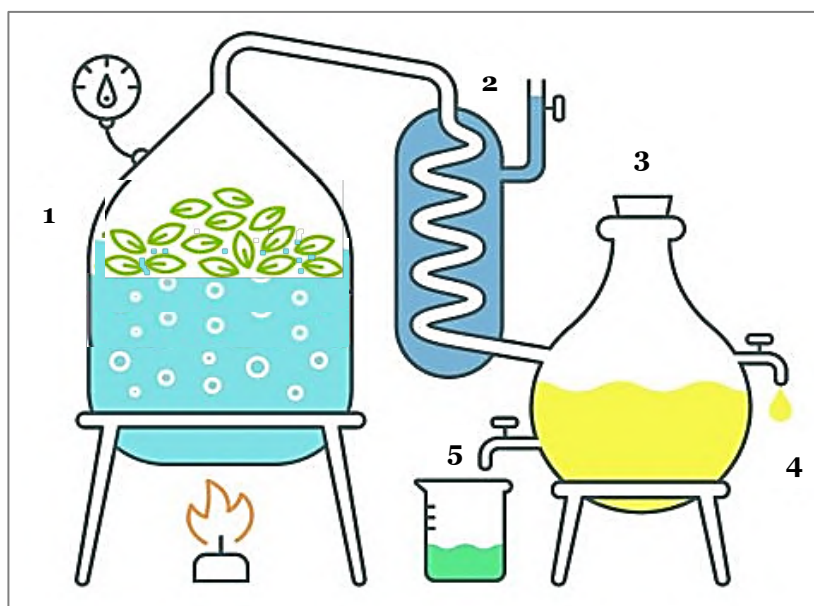


Figura 1 – Esquema representativo do processo de hidrodestilação do OE e o respetivo subproduto (hidrolato). Os números apresentados representam os seguintes elementos: (1) alambique, (2) condensador, (3) separador de fases, (4) OE e (5) hidrolato

Quanto ao método de destilação a vapor (figura 2), é outra técnica amplamente utilizada para a extração dos OE e o respetivo subproduto. O início do processo deste método envolve o aquecimento do material vegetal, através da passagem de vapor num aparelho adequado. Este estado gasoso pode ser proveniente de uma fonte externa ou produzido por água em ebulição, situada abaixo da matéria-prima. Após o processo de condensação, ocorre o processo de separação da fase aquosa e o OE, por decantação. Deste modo, o calor é o principal fator determinante da eficácia com que as estruturas do material vegetal sofrem decomposição, rompimento e libertação dos OE. Uma das principais vantagens deste método está relacionada com o facto de apenas o vapor passar pelas plantas, conseguindo evitar que a água em ebulição se misture com o material vegetal, minimizando os possíveis artefactos que possam advir de hidrodestilação. Assim, o processo de destilação a vapor requer menos vapor e, conseqüentemente, uma menor quantidade de água no destilado é necessária (12,16,19).

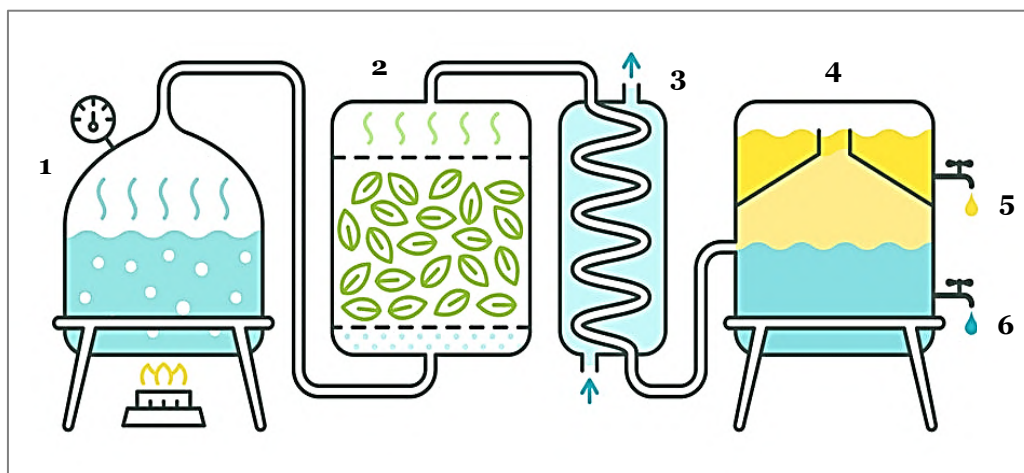


Figura 2 - Esquema representativo do processo de destilação a vapor do OE e o respetivo subproduto (hidrolato). Os números apresentados representam os seguintes elementos: (1) água em ebulição, (2) material vegetal, (3) condensador, (4) separador de fases, (5) OE e (6) hidrolato

Para além destas técnicas, também já foram desenvolvidas as seguintes para obtenção de diferentes extratos: expressão, hidrodifusão, destilação a seco e extração de solvente (12,23,25). A hidrodifusão é normalmente realizada a baixas pressões, ou mesmo em vácuo, onde o vapor é fornecido ao recipiente que contém o material vegetal. Contudo, como limitação, este método só é aplicado em material vegetal na forma seca, o qual pode ser danificado pela temperatura de ebulição. Por outro lado, quanto ao processo de extração de solvente, geralmente, o material vegetal é misturado com os solventes, recorrendo a um aquecimento moderado, seguido pela filtração e evaporação dos solventes. Neste método, os solventes comuns (como acetona, hexano, metanol ou etanol) foram implementados para extraírem os materiais vegetais termolábeis, nomeadamente as estruturas florais, os quais não podem ser sujeitos a processos de extração com aquecimento. Tendo isso em conta, a extração com solventes lipofílicos é favorecido para a possível aplicação dos OE na área industrial de perfumes. No entanto, comparativamente com os outros métodos de extração, apresenta algumas desvantagens, nas quais se inclui: período de tempo longo, elevada quantidade de solvente e custos economicamente aumentados (16).

Como mencionado, os métodos com maior conhecimento e utilização pela comunidade, tanto científica como industrial, apresentam certas desvantagens que podem promover alterações químicas nos extratos (nomeadamente decomposição térmica de componentes termolábeis). Estas limitações, por sua vez, proporcionaram o desenvolvimento de novas técnicas verdes (extração de fluido supercrítico, técnicas assistidas por microondas e ultrassom) (27).

1.2. Extratos de plantas como ingredientes de produtos de saúde

Existem diversos tipos de plantas, onde as designadas por medicinais são principalmente consideradas como as que são utilizadas na medicina oficial e tradicional, enquanto a utilização das plantas aromáticas deve-se ao seu aroma e sabor (29). O termo “planta medicinal” pode ter a seguinte definição: “toda e qualquer fonte vegetal que possui, num ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos, ou como precursores de fármacos semissintéticos” (30). Assim, este termo descreve uma variedade de plantas que possuem uma ampla gama de propriedades medicinais (29). Atualmente, existem 400 000 espécies de plantas, conhecidas como aromáticas e medicinais (PAM), das quais cerca de 2000 espécies pertencem a famílias de plantas com OE (17). Tendo isso em conta, o termo “fitoterapia” resultou da junção das palavras gregas *phython* (planta) e *therapeia* (terapia), sendo esta área responsável por estudar as plantas e as suas aplicações no tratamento de patologias (30).

As plantas, tal como antigamente, têm suscitado interesse, devido à sua diversidade de compostos bioativos e propriedades farmacológicas (4,29,31,32). Desse modo, a utilização destas, para fins medicinais, antecede a história e constitui a origem da medicina moderna (29). Na idade antiga, as civilizações aperceberam-se da existência de plantas medicinais, as quais, embora empiricamente, possuíam significativos efeitos no organismo, desde efeitos tóxicos até potenciais curativos. Esses efeitos na saúde humana foram documentados, há milhares de anos, tendo sido os primeiros compostos farmacológicos utilizados na formulação de diversas preparações medicinais, desde tempos imemoriais. Existe uma dificuldade significativa em afirmar-se quanto à data e ao local em que as plantas foram utilizadas, pela primeira vez. A descoberta das propriedades benéficas, ou até mesmo nocivas, das espécies botânicas ocorreu através do conhecimento empírico das civilizações antigas (33). Contudo, principalmente desde há pelo menos 5000 anos, as plantas têm sido parte integrante das formas tradicionais e não tradicionais de medicina, sendo que o reino vegetal apresenta a mais rica fonte de tratamento para diversas doenças humanas (34). Desse modo, diferentes partes das plantas (folhas, flores, frutos, raízes, caules ou cascas) têm sido utilizadas para os mais variados fins, onde podem ser incluídas na forma de extratos ou misturas (4).

As PAM constituem grande parte da flora natural e são consideradas como um importante recurso em diversas indústrias (farmacêutica, alimentar, perfumaria, cosmética). Por isso, recentemente, o consumismo verde, a sustentabilidade e o ressurgimento do uso de produtos naturais têm impulsionado um crescente interesse das

indústrias em substituir os produtos químicos de origem sintética por compostos de ocorrência natural, principalmente produtos à base de plantas (17,20,21). Estes tipos de produtos estão entre os candidatos mais promissores, devido a serem comumente conhecidos por apresentarem várias características, entre as quais se encontram, por exemplo: boa aceitação pela população, facilidade de obtenção, elevada diversidade dos compostos químicos e amplo espectro dos respectivos potenciais terapêuticos. Contudo, dentro dessas, ainda existem outras características que são empiricamente consideradas, nomeadamente: isenção de efeitos colaterais, baixa toxicidade, boa aceitação pela população, facilidade de obtenção, reduzido impacto ambiental, elevada diversidade dos compostos químicos e amplo espectro dos respectivos potenciais terapêuticos (5,13,32,35,36). Diante disso, a utilização dos extratos de plantas em diversas formulações visa atender à procura dos consumidores modernos por produtos naturais, verdes, seguros e de alta qualidade. Paralelamente ao atual conhecimento, também tem ocorrido um aumento quanto à pesquisa e ao estudo de extratos de plantas, para serem posteriormente utilizados em diversos tipos de produtos (29). Além disso, esta tendência de crescimento tem sido acompanhada pela contínua publicação de artigos científicos acerca do tema (32).

I. Medicamentos

A utilização das substâncias derivadas de plantas (incluindo extratos), como fonte medicinal, encontra-se comprovada por vários registos da antiguidade, entre os quais se destaca o Papiro de Ebers (1550 a.C.) (31,33). O conhecimento popular, transmitido essencialmente entre gerações, permitiu a correlação das substâncias naturais com o tratamento de certas enfermidades, dando origem aos primeiros fármacos, referidos na gíria como drogas. Daí em diante, ao longo de vários séculos, as pessoas foram compreendendo o valor terapêutico dos produtos naturais, com base em tentativa e erro. Tendo isso em conta, Dioscórides (50-70 d.C.) descreveu mais de 600 plantas medicinais, na sua obra *De materia medica* (31,37).

Na idade moderna (século XVI), Paracelso procurava novos medicamentos, tendo os produtos naturais como origem, dando a entender que a medicina se fundamentava na natureza. No século seguinte, o princípio da farmacologia foi particularmente dependente do isolamento de compostos, a partir de fontes naturais, e do subsequente desenvolvimento de métodos experimentais para o estudo desses compostos. Após grandes descobertas, a química moderna permitiu, à comunidade científica, sintetizar

novos compostos e modificar produtos naturais. A partir daí, ocorreu uma evolução significativa da síntese química de diversos produtos farmacêuticos (31).

Nos últimos 100 anos, o desenvolvimento e a produção em massa dos medicamentos sintetizados quimicamente revolucionaram os cuidados de saúde, em muitas partes do mundo (38). Contudo, os medicamentos à base de plantas sobreviveram até hoje e, atualmente, estão perante um novo Renascimento (39). Assim, nos dias de hoje, tem havido um crescente e acentuado interesse por produtos à base de plantas, obtidos principalmente a partir de extratos (13). Conseqüentemente, o conhecimento dos compostos fitoquímicos existentes e as suas propriedades farmacológicas, tal como as técnicas de extração, é de extrema importância para o desenvolvimento de diversas formulações (10).

O Decreto-Lei n.º 716/2006 de 30 de Agosto, denominado por Estatuto do Medicamento, classifica medicamento como “toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano, com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” (1).

Dentro da área de fitoterapia, o princípio ativo dos medicamentos é a parte, ou o extrato, da planta responsável pelos efeitos terapêuticos (30). Similarmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2001, definiu medicamentos fitoterápicos como “os materiais derivados de plantas ou produtos, com benefícios terapêuticos ou outros para o Homem, que contenham ingredientes, crus ou processados, de uma ou mais plantas” (29). Ainda outra definição para medicamento à base de plantas foi publicada no Decreto-Lei n.º 716/2006, sendo a seguinte: “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” (1,2).

Os produtos fitoterápicos, tal como os seus derivados e análogos, representam mais de 50% de todos os medicamentos em uso clínico, nos quais os produtos naturais derivados de plantas superiores representam cerca de 25% do total (30,40). Segundo a OMS, 80% das populações a nível mundial, em particular nos países em desenvolvimento, usam este tipo de produtos para as suas necessidades de saúde, o que permite perceber quanto à importância das plantas na descoberta de novos e mais seguros produtos terapêuticos (21,29,33,34). Além disso, cerca de 60% da população mundial em tratamento de

diversas enfermidades depende de plantas e produtos naturais (29,33,41). Nesse sentido, hoje em dia, a Europa é considerada como o maior mercado em crescimento nesta área, sendo esta procura predominantemente impulsionada pela população feminina (42).

A comercialização de qualquer tipo de medicamento, a nível nacional, está sujeita à autorização do INFARMED. Por isso, para o pedido de autorização de introdução no mercado (AIM), devem ser apresentados certos documentos do medicamento, através de cinco módulos: [1] dados administrativos específicos; [2] resumos de qualidade (não clínicos e clínicos); [3] informações químicas, farmacêuticas e biológicas; [4] relatórios não clínicos e [5] relatórios de estudos clínicos. Estes módulos devem constar no Documento Técnico Comum (DTC), cuja sua apresentação é aplicável a todos os tipos de produtos farmacêuticos, incluindo os medicamentos à base de plantas. No que diz respeito ao subsequente dossier do pedido de AIM, devem ser atendidas as diretrizes aprovadas pelo INFARMED, tal como as normas científicas relativas à qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos para uso humano, publicadas pela Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) (1).

Nesse dossier, especificamente no módulo 3, as informações apresentadas devem ter em conta o estado dos conhecimentos científicos, incluindo a conformidade com as monografias da Farmacopeia Europeia, no momento em que o pedido é realizado. Assim sendo, em certas secções desse módulo, há a necessidade de especificar algumas informações relativas a diferentes parâmetros das substâncias/preparações à base de plantas, tais como: nomenclatura, estrutura, processos de fabrico e de controlo, procedimentos analíticos. Para além disso, no que diz respeito ao desenvolvimento da formulação do medicamento em si, é também necessário apresentar-se uma descrição e, por vezes, até uma breve comparação com dados bibliográficos (1).

Apesar de os extratos de plantas serem utilizados como fontes em diversas formulações, a sua garantia de segurança, qualidade e eficácia, para posterior aplicação nas diversas indústrias, tornou-se recentemente um ponto crucial, principalmente nos países industrializados (42). Neste seguimento, segundo a OMS, entre 1999 e 2012, houve um aumento acentuado no número de regulamentos e políticas nacionais, o que visa promover o uso seguro e eficaz de medicamentos complementares tradicionais, incluindo plantas medicinais e seus derivados (32). Estas legislações vieram acompanhar o aumento na procura global pela medicina tradicional. Como proposto na Diretiva 2004/24/CE, foi estabelecido, na Diretiva N.º. 726/2004, um Comité de Medicamentos à Base de Plantas (HMPC, (do inglês, *Committee on Herbal Medicinal Products*) no âmbito da EMA (2). Até aos dias de hoje, o HMPC já publicou uma diversidade de

documentos para orientação, relativamente ao processo de avaliação da qualidade, segurança e eficácia deste tipo de medicamentos (3). Desse modo, nos dias de hoje, o prestigiado sucesso dos produtos farmacêuticos à base de plantas comercializados evidencia a preocupação com a segurança e a eficácia dos extratos (31).

O INFARMED, no processo de autorização, registo ou introdução de um medicamento de uso humano no mercado, apresenta a avaliação da qualidade, segurança e eficácia desse produto como principal objetivo (1). Desse modo, dentro dos tipos de legislação existentes, destaca-se o que diz respeito à segurança e eficácia dos medicamentos, o qual também regula os processos pelos quais os produtos são avaliados, rotulados e comercializados. Neste sentido, as leis e regulamentações refletem a preocupação das autoridades reguladoras em minimizar os danos que podem resultar da utilização desses produtos, ao mesmo tempo que permitem o uso terapêutico de produtos seguros e benéficos. Assim, a legislação acerca da certificação de segurança dos medicamentos, apesar de ter surgido mais recentemente, é essencial para uma indústria farmacêutica próspera e segura (31).

Aplicando-se as boas práticas de laboratório (BPL), no campo da segurança, as autoridades reguladoras exigem estudos preliminares de toxicidade, *in vitro* e *in vivo*, sendo estes últimos necessários para prever os riscos adversos que possam estar associados à administração do medicamento a seres humanos. Os ensaios toxicológicos e farmacológicos do produto devem demonstrar a sua potencial toxicidade, bem como quaisquer eventuais efeitos tóxicos ou indesejáveis que possam surgir nas condições de utilização previstas no Homem e, caso seja possível, ainda as suas propriedades farmacológicas na respetiva patologia (43). Como complemento ao que se encontra referido acerca do dossier de pedido de AIM, é importante acrescentar que, no módulo 4 que representa os relatórios não clínicos, devem ser apresentados os dados obtidos nos estudos das seguintes áreas: farmacologia, farmacocinética e toxicologia. Os estudos não clínicos em animais podem ser preferencialmente substituídos por ensaios *in vitro* validados, desde que os resultados desses ensaios sejam de qualidade e utilidade comparáveis, para efeitos de avaliação da segurança (1).

Entre os ensaios toxicológicos, segundo o Decreto-Lei n.º 716/2006, destacam-se os seguintes parâmetros de estudo: toxicidade por dose única, toxicidade por dose repetida, genotoxicidade, carcinogenicidade, tolerância local e toxicidade para a função reprodutora e o desenvolvimento (1). É de salientar que, tanto a Diretiva 2001/93/CE como o Decreto-Lei n.º 716/2006, reportam a obrigatoriedade destes estudos para todas as substâncias novas, seja qual for a sua origem, no domínio farmacêutico (1,43).

Após introdução do medicamento no mercado, existe a obrigatoriedade de serem apresentados relatórios periódicos de segurança (RPS) ao INFARMED, os quais devem principalmente conter as reações adversas ocorridas e ainda uma avaliação científica da relação benefício-risco do medicamento (1). Desse modo, o Repositório de RPS foi desenvolvido pela EMA, a fim de facilitar a troca de informação relativa à segurança dos medicamentos autorizados na EU, entre as autoridades competentes e a indústria farmacêutica (44).

Apesar disto, sabe-se que, atualmente, ainda existem desafios para a avaliação de eficácia, segurança e qualidade dos produtos fitoterápicos.

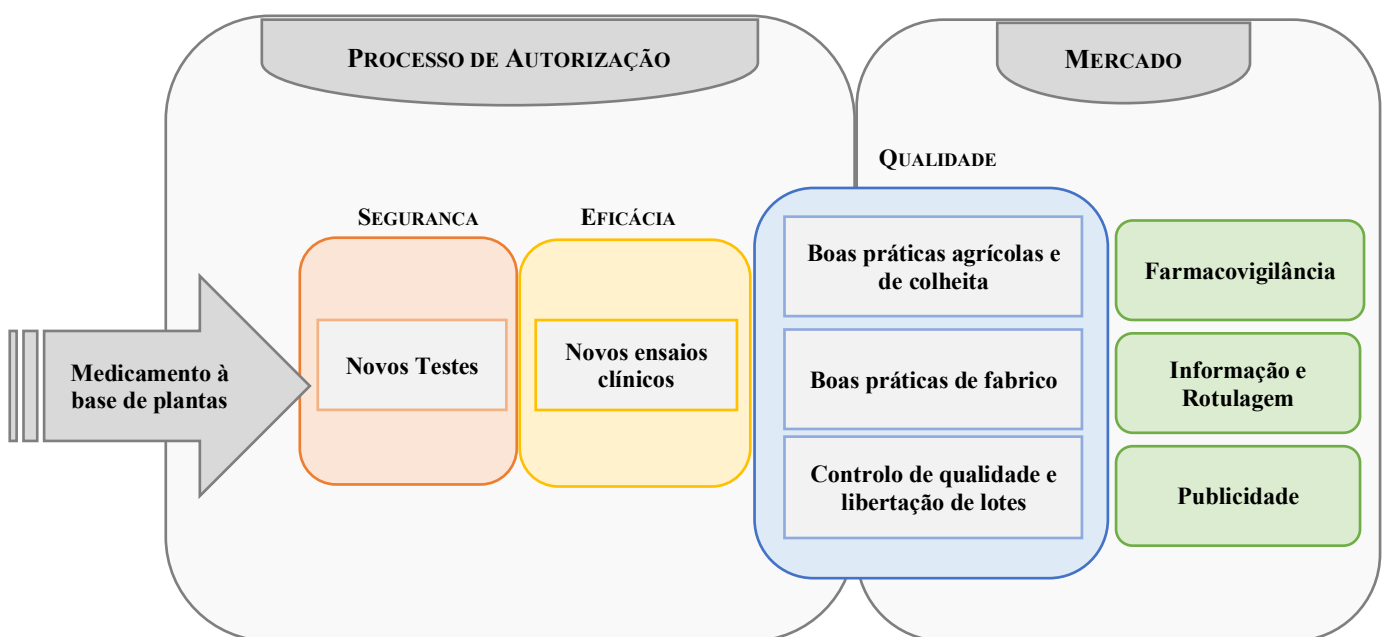


Figura 3 – Procedimento de autorização dos medicamentos à base de plantas, para comercialização no mercado. Adaptado de (33).

Com base nas legislações existentes para os medicamentos à base de plantas, a sua AIM requer os mesmos requisitos mínimos de qualidade, eficácia e segurança, comparativamente com os medicamentos de origem sintética (figura 3). Na figura anterior, encontra-se demonstrado que a base da qualidade do medicamento à base de plantas recai nos processos de cultivo, colheita, secagem, tratamento pós-colheita e armazenamento das espécies vegetais a serem utilizadas como matéria-prima desses produtos (3,33). Consequentemente, a qualidade destas matérias influencia a sua reprodutibilidade, a nível da segurança e eficácia, o que, por sua vez, determina a relação risco-benefício das respetivas formulações (3).

II. Cosméticos

No antigo Egito, a população, maioritariamente feminina, utilizava OE, extraído de flores, com odor doce, tendo como intuito de melhorar esteticamente a sua feminilidade e minimizar os odores corporais. Desse modo, os primeiros registos de produtos cosméticos remontam a essa época (24,45). O termo “cosmético” advém da palavra *cosmetae*, com origem no termo grego *kosmetiké* (8). Nessa época, uma das primeiras substâncias que ganhou um amplo uso como ingrediente cosmético foi o Kohl, originalmente para proteção contra doenças oculares e, mais tarde, contra os raios solares (46). Assim, na antiguidade, os cosméticos também eram utilizados para prevenção e tratamento de certas enfermidades, o que, nos últimos anos, tem vindo a ser um verdadeiro desafio no que diz respeito à distinção regulatória entre produtos cosméticos e farmacêuticos (46).

Ao longo da história da civilização, diversas matérias-primas, de origem vegetal, mineral e animal, foram utilizadas para o desenvolvimento de diferentes preparações cosméticas, tais como: sabões, pomadas ou perfumes. Contudo, principalmente a partir do século XIX, houve o surgimento das primeiras matérias-primas de origem sintética, as quais permitiram a expansão da indústria cosmética (45).

Nos dias de hoje, os produtos cosméticos e de cuidados pessoais são imprescindíveis na vida quotidiana de uma significativa parte da população humana na Europa, mais especificamente de mais de 500 milhões de consumidores europeus, de todas as faixas etárias. Devido a isso, o continente europeu tem vindo a ser reconhecido como líder mundial no setor cosmético, o que faz com que esse setor continue a promover inovação, eficácia, qualidade e segurança no desenvolvimento de novos produtos. Nesse processo de desenvolvimento, encontram-se incluídos os produtos à base de plantas, tendo em conta a sua atual e crescente procura, por parte dos consumidores (47).

O Regulamento de Cosméticos da União Europeia (UE) No. 1223/2009 define cosmético como “qualquer substância ou mistura, destinada a ser colocada em contacto com as várias partes externas do corpo humano (epiderme, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos), ou com os dentes e as mucosas da cavidade oral, com o objetivo, exclusiva ou principalmente, de limpá-los, perfumá-los, mudar a sua aparência, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir odores corporais” (11). Entre as múltiplas categorias de produtos cosméticos conhecidas e descritas no Decreto-Lei nº189/2008, verifica-se uma elevada diversidade de produtos, nomeadamente:

maquilhagem, fragâncias, desodorizantes, sabonetes, protetores solares, dentífricos, capilares, entre outros (45,48).

Outra definição com importância é a de ingrediente cosmético que, segundo o Decreto-Lei nº189/2008, de 24 de setembro, pode ser a seguinte: “qualquer substância química ou mistura, de origem sintética ou natural, que entre na composição de um produto cosmético, com exceção de compostos odoríferos e aromáticos” (48).

O termo “cosmecêutico” foi utilizado pela primeira vez por Raymond Reed, em 1961. Contudo, em 1984, foi o Dr. Albert Kligman que popularizou esse termo, para se referir às substâncias que exercem, em simultâneo, benefícios cosméticos e terapêuticos (49). Assim, como resultado da contínua inovação e melhoria dos cosméticos para os consumidores, os produtos cosmecêuticos, principalmente à base de plantas, têm sido cada vez mais populares, os quais contêm um ou mais compostos bioativos e se destinam a melhorar a saúde e a beleza da população humana (24). Este tipo de produtos são divididos em certas categorias (como: cremes, produtos de banho, desodorizantes, entre outros), de igual modo aos cosméticos (49).

Tendo em conta a elevada importância dos produtos cosméticos, tanto a nível económico como populacional, a sua regulamentação é crucial para se conseguir assegurar a segurança dos consumidores e o seu acesso à informação adequada, no momento de aquisição dos produtos (45). Na EU, os produtos cosméticos estão regulamentados pelo Regulamento de Cosméticos No. 1223/2009, no qual algumas disposições abordam especificamente o uso de certos extratos de plantas (como os OE) (12,50). A indústria cosmética necessita de garantir que esses produtos atendem aos requisitos regulatórios, para poderem ser colocados no mercado (45).

O estudo dos produtos cosméticos deve incluir métodos de análise, necessários ao controlo da sua composição e das respetivas matérias-primas, estudo dos critérios de pureza microbiológica e química, bem como os métodos alternativos aos ensaios em animais, validados e aprovados a nível europeu. Quando não há evidências regulamentares acerca dos ensaios que devem ser realizados, devem seguir-se os métodos e os respetivos critérios estabelecidos nas normas de diversas entidades, entre as quais se destaca a ISO (48).

Similarmente aos medicamentos, por obrigatoriedade do INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, cada produto cosmético comercializado deve possuir um dossier técnico, normalmente designado por Ficheiro de Informação do Produto (FIP), contendo a respetiva documentação, no qual devem estar registadas

diversas informações acerca do produto, ou das suas matérias-primas. Dentro da vasta gama de informações, estão incluídas as seguintes: a fórmula qualitativa e quantitativa; as especificações físico-químicas e microbiológicas; a avaliação da segurança para a saúde humana, nomeadamente através do perfil toxicológico dos ingredientes cosméticos; dados existentes relativamente às possíveis reações adversas (48,51).

Conforme se encontra estabelecido na legislação europeia, os produtos cosméticos comercializados no mercado europeu devem ser seguros para o consumidor, não devendo causar danos à saúde humana, quando aplicado nas condições de utilização normais. Um produto “seguro” foi definido como “qualquer produto que, em condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, não apresenta qualquer risco ou apenas os riscos mínimos compatíveis com a utilização, considerado aceitável e consistente com um alto nível de proteção para a segurança e saúde dos consumidores” (47,48,51). A lógica da segurança do produto cosmético deve basear-se na segurança dos seus ingredientes, tendo em conta que a maioria dos diferentes produtos cosméticos, comercializados na EU, deriva de um número ilimitado de substâncias. Assim, principalmente, os ensaios de toxicidade têm vindo a ser direcionados para os ingredientes e, em particular, para aqueles que se destinam a reagir com porções biológicas e, portanto, são de potencial preocupação para a saúde humana (52).

Neste sentido, o Regulamento No. 1223/2009 exige a garantia de que, antes da sua comercialização, o produto cosmético seja submetido a uma avaliação de segurança, incluindo a elaboração de um relatório de segurança, como descrito no anexo I da presente dissertação (47,50).

Como reforço no campo da segurança dos ingredientes/produtos cosméticos, existe também o *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS), conhecido por emitir pareceres, fundamentados com base em evidências científicas, acerca dos possíveis riscos para a saúde e a respetiva segurança, relativamente a produtos de consumo não alimentares (como produtos cosméticos e os seus ingredientes) (45).

A totalidade dos estudos não clínicos de segurança das substâncias de teste devem apresentar qualidade, dado que estes constituem a base para a avaliação dos riscos. Nesse sentido, os países membros da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) têm tido uma harmonização internacional dos métodos de ensaio e das BPL, como foco principal (50).

No desenvolvimento e fabrico dos produtos cosméticos, é importante que nenhuma das substâncias mencionadas nos anexos II-VI do Regulamento No. 1223/2009 seja incluída

nesses produtos. Além do mais, ter ainda em atenção que, regularmente, ocorrem novas revisões desses anexos, onde, no geral, são acrescentadas mais substâncias proibidas (50). Quanto às substâncias classificadas como cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução, de acordo com o artigo 15.º desse Regulamento, encontra-se sob proibição a respetiva utilização das que se encontram descritas no anexo VI, salvo algumas exceções (12,50). As exceções podem dever-se ao facto de algumas respostas a certos parâmetros toxicológicos (carcinogenicidade, mutagenicidade ou reprodução) serem frequentemente expressas como uma resposta puramente qualitativa, visto que, em geral, a potência para causar esses efeitos não é tida em consideração nos ensaios realizados (51).

Apesar do crescente interesse por produtos naturais, é importante conseguir classificá-los corretamente, como medicamento ou cosmético, antes da sua comercialização. Em 2019, o INFARMED detetou a comercialização de produtos erroneamente classificados como cosméticos, os quais eram essencialmente compostos por extratos de plantas com propriedades terapêuticas já reconhecidas nas respetivas monografias publicadas pela EMA, como por exemplo a *Hamamelis virginiana* (52).

Até recentemente, as metodologias utilizadas para determinar o perfil toxicológico dos ingredientes cosméticos consistiam principalmente em ensaios *in vivo*. Contudo, em 2013, foram substancialmente reduzidas pela proibição imposta que nenhum ingrediente ou produto cosmético fosse testado em animais, dentro do continente europeu (51). Posto isto, foi necessário o desenvolvimento e a respetiva implementação de métodos alternativos para uma possível avaliação de segurança dos produtos cosméticos, ou seus ingredientes, antes de serem comercializados (47,51). Alguns desses métodos alternativos já foram validados e aceites pela OCDE, os quais permitem prever, com precisão, as reações complexas de um sistema biológico, principalmente dos produtos cosméticos acabados, bem como certos parâmetros de toxicidade, no que diz respeito aos possíveis ingredientes (47). Assim, só é permitida a realização de métodos alternativos que tenham sido validados e aprovados ao nível da EU, no âmbito da OCDE, dos quais principalmente já se encontrem publicadas as respetivas diretrizes, para uma maior harmonização e qualidade dos resultados obtidos. Contudo, atualmente, ainda é crucial que ocorra a aceitação de um maior número de métodos validados, por parte das autoridades reguladoras, com o intuito de se atingir uma indústria continuamente inovadora e sem ensaios em animais (45,48).

A avaliação de segurança dos produtos cosméticos pode abranger diversos parâmetros, nomeadamente: identificação e propriedades físico-químicas, toxicidade aguda e

crônica, irritação cutânea e ocular, sensibilização e absorção cutânea, toxicidade reprodutiva, carcinogenicidade e mutagenicidade/genotoxicidade (51). Contudo, torna-se necessário otimizar a legislação atual e, principalmente, estabelecer uma avaliação de segurança mais inequívoca e com um maior rigor, a fim de promover o aumento da conformidade com o Regulamento No. 1223/2009 (47).

À medida que um número crescente de produtos cosméticos à base de plantas tem sido colocado no mercado, o Conselho da Europa publicou recomendações acerca da utilização de plantas e respectivas preparações como ingredientes nesses produtos. Somando a isso, também já se conhece uma publicação relativa a uma pesquisa da segurança de certos ingredientes, utilizados em produtos cosméticos. Contudo, o Regulamento No. 1223/2009 não estabelece disposições com especificidade para os produtos naturais, o que faz com que, nos dias de hoje, ainda não exista uma harmonização quanto aos critérios para esse tipo de produtos (12,50).

1.3. Segurança dos extratos de plantas

A *Food and Drug Administration* (FDA) reconheceu que, em condições de uma utilização bem estabelecida, nomeadamente a baixas concentrações, a maioria dos OE parece ter um bom perfil de segurança, podendo classificar-se a sua toxicidade como baixa ou média (9,19,54). Contudo, devido a serem misturas de substâncias orgânicas voláteis, podem reagir, isoladamente ou em combinação com outras biomoléculas (como proteínas), havendo a possibilidade de provocar uma série de adversidades tóxicas (12).

A toxicidade deste tipo de extratos pode ser totalmente diferente da toxicidade da sua planta de origem, não apenas pela sua alta concentração em compostos bioativos, mas também pelas suas propriedades físico-químicas (12). Assim, a toxicidade dos OE pode estar envolvida com os seguintes fatores: concentração, composição química, diluição, frequência de uso e aplicação (18). Dentro destas características, é também importante entender que a possível existência de diversos quimiotipos em qualquer espécie, os quais, geralmente, apresentam certas diferenças nas vias biossintéticas, pode influenciar a atividade e/ou toxicidade dos diferentes extratos (12).

Para uma qualidade adequada, os extratos de plantas devem ter uma identificação específica com as suas características físico-químicas e ser armazenados em recipientes herméticos e protegidos da luz. O processo de degradação pode alterar as suas propriedades e, potencialmente, comprometer o seu nível de segurança. Neste sentido, as características físicas, organolépticas, químicas e cromatográficas dos OE são definidas,

globalmente, através de vários padrões ISO (12). E ainda existe a *International Fragrance Association* (IFRA) que define quais os OE e os seus componentes que podem representar um potencial risco de alergia, determinando também a concentração máxima que pode ser utilizada no desenvolvimento de formulações, principalmente cosméticas, de modo a estas serem seguras para o consumidor (17).

Tendo em conta a sua complexidade, os ensaios toxicológicos e bioquímicos dos extratos de plantas devem ter em consideração a totalidade dos seus constituintes, os quais podem atuar de forma aditiva, sinérgica ou antagonista entre si. Isto deve ser fundamentalmente considerado, devido ao facto de que a possível interação entre um ou mais constituintes do extrato e macromoléculas normalmente é a responsável pelo desencadeamento de uma resposta biológica, independentemente de ser um efeito desejado (como um odor agradável) ou um potencial efeito tóxico (12).

Segundo a literatura, os OE podem ser considerados como compostos geralmente seguros, contudo, devido a serem misturas complexas de constituintes, alguns deles podem apresentar toxicidade. Posto isto, o equilíbrio entre o risco e o benefício destes extratos tem sido um constante desafio para a comunidade científica e as autoridades reguladoras (54).

Contrariamente aos OE, como os hidrolatos são soluções extremamente diluídas, em geral, apresentam uma menor toxicidade e podem ser aplicados mais facilmente em formulações para ingestão oral ou aplicação dérmica, muitas das vezes, de uma forma direta na pele (13). Além disso, segundo o Regulamento CE nº 1334/2008 de 16 de dezembro de 2008, os hidrolatos não representam, com base nos dados científicos disponíveis, um risco de segurança para a saúde do consumidor, pelo menos quando utilizados em produtos alimentares (25). Contudo, o número de estudos científicos acerca destes extratos e da sua possível isenção de toxicidade nas diversas indústrias ainda são escassos.

Ao longo de vários séculos, os produtos à base de plantas têm vindo a ser considerados naturais e, portanto, teoricamente, mais seguros do que os produtos sintéticos. Atualmente, ainda existem várias limitações que, devido aos longos anos de utilização tradicional, sustentam o pressuposto empírico de que esses produtos podem ser considerados absolutamente seguros. Contudo, um dos Comités de Especialistas do Conselho da Europa destacou o facto de algumas das matérias-primas vegetais conterem substâncias que possam ser potencialmente prejudiciais para os consumidores. Neste sentido, os produtos naturais podem apresentar efeitos adversos e interações com outros produtos, onde algumas evidências científicas revelaram que existe a possibilidade de

vários extratos de plantas serem potencialmente tóxicos, mutagênicos e cancerígenos (12,29). No final da década de 90, a IFRA identificou um conjunto de substâncias com potencial alergênico em produtos cosméticos, as quais eram maioritariamente provenientes de fragâncias e OE (45).

Assim, a segurança das plantas, tal como dos seus extratos, deve ser estudada de forma abrangente e precisa, deixando de se confiar nas crenças tradicionais e milenares existentes (42). Mesmo após a comercialização dos produtos, tanto dos medicamentos como dos cosméticos, estes são sujeitos ao desenvolvimento de RPS, onde se encontra a comunicação atualizada acerca da sua informação de segurança disponível mundialmente, em conjunto com uma avaliação científica dos seus riscos e benefícios (1). Especificamente dos cosméticos, as avaliações de risco, relacionadas com a utilização de extratos de plantas como ingrediente nesse tipo de produtos, devem obedecer ao processo de avaliação do produto cosmético, recomendado pelo SCCS, além da base legislativa para a avaliação de segurança de um produto cosmético, de acordo com o Regulamento No. 1223/2009. Contudo, devido à natureza complexa desses extratos, podem ser necessárias metodologias de suporte ou alternativas adequadas, para avaliar a respetiva segurança (12,50).

De acordo com as diretrizes publicadas para ambos os tipos de produtos, uma avaliação dos extratos de plantas pode incluir: fase analítica, em que a composição quantitativa do extrato é determinada; extensa pesquisa bibliográfica acerca dos seus constituintes e da respetiva mistura; caracterização do perigo; avaliação da exposição em condições de uso; e avaliação de risco, onde se deve utilizar todas as informações obtidas (12). É importante referir que, para a avaliação de segurança de uma mistura complexa, deve se ter em conta as informações completas sobre a origem dos seus materiais de origem (como a parte da planta), método de extração e quaisquer processos adicionais e/ou etapas de purificação utilizadas (52).

Apesar da longa utilização tradicional de diversas plantas, a Diretiva 2004/24/CE reporta que um número significativo de medicamentos à base das mesmas não preenchem os requisitos de um nível de segurança aceitável. Por esse motivo, encontra-se também sugerido a criação de uma lista comunitária de substâncias à base de plantas que atendam a determinados critérios, com o intuito de uma maior harmonização a nível científico e regulamentar (2).

A história dos estudos de toxicidade foi iniciada por Paracelsus, considerado como o pai da toxicologia, o qual determinou substâncias químicas específicas responsáveis pela toxicidade observada em plantas e animais. Após algumas situações de toxicidade na

população humana no século passado, as autoridades reguladoras têm-se concentrado na determinação dos perfis de toxicidade de todas as substâncias farmacêuticas disponíveis e implementaram a obrigatoriedade de serem apresentados os perfis de toxicidade dos novos medicamentos, bem como de outros tipos de formulações, e das suas respectivas substâncias. Desse modo, a OCDE e o *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) publicaram as diretrizes para os estudos toxicológicos das substâncias farmacêuticas (55).

Nesse mesmo sentido, de acordo com o SCCS, atualmente existem vários estudos toxicológicos relevantes que devem ser realizados com os extratos de plantas, para uma possível aplicação em produtos farmacêuticos ou cosméticos. Dentro desse conjunto de estudos já mencionados anteriormente, os estudos que têm apresentado um grande destaque são a toxicidade aguda e a mutagenicidade/genotoxicidade (52).

Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), o termo “genotoxicidade” refere-se a processos que alteram a estrutura, o conteúdo de informação ou segregação do ADN. Apesar destes processos não estarem estritamente associados à mutagenicidade, este campo está incluído na genotoxicidade, o qual está relacionado com a indução de alterações transmissíveis permanentes na quantidade, ou estrutura, do material genético de células ou organismos. Além da mutagenicidade, a genotoxicidade também pode estar presente na forma de aberrações cromossômicas, onde se encontram incluídos os termos “clastogenicidade” (estruturais) e “aneugenicidade” (numéricas) (56). Em geral, existem dois tipos de mecanismos que promovem danos no ADN, levando à genotoxicidade, nomeadamente: primários e secundários. A genotoxicidade primária pode ser direta, onde o agente genotóxico interage diretamente com o ADN, ou indireta, onde o efeito genotóxico é exercido através de moléculas intermediárias (como radicais livres). Já a genotoxicidade secundária é impulsionada pelo stress oxidativo decorrente da inflamação causada pela ativação/recrutamento de células imunológicas (52).

A avaliação de genotoxicidade é uma componente chave no estudo dos riscos das substâncias a serem incluídas em produtos de consumo e farmacêuticos. Até aos dias de hoje, diversas agências reguladoras e órgãos consultivos fizeram recomendações acerca de estratégias para os testes de genotoxicidade, sendo que, em 1991, já existiam até 200 sistemas deste tipo de testes diferentes e, em 2010, a OCDE já tinha publicado 17 diretrizes dos diferentes testes de genotoxicidade (56). Estes testes podem ser definidos como testes *in vitro* e, por vezes, *in vivo* (exceto quando aplicados aos produtos cosméticos), os quais têm como objetivo detetar os compostos que induzem danos

genéticos por vários mecanismos, fornecendo também uma indicação do dano genético induzido (56,57).

A otimização de estratégias para os testes de genotoxicidade é uma área onde, atualmente, há uma atividade considerável em todo o mundo, o que reflete a progressão considerável da ciência nos últimos tempos. Neste sentido, a investigação e o desenvolvimento dos ensaios nesta área de segurança são impulsionados pela necessidade de garantir que os compostos genotóxicos possam ser detetados numa bateria padrão de testes, mas também pelo facto de ser extremamente importante que esses testes não apresentem um elevado número de resultados falso positivos (56).

O registo dos produtos farmacêuticos, tal como os cosméticos, requer uma avaliação abrangente do seu potencial genotóxico. Apesar de todos os avanços nesta área da segurança, ainda não é conhecido nenhum ensaio que seja capaz de detetar todos os mecanismos genotóxicos definidos (57). Uma avaliação adequada do potencial genotóxico de um extrato depende do estudo de diferentes *endpoints*, nomeadamente a indução de mutações genéticas, tal como as alterações cromossómicas estruturais e numéricas, visto que cada um desses *endpoints* genéticos tem sido implicado no processo de carcinogénese e doenças genéticas (56).

Assim, como *screening* inicial da genotoxicidade, é utilizado o Teste de Mutação Reversa Bacteriana para avaliar a mutagenicidade, seguido da incorporação de testes *in vitro* em células de mamífero, com o intuito de aumentar a sensibilidade para a deteção dos carcinogénios em roedores e ampliar o espetro de possíveis eventos genéticos detetados. Dentro dos ensaios *in vitro* em células de mamíferos, já existem alguns com uma ampla utilização e que podem ser considerados como suficientemente validados, nomeadamente: o ensaio das aberrações cromossómicas, o do micronúcleo *in vitro* e o de mutação genética em células de linfoma de rato (L5178Y). Estes três ensaios são, atualmente, considerados como igualmente apropriados e, portanto, intercambiáveis para a medição de danos cromossómicos, quando utilizados em conjunto com outros ensaios de genotoxicidade. A abordagem da bateria de testes é normalmente projetada para reduzir o risco de resultados falsos negativos para compostos com potencial genotóxico. Por outro lado, um resultado positivo num dos testes de genotoxicidade nem sempre significa que a substância apresenta um perigo genotóxico para os humanos. Em conclusão, a avaliação do potencial genotóxico de um composto deve levar em consideração a totalidade dos resultados obtidos nos diferentes ensaios, mas também ter em atenção os valores intrínsecos e as limitações de cada um dos ensaios (56,57).

Os compostos que são classificados como positivos nesta bateria de testes têm o potencial de ser carcinogênicos e/ou mutagênicos, a nível humano. Mais propriamente, os resultados dos testes de genotoxicidade podem ser valiosos para a interpretação dos estudos subsequentes de carcinogenicidade (57). No caso de a bateria de testes padrão incluir testes que consigam avaliar os três principais *endpoints* genéticos, um único resultado positivo é considerado como evidência da possibilidade de a substância ser genotóxica, enquanto a substância só é considerada negativa, se todos os testes realizados apresentarem resultados negativos (56).

Nos ensaios que avaliam as aberrações cromossômicas, o processo de quebra das cromátides, ou mesmo dos cromossomas, pode resultar num amplo espectro de alterações na integridade cromossômica, como por exemplo, a formação de micronúcleos, caso um fragmento acêntrico seja produzido. Estes são considerados como apropriados para a detecção de clastogénios. Contudo, os micronúcleos ainda podem resultar de um atraso de um ou mais cromossomas inteiros, na anáfase, tendo, portanto, também o potencial de detetar alguns compostos indutores do mecanismo de aneuploidia (57).

Normalmente, no processo de avaliação dos candidatos a produtos farmacêuticos, incluindo os fitoterápicos (Diretiva CE 91/414), a bateria padrão de testes de genotoxicidade deve incluir: o teste de mutação reversa bacteriana, um teste *in vitro* e um teste *in vivo* para danos cromossômicos (56,57). Neste caso, quando um resultado positivo ocorre num ensaio *in vitro* em células de mamífero, os resultados claramente negativos em dois subsequentes ensaios *in vivo* são considerados como evidências suficientes para a falta de potencial genotóxico. Os testes *in vivo* estão diretamente relacionados com a sua capacidade de demonstração da exposição adequada do tecido alvo à substância de teste. Contudo, existem substâncias para as quais a maioria dos testes *in vivo* não fornecem informações úteis adicionais, principalmente no caso de essas não serem sujeitas à absorção sistémica do organismo humano (57). Além da bateria de testes padrão sugerida, podem ser utilizados testes adicionais (incluindo ensaios que avaliam a quebra da cadeia de ADN, como por exemplo, o ensaio do cometa) para investigação adicional dos resultados obtidos nestes ensaios de genotoxicidade pertencentes à bateria padrão. Nos últimos anos, o ensaio do cometa tem sido sugerido por vários autores como um teste de acompanhamento adequado para investigar a relevância dos resultados positivos obtidos nos testes *in vitro*, principalmente aqueles que abrangem os seguintes *endpoints*: mutagenicidade e clastogenicidade (56).

No caso das indústrias cosmética e alimentar, a combinação de dois testes *in vitro* (teste de mutação reversa bacteriana e teste de micronúcleo *in vitro* em células de mamífero)

é suficiente para a avaliação de genotoxicidade, sendo que cumpre os requisitos básicos para abranger os três *endpoints* genéticos com o menor número de testes possível. Neste sentido, o Comité Científico da EFSA concluiu que esta combinação é confiável para a deteção da maioria dos potenciais compostos genotóxicos e, ainda acrescentou que a adição de qualquer outro ensaio *in vitro* poderia desencadear uma redução significativa da especificidade, sem um aumento substancial na sensibilidade. Nos últimos anos, principalmente nestas indústrias, mas com um crescimento contínuo em outras, o princípio dos 3Rs tem sido cada vez mais aplicado nos diversos ensaios, incluindo nos de genotoxicidade, estando fortemente realçado na legislação atual. Esta política apoia vigorosamente os esforços da comunidade científica em encontrar métodos alternativos aos testes *in vivo* (nomeadamente em animais) (56).

I. Caracterização fitoquímica dos extratos de plantas

A identificação dos compostos químicos, presentes em diversos extratos de plantas, pode ser realizada através dos métodos de extração e analíticos, entre os quais se encontram os seguintes: espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa-espetrometria de massa, entre outros. Todos estes métodos têm vindo a ser desenvolvidos e melhorados, ao longo de vários anos, para o estudo de compostos ativos encontrados nas plantas e nos seus respetivos extratos (58).

O método de cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas chromatography–mass spectrometry*) é, geralmente, utilizado para a determinação dos constituintes presentes nos diferentes extratos de plantas, o que, por sua vez, nos permite fazer correlações com as suas propriedades. Este método é considerado simples e eficiente, permitindo respostas rápidas, sendo, por isso, uma técnica analítica amplamente utilizada. Desta forma, um relatório obtido por esta técnica é a impressão digital do extrato de planta em estudo, sendo o método GC-MS também capaz de indicar a pureza do mesmo (16). Após a identificação dos constituintes maioritários dos extratos, é possível realizar a caracterização do seu quimiotipo. Nesse mesmo sentido, o conhecimento da constituição química de qualquer extrato de planta é fundamental também para entender os fatores que podem afetar a segurança do mesmo (12).

II. Teste de Mutação Reversa Bacteriana

O estudo do potencial genotóxico, onde se encontram a mutagenicidade, clastogenicidade e aneugenicidade, destina-se a revelar as alterações que um extrato pode causar no material genético dos indivíduos e, conseqüentemente, provocar perturbações a nível hereditário ou até mesmo a nível cancerígeno. O termo “mutagenicidade” refere-se à indução de alterações, geralmente irreversíveis, na quantidade ou estrutura do material genético de células ou organismos. Tendo em conta a definição mencionada, a presença de compostos mutagénicos em extratos de plantas aumenta a preocupação sobre os potenciais riscos genéticos e cancerígenos que possam resultar do uso prolongado de produtos farmacêuticos ou cosméticos à base desses extratos. As mutações genéticas podem ocorrer: de forma pontual, onde apenas uma única base é modificada ou ocorre a inserção ou deleção de uma ou mais bases; como quebras ou rearranjos cromossómicos; ou como ganho ou perda de cromossomas inteiros (59-61).

O teste de mutação reversa bacteriana, comumente designado por teste de Ames, foi proposto pelo bioquímico Bruce Ames na década de 60. O princípio do teste foi baseado na suposição de que a característica essencial dos compostos carcinogénicos era a sua capacidade de danificar o ADN, podendo ser detetada através da utilização de estirpes bacterianas mutantes com sensibilidade a danos genéticos. Na década dos anos 90, o teste de Ames recebeu aprovação regulatória pela OCDE e pela ICH, tendo sido, conseqüentemente, desenvolvidas diretrizes internacionais para garantir a uniformidade dos procedimentos de teste (45).

Assim, este teste, realizado no presente estudo, permite detetar mutações pontuais no genoma de organismos procaríotas, provocadas espontaneamente ou pela ação dos extratos naturais a que são expostos. Essas mutações podem ser do tipo *frameshift* ou por substituição dos pares de bases, as quais têm a capacidade de promover a reversão de mutações pré-existentes no operão de histidina ou triptofano presentes no genoma das bactérias utilizadas no ensaio. Conseqüentemente, as bactérias recuperam a sua capacidade funcional de sintetizar o aminoácido essencial, conseguindo assim multiplicarem-se mesmo na ausência dessa molécula. A partir do crescimento das bactérias revertentes, é possível determinar a potencial mutagenicidade do extrato em estudo relacionada com a concentração utilizada. Atualmente, o teste de Ames encontra-se bem estabelecido e é frequentemente utilizado como *screening* da atividade genotóxica dos compostos, particularmente pela indução de mutações pontuais, tendo como principais vantagens o facto de ser economicamente reduzido, rápido e apresentar

uma elevada eficácia. Tendo isso em conta, tem sido frequentemente considerado um teste *in vitro* de referência no estudo de mutagenicidade, sendo amplamente utilizado pelas indústrias química, cosmética, alimentar e farmacêutica (59-61).

A OCDE, na diretriz do teste em questão (TG471), recomenda a utilização de cinco estirpes bacterianas, entre as quais normalmente se inclui as seguintes: *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 e TA1537, bem como a *Escherichia coli* pKM101 *uvrA* (62). Apesar dessa recomendação, já se encontra relatada, na literatura, uma significativa discordância entre a comunidade científica, quanto à necessidade e obrigatoriedade desse número elevado de estirpes para a realização do teste de Ames. (Williams et al., 2019), através da análise do desempenho de certas estirpes bacterianas, concluíram que as estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100 são, de um modo geral, suficientes para detetar a maioria dos compostos mutagénicos (93%). Acrescentando ainda que, possivelmente, ao realizar-se um posterior ensaio *in vitro* para avaliação de outro *endpoint* genético (aberrações cromossómicas), consegue-se alcançar com essa bateria de testes uma percentagem de deteção equiparável à obtida quando se utiliza as 5 estirpes no teste de Ames (99%) (63).

Tendo em conta a dependência pelo respetivo aminoácido essencial, como demonstrado na tabela 1, cada uma das estirpes de *S. typhimurium* possui um diferente tipo de mutação auxotrófica num operão de metabolismo da histidina, mais propriamente mutação do tipo *frameshift* na estirpe de *S. typhimurium* TA98 e por substituição dos pares de bases na *S. typhimurium* TA100. Estas alterações genéticas são as responsáveis pela incapacidade que as bactérias apresentam em sintetizar o seu aminoácido essencial (59-61,64).

Para além disso, as diferentes estirpes apresentam outras mutações que lhes conferem uma maior sensibilidade e capacidade de deteção de agentes mutagénicos, como: seqüências de ADN responsivas nos locais de reversão; aumento da permeabilidade celular a macromoléculas (*rfa*); eliminação do sistema de reparação do ADN devido à deleção dos respetivos genes codificantes (*uvrB*). Dentro dessas, a mutação *rfa*, presente apenas em ambas as estirpes, promove a perda parcial da camada de lipopolissacáridos (LPS), responsável pelo revestimento da superfície bacteriana, aumentando a sua permeabilidade a macromoléculas (como o cristal violeta), as quais normalmente não conseguem penetrar a membrana. Outro tipo de mutação (*uvrB*) consiste na deleção de um gene que codifica o sistema de reparação por excisão do ADN, permitindo assim que mais danos genéticos sejam sujeitos ao mecanismo de reparação de ADN propenso a erros. Além disso, a deleção do gene *uvrB* ocorre através do gene da biotina (*bio*) e,

consequentemente, o processo de multiplicação das estirpes torna-se dependente dessa molécula. A presença do plasmídeo pKM101 nas duas estirpes desencadeia o processo de reversão com vários agentes mutagénicos que são mais dificilmente detetados por estirpes que não possuam este plasmídeo. Neste sentido, o plasmídeo aumenta a mutagénese química e espontânea, através do processo de codificação do gene *recA* e consequente melhoria do sistema de reparação do ADN propenso a erros, normalmente presente nestes organismos. Esta molécula confere resistência à ampicilina, sendo o antibiótico considerado como um marcador conveniente para detetar a presença do plasmídeo nas bactérias (59-61,64).

Tabela 1 - Tipos de mutação existentes nas estirpes bacterianas utilizadas no ensaio, de acordo com a literatura.

Estirpe bacteriana	Operão	Tipo de mutação*	LPS	Reparação do ADN	Plasmídeo pKM101
<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>hisD3052</i>	<i>frameshift</i>			
<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>hisG46</i>	substituição por pares de bases	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+

Legenda:

+ significa a presença ou ausência de plasmídeo pKM101, respetivamente.

* mais especificamente, refere-se ao tipo de mutação presente no gene biossintético do aminoácido essencial de cada estirpe bacteriana.

O teste de mutação reversa bacteriana, com base na experiência da sua utilização em produtos farmacêuticos, poderia ser considerado como suficiente, quando o resultado fosse claramente negativo ou positivo e fosse realizado com um protocolo totalmente adequado (incluindo todas as estirpes bacterianas, com e sem ativação metabólica, um intervalo de concentrações que atenda aos critérios de seleção, relativamente à toxicidade, e controlos adequados) (57). Contudo, embora tenha diversas vantagens, apresenta a limitação de que as bactérias, caracterizadas como organismos procariotas, diferem das células de mamíferos ao nível de diversos fatores, tais como: captação, metabolismo, estrutura cromossómica e processos de reparação do ADN (56).

Os resultados obtidos neste teste são avaliados comparativamente com o controlo de solvente, o qual representa o número de colónias revertentes espontâneas. Com esta comparação, realiza-se a determinação do rácio de mutagenicidade (R.M.), o qual, em conjunto com outros dois critérios, permite determinar a possível mutagenicidade do extrato. Nesse sentido, um determinado extrato é considerado mutagénico, caso consiga

originar um aumento reprodutível, relacionado com a concentração, no número de colônias revertentes numa ou mais estirpes bacterianas (59-61).

III. Toxicidade aguda

O termo “citotoxicidade” foi definido por Nardone em 1977, como “uma alteração na homeostase celular que afeta adversamente a capacidade da célula em adaptar-se, sobreviver, reproduzir ou realizar as suas funções especializadas”. Essa alteração pode ser causada por estímulos químicos, exposição a outras células ou condições ambientais/físicas (como temperatura). O tratamento das células com um composto citotóxico pode resultar numa variedade de destinos celulares, como por exemplo: a paragem de crescimento e divisão, comumente designado por citostase, ou eventualmente a morte. Tendo isso em conta, os testes de citotoxicidade *in vitro* são considerados uma mais-valia para a identificação de compostos que possam representar riscos à saúde humana, quando utilizados em produtos farmacêuticos ou cosméticos. Neste tipo de produtos, a citotoxicidade mínima, ou desejavelmente até nula, é essencial para o seu desenvolvimento bem-sucedido (65).

Os ensaios tradicionais envolviam a contagem de células viáveis totais, contudo houve a necessidade de implementação de novos ensaios capazes de processar um elevado número de amostras. Nesse sentido, atualmente, existem vários métodos comumente usados para avaliar a citotoxicidade *in vitro*, entre eles, o ensaio colorimétrico de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, comumente conhecido como ensaio de MTT (*Microculture Tetrazolium Assay*), o qual apresenta uma elevada sensibilidade e um custo reduzido (66-68).

O ensaio de MTT foi desenvolvido por Mosmann em 1980, tendo como objetivo determinar quantitativamente a viabilidade celular. O princípio do ensaio é que, na maioria das células viáveis, a atividade mitocondrial pode ser considerada constante e, portanto, a alteração do número de células apresenta uma relação linear com esse tipo de atividade. Assim, as células eucarióticas, viáveis e metabolicamente ativas, têm a capacidade redutora de converter, principalmente pela ação de enzimas mitocondriais, o sal de tetrazólio (MTT), solúvel em água e amarelo, no produto formazano, o qual é insolúvel em água e apresenta uma coloração roxa (figura 4). Esta reação ocorre principalmente através da clivagem do anel de tetrazólio, apenas nas mitocôndrias ativas. Os cristais de formazano formados acumulam-se no interior das células viáveis, sendo que o MTT é carregado positivamente e é impermeável às membranas celulares.

Deste modo, após solubilização completa dos cristais num solvente orgânico, a quantidade de formazano é medida através da leitura ótica das absorvâncias. Este parâmetro medido é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente viáveis, onde uma maior intensidade da cor, resultante num valor de absorvância superior, representa um maior número de células viáveis com capacidade de conversão (69-71).

Os valores de absorvância obtidos são comparados com o controlo de meio e define-se quantitativamente a viabilidade celular, em percentagem. Com base nessas percentagens, procede-se ao cálculo do índice de citotoxicidade (IC) para cada extrato. O IC₅₀ é definido como o valor de concentração do extrato capaz de promover a inibição de 50% da viabilidade da linha celular em estudo (68).

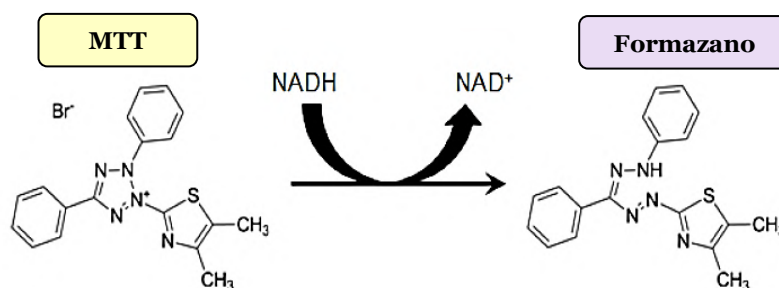


Figura 4 - Reação de redução do composto MTT em formazano. Imagem adaptada de (71).

1.4. Espécies botânicas em estudo

Para a realização da presente Dissertação, foram utilizadas quatro espécies botânicas, cuja sua filogenia é significativamente distinta, com o intuito de se alcançar uma maior abrangência do mundo vegetal. As espécies escolhidas foram as seguintes: *Hamamelis virginiana*, *Matricaria chamomilla*, *Ocimum basilicum* e *Cupressus lusitanica*. O processo de seleção das espécies botânicas mencionadas esteve relacionado com a incorporação do presente estudo no projeto InovEP.

I. *Hamamelis virginiana*

A *Hamamelis virginiana*, comumente designada por hamamelis ou "witch hazel", é uma árvore comum (106). Normalmente, floresce durante os meses de setembro a dezembro. Esta espécie é conhecida por ser uma planta medicinal tradicional com uma longa história na componente farmacêutica, sendo, originalmente, utilizada por várias tribos nativas americanas para o tratamento de alguns distúrbios do organismo humano, bem como alimento ou para fins sagrados. Posto isto, a planta era utilizada para estes fins, encontrando-se em diversas formas, onde as principais eram infusão e decocção (107-110).

Nos dias de hoje, a sua importância ainda permanece, estando a espécie *Hamamelis virginiana* a ser cada vez mais alvo de estudos, com o intuito de se confirmar o vasto espectro de propriedades biológicas e, conseqüentemente, as possíveis áreas de aplicação (107-110). Contudo, como ainda existem poucos ensaios clínicos acerca desta espécie, os seus efeitos benéficos são apoiados principalmente pelo uso tradicional (111).

Teoricamente, a denominação "witch hazel" pode ser derivada do termo antigo inglês *wych* que significa "dobrar", fazendo referência a árvores com galhos resistentes e flexíveis, enquanto "hazel" está relacionado com a possível semelhança das folhas desta planta às das aveleiras verdadeiras, pertencentes ao género *Corylus*. Contudo, desde há vários séculos, o nome comum "hamamelis" é utilizado na Europa, para se referir a outras espécies de árvores. A nível botânico, a designação latina do género *Hamamelis* deriva dos termos gregos *harma*, o qual significa "ao mesmo tempo", e *melon* que traduz "fruta". Posteriormente, o nome da espécie *virginiana* foi atribuído pelo botânico Linnaeus, devido à suposição de que o habitat desta espécie era Virgínia (108,112).

Nos últimos anos, esta planta foi aprovada pela Comissão Alemã E para o tratamento de inflamações da pele e mucosas, bem como para hemorroidas e varizes, o que também

tem promovido um aumento do interesse pela *Hamamelis virginiana*, por parte dos consumidores e, por consequência, da comunidade científica para um possível aumento dos conhecimentos acerca da mesma (113).



Figura 5– Fotografia da espécie botânica *Hamamelis virginiana* (Fonte: Projeto InovEP)

i. Taxonomia e Filogenia

De modo semelhante às espécies botânicas anteriormente descritas, a *Hamamelis virginiana* encontra-se incluída no reino Plantae e, subsequentemente, no filo Magnoliophyta (tabela 6). Sem focar em algumas estruturas hierárquicas de taxonomia botânica, a subclasse Hamamelidae contém 11 ordens, 25 famílias e 3400 espécies. Dentro da totalidade de ordens pertencentes, a mais representativa é a de Urticales (106).

Embora com um destaque menor, a ordem Saxifragales apresenta várias famílias botânicas, entre as quais se encontra a Hamamelidaceae. Nesta ordem, a maioria das plantas pertencentes, senão a sua totalidade, são classificadas como angiospérmicas. Por sua vez, a planta *Hamamelis virginiana* pertence à família Hamamelidaceae, a qual contém 31 gêneros e mais de 140 espécies presentes numa vasta distribuição geográfica entre os seguintes continentes: África, Ásia e América. Esta família apresenta um perfil monofilético (106).

O género *Hamamelis* é composto por 6 espécies diferentes, onde 2 são nativas da América do Norte e as outras 4 do leste do continente asiático. As plantas pertencentes a este género são normalmente caracterizadas como arbustos lenhosos, onde apenas a espécie *Hamamelis virginiana* consegue atingir uma pequena estatura de árvore (106,114).

Tabela 2 – Organização taxonômica da planta *Hamamelis virginiana*

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	Magnoliophytina (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Hamamelidae
Ordem	Saxifragales
Família	Hamamelidaceae
Subfamília	Hamamelidoideae
Gênero	<i>Hamamelis</i>
Espécie	<i>Hamamelis virginiana</i>

ii. Distribuição geográfica

A *Hamamelis virginiana* é nativa do norte do continente americano, nomeadamente nas florestas húmidas. Desse modo, o leste do estado Connecticut é conhecido como a “capital mundial de hamamelis” (108). Após a sua utilização comumente tradicional, atualmente, esta planta é cultivada e apresenta um bom crescimento em diversas regiões do mundo, nomeadamente em regiões húmidas nos continentes americano e europeu (91).

iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva

A aparência estrutural da árvore *Hamamelis virginiana* e das suas folhas varia amplamente, sem um padrão consistente de variação ou correlação geográfica. Esta espécie, de um modo geral, não contém simultaneamente as flores e os frutos, sendo que as primeiras estruturas vegetais normalmente surgem quando ocorre a queda das folhas, no final do outono, enquanto o amadurecimento dos frutos decorre no final do verão (91,106,108,115).

Os troncos da hamamelis são frequentemente múltiplos e sinuosos, com galhos flexíveis, provenientes da base, com o mesmo perfil de sinuosidade. Encontram-se dispostos em ziguezague, apresentando uma copa esparsa e irregular. Por sua vez, as folhas são conhecidas por serem alternadas, caducas, largas e irregularmente ovais, com base assimétrica e oblíqua, apresentando umas margens onduladas ou dentadas. Podem

também ser brevemente pecioladas. A sua coloração sofre alterações consoante a estação do ano, sendo que, por exemplo, se tornam amarelas no outono (91,106,108,115).

Os frutos desta espécie botânica são cápsulas lenhosas com 2 bicos e 2 células, as quais amadurecem e abrem no ano seguinte, tendo em conta que cada célula contém uma única semente preta. Quanto às suas flores (figura 7), estas têm um perfil bissexual, sendo constituídas por 4 pétalas longas e filiformes, levemente perfumadas e amarelas brilhantes. Em geral, encontram-se circundadas por uma bráctea escamosa, estando normalmente dispostas em cachos axilares nos galhos, geralmente 3 por cada (91,106,108,114).

iv. Tipos de extratos

Existem diversas partes da planta que são utilizadas na medicina popular, para o tratamento de uma variedade de doenças, nomeadamente: cascas, galhos e folhas (106). Contudo, os diversos extratos de *Hamamelis virginiana* normalmente, são preparados a partir das suas inflorescências e folhas (115).

A maioria dos extratos de folhas desta espécie botânica, podendo, por vezes, ter o hidrolato como exceção, são conhecidos por conterem uma mistura complexa de polifenóis, o que supostamente representa o seu princípio biologicamente ativo. Dentro dos possíveis extratos, destaca-se o OE e o seu subproduto, o hidrolato, também podendo ser designado por água floral, sendo este último uma solução aquosa dos destilados a vapor, derivados das estruturas anteriormente mencionadas. Porém, segundo a literatura, o método de produção de ambos os extratos influencia significativamente a composição destes e dos seus respetivos ingredientes. Além disso, a eficácia do hidrolato é comumente atribuída à presença de grupos carbonilos na fração volátil desse extrato (110).

v. Constituição Química

Durante todos os anos de interesse científico por esta planta, vários compostos químicos já foram isolados e estudados, entre os quais se encontram as classes de monoterpenos, catequinas, taninos, galactosídeos e ácidos fenólicos.

A composição da fração volátil presente no OE, obtido pelo respetivo processo de destilação, consiste em cerca de 175 compostos nas folhas e 168 na casca. O óleo proveniente da casca contém quantidades significativamente maiores de

fenilpropanóides e sesquiterpenóides, comparativamente com o das folhas que contêm quantidades mais elevadas de monoterpenóides (115).

Dentro da classe dos compostos monoterpénicos, destaca-se os seguintes compostos: geraniol, linalol e carvacrol. No que diz respeito aos taninos, os compostos ácido gálico, hamamelitanino hidrolisável e proantocianidinas condensadas são considerados como os principais compostos ativos, encontrados nas folhas e na casca de *Hamamelis virginiana* (108,109,115,116). Nas folhas, normalmente estão presentes até 3%, enquanto a casca (nomeadamente dos caules) contém entre 4 e 12%. Tanto os taninos hidrolisáveis, como os condensados, estão presentes nestas estruturas vegetais, sendo estes últimos predominantes (115). O significativo teor de taninos e outros compostos fenólicos é o principal responsável pela sua ampla utilização em tratamentos a nível dérmico (107,108,115).

vi. Atividades Biológicas

Segundo a literatura, a espécie *Hamamelis virginiana* tem sido intensamente estudada para conhecimento das suas atividades biológicas, entre as quais se encontram as seguidamente apresentadas na tabela 7 (91,106-108,112,115,116). Devido a todas as suas propriedades, esta espécie botânica tem vindo a ser comumente aplicada em produtos para o tratamento de diferentes distúrbios dermatológicos e feridas. Além disso, a hamamelis pode ser consumida na forma de infusão e já tem sido incluída em maquilhagem, formulações hidratantes da pele, capilares, de higiene oral e para utilização em bebés (38,106,107,115-117).

Na indústria farmacêutica, em meados do século XIX, esta espécie estava disponível nas farmácias americanas. Posto isto, desde o início dos anos 80 até agora, a FDA incluiu um dos seus extratos em produtos farmacêuticos de venda livre (anorretais, analgésicos externos e dermatológicos). Passados uns anos, a FDA publicou monografias relacionadas com certos tipos de fármacos, onde se encontrava relatado que esse extrato de *Hamamelis virginiana* podia ser considerado como um ingrediente ativo adstringente com segurança e eficácia. Neste campo, ainda na década de 1830, houve a preparação de uma pomada adstringente, a partir de um extrato da casca de hamamelis, e posteriormente, também uma decocção desta espécie para aplicação tópica. No final do século XX, a Comissão E alemã aprovou o uso de folha e casca de hamamelis (*Hamamelidis folium et cortex*) e, além disso, posteriormente, foram publicadas várias monografias pela OMS e pela EMA acerca desta espécie. Devido ao seu estado regulatório de longa data em diversos países, aprovado para produtos farmacêuticos, e a sua

utilização popular em produtos cosméticos naturais, a procura da população humana por hamamelis provavelmente continuará a crescer (38,59-61,67,69,71,118).

Tabela 3 – Tabela representativa de algumas propriedades biológicas da espécie *Hamamelis virginiana*

Adstringente	Anti-hemorrágica	Conservante
Anódina	Anti-inflamatória	Estomacal
Anticancerígena	Antimicrobiana	Fotoprotetora
Antidiarreica	Antioxidante	Sedativa
Anti-eritema	Antisséptica	Tónica
Antiflogística	Cardioprotetora	Vasoconstritora

II. *Matricaria chamomilla*

As denominações *Matricaria chamomilla* L. e *M. recutita* L. foram as primeiras classificações taxonómicas da camomila, estabelecidas por Linnaeus em 1753. O nome científico atualmente aceite é *Matricaria recutita*, embora *Chamomilla recutita* e, em menor grau, *Matricaria chamomilla* ainda sejam nomes comumente mencionados na literatura (32).

A Camomila, um membro da família das margaridas e comumente referida como a “estrela entre as espécies medicinais”, é uma planta medicinal bem conhecida na medicina popular e tradicional, cultivada e bem documentada em todo o mundo (36, 72,73). Durante a antiguidade, mais propriamente no antigo Egipto, foi uma das plantas amplamente utilizadas como ingredientes básicos da maioria dos perfumes (8). Esta é a quinta planta mais vendida mundialmente, sendo normalmente considerada uma espécie diploide ($2n = 18$) e alogâmica na natureza (36). O uso da camomila como planta medicinal remonta à Grécia e Roma antigas, sendo que a designação “camomila” é proveniente de duas palavras gregas (*chamos* e *melos*) que significam “solo” e “maçã”, devido a apresentarem um crescimento lento e ao facto de o cheiro das flores de camomila fazer lembrar algumas variedades de maçã (39,73,74). Já o nome latino *recutitus* refere-se às pétalas da planta, significando truncadas ou aparadas (74). Nesse sentido, esta planta apresenta propriedades organoléticas características, como um odor agradável e aromático, tal como um sabor ligeiramente amargo (75).

Tendo isto em conta, os seus valores significativos, a nível terapêutico, fitoquímico, cosmético e nutricional, foram estabelecidos através de várias décadas de uso e pesquisa tradicionais e científicos (32,36,40). Ainda assim, a sua utilização continua em constante crescimento em diversas indústrias, como: farmacêutica, cosmética, perfumaria, sanitária e alimentar (32,39).

É de salientar que o Painel de Especialistas em Revisão de Ingredientes Cosméticos deferiu quanto à segurança dos ingredientes derivados de camomila (nomeadamente o OE das flores ou outros extratos), para serem utilizados em cosméticos, principalmente não sensibilizantes (76). Para além disso, é conhecido que a *Matricaria chamomilla* está listada entre as especiarias e aromas naturais geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, do inglês *Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (38,74,76). Contudo, atualmente, está a fazer-se um longo percurso entre as descobertas científicas e as suas aplicações nas indústrias, criando a perspetiva de que novos produtos à base de camomila, futuramente, possam chegar ao mercado (32).



Figura 6 – Fotografia da espécie botânica *Matricaria chamomilla* (Fonte: Projeto InovEP)

i. Taxonomia e Filogenia

A ordem Asterales, pertencente ao reino Plantae, apresenta várias famílias botânicas, entre as quais se destaca a Asteraceae (tabela 2). Por sua vez, a família Asteraceae (anteriormente conhecida por Compositae) é a maioritária do reino vegetal, considerada como muito abundante e diversa, na qual as plantas são as mais amplamente distribuídas, relativamente a todas as famílias de angiospermas. Posto isto, as plantas pertencentes a esta família são normalmente consideradas como angiospérmicas, mais especificamente dicotiledóneas. Inclui cerca de 1400 géneros e mais de 25000 espécies, formando aproximadamente 10% da totalidade de plantas com flores. Esta família

apresenta caracteres taxonômicos característicos, sendo que os seus membros são geralmente ervas de hábitos anulares ou perenes. Quanto às flores, são agrupadas em cabeças, conhecidas como “capítulos”, rodeadas por involúcros. Existem os seguintes 2 tipos de flores: tubulares (principalmente hermafrodita) e liguladas (principalmente fêmeas) (73,77).

O género *Matricaria* é considerado como difundido em plantas com flores da família Asteraceae, compreendendo plantas com vários metabolitos secundários de natureza química diferente, os quais se encontram presentes principalmente na espécie *Matricaria chamomilla*, comumente conhecida por camomila alemã (39,77). O nome *Matricaria* vem do latim *matrix*, o qual significa útero, derivando da sua aplicação como produto fitoterápico para problemas associados ao ciclo menstrual e aborto (39). Este género inclui 256 nomes científicos de espécies botânicas, onde pelo menos 26 são aceites e geralmente, nos dias de hoje, utilizadas a nível mundial para o tratamento de diversas patologias (32).

As camomilas alemã (*Matricaria recutita*) e romana (*Chamaemelum nobile*) são as duas espécies mais utilizadas para várias aplicações, há mais de milhares de anos. São geralmente confundidas, as quais apresentam teoricamente morfologia, propriedades químicas e efeitos semelhantes no organismo humano, embora o efeito da primeira espécie mencionada possa ser mais potente, segundo a literatura. Também devido a isto, a camomila alemã continua a ser a espécie com maior interesse por parte da comunidade científica e a mais amplamente cultivada (32,35,73,74,78).

Tabela 4 – Organização taxonômica da planta *Matricaria chamomilla*

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	Magnoliophytina (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Asterales
Família	Asteraceae
Género	<i>Matricaria</i>
Espécie	<i>Matricaria recutita</i>

ii. Distribuição Geográfica

A *Matricaria chamomilla* é descrita como uma planta nativa do sul e leste da Europa, Ásia Ocidental e norte de África (32,36,40). Amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais, crescendo livremente em todos os lugares, sendo mais comum em regiões temperadas dos continentes Europa, Ásia, América e África (73,75,79).

A camomila alemã pode ser cultivada em qualquer tipo de solo, mas o mais importante é o facto de que a temperatura e as condições de luz são características com uma elevada influência nos seus extratos e no respetivo conteúdo de constituintes químicos (36,39).

iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva

A *Matricaria chamomilla* é uma planta anual com um crescimento de até 50 centímetros, apresentando folhagem emplumada com flores parecidas com margaridas. Essas estruturas florais da planta são perfumadas, contrariamente à folhagem (73). As folhas da camomila, além de longas e estreitas, são bitripinadas e alternadas, com secções lineares estreitas e pontiagudas (36,74). Quanto às flores da espécie *Matricaria chamomilla* (figura 5) apresentam, geralmente, um diâmetro entre 10 e 30 milímetros, sendo consideradas como pedunculadas e heterogâmicas. Em geral, após serem colhidas, são sujeitas ao processo de secagem a uma temperatura entre os 35 e 38°C, durante um certo período de tempo (36,39). Os principais constituintes presentes nas flores de camomila alemã incluem diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, cumarinas e dicicloéteres. Existem dois tipos de flores encontradas na espécie *Matricaria chamomilla*: tubulares e liguladas (79). As flores tubulares são compostas por 5 dentes, com uma coloração amarela e um comprimento entre 1,5 e 2,5 milímetros, as quais, em geral, terminam no tubo glandular (36,79). As flores liguladas apresentam o cheiro típico de *Matricaria chamomilla* e contêm um maior teor de cumarinas, em comparação com outras partes das estruturas florais (5,74).

Ainda nas estruturas florais desta espécie, existe o carpelo floral que corresponde à estrutura de maior interesse comercial, devido a ser a estrutura responsável pelo armazenamento do OE (0,24 – 2,0 %) nos seus canais secretores e glândulas multicelulares. Para além disso, o carpelo normalmente possui os compostos bioativos não voláteis, o que destaca a sua utilização no processo de desenvolvimento de diversos produtos (32,79). Contudo, é de realçar que as estruturas secretoras das plantas pertencentes à família Asteraceae, normalmente, podem ser internas ou externas, tais como: os canais e os tricomas, respetivamente (79). Para além disso, na fase inicial de

crescimento, apresenta-se na forma plana e, posteriormente, fica na forma cônica oca, sendo esta última uma característica distintiva com extrema importância do género *Matricaria* (36,79).

iv. Tipos de extratos

O efeito farmacológico da planta está principalmente relacionado com o seu OE, o qual é amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (73,76). Contudo, o uso desse extrato para o desenvolvimento de produtos dermatológicos é limitado, possivelmente devido ao facto de ser constituído por compostos física e quimicamente instáveis (32). Além disso, o OE, entre outros extratos de camomila, podem ser adicionados às formulações orais, capilares ou tópicos, tendo diversas funções (80).

Geralmente, o uso mais comum da camomila como ingrediente cosmético é na forma de extratos provenientes das flores, os quais estão sendo relatados para produtos sem enxaguamento (76). Apesar de todos os produtos, as formulações de aplicação tópica predominaram relativamente às de aplicação oral (32). Contudo, na generalidade da população, a utilização mais comum da camomila é na forma de infusão ou tónico (73).

O OE e o seu subproduto são normalmente obtidos a partir de inflorescências, frescas ou secas, pelo processo de destilação a vapor ou hidrodestilação, tendo normalmente um rendimento baixo de OE (entre 0,3 e 1,5 %) (5,32,39,79). As flores são os principais órgãos da produção de OE, apesar de o caule, as folhas e a raiz também o conterem (5,36). O OE é considerado como um líquido viscoso, com uma coloração azul, um intenso odor e sabor herbáceo característico, apresentando uma elevada percentagem de sesquiterpenos. Mesmo com ligeiras diferenças por ser uma solução mais diluída, o hidrolato normalmente partilha algumas características do OE, mesmo que seja com uma menor intensidade (11,32,39,79). Dentro dos extratos desta planta, encontram-se também incluídos os extratos metanólicos, os quais possivelmente são mais ricos em fenóis, contribuindo assim para a sua maior atividade antioxidante, comparativamente com o OE (5).

v. Constituição Química

De acordo com o que se encontra descrito na literatura, a espécie botânica *Matricaria chamomilla* contém um amplo grupo de classes de compostos ativos e terapeuticamente interessantes, numa totalidade de 120 constituintes químicos identificados, por

cromatografia gasosa, como metabolitos secundários. Nessa globalidade de compostos, encontram-se os terpenóides e os flavonoides como classes químicas principais, estando normalmente em quantidades maioritárias (36,39,73). Para além dessas classes predominantes, os espiroéteres e as cumarinas também podem ser responsáveis, em parte, pela ampla gama de atividades biológicas da planta (39).

Dentro dos terpenóides, os compostos destacados são α -bisabolol, chamazuleno, (E)- β -farneseno e óxidos de α -bisabolol A e B (35,38,79,81). Os compostos apigenina, luteolina, quercetina e rutina encontram-se na classe de flavonoides, os quais são os principais constituintes hidrofílicos presentes na flor de *Matricaria chamomilla*, assim como as cumarinas (76,80,81). Embora em quantidades menores do que as classes anteriormente mencionadas, dentro da classe de cumarinas, realça-se a umbeliferona e o seu éter metílico, denominado por herniarina (38,81). Estes derivados cumarínicos são frequentemente encontrados nos vários extratos de *Matricaria chamomilla*, sendo que, em geral, a umbeliferona está presente em níveis mais elevados nas folhas, enquanto nas flores é a herniarina (5).

vi. Atividades Biológicas

Ao longo de vários anos, inúmeras ações biológicas e farmacológicas têm sido atribuídas a esta espécie, dentro das quais se destacam as que se encontram apresentadas na tabela 3. É importante realçar que esta eficácia terapêutica é devida principalmente à combinação dos possíveis efeitos dos diversos constituintes da camomila (11,32,35,36,39,40,73,77). Assim, os campos de aplicação dos produtos à base de camomila incluem: dermatologia, estomatologia, otorrinolaringologia e medicina interna, particularmente em gastroenterologia, pneumologia, pediatria e radioterapia (5).

Tabela 5 – Tabela representativa de algumas propriedades biológicas da espécie *Matricaria chamomilla*

Analgésica	Antidiarreica	Antipruriginosa	Hepatoprotetora
Angiogénica	Antiespasmódica	Carminativa	Hipoglicémica
Ansiolítica	Anti-inflamatória	Cicatrizante	Hidratante
Antialérgica	Antimicrobiana	Dermatológica	Imunomoduladora
Anticancerígena	Antioxidante	Desodorizante	Lubrificante
Antidepressiva	Antiplaquetária	Emenagoga	Uterotónica

Tendo em conta a extensa variedade de atividades biológicas desta planta, é possível inferir que a camomila pode ter um papel significativo na manutenção da saúde e no tratamento de determinadas patologias (39,40,74,77). Nesse sentido, a planta possui um grande valor económico e uma intensa procura nos países europeus (36). Paralelamente, a Comissão Alemã E aprovou a utilização da camomila para problemas do trato gastrointestinal e respiratório e, externamente, para doenças bacterianas da pele e das mucosas (38).

III. *Ocimum basilicum* L.

O *Ocimum basilicum* L., comumente denominado como manjeriço doce, é uma planta herbácea frequentemente conhecida pela sua importância ornamental e terapêutica (34, 82,83). No seu país de origem, é cultivado desde os tempos antigos, pelas suas fortes associações religiosas e espirituais e, tal como nos dias de hoje, era também utilizado como ingrediente de fragâncias, formulações capilares e produtos de saúde oral e dentária (7,81,84,85).

A ampla gama de estudos sobre a espécie botânica em questão demonstra que esta é muito benéfica para o aprimoramento das formulações atuais e que, futuramente, mais pesquisas científicas podem ser feitas com o intuito de se tirar proveito das suas potenciais qualidades curativas e até comprovar a sua possível utilidade no sistema de saúde à base de plantas, o qual se encontra em ascensão novamente com o passar dos anos (34,82,84). Devido à considerável diversidade intraespecífica, as variedades desta planta diferem no tamanho, forma e cor das folhas, bem como no odor e na composição química (28,81).

Desde há muito tempo, o *Ocimum basilicum* tem sido utilizado tradicionalmente para o tratamento de diversos problemas de saúde. Para além disso, também é cultivado para produção de OE, utilização das suas folhas secas como condimento, especiaria culinária ou infusão, ou como planta ornamental (7,82,85,86). No caso da indústria alimentar, a utilização da planta como tempero ou aromatizante natural, tal como o OE e restantes extratos, foi considerada como GRAS (27,81).



Figura 7 – Fotografia da espécie botânica *Ocimum basilicum* (Fonte: Projeto InovEP)

i. Taxonomia e Filogenia

A ordem Lamiales, pertencente ao reino Plantae, apresenta um vasto número de famílias botânicas, entre as quais se destaca a Lamiaceae (tabela 4). O manjerição doce está presente na família Lamiaceae, antigamente designada por Labiatae, a qual é uma das famílias de plantas mais extensivamente estudadas e conhecidas pelos seus efeitos benéficos para a saúde (20,34,81,86,87). Segundo o que se encontra descrito na literatura, as plantas pertencentes a esta família são normalmente classificadas como dicotiledóneas, estando disponível em várias regiões do mundo (17).

O género *Ocimum*, considerado um dos maiores géneros da família Lamiaceae, apresenta uma designação proveniente do termo grego *ozo* que significa cheiro, sendo esta apropriada para as suas várias espécies, uma vez que são conhecidas pelos seus odores fortes e peculiares (34). É notório por ser composto por mais de 150 espécies, as quais estão entre a classe de plantas aromáticas consideradas como ricas fontes de OE (7,84,88,89).

A elevada variabilidade do género *Ocimum* inclui diferentes parâmetros da planta, como: morfologia, cor das flores, hábitos de crescimento, composição química, folhas e caules (90-92). Contudo, o *Ocimum basilicum* é a espécie botânica com maior importância, entre todos os *Ocimum* spp (93).

A espécie da planta é *basilicum*, onde esse termo é a tradução latina da palavra grega *basileus*, a qual significa rei (34,82,90). Além disto, é denominado como o “rei das ervas”, devido a conter uma ampla diversidade de compostos fitoquímicos com importantes capacidades nutricionais, antioxidantes e benéficas para a saúde (7). Esta espécie apresenta uma heterogeneidade significativa, a nível morfológico e químico, dividindo-

se em diversas variedades com dificuldade em serem diferenciadas (tal como: *O. basilicum* var. *basilicum*, *O. basilicum* var. *missshapen* Benth. ou *O. basilicum* var. *glabratum* Benth.) (12).

Tabela 6 – Organização taxonômica da planta *Ocimum basilicum*

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	Magnoliophytina (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Lamiidae
Ordem	Lamiales
Família	Lamiaceae
Subfamília	Nepetoideae
Gênero	<i>Ocimum</i>
Espécie	<i>Ocimum basilicum</i>

ii. Distribuição Geográfica

A origem da espécie *Ocimum basilicum* teve relacionada com o continente asiático, mais concretamente nos locais mais quentes e tropicais das regiões indo-malaias (7,34, 81,82,93).

Nos dias de hoje, esta planta é cultivada e apresenta um bom crescimento em diversas regiões do mundo, nomeadamente em climas tropicais e temperados nos continentes de América, Europa e África (7,28,82,89). O crescimento desta espécie ocorre principalmente de forma indígena, o qual pode ser fortemente afetado por fatores ambientais alterados (como temperatura, localização geográfica, solo) (87). Uma das grandes razões para o seu significativo cultivo, a nível mundial, é a produção do respetivo OE (93).

iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva

O *Ocimum basilicum* é uma planta anual, autógama e aromática, sendo conhecida por ser um pequeno arbusto perene com ramificações eretas de tamanho médio. Normalmente, tem um perfil pubescente da base para a parte superior da planta, crescendo entre 0,1 e 1,3 metros de altura (94,95).

Os seus caules são normalmente descritos como espessos, eretos e herbáceos, apresentando ramificações em todos os lados com 2 folhas em cada junta. Estas estruturas são obtusamente quadrangulares (94,95). Já as folhas de manjeriço (figura 6) são simples, inteiras, sedosas, opostas entre si, ovais com margens ligeiramente onduladas e dentadas, tendo, em geral, uma coloração verde brilhante e uma forte característica aromática. Em ambos os lados das folhas, encontram-se os pêlos glandulares e não glandulares, sendo que os primeiros mencionados contêm numerosas glândulas sebáceas responsáveis pelo armazenamento do OE (7,34,41,85). Por vezes, as folhas podem apresentar propriedades organoléticas significativas, entre o carácter doce e o picante (96). Contudo, normalmente, as estruturas secretoras da família Lamiaceae, onde se encontra incluída a espécie *Ocimum basilicum*, são externas, mais propriamente nas partes da planta designadas por tricomas (97).

As flores de manjeriço, mais especificamente as suas inflorescências, têm carácter aromático e encontram-se na forma de círculos, estando dispostas numa ponta terminal, normalmente em cachos constituídos por várias flores, dando origem aos verticilastros. As suas pétalas podem ter uma coloração branca, rosa ou roxa e, na parte externa, contêm as sépalas, as quais permanecem fundidas num cálice bilabial. No processo de cultivo, as flores são normalmente removidas para promover o aumento de rendimento das folhas de manjeriço. Quando o manjeriço é cultivado para utilização posterior das suas folhas secas e extração do OE, em geral, a planta é colhida imediatamente antes do aparecimento das flores (7,34,85,92,94,95).

iv. Tipos de extratos

Dentro dos extratos da espécie *Ocimum basilicum* mais comumente conhecidos, destacam-se o extrato hidroalcoólico, o OE e o subproduto do seu processo de destilação, designado por hidrolato. Para a preparação dos diversos tipos de extratos, as partes das plantas comumente utilizadas são as partes aéreas, nomeadamente as folhas e inflorescências (34,81,84).

O processo de secagem do *Ocimum basilicum* tem o potencial de redução do crescimento microbiano e evita algumas reações bioquímicas. Contudo, tanto esse processo como o de armazenamento, podem dar origem a uma série de modificações físico-químicas negativas na qualidade da planta e dos respetivos extratos. Segundo estudos relatados na literatura, nessas etapas, a perda de OE pode dever-se principalmente à sua evaporação, através de diminuições significativas dos compostos maioritários, e há a possibilidade de

ocorrer uma reação de hidrólise, o que pode levar ao aumento do conteúdo de monoterpenos e sesquiterpenos (86).

O OE de manjeriço é isolado a partir do processo de hidrodestilação ou destilação a vapor da planta, a qual pode estar fresca ou seca (7,28,81,82,83,84,89). Normalmente, o seu rendimento de extração pode ser de aproximadamente 0,1 – 1,6%. Este extrato apresenta coloração amarela e uma fragância característica, sendo comumente aplicado na indústria alimentar como agente aromatizante, enquanto, na indústria de perfumes e cosméticos, é utilizado como componente das composições de fragâncias, tal como nas composições de produtos farmacêuticos. Além disso, desempenha um papel importante na aromaterapia, tal como em massagens e banho contra estados de depressão (27,41,98). No âmbito dos produtos cosméticos, o OE de *Ocimum basilicum* é, em geral, utilizado para retardar o envelhecimento da pele, mas também para promover certas condições benéficas a nível capilar (18).

Outro extrato cada vez mais utilizado trata-se do hidrolato de manjeriço, o qual tem diversas propriedades terapêuticas, estando também incluído na indústria alimentar, cosmética e na aromaterapia. O hidrolato é transparente e caracterizado por apresentar uma fragância mais delicada, comparativamente com o OE, e herbácea característica da sua planta de origem (28). Para serem aplicados como matéria-prima nas variadas indústrias, tal como para avaliar a qualidade da planta de manjeriço, é importante conhecer a composição química dos seus diferentes extratos (21).

V. Constituição Química

A composição química dos extratos de *Ocimum basilicum* é extremamente variável, devido, por exemplo, à existência de vários quimiotipos. Contudo, a totalidade de compostos já identificados e descritos na literatura é extensa, entre os quais a classe química com mais destaque é a dos monoterpenos, estando normalmente em quantidades maioritárias. Dentro desta classe, podem destacar-se os seguintes compostos: linalol, geraniol, α -terpineol, cânfora, α - e β -pineno, carvacrol, timol, entre outros. Contudo, os fenilpropanóides e flavonoides também são considerados como classes de compostos com determinada importância para os subseqüentes efeitos desta planta (7,14,20,21,28,34,41,81,84,88,89,92,94,95,99-102). A maioria destes principais componentes estão presentes nas folhas da planta de manjeriço, apesar de também poderem estar noutras estruturas vegetais (flores, caules, raízes e sementes) (103).

Apesar de ser uma planta com um histórico de utilização milenar, apenas relativamente poucos estudos destacam as possíveis questões toxicológicas da espécie *Ocimum basilicum* (103). Por isso, pode ser necessário mais estudos e precaução, quanto à segurança de certos componentes da planta de manjeriço, nomeadamente dos seus extratos, a serem aplicados em formulações para consumo humano. Dentro do campo da segurança, existem algumas preocupações relativamente à espécie botânica em questão sendo uma pequena parte desta abordada no corpo desta dissertação (27,103).

vi. Atividades Biológicas

Segundo a literatura, até aos dias de hoje, já foi atribuída uma vasta diversidade de ações farmacológicas à espécie *Ocimum basilicum*, sendo uma das plantas com maior interesse científico. Entre as atividades biológicas com maior impacto, encontram-se as apresentadas na seguinte tabela (tabela 5). Com base em todos os seus possíveis efeitos benéficos, o OE de manjeriço é comumente utilizado para o tratamento de uma ampla e variada gama de problemas de saúde, desde picadas de insetos até doenças renais, bem como do trato respiratório e a nível do sistema nervoso central (7,28,34,81,83,84,85,89,92,94,97,99,102-105). Por outro lado, as folhas e as inflorescências da planta de *Ocimum basilicum* têm sido tradicionalmente utilizadas como agentes antiespasmódicos, aromáticos, carminativos, estomacais, galactagogos e tónicos (82).

Tabela 7 – Tabela representativa de algumas propriedades biológicas da espécie *Ocimum basilicum*

Analgésica	Antineoplásica	Contracetiva	Hipotensiva
Anestésica local	Antioxidante	Despigmentante	Imunomoduladora
Ansiolítica	Antinociceptiva	Diurética	Neuroprotetora
Antiaflatoxigénica	Antipirética	Expetorante	Radioprotetora
Antiespasmódica	Antiplaquetária	Fotoprotetora	Repelente
Antiespasmódica	Broncodilatadora	Hepatoprotetora	Vasorrelaxante
Anti-inflamatória	Cardioprotetora	Hipoglicémica	
Antimicrobiana	Carminativa	Hipolipidémica	

IV. *Cupressus lusitanica*

A planta *Cupressus lusitanica* pode apresentar várias designações, entre as quais se destacam as seguintes: cipreste português, cedro-do-Buçaco, cipreste mexicano ou cedro de Goa. Foi introduzido em Portugal, há várias centenas de anos, onde, nos dias de hoje, ainda é amplamente utilizado como planta ornamental e para reflorestamento. As suas denominações comuns, ou até o seu nome mais popular como "cipreste", em vez de cedro, devem-se ao facto de a planta ter sido introduzida em Portugal, no século XVII, no antigo Convento do Buçaco (119).

Porém, apesar de ser uma espécie conhecida há vários anos, atualmente, a informação disponível na literatura sobre a mesma e os seus extratos ainda é muito escassa (120).



Figura 8 – Fotografia da espécie botânica *Cupressus lusitanica* (Fonte: Projeto InovEP)

i. Taxonomia e Filogenia

A ordem Pinales, pertencente ao filo Magnoliophyta e subsequente reino Plantae, é constituída por 6 famílias (tabela 8). Dentro destas, destaca-se a família Cupressaceae na qual as respetivas plantas são comumente classificadas como gimnospérmicas. Esta família é constituída por cerca de 70 espécies, segundo a literatura (17).

O género *Cupressus* é composto por doze espécies, as quais estão dispersas nos continentes americano, europeu e asiático, principalmente em altitudes elevadas. Contudo, a área geográfica deste género é significativamente limitada ao hemisfério norte, no qual se têm realizado vários estudos com as suas espécies (121). Dentro deste género, tem vindo a ser descrito que a classe quimiotaxonómica com maior importância

são os biflavonoides, aos quais tem sido atribuído uma distinta variedade de atividades biológicas (122).

Tabela 8– Organização taxonômica da planta *Cupressus lusitanica*

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	Coniferophytina
Classe	Pinatae
Subclasse	Pinidae
Ordem	Pinales
Família	Cupressaceae
Género	<i>Cupressus</i>
Espécie	<i>Cupressus lusitanica</i>

ii. Distribuição geográfica

A espécie botânica *Cupressus lusitanica* é uma planta classificada como conífera, sendo nativa e espontânea de regiões do México e da América Central. Nos dias de hoje, o seu crescimento ocorre essencialmente em regiões com uma temperatura média anual que varia entre 10°C e 17°C. Posto isto, esta planta é comumente encontrada na Califórnia, África Oriental, Nova Zelândia, Portugal, Espanha, França, Itália e Brasil. Em Portugal, entre os ciprestes conhecidos, *Cupressus lusitanica* é a espécie mais difundida (96).

iii. Morfologia e Biologia Reprodutiva

O *Cupressus lusitanica* trata-se de uma árvore que pode atingir vários metros de altura, conseguindo crescer em diversas regiões temperadas e tropicais de diferentes países (123). Esta espécie é de rápido crescimento, sendo vocacionada para a produção lenhosa de alta qualidade e tolera uma ampla gama de condições ambientais. Como resultado, tem sido amplamente plantada, tanto como árvore ornamental quanto para produção de madeira e celulose, em muitas regiões temperadas e subtropicais quentes a nível mundial (96,124).

O tronco desta árvore tem um perfil reto, geralmente cónico, mas de forma irregular, onde os galhos pendem com ramificações em todas as direções e crescem até 35 metros de altura (125). Esta estrutura apresenta um cerne (parte interna) amarelo-dourado ou

acastanhado e borne (parte externa) amarelo, enquanto a casca contém sulcos verticais que, ao longo do seu ciclo de vida, ficam com uma coloração cinzenta (96,124,125).

Ao longo do seu crescimento e subsequente envelhecimento, a forma da copa desta árvore vai sofrendo alterações de cônica para uma forma mais plana. O *Cupressus lusitanica* é considerada como uma espécie monoica, apresentando flores com carácter bissexual, sendo estas estruturas vegetais classificadas como hermafroditas. Para além disso, as suas folhas (figura 8) apresentam características distintas de outras espécies, as quais são normalmente pequenas, aguçadas e escamiformes, com uma coloração verde-azulada. A sua folhagem tem carácter persistente, o permite classificar esta árvore como perenifólia (125,126).

Quanto aos frutos, devido a ser uma espécie gimnospérmica, não tem verdadeiros frutos. Contudo, apresenta os estróbilos que, neste caso, podem ser femininos e masculinos. Os estróbilos femininos, quando sofrem maturação após a polinização, têm a capacidade de formar estruturas globosas de coloração castanha com saliências pontiagudas centrais, tendo cerca de 2 centímetros de diâmetro (125,126).

iv. Tipos de extratos

Normalmente, as partes mais utilizadas desta planta são as folhas e o respetivo OE, embora também se possa recorrer aos frutos. Tanto as folhas, como o OE, podem ser aplicados em diversas situações, mas principalmente relacionadas com o sistema respiratório e a nível dérmico. Posto isto, a nível mundial, a espécie botânica *Cupressus lusitanica* tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional, desde há vários séculos (123,125).

O OE de *Cupressus lusitanica* é normalmente extraído das suas folhas e da sua casca, através de destilação a vapor, apresentando uma coloração clara e um odor fresco (125). Este extrato tem sido relatado, com significância, como adjuvante em variadas formulações cosméticas e de higiene pessoal, tendo por isso a aromaterapia e a indústria cosmética como uma das suas maiores áreas de aplicação (125,127). Para além do OE, ao longo dos anos, também têm vindo a ser conhecidos outros tipos de extratos desta espécie botânica, nomeadamente: hidrolato, extrato aquoso e extrato etanólico (125).

V. Constituição Química

(Kuiate et al., 2006) relatam que, aquando da análise química de algumas amostras do OE de *Cupressus lusitanica*, conseguiram comprovar a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos nesse extrato, tendo o abietadieno como um possível componente maioritário (123,128). Para além deste, dependendo de diversos fatores, também já foram identificados, e subsequentemente descritos na literatura, outros compostos, normalmente minoritários, como: α - e β -pineno, umbelulona, sabineno, limoneno, germacreno, terpinen-4-ol, entre outros (119). Contudo, segundo (Bett, 2016), puderam ser identificados cerca de 68 compostos no OE de *Cupressus lusitanica*, onde, por sua vez, os principais constituintes foram: umbelulona, α -pineno, sabineno e limoneno (129).

Ainda assim, tal como se consegue depreender pela informação anteriormente descrita, o OE de cipreste apresenta significativas variações na sua composição, o que também tem sido relatado em diversas revisões bibliográficas. Contudo, há indícios de que a composição deste extrato pode variar consoante o ambiente ecológico da planta, bem como o seu estado fisiológico. Mesmo assim, apesar de alguma controvérsia quanto à representatividade dos compostos neste extrato, por comparação entre as diferentes classes químicas, foi possível concluir que o OE de cipreste é maioritariamente constituído por monoterpenos oxigenados. Para além desses, como já foi referido, outra classe química com destaque no género *Cupressus* são os biflavonoides, os quais podem ser os responsáveis por algumas das atividades biológicas já descritas para a espécie botânica *Cupressus lusitanica* (123,128). Acerca destes compostos raramente estudados, (Gadek & Quinn, 1985) relataram, pela primeira vez, a presença de mentoflavona e cupresuflavona nas folhas de diferentes espécies pertencentes ao género *Cupressus*, entre as quais estava incluída a de *Cupressus lusitanica* (122,130).

VI. Atividades Biológicas

Os ciprestes, nos quais se encontra incluído o *Cupressus lusitanica*, têm sido amplamente utilizados na prática da medicina popular, principalmente devido à gama de atividades biológicas que apresenta, como se encontra apresentado na tabela 9 (122,123,131).

Tabela 9 – Tabela representativa de possíveis propriedades biológicas da espécie *Cupressus lusitanica*

Adstringente	Antiparasitária	Estrogénica
Antibacteriana	Antisséptica	Expetorante
Anticoagulante	Antitússica	Hemostática
Antiespasmódica	Antiviral	Hepatoprotetora
Antifúngica	Cicatrizante	Hipoglicémica
Anti-inflamatória	Dermatológica	Inseticida
Antioxidante	Diurética	Vasodilatadora

1.5. Objetivo Geral

Esta dissertação e a totalidade do respetivo trabalho laboratorial desenvolvido têm como principal objetivo avaliar a segurança de dois tipos de extratos de plantas de quatro espécies botânicas diferentes, nomeadamente: o hidrolato de *Matricaria chamomilla*, o hidrolato e o OE de *Ocimum basilicum*, o hidrolato de *Hamamelis virginiana* e o OE de *Cupressus lusitanica*. Esta avaliação da segurança teve como fim a determinação de quais os extratos de plantas com potencial de interesse para uma futura possível aplicação no processo de desenvolvimento de produtos cosméticos e farmacêuticos.

No presente trabalho, os óleos essenciais de *Hamamelis virginiana* e *Matricaria chamomilla* não foram estudados, devido ao seu rendimento de extração ser significativamente baixo. Por outro lado, o hidrolato de *Cupressus lusitanica* já tinha sido previamente estudado no âmbito de outra dissertação.

Nesse sentido, a fim de alcançar o objetivo geral mencionado anteriormente, foram delineados os seguintes objetivos mais detalhados:

- Caracterização química dos extratos de plantas;
- Avaliação *in vitro* do potencial genotóxico, mais especificamente ao nível da mutagenicidade, através do teste de mutação reversa bacteriana com as estirpes de *Salmonella typhimurium* TA98 (CCM 3811) e TA100 (CCM 3812).
- Determinação *in vitro* da atividade citotóxica dos extratos, recorrendo ao ensaio colorimétrico de MTT, numa linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT, ATCC-CCS-300493).

Os processos de enriquecimento, tanto teórico como prático, foram também considerados como objetivos atingidos, embora adicionais, mas, indispensavelmente relacionados com o trabalho laboratorial.

2. Componente Experimental

2.1. Extratos em estudo

Os cinco extratos de plantas, três hidrolatos e dois óleos essenciais, foram adquiridos do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI), pertencente ao Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal.

Ao longo desta dissertação, as seguintes siglas dos diferentes extratos serão adotadas:

- Hidrolato das folhas de *Hamamelis virginiana*: H-HV;
- Hidrolato das flores de *Matricaria chamomilla*: H-MC;
- Hidrolato das folhas de *Ocimum basilicum*: H-OB;
- Óleo Essencial das folhas de *Cupressus lusitanica*: OE-CL.
- Óleo Essencial das folhas de *Ocimum basilicum*: OE-OB;

2.2. Caracterização Fitoquímica

I. Objetivo

O presente capítulo tem como objetivo caracterizar quimicamente os diferentes extratos de plantas em estudo, através do método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, com o intuito de se poder correlacionar a composição dos extratos com os respetivos parâmetros de segurança estudados.

II. Materiais e Métodos

O perfil volátil dos diferentes extratos em estudo foi obtido através do método de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC-MS SCION-SQ 456 GC, Bruker), cuja identificação e análise foram cedidas pelo centro produtor (CBP-BI). Os respetivos cromatogramas e as tabelas com os diferentes compostos identificados encontram-se apresentados no anexo II e serão analisados ao longo deste capítulo.

III. Resultados e Discussão

Os cinco extratos de plantas foram submetidos à análise da sua composição química, através do método de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massa. Os resultados obtidos neste processo de caracterização encontram-se representados na tabela 10, estando expressos em percentagem da área relativa do pico do composto, relativamente à área total dos picos identificados na amostra.

Tabela 10 – Compostos maioritários presentes em cada um dos extratos de plantas em estudo. A % de área relativa representa a quantidade relativa do respetivo composto, tendo sido obtida a partir da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Extrato de Planta	Nome do composto	% Área relativa
Hidrolato de <i>H. virginiana</i>	Carvacrol	26,80%
Hidrolato de <i>M. chamomilla</i>	Óxido de bisabolol A	80,67%
Hidrolato de <i>O. basilicum</i>	Eugenol	52,53%
OE de <i>C. lusitanica</i>	Sabineno	19,01%
OE de <i>O. basilicum</i>	Linalol	67,57%

Relativamente à composição química do hidrolato de *Hamamelis virginiana*, foram identificados onze [11] compostos na sua fração volátil, nos quais o composto maioritário foi o carvacrol, representando 26,80% dos compostos totais presentes nesse extrato. Este composto é classificado como um monoterpénóide fenólico, o qual possui uma vasta gama de propriedades biológicas com utilidade terapêutica. Para além disso, em quantidades inferiores, representando 14,80% e 10,87%, destacaram-se também o α -terpineol e o éster 2-metil-3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentil de ácido propanoico, respetivamente (19). Segundo a literatura, o carvacrol é normalmente descrito como um dos principais compostos presentes no OE de *Hamamelis virginiana*. Como se encontra mencionado anteriormente, a fração mais importante de compostos presentes nas folhas desta espécie botânica, parte utilizada para a produção do extrato em estudo, normalmente corresponde aos taninos, o que não corrobora com o resultado obtido. Contudo, devido ao hidrolato ser um subproduto do processo de destilação do OE, a quantidade significativa de carvacrol pode estar relacionada com as quantidades vestigiais de OE presentes no hidrolato (107). O carvacrol tem vindo a ser reconhecido como o composto responsável por diversas atividades biológicas da espécie botânica

Hamamelis virginiana, nomeadamente: anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante (19).

No hidrolato de *Matricaria chamomilla*, através da sua caracterização química, é nos possível afirmar que o óxido de bisabolol A foi considerado como o seu composto maioritário, a 80,67%, num total de dez [10] compostos identificados. Os restantes compostos identificados encontravam-se em quantidades significativamente inferiores. O óxido de bisabolol A é um sesquiterpenóide, presente em diversas espécies botânicas, sendo frequentemente encontrado na espécie de *Matricaria chamomilla*. Por isso, muitas das atividades biológicas já conhecidas para esta espécie estão relacionadas com a presença deste composto, entre as quais se destacam as seguintes atividades: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (40,73,77).

Quanto ao hidrolato de *Ocimum basilicum*, o composto presente em maior quantidade (52,53%), tendo sido considerado como maioritário, foi o eugenol. Porém, neste extrato, conseguiu-se identificar um total de sete [7] compostos, dos quais se destaca também o linalol, estando presente numa quantidade significativa (38,34%), relativamente aos compostos totais. Na totalidade de compostos identificados no H-OB, embora em percentagens relativas consideravelmente inferiores, encontram-se ainda os seguintes: eucaliptol, α -terpineol, cânfora, entre outros. Como seria esperado, alguns destes compostos foram também identificados no OE de *Ocimum basilicum*, o qual continha maioritariamente o linalol (67,57%). Dentro da totalidade de compostos identificados (27 compostos), destacou-se, em percentagens inferiores, o eucaliptol (9,33%), o α -bergamoteno (6,61%) e o eugenol (6,09%). O eugenol é considerado como um fenilpropanóide, podendo a sua presença ter correlação com a coloração amarela-clara a incolor que os dois extratos em estudo de *Ocimum basilicum* apresentam (11). Segundo o que se encontra descrito na literatura, este composto é normalmente encontrado em baixas concentrações no OE desta espécie botânica, o que corrobora com os resultados do processo de caracterização química de ambos os extratos, sendo que está presente em concentrações significativamente inferiores no OE, comparativamente com a sua presença no hidrolato (11). Relativamente ao linalol, é normalmente classificado como um álcool monoterpénico, sendo encontrado em diversas especiarias, flores e os seus respetivos OE. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com muitos dos estudos referenciados na literatura, nos quais o linalol tem vindo a ser reconhecido como um dos principais componentes do OE-OB. Dentro da classe dos monoterpenos, também se encontra o eucaliptol, comumente designado por 1,8-cineol, estando este relacionado com algumas das atividades biológicas conhecidas para esta espécie botânica (11,89).

Segundo (Baritoux et al., 1992), os principais constituintes encontrados na espécie de *Ocimum basilicum* são produzidos por duas vias bioquímicas diferentes, nomeadamente: os fenilpropanóides (como eugenol) pela via do ácido chiquímico e os terpenos (como linalol e eucaliptol) a partir da via do ácido mevalónico, tendo como origem o precursor formado IPP (Pirofosfato de isopentenilo) (21,86). Porém, na totalidade de compostos presentes, aqueles que foram identificados em maiores percentagens são os responsáveis pelo carácter aromático da planta, nomeadamente encontrado nas suas folhas e caules, e dos seus respetivos extratos (41,88).

No OE de *Cupressus lusitanica*, foram identificados vinte e nove [29] compostos, nos quais o sabineno foi considerado como composto maioritário numa concentração de 19,01%, em relação à totalidade de compostos presentes. Por sua vez, dois do total de compostos foram também identificados em concentrações significativamente elevadas, nomeadamente: terpineno-4-ol (17,16%) e D-limoneno (12,41%). O sabineno trata-se de um monoterpeno bicíclico, presente nos OE de várias plantas, sendo, muitas vezes, responsável pelo odor agradável desses extratos (121). A partir dos resultados obtidos no processo de caracterização química da espécie botânica de *Cupressus lusitanica*, constatou-se que os mesmos correspondem às informações já descritas na literatura, ao nível dos principais compostos normalmente presentes nesta espécie botânica (119).

2.3. Teste de Mutação Reversa Bacteriana

I. Objetivo

O presente capítulo tem como objetivo determinar a possível atividade mutagénica e genotóxica *in vitro* dos extratos de plantas em estudo, nomeadamente hidrolatos e OE, através da análise da capacidade que as bactérias têm em reverter muta es, após serem expostas aos mesmos. Para isso, procedeu-se   implementa o do teste de muta o reversa bacteriana no laboratório, conforme descrito na diretriz OCDE 471, permitindo assim a subsequente avalia o da mutagenicidade dos diferentes extratos, com base em determinados critérios.

II. Materiais e Métodos

i. Consumíveis e Equipamentos

- Agitador orbital (Aralab, Agitorb 200)
- Ansas de inocula o (1 e 10 μ L, VWR [®])
- Autoclave (A. J. Costa)
- Balanças analíticas (KERN [®], ABT 100-5M e ABJ B0-4M)
- Balanças de precisão (RADWAG [®], PS2100.R2; KERN [®], PLJ 510-3M)
- Balões *Erlenmeyer* (100 mL, NORMAX)
- Banho termostatzado (VWR [®], VWB 26)
- Câmara de fluxo laminar (BIOAIR Instruments, Aura 2000 MAC)
- Centrífuga (Sigma Laborzentrifugen GmbH, 2-16KL)
- Contador digital de col nias (J.P. SELECTA [®], Digital S)
- Tubos criog nicos (2 mL, VWR [®]; 1,8 mL, IMEC)
- *Eppendorfs* (1,5 mL, Labbox; 2 mL, AstiK's)
- Espectrofot metro UV-visível (Thermo Scientific TM, Evolution 201)
- Filtros de seringa estéreis 0,22 μ m (Branchia)
- Frascos Schott (marcas variáveis)
- Incubadora (BINDER)
- Medidor de pH (Thermo Scientific TM, Orion Star A211; Metrohm, 827 pH lab)
- Micropipetas
- Estereomicroscópio SZX7 (Olympus)
- Papel de alumínio

- Pipeta de *Pasteur*
- Pipetador automático (Levo Plus, DRAGONLAB)
- Pipetas graduadas (5 e 10 mL; NORMAX)
- Pipetas serológicas (10 e 25 mL; VWR[®])
- Placas de 96 poços (VWR[®])
- Placa de agitação com aquecimento (OVAN; J.P. SELECTA[®])
- Placas de Petri estéreis (90 mm; VWR[®], Esteriplas)
- Seringa (10 e 20 mL; B. Braun)
- Sistema de Purificação de Água Milli-Q (Merck Millipore)
- Tubos de *falcon* (15 mL, marcas variáveis; 50 mL, Labbox)
- Tubos de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (0,2 mL)
- Vórtex (RSLab)

ii. Reagentes

A Água Milli-Q[®] (Merck Millipore) foi utilizada na preparação de todos os meios de cultura e restantes soluções necessários no decorrer dos ensaios.

Os seguintes sais foram utilizados na preparação do meio *Vogel-Bonner E* (50 x): sulfato de magnésio heptahidratado (Labkem), ácido cítrico monohidratado (Panreac), fosfato de potássio dibásico (Honeywell, Fluka[™]) e fosfato de amónio de sódio.

O composto D-Glucose anidro (Fisher Scientific[™]) foi utilizado na solução de glucose (25% m/v), a qual foi, posteriormente, considerada um componente do meio agar *glucose minimal* (GM).

O Agar bacteriológico tipo E (Biokar diagnostics; GRiSP Research Solutions) foi utilizado como agente de solidificação na maioria dos meios de cultura preparados.

Os reagentes Fosfato de sódio monobásico anidro (ITW Companies, Panreac AppliChem) e Fosfato de sódio dibásico anidro (Fisher BioReagents[™]) foram utilizados na preparação da solução de tampão fosfato de sódio, tendo sido o último também considerado como componente da solução de tampão fosfato salino.

Os compostos D(+)-biotina (ITW Reagents, Panreac AppliChem) e L-histidina (ITW Reagents, Panreac AppliChem) foram utilizados para se prepararem diferentes soluções, as quais posteriormente foram adicionadas aos meios GM ou *top agar*.

O Hidróxido de sódio (LabChem) foi utilizado para se preparar a solução que dissolveu a ampicilina.

O antibiótico Ampicilina trihidratada (Alfa Aesar) foi utilizado para se verificar a presença do plasmídeo pKM101 nas estirpes, no estudo de confirmação do genótipo.

O corante Cristal violeta (AMRESCO®) foi utilizado na avaliação de confirmação do genótipo, nomeadamente na verificação da presença de mutação *rfa*.

O sal Cloreto de sódio (Fisher Scientific™) foi utilizado na preparação de meios de cultura, nomeadamente o *Oxoid nutrient broth No. 2* e o *top agar*, tal como da solução de tampão fosfato salino (PBS).

A Água peptonada (VWR Chemicals BDH Prolabo®) foi considerada como componente do meio de cultura *Oxoid nutrient broth No. 2*.

O composto Peptona de carne (Biokar diagnostics) foi utilizado na composição do meio de cultura *Oxoid nutrient broth No. 2*.

O meio de cultura líquido, designado por *Brain Heart Infusion* (BHI, Biolife Italiana srl), foi um dos meios empregues no processo de criopreservação das culturas bacterianas, onde foi adicionado o glicerol (LabChem), atuando como agente criopreservante para o armazenamento a longo prazo das estirpes.

O meio *Nutrient agar DEV* (NA DEV, VWR Chemicals BDH Prolabo®) correspondeu ao meio de cultura sólido para confirmação das condições de crescimento das culturas bacterianas descongeladas, tendo sido também utilizado como meio não seletivo no método de diluição em gota da suspensão bacteriana, ao longo dos diversos ensaios realizados.

Os compostos Azida de sódio (VWR Chemicals BDH®) e 2-nitrofluoreno (ALDRICH®) apresentam características cancerígenas e mutagénicas definidas, tendo sido utilizados como controlos positivos, a partir de uma solução *stock* a 1 mg/mL.

Os compostos Cloreto de potássio (Labkem) e Fosfato de potássio monobásico (ChemLab) foram considerados como componentes da solução de PBS.

A água ultrapura (Hikma Farmacêutica) foi utilizada como solvente dos hidrolatos, tendo sido assim considerada como controlo de solvente desses extratos, na realização do ensaio.

O Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific TM) é um solvente aprótico e de natureza anfífila, o qual foi utilizado como agente emulsificante, com o intuito de permitir a solubilização dos OE, devido a estes serem caracterizados como compostos voláteis, complexos e de carácter hidrofóbico. Por esta razão, no decorrer dos ensaios, os OE necessitaram de ser previamente diluídos em DMSO numa estequiometria de 1:2 para, posteriormente, proceder-se à preparação das diferentes concentrações de teste. Preliminarmente, foi ainda utilizado nos dois seguintes passos: como agente criopreservante das culturas bacterianas, aquando do seu processo de congelamento, e para dissolução de um dos compostos mutagénicos padrão, nomeadamente o 2-nitrofluoreno.

iii. Condições de Assepsia

Os ensaios em causa foram totalmente realizados em condições de assepsia, nomeadamente à chama do bico de Bunsen ou em câmaras de fluxo laminar, de modo a evitar contaminações microbianas. Além disso, antes e após cada utilização, o local de trabalho foi desinfetado com solução de etanol a 70%, conferindo assim também uma maior proteção para o utilizador.

O material de laboratório utilizado foi obtido comercialmente em condições de esterilidade ou sujeito a processos de esterilização, mais comumente por calor húmido a 121°C (autoclavagem). Relativamente a meios de cultura e soluções utilizados na realização do ensaio, foram primeiramente esterilizados pelo método mencionado ou pelo processo de filtração com sistema de vácuo, dependendo da presença de componentes termolábeis na constituição dessas soluções.

iv. Preparação de Soluções

• Meio *Vogel-Bonner E* (50x) (61)

Pesou-se 10 g sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g ácido cítrico monohidratado, 500 g fosfato de potássio dibásico e 175 g fosfato de amónio de sódio. Pela ordem indicada, dissolveram-se completamente os sais em 650 mL água Milli-Q, com aquecimento e agitação. Ajustou-se o volume para 1000 mL, procedeu-se à autoclavagem a 121°C e armazenou-se à temperatura ambiente.

- **Solução de glicose (25% m/V)**

Dissolveu-se 250 g D-glicose em 700 mL de água Milli-Q, recorrendo a aquecimento e agitação. Perfez-se o volume de 1000 mL, esterilizou-se por filtração a vácuo, com uma membrana de 0,2 µm, e por fim, a solução foi armazenada a 5 ± 3 °C.

- **Placas de agar *glicose minimal* (GM) (61)**

15 g agar foram dissolvidas em 900 mL de água Milli-Q e, posteriormente, realizou-se o processo de autoclavagem a 121°C. Após o arrefecimento da solução autoclavada, tal como a estabilização do meio *Vogel-Bonner* estéril até 65°C, adicionou-se 20 mL desse meio à solução anterior e 20 mL da solução de glicose estéril. Homogeneizou-se a mistura e procedeu-se à distribuição da mesma em placas de Petri. Por fim, as placas foram armazenadas a 5 ± 3 °C, até posterior utilização. Foi de extrema importância colocar as placas à temperatura ambiente, antes da sua utilização, de modo a estarem totalmente secas.

- **Tampão fosfato de sódio (0,1 mM, pH 7,4) (61)**

Primeiramente, realizou-se a preparação do reagente A onde se dissolveu 13,8 g fosfato de sódio monobásico em 1000 mL água Milli-Q, tal como se preparou o reagente B ao adicionar 14,2 g de fosfato de sódio dibásico a 1000 mL água Milli-Q e homogeneizou-se ambas as soluções. De seguida, misturou-se vigorosamente 120 mL de reagente A com 880 mL de reagente B. Acertou-se o pH da mistura a 7,4, autoclavou-se a 121°C e, por fim, foi armazenada à temperatura ambiente.

- **Solução de biotina (0,01% m/V) (61)**

Dissolveu-se 0,01 g de D(+)-biotina em 100 mL água Milli-Q, com aquecimento e agitação. Depois, esterilizou-se a solução por filtração à seringa, com uma membrana de 0,2 µm, e armazenou-se a 4 °C.

- **Solução de histidina (0,5% m/V) (61)**

0,5 g de L-histidina foram dissolvidas em 100 mL água Milli-Q sob agitação, e procedeu-se à autoclavagem a 121°C com posterior armazenamento a 4 °C.

- **Solução de hidróxido de sódio (NaOH; 0,02 M)**

Adicionou-se lentamente, com agitação, 0,16 g hidróxido de sódio a 200 mL água Milli-Q e armazenou-se à temperatura ambiente.

- **Solução de ampicilina (0,8% m/V) (64)**

Dissolveu-se 0,8 g ampicilina trihidratada em 100 mL solução de NaOH (0,02 M), com auxílio de agitação. Seguidamente, procedeu-se à esterilização por filtração à seringa, com uma membrana 0,2 µm, e armazenou-se a -20 °C.

- **Placas de agar GM enriquecidas para confirmação do genótipo (61)**

Procedeu-se à adição dos seguintes compostos, conforme necessário, a cada frasco de meio agar GM anteriormente preparado e autoclavado.

Placas de biotina

Adicionou-se 8 mL da solução estéril de biotina (0,01% m/V) ao volume de agar GM, misturou-se e verteu-se a solução em placas de Petri.

Placas de histidina

Um volume de 8 mL da solução estéril de histidina (0,5% m/V) foi adicionado ao meio agar GM, misturou-se e verteu-se a solução em placas de Petri.

Placas de biotina/histidina

8 mL da solução estéril de biotina (0,01% m/V) e 8 mL da solução estéril de histidina (0,5% m/V) foram dissolvidos no meio agar GM e posteriormente, distribuiu-se a mistura em placas de Petri.

Placas de biotina/histidina/ampicilina

Realizou-se a mistura de 8 mL da solução estéril de biotina (0,01% m/V), 8 mL da solução estéril de histidina (0,5% m/V) e 3 mL da solução de ampicilina (0,8% m/V) no volume de meio agar GM. A solução obtida foi distribuída em placas de Petri.

Os diferentes tipos de placas enriquecidas foram armazenados a 5 ± 3 °C, até posterior utilização. Tal como as placas não suplementadas, antes da sua utilização, foram secas à temperatura ambiente.

- **Solução de Cristal violeta (0,1 % m/V) (61)**

Dissolveu-se 0,1 g de cristal violeta em 100 mL água Milli-Q, homogeneizou-se e armazenou-se a solução à temperatura ambiente, em condições protetoras da luz.

- **Meio Oxoid nutrient broth No.2**

Realizou-se a dissolução de 8,6 g água peptonada, 4,3 g peptona de carne e 4,25 g cloreto de sódio em 1000 mL água Milli-Q. De seguida, acertou-se o pH a 7,5 e autoclavou-se a solução a 121°C. Além disso, foi necessário realizar o processo de filtração com sistema de vácuo, devido à sua facilidade de contaminação. Por fim, foi armazenado a 4°C.

- **Meio Brain Heart Infusion (BHI)- Glicerol**

Preparou-se 80 mL de meio BHI, segundo as instruções do fabricante, onde se dissolveu 2,96 g do respetivo meio em 80 mL de água Milli-Q. De seguida, adicionou-se 20 mL de glicerol, seguida de homogeneização e autoclavagem a 121°C. A solução estéril foi armazenada a 4°C.

- **Solução de Histidina/Biotina (0,5 mM) (61)**

Dissolveu-se 0,124 g D(+)-biotina e 0,096 g L-histidina em 1000 mL água Milli-Q, utilizando agitação. Posteriormente, procedeu-se à esterilização da solução por filtração sob sistema de vácuo, com uma membrana de 0,2 µm. Até posterior utilização, armazenou-se a 4°C.

- **Meio Top Agar suplementado com biotina e histidina (61)**

Realizou-se a solubilização de 6 g agar e 6 g cloreto de sódio em 900 mL água Milli-Q, tendo sido a solução posteriormente autoclavada a 121°C e armazenada à temperatura ambiente. Aquando da realização do ensaio, fundiu-se o meio no banho a aproximadamente 95°C e, de seguida, suplementou-se esse meio com 100 mL da solução de biotina/histidina (0,5 mM). Após mistura vigorosa, manteve-se o meio no banho, a uma temperatura de 50°C, até ser utilizado no ensaio.

- **Placas de Nutrient agar DEV**

Segundo as instruções do fabricante presentes no rótulo do composto, pesou-se 43 g NA DEV, dissolveu-se em 1000 mL água desmineralizada e procedeu-se à autoclavagem a 121°C. Por fim, distribuiu-se a solução autoclavada por placas de Petri, as quais foram armazenadas a 5 ± 3 °C.

- **Soluções de compostos mutagênicos padrão, a utilizar como controles, no ensaio sem ativação metabólica (1 mg/mL)**

Dissolveu-se 0,01 g do composto mutagênico padrão em 10 mL do solvente apropriado, mais propriamente: 2-nitrofluoreno em DMSO e azida de sódio em água Milli-Q. De seguida, homogeneizou-se vigorosamente e a solução foi armazenada à temperatura ambiente em caixa selada, na ausência de luz.

- **Tampão fosfato salino (PBS 1x, do inglês *Phosphate-buffered saline*)**

Preparou-se uma solução 10 vezes mais concentrada, através da dissolução completa dos seguintes compostos em 1000 mL água Milli-Q: 80,06 g cloreto de sódio, 2,01 g cloreto de potássio, 14,20 g fosfato de sódio dibásico e 2,72 g fosfato de potássio monobásico. A partir da solução preparada, diluiu-se 100 mL em 900 mL água Milli-Q, seguida pelo processo de autoclavagem e subsequente armazenamento à temperatura ambiente de ambas as soluções.

V. Estirpes Bacterianas

O protocolo do teste de Ames e a subsequente análise do potencial mutagênico dos extratos (hidrolatos e OE) foi implementado, validado e realizado com um conjunto das duas seguintes estirpes de *S. typhimurium*, obtidas comercialmente da *Czech Culture Collection* (CCM): TA98 (CCM 3811) e TA100 (CCM 3812).

Com base no que se encontra explicado acerca das estirpes bacterianas, o presente trabalho descrito foi realizado nas estirpes TA98 e TA100, tendo a sua maior sensibilidade de deteção dos compostos mutagênicos como principal razão (63). De um modo semelhante às restantes estirpes bacterianas recomendadas pela OCDE, estas apresentam diferentes tipos de mutações genéticas, o que permite capturar vários processos mutagênicos que possam ser causados pela ação dos extratos de plantas e subsequentes compostos, através de diferentes mecanismos. Nesse sentido, as estirpes bacterianas mencionadas possuem uma dependência pelo aminoácido histidina, para o seu processo de multiplicação.

a. Armazenamento e manutenção das estirpes

As estirpes bacterianas normalmente são armazenadas a -80°C , como um dos métodos comuns de criopreservação dos microrganismos. Para isto, preparou-se os crioviais de cada estirpe de coleção em suspensão, da seguinte forma: procedeu-se ao processo de descongelamento da estirpe e posterior repicagem em meio sólido, segundo as instruções do fabricante. A partir da cultura presente na respetiva placa, foram preparados vários crioviais para subsequente criação do banco de células, os quais foram definidos como “culturas-mãe”.

Culturas *Master stock* e *working stock* das estirpes

Para além das culturas-mãe, realizou-se a preparação de outros dois tipos de culturas de cada estirpe bacteriana, designados por *Master stocks* e *working stocks*. Dentro das culturas *Master stock*, preparou-se os seguintes tipos: suspensão bacteriana *overnight* em meio *Oxoid nutrient broth* N^o2, onde se adicionou o agente criopreservante DMSO (tipo 1); ou suspensão bacteriana obtida através do processo de ressuspensão do *pellet*, após centrifugação, com meio BHI-glicerol (tipo 1). As culturas *working stock* foram congeladas em criotubos de utilização única, de modo que fossem posteriormente utilizadas para a inoculação das culturas bacterianas para os subseqüentes ensaios. Nesse sentido, a partir da cultura-mãe descongelada de cada estirpe, retirou-se um determinado volume de cada suspensão líquida, o qual é correspondente ao volume de calibração da ansa utilizada. Em placas de agar GM suplementado com biotina/histidina/ampicilina, para obtenção de colónia pura e isolada, realizou-se a técnica de esgotamento e incubou-se a placa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Posteriormente, inoculou-se uma colónia isolada num volume de 20 mL meio de cultura *Oxoid nutrient broth* N^o2 em Erlenmeyers de 100 mL previamente autoclavados (61,132).

A fim de realizar as culturas de pré-inóculo, colocou-se os *Erlenmeyers* com as suspensões bacterianas no agitador orbital, *overnight* a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 150 rotações por minuto (rpm), por um período de 9 a 10 horas. Para a realização dos posteriores ensaios, segundo recomendação da OCDE, as estirpes bacterianas deviam encontrar-se no início da fase estacionária, pelo que se procedeu à monitorização, através da leitura das densidades óticas (DO), ao longo do crescimento, conseguindo estabelecer-se uma curva de crescimento microbiano para cada estirpe (62,64). Além disso, simultaneamente à leitura, realizou-se o método de diluição em gota da suspensão bacteriana para posterior contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro, com o intuito de se confirmar se as culturas congeladas apresentariam o número de UFC/mL

pretendido na realização dos ensaios, com base no procedimento mencionado posteriormente (ponto 2).

Após o período de crescimento, num tubo *falcon* estéril (15 mL), pipetou-se 9 mL da suspensão bacteriana obtida e 1 mL do agente criopreservante DMSO, o qual foi preliminarmente autoclavado. Agitando-se o tubo com a mistura, procedeu-se ao processo de pipetagem de 1 mL e 100 µL da mesma para tubos criogénicos (2 mL) e tubos de PCR autoclavados, respetivamente, dando origem às respetivas culturas *Master stocks* (tipo 1) e *working stocks*. Por fim, congelou-se de imediato os diferentes frascos com as culturas, a -80°C, para minimizar a possível toxicidade do DMSO para as bactérias. A partir do volume restante da suspensão bacteriana, num tubo *falcon* estéril (15 mL), procedeu-se à centrifugação da mistura a 1000 rpm, durante 20 minutos. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em meio de cultura líquido BHI-glicerol. É de referir que o volume de meio utilizado correspondeu ao número de crioviais preparados. Em tubos criogénicos (2 mL), previamente autoclavados, dividiu-se a mistura num volume pipetado de 1 mL (*Master stock* tipo 2) e por fim, congelados a -80°C (61,132).

Simultaneamente a este processo de congelamento, realizou-se ainda o ensaio de confirmação do genótipo das respetivas culturas bacterianas obtidas, como se encontra demonstrado no ponto 3.

b. Curvas de crescimento microbiano das estirpes

Como se encontra mencionado anteriormente, realizou-se as curvas de crescimento microbiano de ambas as estirpes de teste, de modo a conseguir-se monitorizar a capacidade das suas culturas em atingirem o início da fase estacionária e determinar o respetivo período de tempo necessário. Neste sentido, este passo foi realizado aquando do processo de congelamento e, posteriormente, a partir das respetivas culturas *working stock* congeladas, de forma a se controlar o comportamento das estirpes. Para isso, o crescimento foi seguido por leituras periódicas, em intervalos de 1 hora, da DO e, em simultâneo, através do processo de diluição e subsequente plaqueamento, para se obter uma correlação da DO com o número de UFC (61,132).

Na fase de controlo do comportamento das estirpes, procedeu-se ao descongelamento de uma cultura *working stock*, como se encontra explicado no ponto 4. Nesse sentido, após o crescimento da respetiva estirpe bacteriana em meio sólido, inoculou-se uma colónia isolada em 20 mL do meio de cultura *Oxoid nutrient broth* N°2 em Erlenmeyers de 100

mL previamente autoclavados, seguido do seu crescimento no agitador orbital, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150 rpm, por um período máximo de 15 horas (figura 9) (61,132).

Tanto na fase anteriormente descrita, como aquando do processo de congelamento, durante o período de crescimento do inóculo bacteriano, procedeu-se à medição da DO a 600 nm, no espectrofotómetro, em intervalos de aproximadamente 1 hora. Concomitantemente, em cada período, foi realizado o método de diluição em gota, da seguinte forma: numa placa de 96 poços, em triplicado ($n = 3$ poços), pipetou-se 20 μL do inóculo bacteriano, seguido da adição de 180 μL de PBS aos poços anteriores e ressuspensão dessa mistura. De seguida, foram pipetados 20 μL de cada suspensão preparada e transferidos para a coluna seguinte da placa ($n = 3$ poços), utilizando uma pipeta multicanal. A esses poços, adicionou-se 180 μL de PBS e ressuspendeu-se a mistura, correspondente à diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente até à diluição 10^{-6} , na qual se descartou os 20 μL da mistura final. A partir das misturas obtidas, pipetou-se 5 μL dos triplicados de cada diluição para uma placa não seletiva, mais propriamente de meio NA DEV, onde se obteve um perfil vertical de três gotas por diluição. Após secagem completa das gotas, as placas foram invertidas e incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 12 a 24 horas. Por fim, procedeu-se à contagem das colónias por diluição, para posterior cálculo do número de UFC/mL.

Considerações

Segundo (Maron & Ames, 1983), o período de crescimento das estirpes bacterianas não deve ser superior a 16 horas. Deste modo, tal como se encontra descrito anteriormente, a partir das culturas *working stocks*, realizou-se uma curva de crescimento de cada estirpe até um tempo máximo de 15 horas, de modo a verificar-se qual o momento da curva em que as culturas se encontravam no início da fase estacionária e, concomitantemente, atingiam uma DO_{600} de pelo menos 1×10^9 UFC/mL (idealmente $1-2 \times 10^9$ UFC/mL) (64). Assim, através da realização e validação das curvas de crescimento para as estirpes bacterianas de teste, concluiu-se que o período de tempo ideal para as suas culturas se encontrarem na fase estacionária correspondeu às 13 horas de crescimento, o qual foi adotado para a realização dos subseqüentes ensaios.

c. Confirmação do genótipo das estirpes bacterianas

Tendo como base o que se encontra descrito na literatura, o genótipo das estirpes bacterianas de teste deve ser confirmado em diversas situações (figura 10), tal como: imediatamente após a receção das estirpes bacterianas, na preparação de um novo conjunto de culturas bacterianas congeladas, quando o número de colónias com mutação reversa espontânea estiver fora dos limites estipulados pelo laboratório (histórico de controlos), ou quando ocorre perda de sensibilidade das estirpes aos compostos mutagénicos padrão (controlos positivos). Este processo de confirmação teve como objetivo comprovar a dependência dos aminoácidos e a presença de mutações responsáveis pelo aumento da capacidade de deteção de agentes mutagénicos, como enunciado anteriormente.

Deste modo, este incluiu os seguintes seis passos de verificação das seguintes características para as estirpes de teste: dependências de biotina, de histidina e de biotina/histidina; presença de mutações *rfa* e *uvrB*. Além disso, devido às estirpes possuírem o plasmídeo pKM101, avaliou-se a resistência à ampicilina.

Para a realização deste ensaio, tanto no processo de congelamento como ao longo dos subsequentes ensaios, utilizou-se o inóculo bacteriano de cada estirpe, a partir de uma colónia, em meio *Oxoid nutrient broth N^o.2*.

• Dependência de biotina

Pipetou-se 100 µL do inóculo bacteriano para placas de agar GM suplementado com histidina (0,5% m/V), nas quais se realizou um único varrimento. De seguida, as placas foram incubadas a 37 ± 1 °C, por um período de 48 horas.

• Dependência de histidina

Um volume de 100 µL do inóculo bacteriano foi pipetado para placas de agar GM suplementado com biotina (0,01% m/V), fazendo-se um único varrimento ao longo das mesmas, seguido do passo de incubação a 37 ± 1 °C, durante 48 horas.

• Dependência de biotina/histidina

Realizou-se a pipetagem de 100 µL do inóculo bacteriano para placas de agar GM suplementado com biotina (0,01% m/V) e histidina (0,5% m/V), tendo-se procedido posteriormente a único varrimento ao longo das mesmas. As placas foram incubadas por um período de 48 horas, a 37 ± 1 °C.

- **Presença de mutação *rfa***

100 µL do inóculo bacteriano foram pipetados e inoculados em toda a superfície das placas de agar GM suplementado com biotina (0,01% m/V) e histidina (0,5% m/V). Posteriormente, cortou-se uma pipeta de Pasteur estéril na marca de 1 mL e utilizando a mesma, fez-se um poço no centro das placas, onde foram adicionadas algumas gotas da solução de cristal violeta (0,1% m/V). As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C, durante 48 horas.

- **Presença de mutação *uvrB***

Procedeu-se à pipetagem do inóculo das estirpes, num volume de 100 µL, para placas de agar GM suplementado com biotina (0,01% m/V) e histidina (0,5% m/V), seguido pelo subsequente varrimento ao longo das mesmas. De seguida, na câmara de fluxo laminar, as placas foram destapadas e tapou-se metade de cada uma com papel de alumínio. Irradiou-se as mesmas com luz ultravioleta (UV), durante 10 segundos, e foram incubadas a 37 ± 1 °C por 48 horas.

- **Presença de plasmídeo pKM101**

Um volume de 100 µL do inóculo bacteriano foi pipetado para placas de agar GM suplementado com biotina (0,01% m/V), histidina (0,5% m/V) e ampicilina (0,8% m/V). Posteriormente, inoculou-se toda a superfície das placas, as quais foram incubadas a uma temperatura de 37 ± 1 °C, por um período de 48 horas.

d. Descongelamento das estirpes

Como o número de UFC/mL das culturas congeladas foi o recomendado pela OCDE e as características fenotípicas foram cumpridas, realizou-se o processo de descongelamento de uma alíquota dos dois tipos de *Master stock* de cada estirpe bacteriana, com o intuito de se confirmar as características do seu crescimento em meio sólido. Para isso, um criovial de cada tipo das culturas *working stock* foi descongelado à temperatura ambiente e, posteriormente, um certo volume da suspensão bacteriana, correspondente ao volume de calibração da ansa utilizada, foi repicado ao longo de uma placa de agar GM suplementado com histidina/biotina/ampicilina. Em simultâneo, procedeu-se de igual modo numa placa de meio NA DEV, com o intuito de comparação. Ambas as placas de cada estirpe foram incubadas a 37 ± 1 °C, por um período de 12 a 24 horas, seguido pela verificação das colónias, quanto à sua pureza, morfologia e capacidade de crescimento.

Considerações

O significativo crescimento das estirpes nas placas com meio NA DEV foi alcançado em apenas 24 horas de incubação, enquanto, em placas de agar GM suplementado, as estirpes necessitaram de pelo menos 48 horas de incubação para se conseguir obter um crescimento considerável. Deste modo, os dois tipos de placas foram observados em diferentes tempos de incubação.

Como as culturas bacterianas apresentaram as condições de crescimento e pureza pretendidas em meio sólido, preliminarmente a cada ensaio, procedeu-se a este processo de descongelamento de uma cultura *working stock* de cada estirpe bacteriana. Assim, inoculou-se um certo volume da cultura descongelada ao longo de uma placa de agar GM suplementado com biotina/histidina/ampicilina, seguido pela incubação da mesma a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 48 horas.

e. Execução dos ensaios

Concentrações de exposição

Para a realização do teste de mutação reversa bacteriana, a concentração máxima recomendada pela OCDE é de 5 mg/placa (substâncias sólidas) ou 5 μL /placa (substâncias no estado líquido). Além disso, a mesma organização propõe a utilização de um mínimo de cinco concentrações de teste, em intervalos iguais de espaçamento (61,62,132). Dentro das escolhas mais comuns do tipo de espaçamento, a diluição 1:2 foi a adotada no decorrer deste trabalho.

Controlos Positivos

A diretriz da OCDE prevê a inclusão de um controlo positivo com especificidade para cada estirpe bacteriana de teste (tabela 11), sendo um composto para o qual já se encontra descrita a sua atividade mutagénica na respetiva estirpe. Devido a isso, estes compostos já se encontram padronizados na literatura a serem utilizados como controlo, de forma a assegurar o correto procedimento dos ensaios (62).

Preliminarmente ao ensaio principal do teste de Ames, foi necessário proceder ao estudo e subsequente validação da concentração máxima a utilizar de cada controlo positivo, sem provocar toxicidade para as bactérias (ponto 5.1.).

Tabela 11 – Compostos mutagênicos padrão utilizados como controlos positivos no ensaio sem ativação metabólica, a partir de uma solução *stock* com uma concentração de 1 mg/mL.

Estirpe Bacteriana	Composto mutagénico padrão	Concentração da solução <i>stock</i>
<i>S. typhimurium</i> TA98	2-nitrofluoreno	1 mg/mL
<i>S. typhimurium</i> TA100	Azida de sódio	

Controlos Negativos (ou de Solvente)

Para além dos controlos positivos, incluiu-se outros dois tipos de controlos: o negativo e de solvente. Ambos não contêm o extrato em estudo, contudo são sujeitos ao mesmo tipo de tratamento. O primeiro mencionado foi utilizado como referência, tendo sido escolhido o tampão fosfato de sódio, enquanto o outro tipo de controlo correspondeu ao solvente utilizado para dissolver o extrato de planta em estudo. Os controlos de solvente adotados para a realização deste método foram a água, no caso dos hidrolatos, e o DMSO para os OE, devido à sua elevada hidrofobicidade já mencionada. Todavia, o DMSO pode apresentar toxicidade para as bactérias, quando expostas a concentrações mais altas, pelo que foi também necessário determinar, preliminarmente ao ensaio principal, a concentração máxima a utilizar sem provocar toxicidade e interferir no crescimento microbiano (ponto 5.1.). É de salientar que qualquer um dos tipos de controlos aqui mencionados não deve apresentar reação química com o extrato de planta, tal como não deve causar diminuição da viabilidade bacteriana (132).

Cada estirpe bacteriana tem a capacidade de reversão espontânea a uma frequência que lhe é característica, a qual é estabelecida pelos controlos de solvente. Posto isto, ao longo dos diferentes ensaios realizados, foi necessário o desenvolvimento de um histórico com os valores obtidos destes controlos, onde se procedeu à definição de limites de controlo aceitáveis e subsequente criação dos gráficos de controlo, de modo a sustentar a decisão de aceitar ou rejeitar-se um ensaio com base nos valores obtidos. Assim, caso os valores de colónias revertentes obtidos no respetivo controlo de solvente estivessem fora de um dos limites de controlo pré-determinados, o ensaio seria considerado como inválido (64).

Os intervalos de valores apresentados na seguinte tabela (tabela 12) são os que se encontram descritos na literatura, tendo os valores obtidos, para ambas as estirpes bacterianas de teste, durante a realização dos ensaios sido consistentes com os mesmos (64).

Tabela 12 – Intervalos dos números de revertentes espontâneos característicos de cada estirpe bacteriana, no ensaio sem ativação metabólica.

Estirpe Bacteriana	Nº de revertentes espontâneos esperados
<i>S. typhimurium</i> TA98	20-50
<i>S. typhimurium</i> TA100	75-200

O número de colónias revertentes espontâneas foi verificado em cada ensaio, o qual está relacionado com a concentração de histidina presente no meio *top agar*. Contudo, segundo o que se encontra descrito na literatura, este número não apresenta correlação com o número inicial de bactérias de cada placa (10^8 por 100 mL de suspensão bacteriana adicionados). Caso as taxas de reversão espontânea estivessem acima dos intervalos esperados, poderia indicar possível contaminação ou acumulação de mutações reversas na suspensão bacteriana. Para além disso, os valores deste tipo de reversão consistentemente elevados poderiam ser atribuídos à presença de compostos mutagénicos no ambiente de crescimento da estirpe, o que influenciaria negativamente esse processo. Por outro lado, uma diminuição do número de revertentes espontâneos das estirpes bacterianas de teste, devido a apresentarem o plasmídeo pKM101, poderia ser indicativo da perda dessa molécula (64).

1.1. Ensaio de verificação da toxicidade dos controlos

Preparação da gama de concentrações dos controlos

Para a realização deste ensaio, utilizaram-se cinco concentrações diferentes de cada controlo, em intervalos aproximadamente iguais com um fator de diluição igual a 2. Deste modo, relativamente ao controlo de solvente dos OE (DMSO), preparou-se a concentração de 5 µL/placa, adicionando-se 100 µL do composto de controlo puro num *ependorf* estéril. De seguida, nos restantes *ependorfs*, pipetou-se 50 µL da solução tampão fosfato de sódio. A partir do *ependorf* anteriormente preparado (5 µL/placa), pipetou-se 50 µL para o *ependorf* com solução tampão, correspondendo a uma concentração de 2,5 µL/placa, seguido pela ressuspensão dessa mistura. Nesse sentido, pipetou-se a mistura anterior, num volume de 50 µL, para um *ependorf* com solução tampão, dando origem à concentração seguinte (1,25 µL/placa). Para as concentrações posteriores (0,6 e 0,3 µL/placa), procedeu-se do mesmo modo. Por fim, noutros cinco *ependorfs* estéreis, adicionou-se 180 µL da solução tampão a cada um, para os quais se

pipetaram, respetivamente, 20 μL de cada diluição anteriormente preparada. A preparação do controlo de solvente dos hidrolatos (água) foi realizada da seguinte forma: pipetou-se 180 μL da solução tampão fosfato de sódio para um *ependorf* estéril, ao qual foram adicionados 20 μL de água ultrapura.

Quanto aos controlos positivos, também se estudaram cinco concentrações diferentes, através de um fator de diluição igual a 2. Em ambos os controlos (2-nitrofluoreno e azida de sódio), as concentrações de teste foram as seguintes: 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/placa}$. Para isso, tendo em conta que a solução *stock* dos controlos positivos validados, sem ativação metabólica, estava a uma concentração de 1 mg/mL , o procedimento foi o seguinte: no *ependorf* estéril correspondente a 20 $\mu\text{g/placa}$, adicionou-se 200 μL do composto de controlo puro. Nos *ependorfs* das restantes concentrações de teste, pipetou-se 100 μL da solução tampão fosfato de sódio. De seguida, para a concentração de 10 $\mu\text{g/placa}$, procedeu-se à pipetagem do *ependorf* anterior (20 $\mu\text{g/placa}$), num volume de 100 μL , para um dos *ependorfs* com solução tampão, seguido do processo de ressuspensão da mistura. A partir dessa, pipetou-se 100 μL para um *ependorf* com solução tampão, tendo se depois ressuspendido essa mistura, a qual correspondeu a 5 $\mu\text{g/placa}$. Assim sendo, o procedimento para a preparação das restantes concentrações de teste (2,5 e 1,25 $\mu\text{g/placa}$) foi o mesmo. Posteriormente, noutros cinco *ependorfs* estéreis, adicionou-se 180 μL da solução tampão a cada um, para os quais se pipetaram, respetivamente, 20 μL de cada diluição do controlo anteriormente preparada.

Preliminarmente à adição ao respetivo tubo de *falcon*, todos os últimos *ependorfs* preparados de cada controlo foram agitados, de forma vigorosa, no vórtex.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se as concentrações dos diferentes controlos a utilizar não causariam toxicidade nas bactérias, validando a concentração ideal a ser utilizada na realização do ensaio principal. Para isso, sendo um ensaio preliminar, avaliou-se apenas uma placa por condição de teste, utilizando as duas estirpes bacterianas de teste. Assim sendo, após a preparação dos diferentes controlos, procedeu-se à seguinte adição a cada tubo de *falcon* estéril (15 mL): 500 μL da solução tampão fosfato de sódio, 50 μL do composto de controlo (tampão, diluição do controlo de solvente (água e DMSO) ou diluição do controlo positivo da estirpe, anteriormente preparadas) e 100 μL do inóculo bacteriano, o qual se deve encontrar na fase estacionária como já se encontra mencionado. Como passo confirmatório das condições de crescimento da cultura, simultaneamente a esta última adição, procedeu-se à monitorização da DO_{600} e determinação do número de UFC/ mL , tal como descrito no

ponto 2. Posteriormente, a totalidade de tubos foi agitada no vórtex, seguido da sua incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sem agitação, durante 20 minutos. Após esse período de incubação, adicionou-se 2 mL do meio *top agar* suplementado com biotina e histidina a cada tubo, da menor para a maior concentração de teste de cada controlo, com o intuito de minimizar possíveis interferências. Para além disso, nesse mesmo sentido, este passo foi realizado por cada estirpe bacteriana, onde se utilizou uma pipeta estéril por estirpe. De seguida, em cada adição, agitou-se o tubo no vórtex, verteu-se sobre a placa de agar GM e distribuiu-se uniformemente a mistura, através de movimentos circulares com a placa. Quando se encontravam no estado sólido, as placas foram invertidas e colocadas a incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 72 horas. Por fim, realizou-se a contagem manual das colónias em cada placa, as quais correspondem ao número de bactérias revertentes por placa. No processo de contagem, realizou-se também a visualização, normalmente a olho nu, da presença ou ausência do *background lawn* em cada condição. É importante referir que, como a contagem das colónias foi realizada manualmente, nas placas com um número significativamente maior de colónias revertentes (superior a 300), adotou-se a metodologia de contagem de um quarto ou metade da placa, na tentativa de minimização do erro de contagem.

Considerações

A avaliação da toxicidade no teste de Ames é realizada de forma qualitativa, com base nos seguintes dois parâmetros de visualização: redução significativa do *background lawn*, sendo que reflete a inibição do crescimento ou a morte das bactérias; ou diminuição do número de colónias revertentes, comparativamente com as culturas bacterianas que foram expostas a concentrações inferiores do composto. Nesse sentido, a concentração na qual um e/ou os dois parâmetros descritos são visualizados é, geralmente, definida como a concentração máxima a utilizar no ensaio.

A maioria dos compostos mutagénicos padrão, normalmente utilizados como controlos positivos, apresenta uma elevada mutagenicidade e possível toxicidade das bactérias, pelo que, de um modo geral, as concentrações máximas utilizadas no ensaio são significativamente inferiores à concentração máxima permitida pela OCDE. Assim, estes controlos foram utilizados numa concentração otimizada para as condições do nosso laboratório, a qual foi escolhida como sendo a concentração que induziu, confiavelmente, um aumento do número de colónias revertentes, em comparação com os controlos de solvente. Segundo (Levy et al., 2019a), a escolha de uma concentração que se encontre a meio da curva dose-resposta de cada controlo positivo é geralmente recomendada. Por esta razão, em concordância com o descrito na literatura, a concentração ideal

escolhida para cada controlo positivo foi 5 µg/placa para o 2-nitrofluoreno (TA98), assim como 5 µg/placa para a azida de sódio (TA100) (132).

No caso dos controlos de solvente, mais propriamente do DMSO, a concentração máxima a utilizar no ensaio (2,5 µL/placa), de acordo com a recomendação da OCDE, não apresentou toxicidade para as bactérias, nem subsequente influência na sua viabilidade.

1.2. Ensaio de verificação da toxicidade dos extratos de plantas

Da mesma forma que o ensaio anterior, o objetivo presente estudo é a avaliação preliminar da possível toxicidade das diferentes concentrações dos extratos de plantas para as bactérias, validando essa gama de concentrações para a realização do subsequente ensaio. Tendo em conta a concentração máxima recomendada pela OCDE (5 µL/placa), devido à composição química dos hidrolatos, a concentração máxima de teste foi correspondente à recomendada. Contrariamente, os OE são conhecidos como mais concentrados do que os hidrolatos e, devido à sua necessidade de solubilização prévia em DMSO (diluição 1:1), a concentração máxima que foi possível estudar foi de 2,5 µL/placa, na qual se encontra já considerada a diluição prévia. Para além disso, neste passo de decisão quanto à concentração máxima dos OE, teve de se ter também em conta qual a concentração máxima de DMSO, sem provocar toxicidade para as bactérias, tendo esta sido validada no ponto 1.1. Similarmente ao ensaio dos controlos, avaliou-se apenas uma placa por condição de teste de cada extrato, onde também se incluiu os respetivos controlos.

Preparação da gama de concentrações dos hidrolatos

Para a realização do ensaio (figura 11), utilizaram-se cinco concentrações diferentes de cada extrato de planta, em intervalos aproximadamente iguais numa proporção de 1:2, as quais foram: 5, 2,5, 1,25, 0,6 e 0,3 µL/placa. Deste modo, preparou-se a diluição 5 µL/placa, pipetando-se 100 µL do hidrolato puro num *ependorf* estéril. De seguida, para a preparação das restantes concentrações, pipetou-se 50 µL da solução tampão fosfato de sódio para quatro *ependorfs* estéreis. A um desses *ependorfs*, adicionou-se 50 µL do hidrolato presente no *ependorf* anteriormente preparado (5 µL/placa), dando assim origem à concentração de 2,5 µL/placa. Após ressuspensão dessa mistura, procedeu-se à pipetagem da mesma, num volume de 50 µL, para outro *ependorf*, correspondente a 1,25 µL/placa, e assim sucessivamente para as restantes concentrações. Noutros cinco *ependorfs* estéreis, adicionou-se 180 µL da solução

tampão, para os quais, de seguida, se pipetou 20 μL da respetiva diluição do hidrolato anteriormente preparada. Nota-se que entre cada diluição, tal como no final da preparação de todas, procedeu-se a uma mistura vigorosa das misturas no vórtex.

Paralelamente, o controlo de solvente dos hidrolatos foi preparado do seguinte modo: num *ependorf* estéril, pipetou-se 180 μL da solução tampão, seguida da adição de 20 μL de água ultrapura, com o intuito de, na realização do ensaio, se obter a concentração máxima recomendada pela diretriz da OCDE (5 $\mu\text{L}/\text{placa}$). No mesmo sentido, procedeu-se também à preparação dos controlos positivos, onde o procedimento foi semelhante ao do controlo de solvente: 180 μL da solução tampão e 20 μL do composto mutagénico padrão da respetiva estirpe bacteriana, a partir da solução *stock* a uma concentração de 1 mg/mL.

Preparação da gama de concentrações dos OE

Como referido anteriormente, os OE necessitam de ser previamente solubilizados num agente surfactante, pelo que se procedeu à diluição 1:1 do OE com o DMSO, num *ependorf* estéril, no qual se adicionou: 50 μL de DMSO e o mesmo volume de OE puro, tendo sido correspondente à concentração de 2,5 $\mu\text{L}/\text{placa}$ (figura 12). Para cada um dos restantes *ependorfs*, pipetou-se 50 μL da solução tampão fosfato de sódio. De seguida, pipetou-se 50 μL do *ependorf* com a mistura OE-DMSO para um dos *ependorfs* com a solução tampão e assim sucessivamente para as outras concentrações. Entre cada diluição, tal como no final da preparação de todas, misturou-se vigorosamente as misturas recorrendo ao vórtex. Noutros cinco *ependorfs* estéreis, adicionou-se 180 μL da solução tampão, para os quais, de seguida, se pipetou 20 μL da respetiva diluição do OE anteriormente preparada.

Em concomitância, preparou-se a diluição do controlo de solvente dos OE, onde se adicionou 10 μL do composto DMSO a 190 μL da solução tampão, num *ependorf* estéril, de modo a encontrar-se a uma concentração de 2,5 $\mu\text{L}/\text{placa}$ na mistura final dos subsequentes ensaios. O procedimento de preparação dos controlos positivos foi o mesmo do que se encontra descrito anteriormente, no ponto anterior dos hidrolatos.

O procedimento do presente estudo foi realizado de igual forma ao ensaio anterior, relativamente aos controlos, para todos os extratos de plantas, em ambas as estirpes bacterianas (figura 13). Desse modo, aquando da preparação das cinco concentrações de cada extrato de planta, procedeu-se à seguinte adição a cada tubo de *falcon* estéril (15 mL): 500 μL da solução tampão fosfato de sódio e 50 μL de cada concentração do extrato,

sendo que esse volume incluiu apenas o volume máximo recomendado por placa (5 µL). Paralelamente aos extratos, também foram incluídos os seguintes controles: positivo (5 µg/placa, em qualquer uma das estirpes), solvente (água para os hidrolatos e DMSO nos OE) e negativo, sendo que, neste último, pipetou-se diretamente 50 µL da solução tampão fosfato de sódio para o respectivo tubo. Posteriormente, para cada tubo preparado, pipetou-se 100 µL do inóculo bacteriano, encontrando-se na fase estacionária. Tal como anteriormente, realizou-se o passo de confirmação das condições de crescimento da cultura, através do procedimento descrito no subponto c. De seguida, agitou-se os tubos no vórtex e foram colocados na incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sem agitação, durante 20 minutos. No término desse período, adicionou-se 2 mL do meio *top agar* suplementado com biotina e histidina a cada tubo, da menor para a maior concentração de teste de cada controlo, com o intuito de minimizar possíveis interferências. Em cada adição, agitou-se o tubo no vórtex, verteu-se sobre a placa de agar GM e distribuiu-se uniformemente a mistura, através de movimentos circulares com a placa. Quando se encontravam no estado sólido, as placas foram invertidas e colocadas a incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 72 horas. Por fim, realizou-se a contagem manual das colónias em cada placa, as quais correspondem ao número de bactérias revertentes por placa, e subsequente visualização da presença do *background lawn*. É importante evocar que, como a contagem das colónias foi realizada manualmente, nas placas com um número significativamente maior de colónias revertentes (superior a 300), adotou-se a metodologia de contagem de um quarto ou metade da placa, na tentativa de minimização do erro de contagem.

Considerações

A avaliação da toxicidade dos diferentes extratos de plantas foi realizada de igual modo ao anteriormente descrito, tendo como base os 2 parâmetros de visualização. Desse modo, as diferentes concentrações de teste na totalidade de extratos de plantas não apresentaram toxicidade, em ambas as estirpes bacterianas, pelo que foram as utilizadas no subsequente ensaio.

1.3. Método por pré-incubação, sem ativação metabólica

O estudo em causa visou a avaliação da atividade mutagénica dos diversos extratos de plantas em estudo, nas duas estirpes bacterianas de teste. Assim, após a determinação dos intervalos de concentrações a testar para cada extrato de planta, com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores de avaliação da toxicidade, procedeu-se ao método por pré-incubação, sem ativação metabólica (figura 14). Para isso, realizou-se o mesmo procedimento descrito no ponto 1.2 para as cinco concentrações adotadas dos diferentes extratos, tal como os respetivos controlos, na totalidade de estirpes bacterianas de teste. A única diferença foi o facto de que se avaliou cada condição de teste (incluindo os controlos) em triplicado ($n = 3$ placas), com o intuito de se alcançar uma adequada estimativa de variação. Em certas condições, houve a perda de uma placa por diversas situações, o que não invalidou necessariamente todo o ensaio realizado. Para além disso, foram realizados dois ensaios independentes por cada extrato e estirpe bacteriana, nos quais se utilizou as mesmas condições de teste e procedimentais, de modo a se conseguir avaliar quanto à reprodutibilidade da resposta observada.

III. Esquema representativo da metodologia realizada

1. Crescimento do inóculo bacteriano

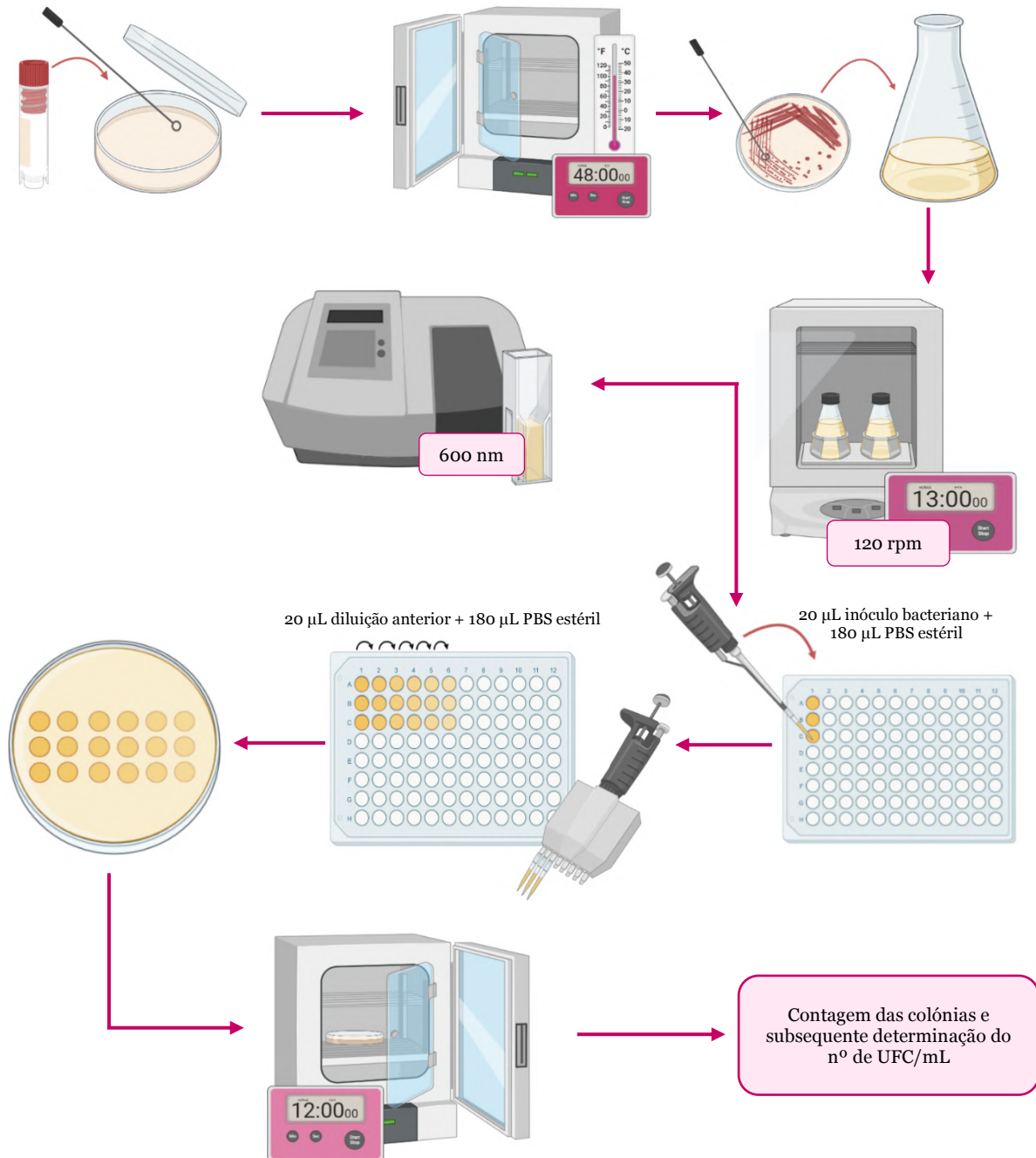


Figura 9 – Esquema representativo do passo de crescimento do inóculo bacteriano, a partir de uma única colônia. Esta metodologia corresponde a um dos principais passos iniciais para a realização do teste de mutação reversa bacteriana, a qual aplica-se às duas estirpes bacterianas de teste. Foi desenvolvido no programa BioRender.

2. Confirmação do genótipo das estirpes bacterianas

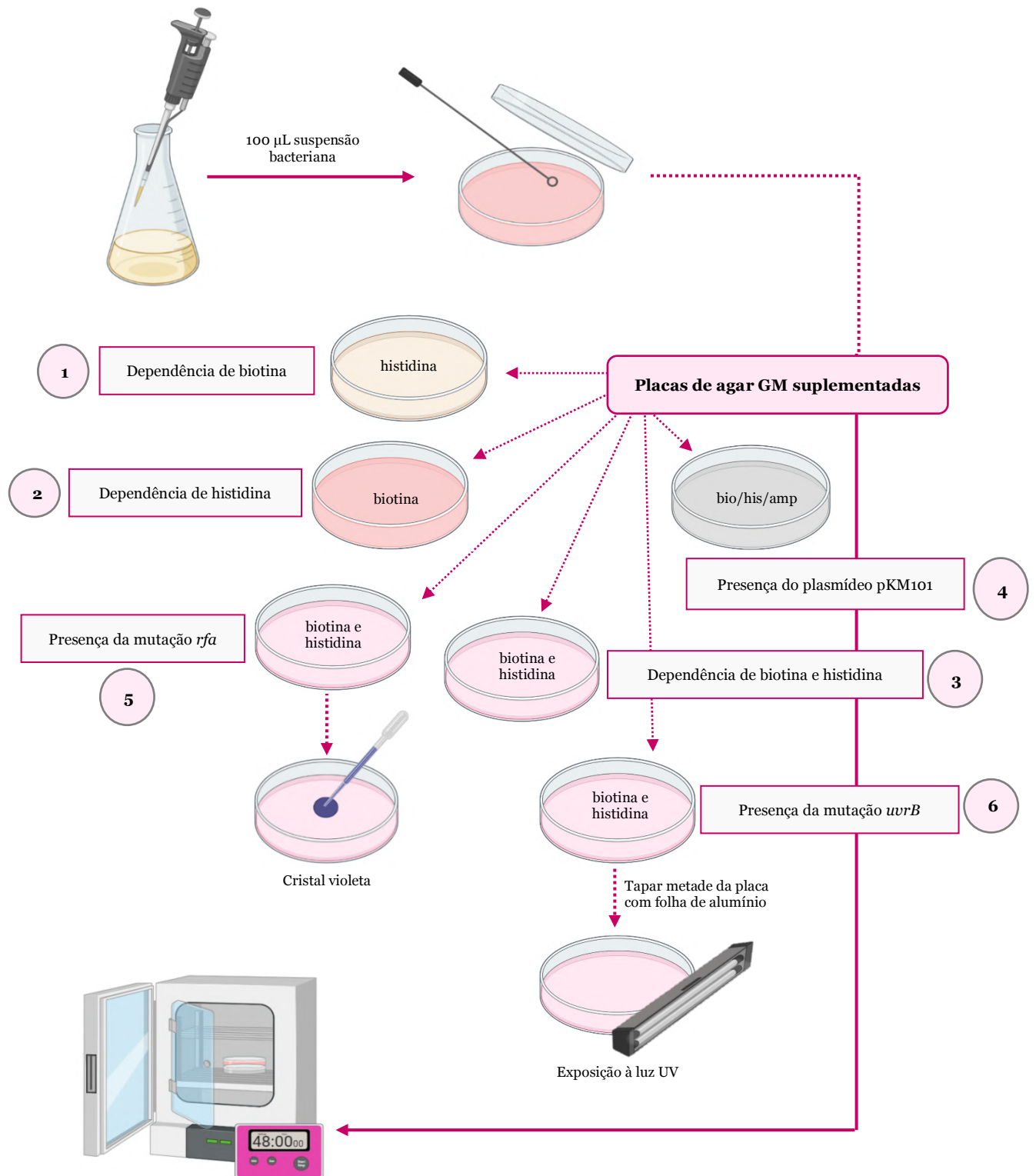


Figura 10 – Esquema representativo do passo de confirmação do genótipo das estirpes bacterianas, a partir do inóculo bacteriano obtido. Esta metodologia corresponde a um passo necessário para verificar se as estirpes apresentam as características fenotípicas pretendidas para o ensaio, a qual aplica-se às duas estirpes bacterianas de teste. Foi desenvolvido no programa BioRender.

3. Preparação das concentrações dos extratos

Hidrolatos

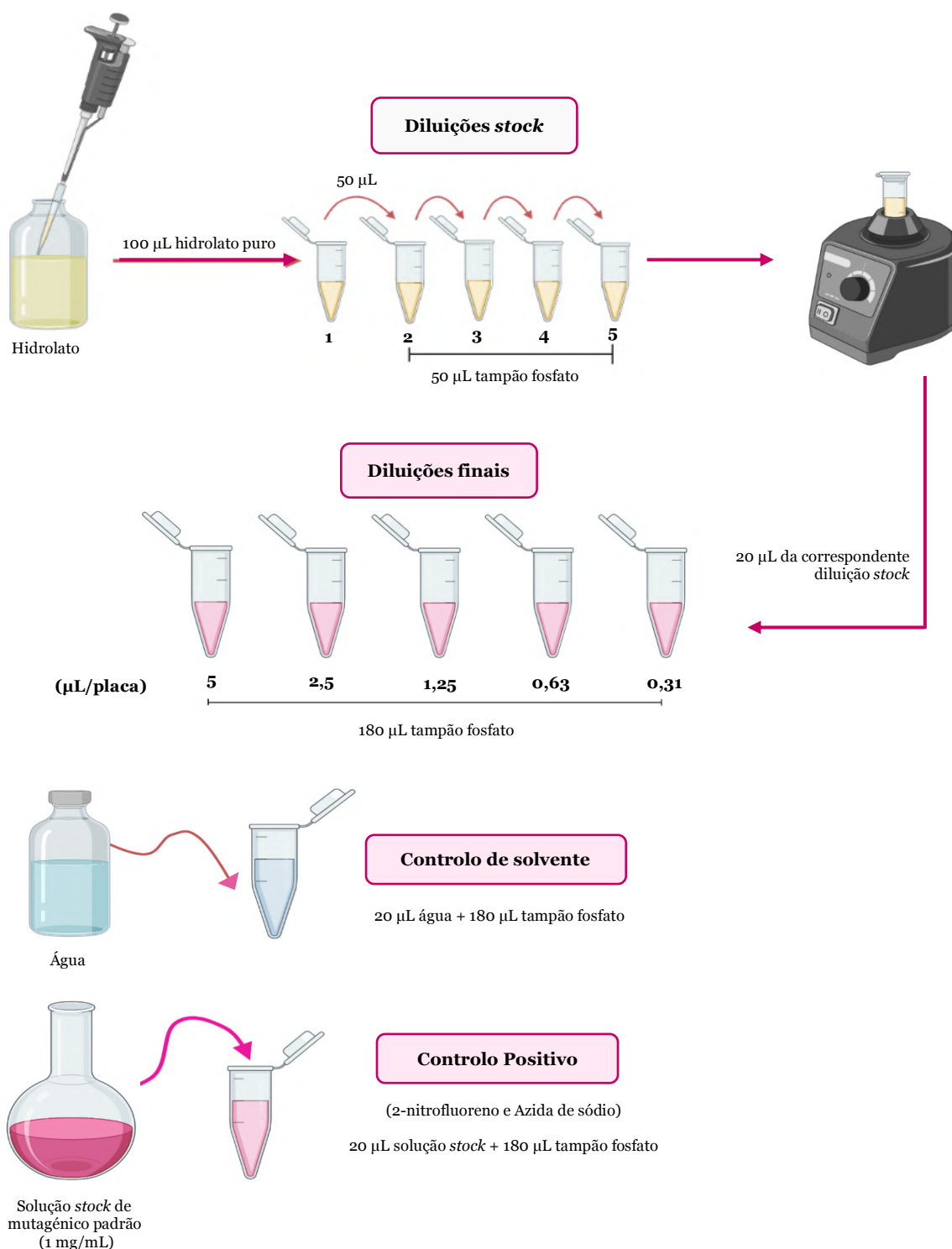


Figura 11 – Esquema representativo da preparação das concentrações de teste dos extratos, em específico dos hidrolatos. Segundo a OCDE, a concentração de teste máxima permitida corresponde a 5 µL/placa.

Nesse sentido, no caso dos hidrolatos, essa concentração foi utilizada como máxima, tendo-se depois realizado diluições sucessivas de 1:2 em tampão fosfato. As concentrações de teste dos hidrolatos foram as seguintes: 0,31, 0,63, 1,25, 2,5 e 5 µL/placa. Foi desenvolvido no programa BioRender.

Óleos Essenciais

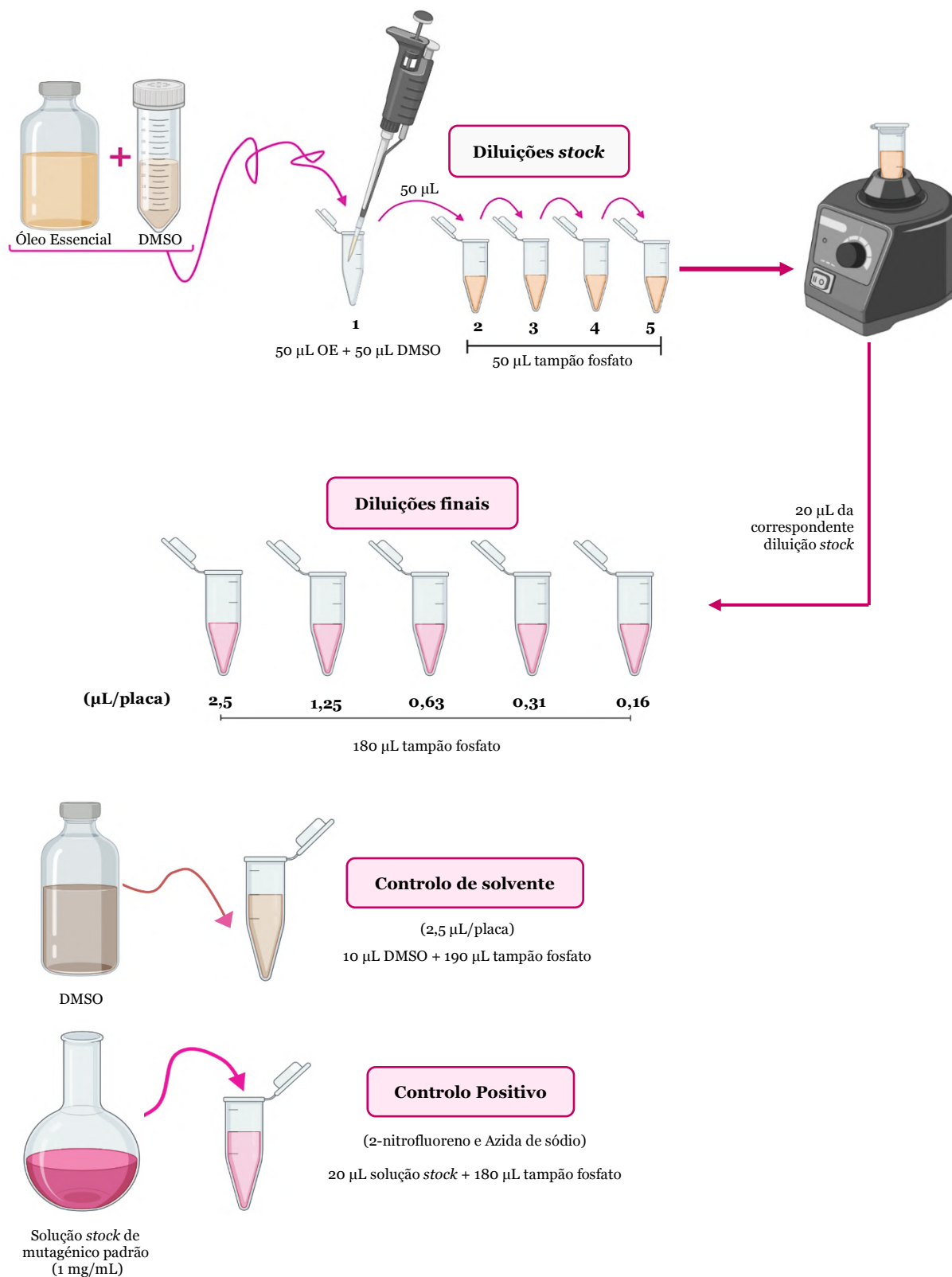


Figura 12 – Esquema representativo da preparação das concentrações de teste dos extratos, em específico dos OE. Tendo em conta a concentração máxima permitida, no caso dos OE, devido à necessidade de solubilização prévia do OE em DMSO (1:1), a concentração utilizada como máxima foi de 2,5 µL/placa, tendo-se depois realizado diluições sucessivas de 1:2 em tampão fosfato. Nesse sentido, as concentrações de teste dos OE foram as seguintes: 0,16, 0,31, 0,63, 1,25 e 2,5 µL/placa. Foi desenvolvido no programa BioRender.

4. Estudo da toxicidade dos extratos de plantas

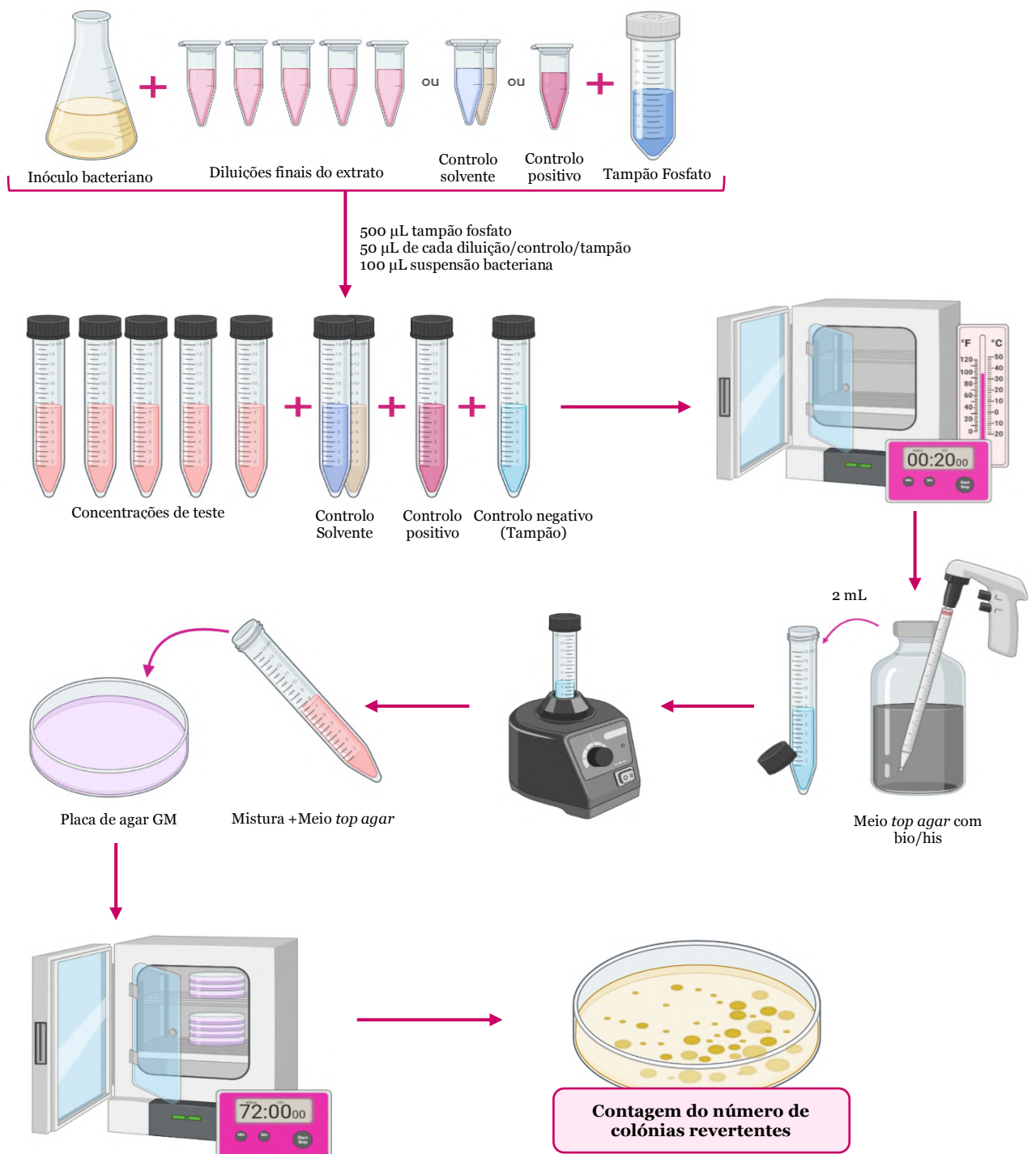


Figura 13 – Esquema representativo do estudo de toxicidade das concentrações de teste dos extratos de plantas, tanto dos hidrolatos como dos OE. Neste estudo, para além dos extratos, foram os incluídos os seguintes controlos: solvente (água ou DMSO, dependendo do extrato), positivo (composto mutagénico padrão da estirpe bacteriana) e o negativo (tampão fosfato). Esta metodologia aplica-se às duas estirpes bacterianas. Foi desenvolvido no programa BioRender.

5. Método por pré-incubação, sem ativação metabólica

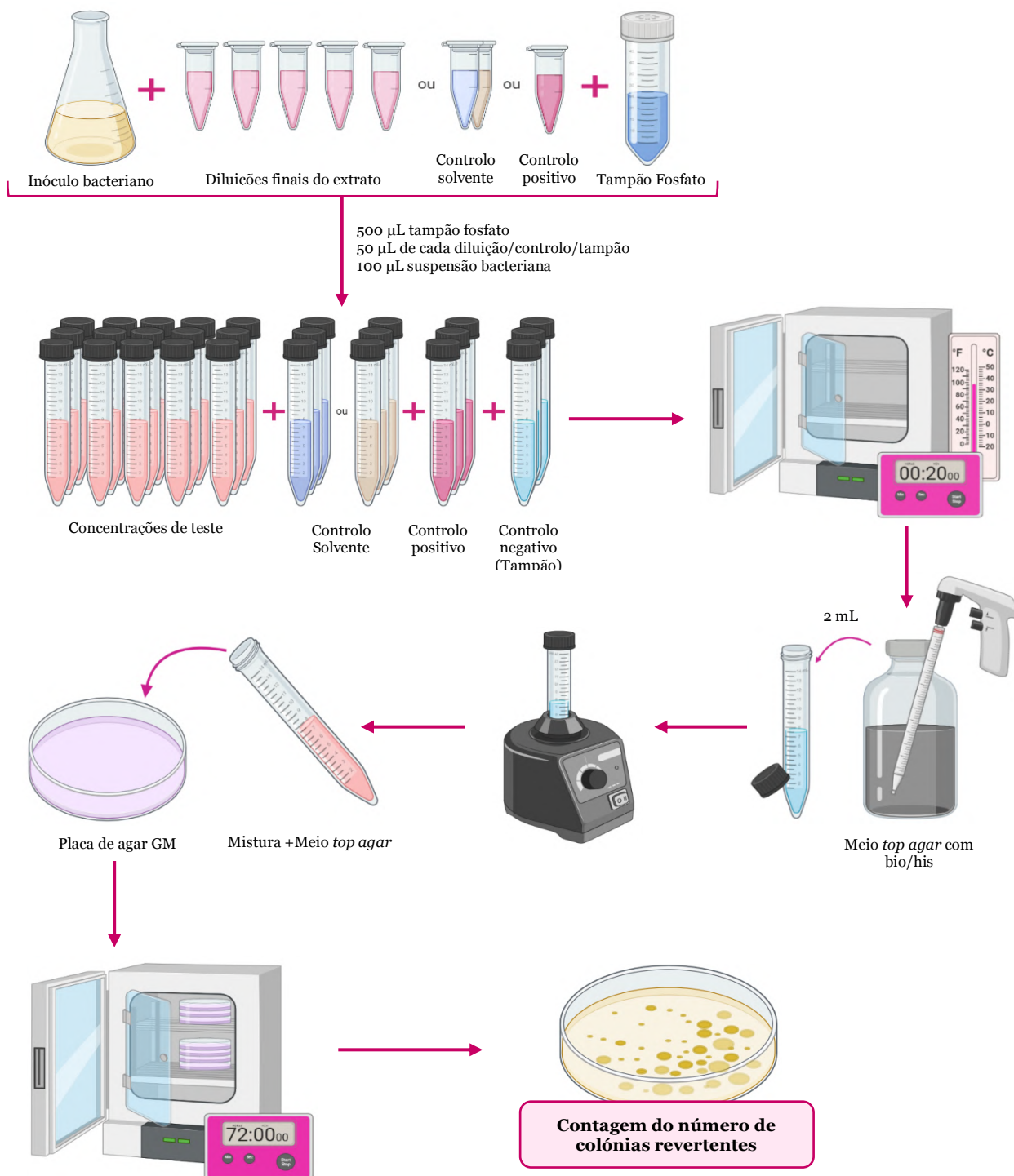


Figura 14 – Esquema representativo do método por pré-incubação, sem ativação metabólica, para ambos os extratos de plantas. Neste estudo, para além dos extratos, foram incluídos os seguintes controlos: solvente (água ou DMSO, dependendo do extrato), positivo (composto mutagénico padrão da estirpe bacteriana) e o negativo (tampão fosfato). Esta metodologia é a mesma do estudo de toxicidade, com a diferença de que as condições de teste são avaliadas em triplicado, aplicando-se também às duas estirpes bacterianas. Foi desenvolvido no programa BioRender.

IV. Tratamento de Resultados

O tratamento e a análise dos resultados foram realizados através de folhas de cálculo, no programa Microsoft Excel (Microsoft Office 365, 2021), onde foram introduzidos os números de colónias por placa. Esses números foram determinados por contagem manual, com o auxílio de um contador digital de colónias bacterianas. Para além disso, também se utilizou o programa GraphPad Prism (versão 8.0.2 (263) para Windows, GraphPad Software, Inc.), para a construção dos diversos gráficos e a respetiva análise estatística. Desse modo, realizaram-se os seguintes passos:

- 1.** Calcularam-se as médias e os desvios-padrão para cada condição de teste, nos diferentes ensaios realizados. No caso do método por pré-incubação, estes parâmetros estatísticos foram calculados para cada condição, na totalidade dos ensaios independentes.
- 2.** Nas curvas de crescimento microbiano das estirpes, tal como ao longo dos vários ensaios realizados, procedeu-se ao passo confirmatório das condições de crescimento de cada cultura bacteriana, no qual se determinou o número de UFC/mL. Para isso, o procedimento foi o seguinte:
 - I.** Calculou-se as médias dos números de colónias contados, para cada diluição;
 - II.** Por cada diluição, a média obtida (subponto I) foi multiplicada por 1000. De seguida, calculou-se a razão entre o valor obtido e o volume pipetado para a placa (5 µL), a qual foi posteriormente multiplicada pelo respetivo fator de diluição;
 - III.** Calculou-se a média dos valores das diferentes diluições, obtidos no subponto anterior, a qual correspondeu ao número de UFC por mL;
- 3.** Para a criação dos gráficos de controlo, relativamente aos controlos de solvente (água e DMSO), nas folhas de cálculo, procedeu-se do seguinte modo:
 - I.** Aquando da realização de cada ensaio, dependendo do tipo de extrato, os números de colónias revertentes espontâneos, obtidos para o respetivo controlo de solvente, foram introduzidos nas folhas de cálculo;
 - II.** Calculou-se a média e o desvio-padrão dos valores obtidos nos diferentes ensaios. A partir destes valores, estabeleceram-se os limites de alerta (inferior e superior) e os limites de rejeição (inferior e superior), através do cálculo da média \pm dobro do desvio padrão e da média \pm triplo do desvio padrão, respetivamente;

- III.** Na folha de cálculo, procedeu-se à construção do gráfico de controlo, onde as linhas contínuas no sentido horizontal corresponderam aos seguintes parâmetros: limite de alerta inferior, limite de rejeição inferior, média, limite de alerta superior e limite de rejeição superior. Nesses gráficos de dispersão, foram introduzidos os valores correspondentes ao número de revertentes espontâneos dos diferentes ensaios, na forma de pontos.
- 4.** No ensaio de verificação da toxicidade dos controlos, por cada controlo positivo, e para o controlo de solvente dos OE (DMSO), traçou-se o gráfico de barras, a partir da média do número de colónias revertentes obtida em cada concentração de teste. Ainda no mesmo programa (GraphPad Prism), apenas para os controlos positivos, realizou-se a análise estatística One-way ANOVA, mais propriamente o teste de tendência linear dos resultados obtidos.
- 5.** No ensaio de verificação da toxicidade dos extratos de plantas, por cada extrato, realizou-se o mesmo procedimento descrito no subponto anterior, incluindo a análise estatística.
- 6.** No método por pré-incubação, sem ativação metabólica, por cada condição de teste, procedeu-se do seguinte modo:
- I.** Calculou-se a razão entre a média obtida na respetiva concentração do extrato (ponto 1) e a média obtida do número de revertentes espontâneos (controlo de solvente), correspondendo o valor obtido ao rácio de mutagenicidade (R.M.). É de notar que, relativamente aos controlos, este parâmetro foi apenas calculado também para o controlo positivo;
- II.** Por extrato em cada estirpe bacteriana, traçou-se gráficos de combinação (barras *vs.* linha contínua) no programa GraphPad Prism, nos quais as barras corresponderam às médias obtidas (ponto 1) e a linha contínua representou o rácio de mutagenicidade (subponto I), por cada condição de teste;
- III.** Ainda no programa GraphPad Prism, realizou-se a análise estatística *One-way* ANOVA, com o intuito de se verificar a possibilidade de existir diferença estatística, em relação ao controlo de solvente. Além disso, nessa mesma análise, também se avaliou a relação dose-resposta das cinco concentrações de teste, através do teste de tendência linear.

V. Resultados e Discussão

Primeiramente, foi necessário realizar o processo de implementação e validação do teste de mutação reversa bacteriana (Ames) no laboratório acadêmico não proficiente, para duas das cinco estirpes bacterianas recomendadas pela OCDE. Contudo, devido à falta de um modelo de protocolo com as diferentes etapas a realizar, inclusive a escassa informação detalhada na diretriz da OCDE, houve a necessidade de se proceder ao desenvolvimento de uma proposta de protocolo para o teste de Ames (anexo III), a partir do processo de compilação das informações dispersas em diversas referências bibliográficas.

Após implementação e validação do teste de Ames, foi possível realizar a avaliação do potencial genotóxico, mais propriamente ao nível da mutagenicidade, dos dois tipos de extratos de plantas em estudo. Assim, em seguida, encontram-se demonstrados os resultados obtidos aquando do processo de implementação e da respetiva avaliação dos extratos de plantas.

Como mencionado anteriormente, o início do processo recaiu na realização da curva de crescimento para cada estirpe bacteriana de teste. Nesse sentido, através das respetivas curvas seguidamente apresentadas (*S. typhimurium* TA98 (figura 15) e TA100 (figura 16)), consegue-se inferir que ambas alcançaram a fase estacionária, em específico o início do *platô* na curva de crescimento, num período de aproximadamente dez [10] horas. Contudo, com o intuito de se ter a certeza quanto à presença das bactérias na fase de crescimento pretendida, o período de tempo escolhido foi de treze [13] horas, equivalente a setecentos e oitenta [780] minutos, o que corrobora com o facto de ser um momento em que o número de UFC das duas estirpes bacterianas de teste encontra-se dentro do intervalo de UFC/mL recomendado pela OCDE ($1 - 2 \times 10^9$), mais propriamente $1,26 \times 10^9$ (tabela 13) e $1,11 \times 10^9$ (tabela 14) para as estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100, respetivamente (62).

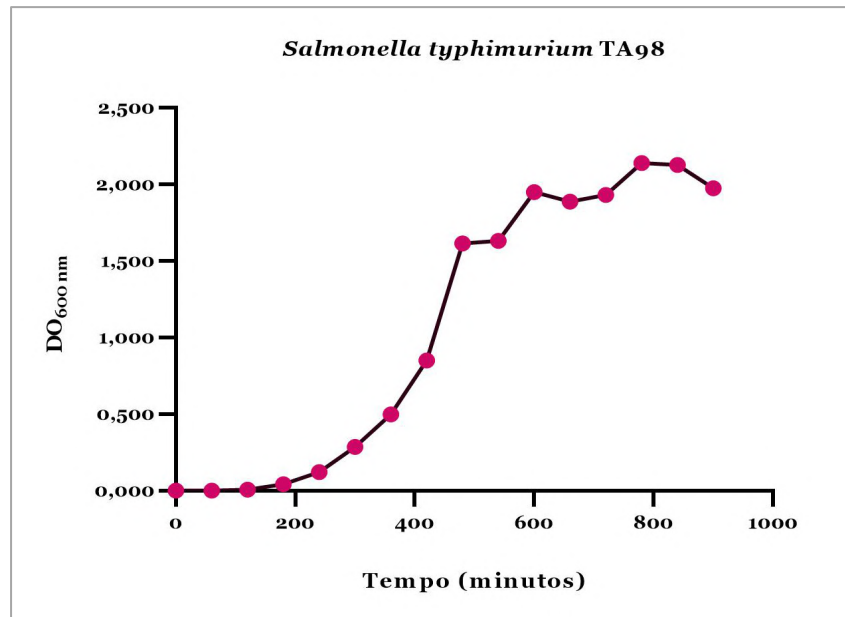


Figura 15 – Curva de crescimento da estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA98, por um período de 15 horas, equivalente a 900 minutos. O crescimento foi realizado no agitador orbital, a 37°C e 120 rpm, com subsequente monitorização através da leitura da densidade ótica a 600 nm em períodos de 1 hora.

Tabela 13 – Valores de DO_{600 nm} e do número de UFC/mL para a estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA98, ao longo da respetiva curva de crescimento.

Tempo (minutos)	DO _{600 nm}	Nº de UFC/mL
0	0,000	-
60	0,000	2,02 x 10 ⁶
120	0,008	2,34 x 10 ⁶
180	0,042	7,27 x 10 ⁶
240	0,121	2,16 x 10 ⁷
300	0,286	4,74 x 10 ⁷
360	0,498	1,62 x 10 ⁸
420	0,852	2,31 x 10 ⁸
480	1,616	3,21 x 10 ⁸
540	1,632	9,60 x 10 ⁸
600	1,952	7,10 x 10 ⁸
660	1,888	1,43 x 10 ⁹
720	1,932	2,02 x 10 ⁹
780	2,140	1,26 x 10⁹
840	2,128	1,25 x 10 ⁹
900	1,976	1,46 x 10 ⁹

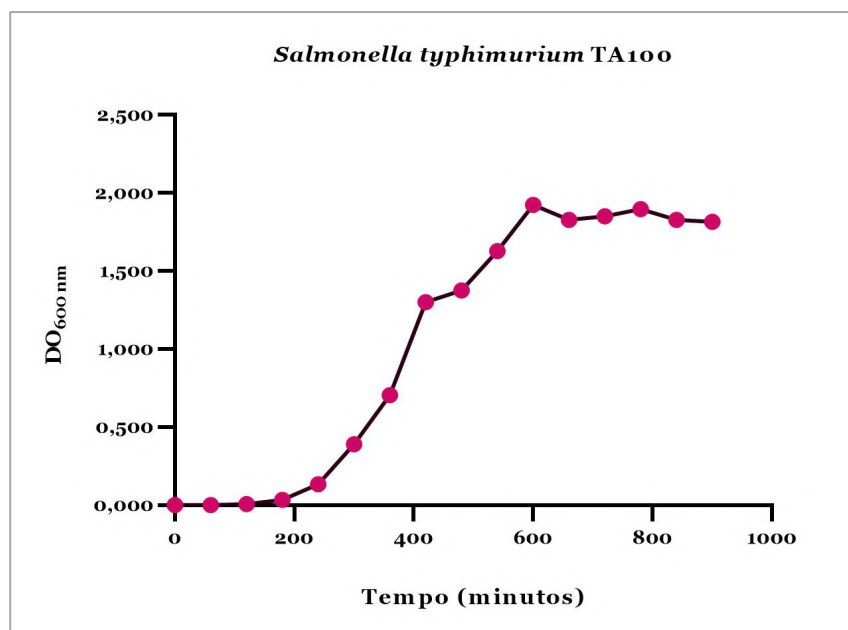


Figura 16 – Curva de crescimento da estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA100, por um período de 15 horas, equivalente a 900 minutos. O crescimento foi realizado no agitador orbital, a 37°C e 120 rpm, com subsequente monitorização através da leitura da densidade ótica a 600 nm em períodos de 1 hora.

Tabela 14 - Valores de DO_{600 nm} e do número de UFC/mL para a estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA100, ao longo da respetiva curva de crescimento.

Tempo (minutos)	DO _{600 nm}	Nº de UFC/mL
0	0,000	-
60	0,000	1,48 x 10 ⁶
120	0,007	4,33 x 10 ⁶
180	0,034	8,90 x 10 ⁶
240	0,134	3,83 x 10 ⁷
300	0,391	1,40 x 10 ⁸
360	0,705	2,23 x 10 ⁸
420	1,300	4,93 x 10 ⁸
480	1,376	6,33 x 10 ⁸
540	1,628	8,57 x 10 ⁸
600	1,924	1,34 x 10 ⁹
660	1,828	2,40 x 10 ⁹
720	1,852	1,07 x 10 ⁹
780	1,896	1,11 x 10⁹
840	1,828	1,11 x 10 ⁹
900	1,816	9,37 x 10 ⁸

Ao longo do presente estudo, realizou-se a etapa de confirmação das características fenotípicas das estirpes bacterianas de teste, ao nível dos seis seguintes parâmetros: dependências de biotina, histidina e histidina/biotina; presença de mutação *rfa*, mutação *uvrB* e do plasmídeo pKM101. Desse modo, as seguintes tabelas apresentam os resultados esperados e os obtidos para cada característica fenotípica em estudo, em ambas as estirpes bacterianas de *S. typhimurium*: TA98 (tabela 15) e TA100 (tabela 16).

A mutação do gene *uvrB*, presente nas duas estirpes bacterianas de teste, estende-se irreversivelmente através do gene *bio* e, conseqüentemente, as bactérias também necessitam de biotina para o seu processo de multiplicação. Desse modo, a ausência de crescimento nas placas seletivas com histidina demonstra esta dependência das estirpes (60,61,64). Contudo, contrariamente ao resultado esperado segundo a literatura, verificou-se crescimento das estirpes de *S. typhimurium* TA98 (figura 17B) e TA100 (figura 18B) nas placas seletivas, o que pode ser provavelmente justificado pelo facto de a necessidade das estirpes por essa molécula ser extremamente pequena, pelo que pode ser satisfeita por quantidades vestigiais presentes no meio de inoculação. Tendo isto em conta e, apesar da avaliação deste parâmetro ser recomendada em alguns protocolos publicados, esta pode ser opcionalmente desprezada, visto que a mutação que exclui o gene *bio* não pode ser revertida, podendo apenas verificar-se a presença da mutação do gene *uvrB*, estando esta intrinsecamente correlacionada com a dependência de biotina (64).

Cada uma das estirpes bacterianas de teste possui um diferente tipo de mutação no operão de metabolismo da histidina (*hisD3052* e *hisG46* nas estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100, respetivamente), as quais são responsáveis pela incapacidade que as bactérias apresentam em sintetizar o seu aminoácido essencial. Assim, esta característica *his*- das estirpes é confirmada pela demonstração da dependência de histidina para o seu crescimento em placas de agar seletivas (64). Como seria esperado, na presença somente de biotina, as estirpes não apresentaram crescimento microbiano, o que comprova a necessidade de histidina para o seu processo de multiplicação (figuras 17A e 18A).

De acordo com as duas dependências anteriormente avaliadas isoladamente, é esperado que o crescimento de ambas as estirpes em placas suplementadas com biotina e histidina demonstre a dependência destas moléculas para o seu crescimento. Assim, a presença de crescimento microbiano nesse tipo de placas seletivas foi verificada, como esperado (figuras 17C e 18C).

A mutação *rfa*, presente nas estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100, promove a perda parcial da camada de lipopolissacáridos que envolve a bactéria, aumentando a sua permeabilidade a macromoléculas (como o cristal violeta), as quais normalmente não conseguem penetrar a membrana (60,61,64). Por isto, as estirpes com este tipo de mutação são sensíveis ao cristal violeta, não conseguindo multiplicar-se na sua presença, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. Assim sendo, para ambas as estirpes (figuras 17D e 18D), a presença da mutação *rfa* foi verificada através da ausência de crescimento microbiano à volta do poço onde se colocou o cristal violeta.

As estirpes bacterianas de teste possuem a mutação *uvrB*, a qual consiste na deleção de um gene que codifica o sistema de reparação por excisão do ADN, aumentando a sua sensibilidade na deteção de compostos mutagénicos. A presença deste tipo de mutação pode ser confirmada pela demonstração de uma maior sensibilidade à luz UV (60,61,64). Desse modo, como seria esperado, verificou-se a ausência de crescimento das estirpes de *S. typhimurium* TA98 (figura 17E) e TA100 (figura 18E) na zona da placa que foi exposta à luz UV, comparativamente com a zona não exposta onde ocorreu crescimento microbiano.

A presença do plasmídeo pKM101, em ambas as estirpes bacterianas, desencadeia o processo de reversão com vários compostos mutagénicos, os quais são mais difíceis de ser detetados por estirpes que não possuem esse plasmídeo. Nesse sentido, o plasmídeo aumenta a mutagénese química e espontânea, melhorando o sistema de reparação do ADN propenso a erros. Essa molécula confere resistência à ampicilina, sendo o antibiótico considerado um marcador conveniente para detetar a presença do plasmídeo nas bactérias (60,61,64). Posto isto, no presente estudo, foi possível a visualização de crescimento das estirpes de *S. typhimurium* TA98 (figura 17F) e TA100 (figura 18F), o que demonstra a presença do plasmídeo pKM101 nessas estirpes.

Tabela 15 - Resumo dos resultados esperados e dos respectivos resultados obtidos para cada característica fenotípica em estudo, no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe de *S. typhimurium* TA98.

<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		
Característica fenotípica a avaliar	Resultado esperado	Resultado obtido
Dependência de biotina	Ausência de crescimento microbiano	Ocorrência de crescimento microbiano
Dependência de histidina	Ausência de crescimento microbiano	Ausência de crescimento microbiano
Dependência de biotina/histidina	Ocorrência de crescimento microbiano	Ocorrência de crescimento microbiano
Presença de mutação <i>rfa</i>	Sem crescimento, em volta do poço com cristal violeta	Sem crescimento, em volta do poço
Presença de mutação <i>uvrB</i>	Sem crescimento, na zona da placa exposta à luz UV	Sem crescimento, na zona exposta à luz UV
Presença do plasmídeo pKM101	Ocorrência de crescimento microbiano	Ocorrência de crescimento microbiano

Tabela 16 - Resumo dos resultados esperados e dos respectivos resultados obtidos para cada característica fenotípica em estudo, no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe de *S. typhimurium* TA100.

<i>Salmonella typhimurium</i> TA100		
Característica fenotípica a avaliar	Resultado esperado	Resultado obtido
Dependência de biotina	Ausência de crescimento microbiano	Ocorrência de crescimento microbiano
Dependência de histidina	Ausência de crescimento microbiano	Ausência de crescimento microbiano
Dependência de biotina/histidina	Ocorrência de crescimento microbiano	Ocorrência de crescimento microbiano
Presença de mutação <i>rfa</i>	Sem crescimento, em volta do poço com cristal violeta	Sem crescimento, em volta do poço
Presença de mutação <i>uvrB</i>	Sem crescimento, na zona da placa exposta à luz UV	Sem crescimento, na zona exposta à luz UV
Presença do plasmídeo pKM101	Ocorrência de crescimento microbiano	Ocorrência de crescimento microbiano

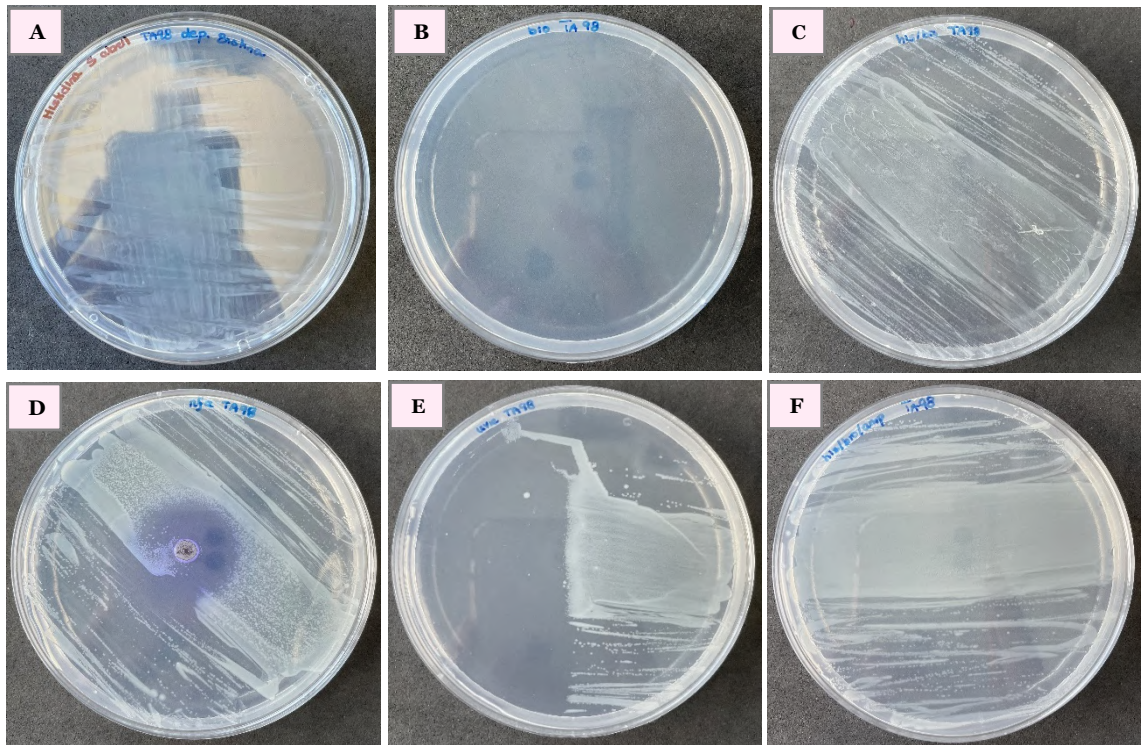


Figura 17 – Fotografias representativas das placas obtidas no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA98. Os números representam: (A) dependência de biotina, (B) dependência de histidina, (C) dependência de biotina e histidina, (D) presença da mutação *rfa*, (E) presença da mutação *uvrB* e (F) presença do plasmídeo pKM101.

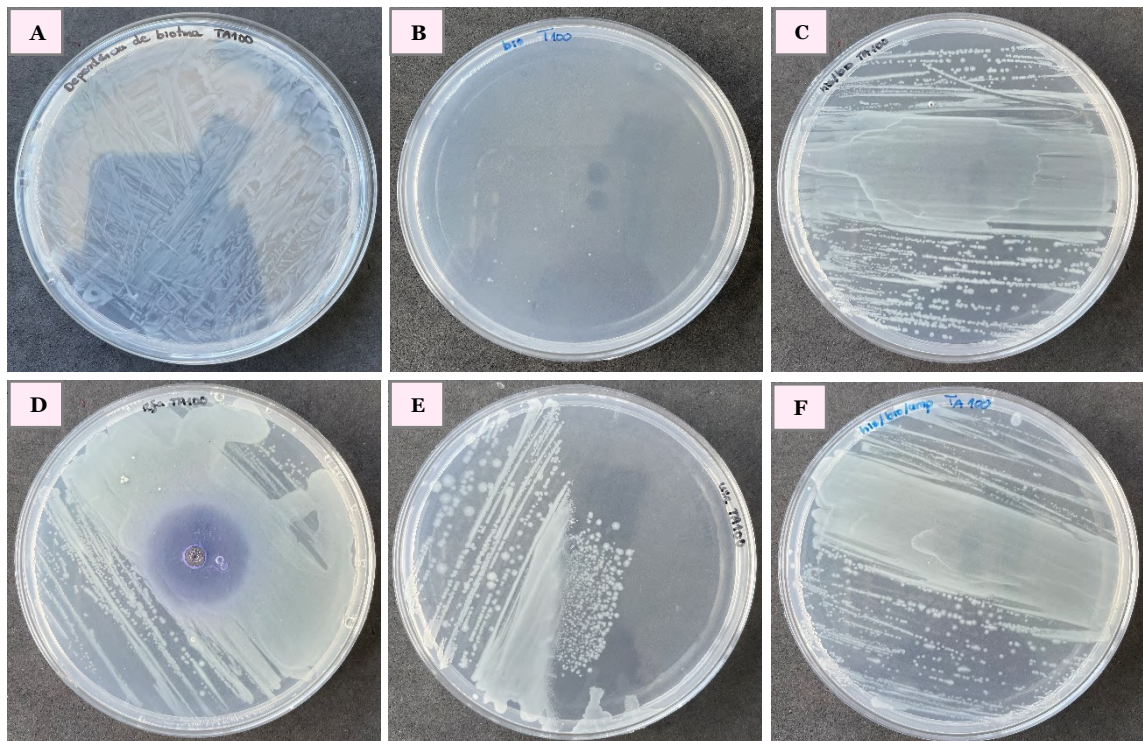


Figura 18 – Fotografias representativas das placas obtidas no ensaio de confirmação do genótipo da estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA100. Os números representam: (A) dependência de biotina, (B) dependência de histidina, (C) dependência de biotina e histidina, (D) presença da mutação *rfa*, (E) presença da mutação *uvrB* e (F) presença do plasmídeo pKM101.

Os controlos positivos utilizados foram compostos mutagénicos padrão com especificidade para a respetiva estirpe bacteriana, amplamente definida na literatura (61,62). Desse modo, foi necessário determinar a concentração que promovesse, eficazmente, a sua ação mutagénica mas que, em simultâneo, não provocasse toxicidade para as bactérias. Como referido nas considerações do ponto 1.1. deste subcapítulo 2.3., a toxicidade é avaliada qualitativamente, com base nos dois seguintes parâmetros de visualização: redução significativa do *background lawn* ou a diminuição do número de colónias revertentes, em comparação com as culturas bacterianas expostas a concentrações inferiores. Normalmente, a concentração na qual estes parâmetros são visualizados é definida como a concentração máxima a utilizar no ensaio (118,132).

Estes controlos foram utilizados numa concentração otimizada para as condições do nosso laboratório, a qual foi escolhida como sendo a concentração que induziu, confiavelmente, um aumento do número de colónias revertentes, em comparação com as colónias revertentes espontâneas (132). Por análise da figura 19 (A), o controlo positivo da estirpe de *S. typhimurium* TA98, designado de 2-nitrofluoreno, não apresentou toxicidade para a totalidade de concentrações testadas. Contrariamente, a azida de sódio, considerada como o controlo positivo específico para a *S. typhimurium* TA100, apresentou toxicidade para as bactérias nas concentrações de 10 e 20 µg/placa (figura 19 (B)). Este perfil tóxico foi classificado com base na visualização dos dois parâmetros (redução do *background lawn* e do número de colónias revertentes), em ambas as concentrações de teste (figura 21).

Como mencionado anteriormente, segundo (Levy et al., 2019a), a escolha de uma concentração que se encontre a meio da curva dose-resposta de cada controlo positivo é recomendada. De um modo concordante, no presente estudo, a concentração ideal escolhida para cada controlo positivo foi 5 µg/placa para o 2-nitrofluoreno (TA98). No caso da azida de sódio (TA100), devido à presença de toxicidade, a concentração a meio da curva dose-resposta seria a de 2,5 µg/placa. Contudo, a concentração de 5 µg/placa também não apresentou toxicidade para as bactérias e é a que, amplamente, se encontra mencionada na literatura, tendo, nesse sentido, sido adotada para a realização do ensaio (132).

Em semelhança ao controlo positivo, houve também a necessidade de determinar a concentração máxima de DMSO tolerada pelas bactérias, sem causar toxicidade e que, concomitantemente, apresentasse o número de colónias revertentes espontâneos dentro dos intervalos característicos de cada estirpe, descritos na tabela 12 (20-50 para *S. typhimurium* TA98 e 75-200 para *S. typhimurium* TA100).

Assim, conforme apresentado na figura 20, foi possível compreender que a totalidade de concentrações de teste do DMSO não provocou redução do *background lawn* para ambas as estirpes bacterianas, estando o número de revertentes espontâneos obtidos incluídos nos intervalos característicos, o que levou à conclusão de que as concentrações estudadas desse composto não apresentaram toxicidade para as bactérias. Desse modo, a concentração de DMSO a utilizar (2,5 $\mu\text{L}/\text{placa}$), correspondendo à concentração máxima de OE, não apresentou qualquer parâmetro de toxicidade, tendo sido esta adotada para a realização dos ensaios (figura 22).

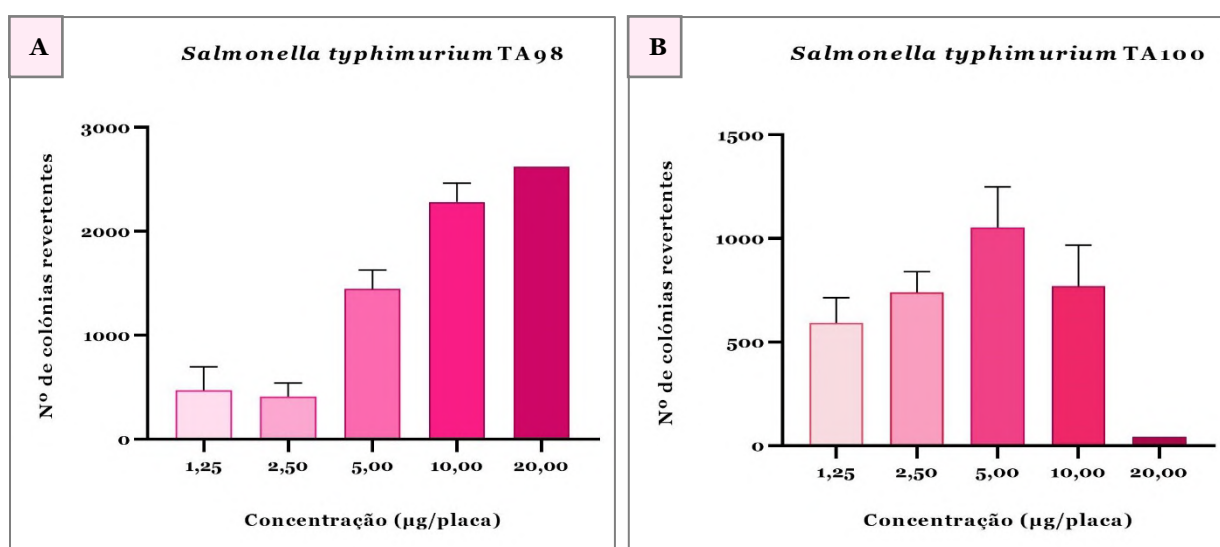


Figura 19 – Gráficos dos números de colônias revertentes obtidos para os controles positivos com especificidade estirpes bacterianas de *S. typhimurium*. Os controles positivos correspondem nomeadamente a: (A) 2-nitrofluoreno (TA98) e (B) azida de sódio (TA100). Estes gráficos foram utilizados para determinar a concentração a utilizar destes compostos, na realização dos subsequentes ensaios.

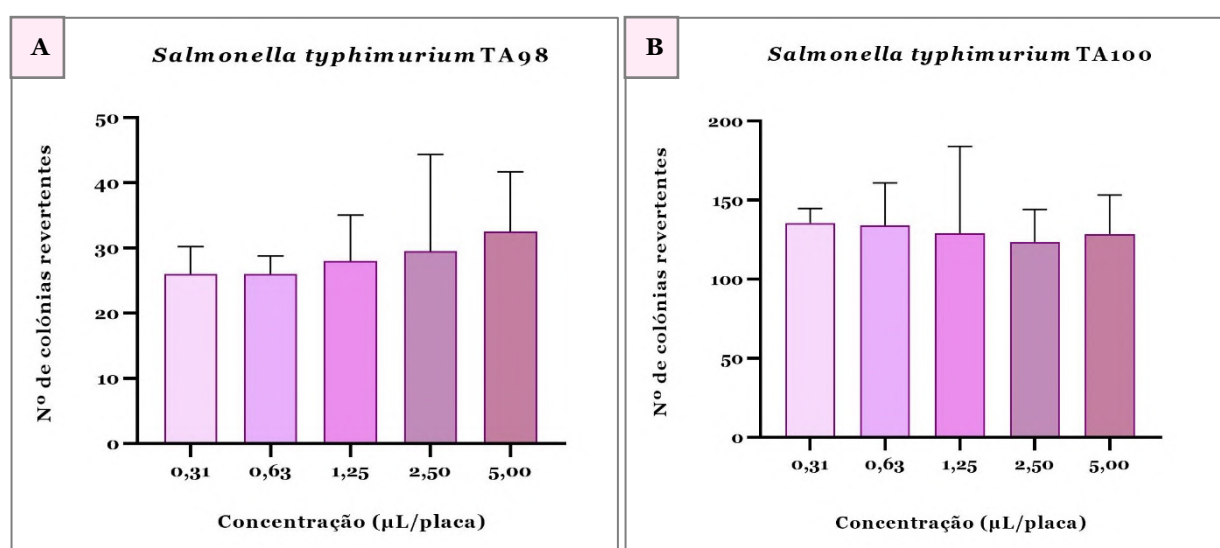


Figura 20 – Gráficos dos números de colônias revertentes espontâneas obtidas pelo DMSO, para ambas as estirpes bacterianas de *S. typhimurium*: (A) TA98 e (B) TA100. Estes gráficos foram utilizados para determinar a concentração a utilizar, na realização dos subsequentes ensaios.

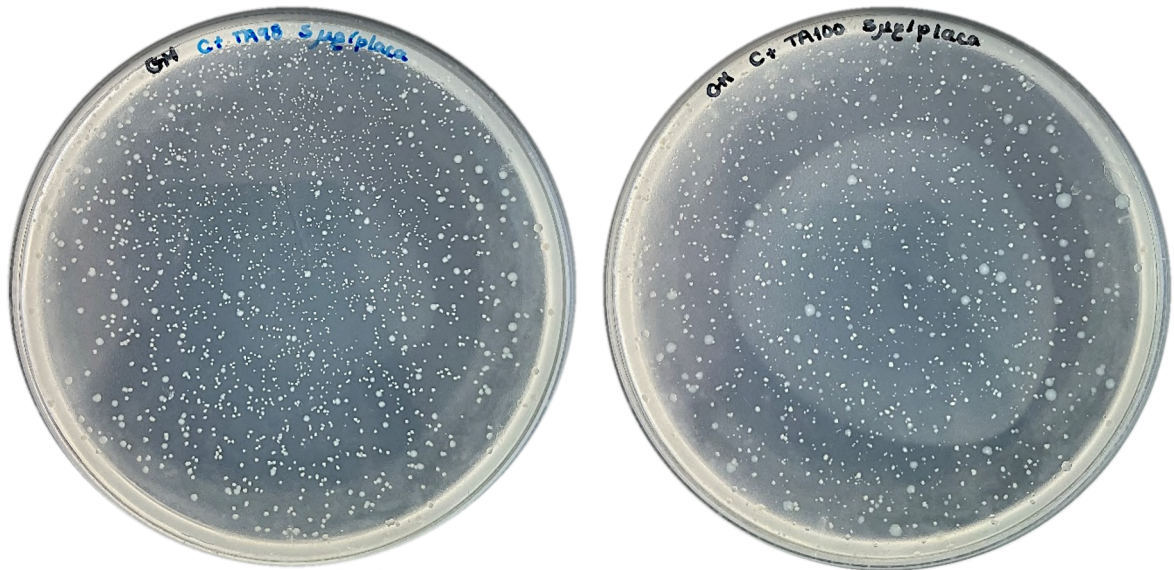


Figura 21 – Fotografias representativas das placas do teste de mutação reversa bacteriana, onde as culturas bacterianas foram expostas com o respetivo controlo positivo na concentração de teste adotada (5 µg/placa). Na figura, as placas são correspondentes a: *S. typhimurium* TA98 (esquerda) e TA100 (direita).

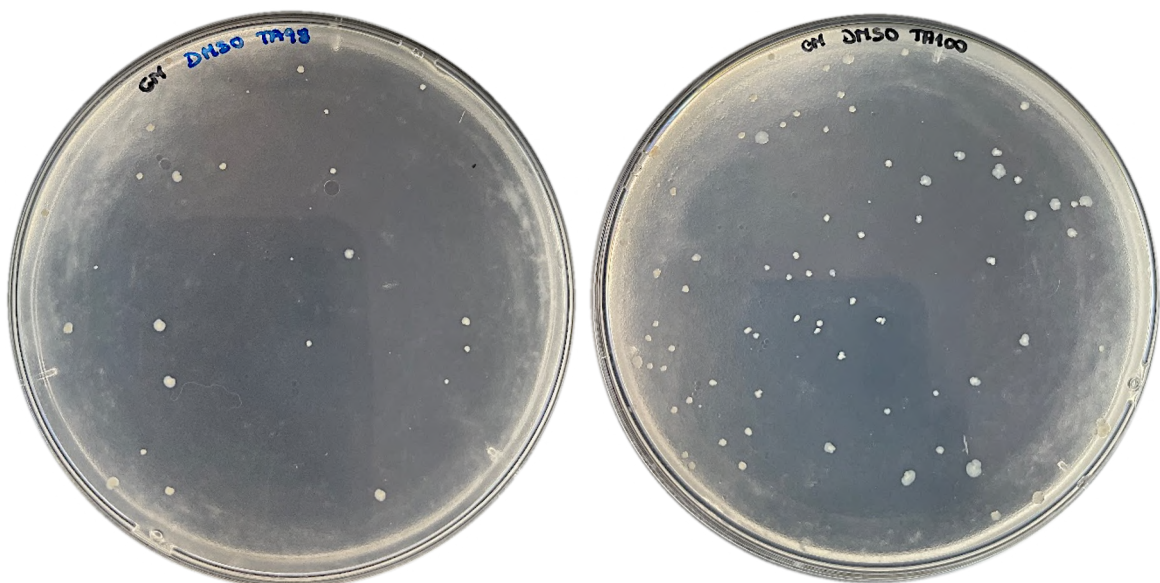


Figura 22 – Fotografias representativas das placas do teste de mutação reversa bacteriana, onde as culturas bacterianas foram expostas com o controlo de solvente dos OE (DMSO) na concentração de teste adotada (2,5 µL/placa). Na figura, as placas são correspondentes a: *S. typhimurium* TA98 (esquerda) e TA100 (direita).

Através dos resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados, procedeu-se à criação dos gráficos de controlo para o controlo negativo (figuras 23-24) e o controlo de solvente (figuras 25-28), respetivo de cada tipo de extrato de planta, nas estirpes bacterianas de *S. typhimurium* TA98 e TA100. Com o intuito de se obter uma maior precisão, foram definidos limites que permitiram sustentar a decisão de aceitar ou rejeitar um ensaio, consoante os valores dos controlos de solvente (ou negativo). Apesar de não existir nenhum parâmetro estatístico padrão globalmente aceite, Levy et al. (2019b) recomendam que a média \pm duas (2) vezes o desvio padrão é um bom ponto de partida para ser considerado como limite de alerta, o qual realça a necessidade de uma possível intervenção para investigar o problema, antes de ser necessário rejeitar resultados obtidos em vários ensaios. Para além disso, a média \pm três (3) vezes o desvio padrão pode ser considerado como limite de rejeição, o qual, caso seja ultrapassado, realça que esse ensaio deve ser considerado inválido. Desse modo, considerou-se os dois tipos de limites referidos e, como se observa nas seguintes figuras (23-28), não houve a necessidade de rejeitar nenhum ensaio realizado, devido ao facto de apenas um ensaio, em cada controlo, ter ultrapassado apenas um dos limites de alerta e não, um dos limites de rejeição (118).

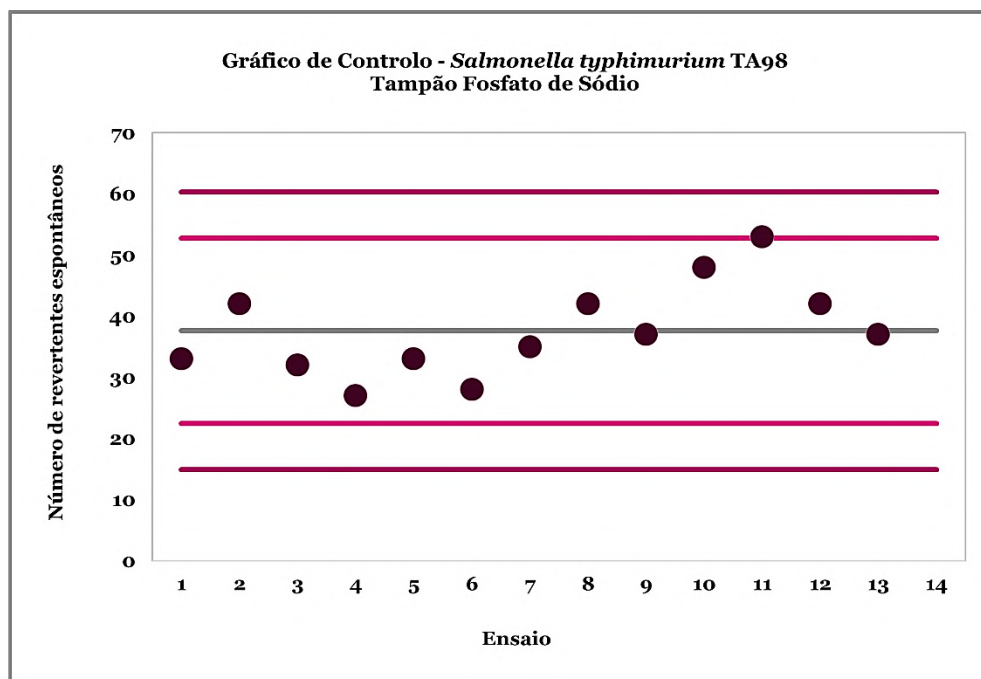


Figura 23 – Gráfico de controlo, num conjunto de 13 ensaios realizados ao longo do estudo com os dois tipos de extratos de plantas, para o controlo negativo (tampão fosfato de sódio) na estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA98. A construção deste gráfico foi realizada a partir dos valores de colónias revertentes obtidas para o respetivo controlo, onde a linha horizontal cinzenta corresponde ao valor médio da totalidade de ensaios, enquanto as linhas coloridas (rosa e roxo) representam, respetivamente, o seguinte: limites de alerta (média \pm 2 vezes o desvio padrão) e limites de rejeição (média \pm 3 vezes o desvio padrão). Desse modo, os valores são os seguintes: média = 37,62; limite inferior de alerta = 22,46; limite superior de alerta = 52,77; limite inferior de rejeição = 14,88 e limite superior de rejeição = 60,35.

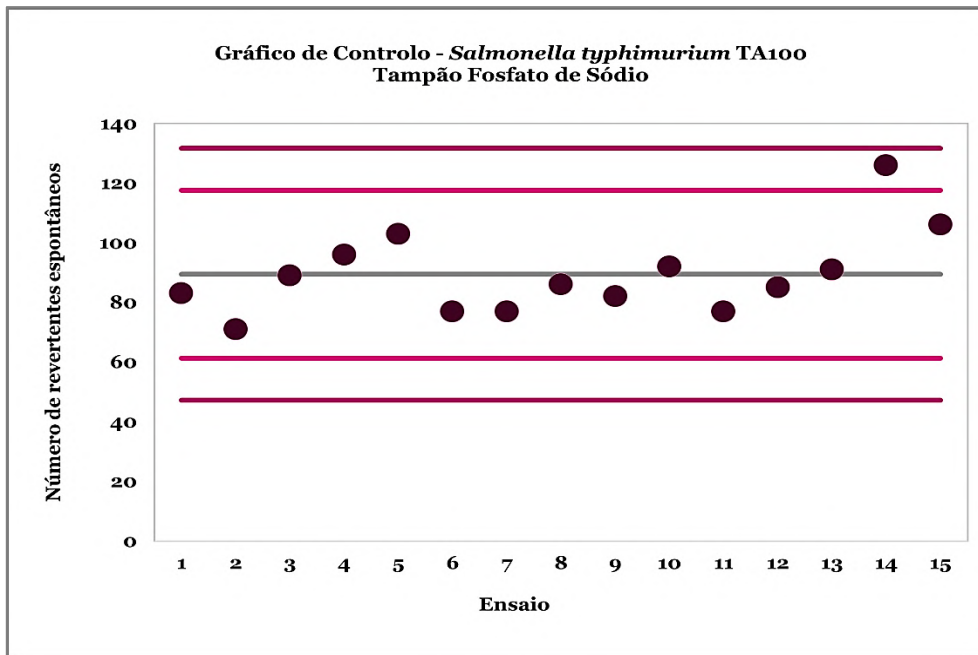


Figura 24 – Gráfico de controle, num conjunto de 15 ensaios realizados ao longo do estudo com os dois tipos de extratos de plantas, para o controlo negativo (tampão fosfato de sódio) na estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA100. A construção deste gráfico foi realizada a partir dos valores de colónias revertentes obtidas para o respetivo controlo, onde a linha horizontal cinzenta corresponde ao valor médio da totalidade de ensaios, enquanto as linhas coloridas (rosa e roxo) representam, respetivamente, o seguinte: limites de alerta (média ± 2 vezes o desvio padrão) e limites de rejeição (média ± 3 vezes o desvio padrão). Desse modo, os valores são os seguintes: média = 89,40; limite inferior de alerta = 61,22; limite superior de alerta = 117,58; limite inferior de rejeição = 47,13 e limite superior de rejeição = 131,67.

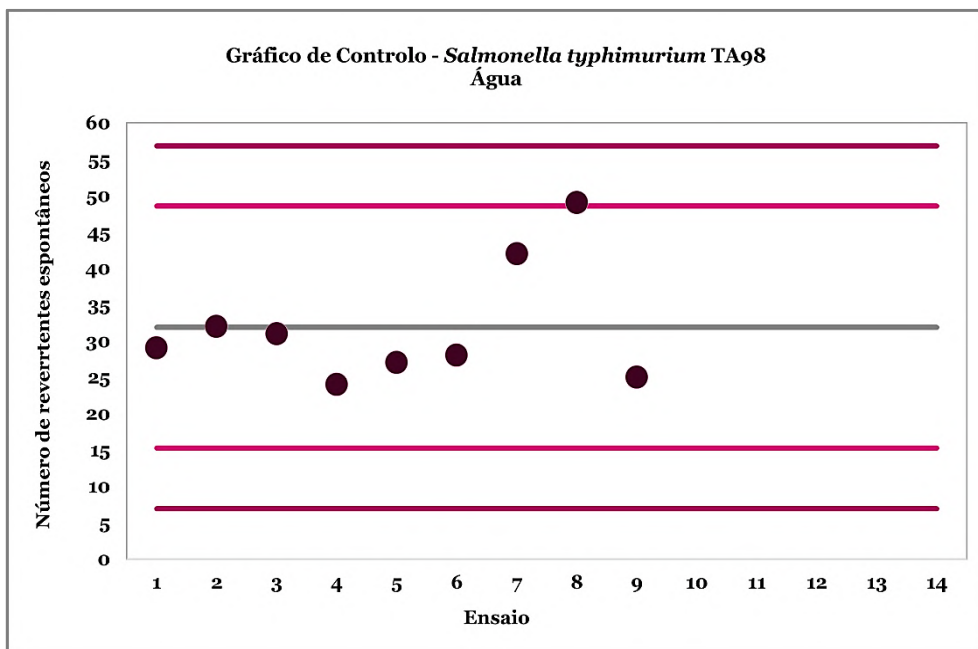


Figura 25 – Gráfico de controle, num conjunto de 9 ensaios realizados ao longo do estudo com os hidrolatos, para o respetivo controlo de solvente (água) na estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA98. A construção deste gráfico foi realizada a partir dos valores de colónias revertentes espontâneas obtidas para o controlo, onde a linha horizontal cinzenta corresponde ao valor médio da totalidade de ensaios, enquanto as linhas coloridas (rosa e roxo) representam, respetivamente, o seguinte: limites de alerta (média ± 2 vezes o desvio padrão) e limites de rejeição (média ± 3 vezes o desvio padrão). Desse modo, os valores são os seguintes: média = 31,89; limite inferior de alerta = 15,26; limite superior de alerta = 48,52; limite inferior de rejeição = 6,95 e limite superior de rejeição = 56,83.

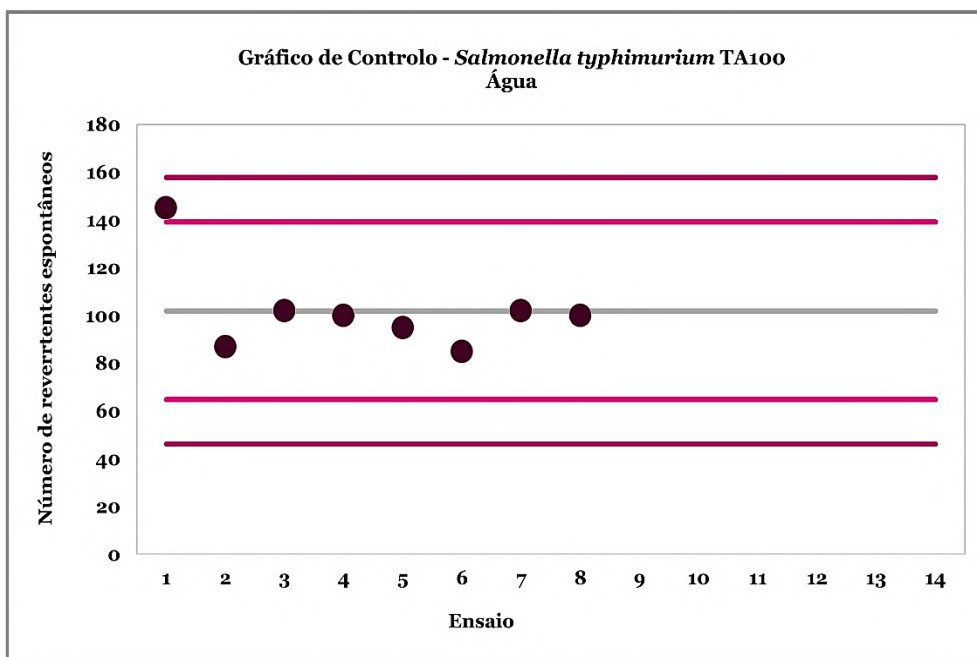


Figura 26 – Gráfico de controle, num conjunto de 8 ensaios realizados ao longo do estudo com os hidrolatos, para o respetivo controlo de solvente (água) na estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA100. A construção deste gráfico foi realizada a partir dos valores de colónias revertentes espontâneas obtidas para o controlo, onde a linha horizontal cinzenta corresponde ao valor médio da totalidade de ensaios, enquanto as linhas coloridas (rosa e roxo) representam, respetivamente, o seguinte: limites de alerta (média ± 2 vezes o desvio padrão) e limites de rejeição (média ± 3 vezes o desvio padrão). Desse modo, os valores são os seguintes: média = 102,00; limite inferior de alerta = 64,81; limite superior de alerta = 139,19; limite inferior de rejeição = 46,22 e limite superior de rejeição = 157,78.

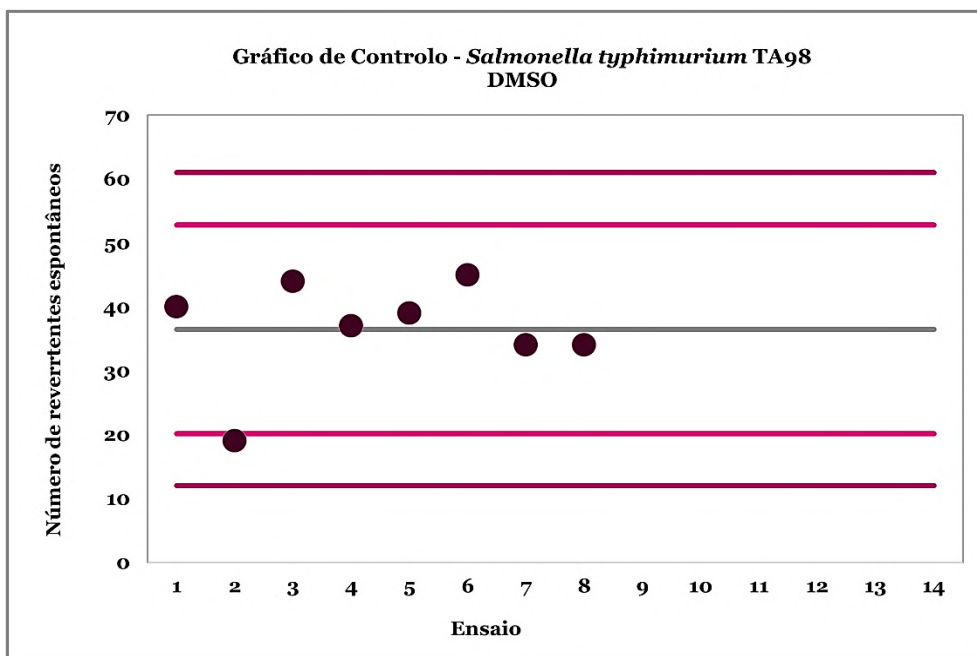


Figura 27 – Gráfico de controle, num conjunto de 8 ensaios realizados ao longo do estudo com os OE, para o respetivo controlo de solvente (DMSO) na estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA98. A construção deste gráfico foi realizada a partir dos valores de colónias revertentes espontâneas obtidas para o controlo, onde a linha horizontal cinzenta corresponde ao valor médio da totalidade de ensaios, enquanto as linhas coloridas (rosa e roxo) representam, respetivamente, o seguinte: limites de alerta (média ± 2 vezes o desvio padrão) e limites de rejeição (média ± 3 vezes o desvio padrão). Desse modo, os valores são os seguintes: média = 36,50; limite inferior de alerta = 20,18; limite superior de alerta = 52,82; limite inferior de rejeição = 12,02 e limite superior de rejeição = 60,98.

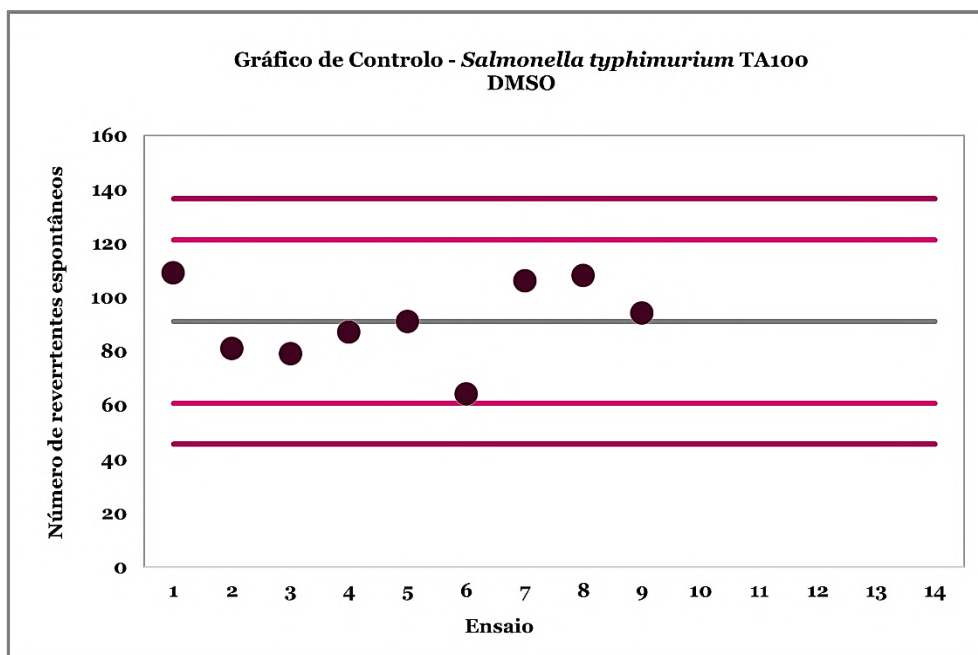


Figura 28 – Gráfico de controle, num conjunto de 9 ensaios realizados ao longo do estudo com os OE, para o respetivo controlo de solvente (DMSO) na estirpe bacteriana de *S. typhimurium* TA100. A construção deste gráfico foi realizada a partir dos valores de colónias revertentes espontâneas obtidas para o controlo, onde a linha horizontal cinzenta corresponde ao valor médio da totalidade de ensaios, enquanto as linhas coloridas (rosa e roxo) representam, respetivamente, o seguinte: limites de alerta (média \pm 2 vezes o desvio padrão) e limites de rejeição (média \pm 3 vezes o desvio padrão). Desse modo, os valores são os seguintes: média = 91,00; limite inferior de alerta = 60,70; limite superior de alerta = 121,30; limite inferior de rejeição = 45,55 e limite superior de rejeição = 136,45.

Apesar de, nas diferentes referências da literatura, não haver uma total concordância quanto às abordagens de classificação de um resultado positivo, (Levy et al., 2019b) recomendam a aplicação de vários procedimentos de avaliação dos dados, tendo os resultados dos controlos de solvente como comparação. Do mesmo modo, para que um valor de controlo positivo seja válido, precisa também atender aos critérios do laboratório para uma resposta positiva (118).

Dentro dos parâmetros mais comumente descritos na literatura, (Maron & Ames, 1983) já teria abordado o rácio de mutagenicidade, denominando de “regra do dobro”, referindo que uma substância de teste tem uma resposta negativa, se o R.M., o qual é obtido pela comparação do número de revertentes induzidos com os revertentes espontâneos, for inferior a duas vezes. Contudo, este critério utilizado por si só não faz distinção entre estirpes com maior número de revertentes espontâneos e as que apresentam um menor número. Por outro lado, tal como se encontra referido na diretriz da OCDE, a significância estatística, descrita como outra abordagem possível de ser aplicada, não deve ser utilizada como o único fator determinante para uma resposta positiva. Além disso, até ao momento, existem algumas discordâncias relativamente a este tipo de análise, devido ao facto de ainda não existir um único tipo de distribuição e um valor de p definido para serem utilizados neste tipo de teste (64).

Posto isto, (Levy et al., 2019b) referem quanto à necessidade de se considerar outros critérios, de modo a garantir que os valores aleatórios obtidos durante o teste não são classificados erroneamente como resultados positivos. Neste sentido, foram sugeridas três abordagens para a possível classificação de um resultado positivo, nomeadamente: o R.M., o aumento relacionado com a concentração e o aumento fora dos intervalos históricos de controlo (118).

Assim, tal como se procedeu aquando do tratamento de resultados, o R.M. foi calculado para cada condição de teste, na totalidade de ensaios independentes do respetivo extrato de planta, em cada estirpe bacteriana, tendo o respetivo controlo de solvente como comparação. De acordo com o que se encontra mencionado anteriormente acerca deste parâmetro, validou-se que o limite do R.M. para uma resposta negativa a este parâmetro tem de ser de dois [2] para as estirpes bacterianas de teste, visto que ambas apresentam um número de revertentes espontâneos superior a vinte [20], o que possivelmente não teria influência na sensibilidade de deteção dos compostos mutagénicos (118).

Relativamente ao aumento relacionado com a concentração, este parâmetro significa um número progressivo de colónias revertentes em concentrações crescentes, nas quais há mínima, ou não há mesmo, evidência de toxicidade do extrato de planta para as bactérias. Caso houvesse a presença de um *platô* ou uma significativa queda no número de revertentes nas concentrações maiores, poderia ser uma indicação de toxicidade do extrato. Como mencionado anteriormente, para auxílio à determinação da possível dose-resposta, foram utilizados testes estatísticos de tendência (118).

A última abordagem mencionada (aumento fora dos intervalos históricos de controlo) tem como intuito a verificação de se a média do número de revertentes induzidos pelo extrato de planta está fora dos intervalos históricos do laboratório, relativamente ao respetivo controlo de solvente, tendo como base os limites de alerta (média \pm duas vezes o desvio padrão) (118).

Assim, tendo em conta as informações publicadas pelo grupo de trabalho de (Levy et al., 2019b), concluiu-se que uma resposta é claramente positiva se, para pelo menos uma estirpe bacteriana, todos os seguintes critérios forem atendidos: aumento do número de revertentes relacionado com a concentração (dose-resposta); R.M. superior a dois, em pelo menos uma concentração de teste; aumento fora do histórico de dados do controlo de solvente (incluindo os limites de alerta), em pelo menos uma concentração de teste (118).

Tabela 17 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA98 nas diferentes condições de teste do hidrolato de *Hamamelis virginiana* e, conseqüentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi a água, enquanto o controlo positivo correspondeu ao 2-nitrofluoreno.

Condição	Concentração	Ensaio 1			Ensaio 2			Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	42	32	27	33	28	35	32,83 \pm 5,42	-
Solvente	5,00 μ L/placa	24	27	28	42	49	25	32,50 \pm 10,41	-
Positivo	5,00 μ g/placa	404	437	732	1324	1238	1561	949,33 \pm 490,91	29,21
Extrato	0,31 μ L/placa	23	24	25	35	25	31	27,17 \pm 4,75	0,84
	0,63 μ L/placa	24	32	30	43	34	37	33,33 \pm 6,44	1,03
	1,25 μ L/placa	23	31	37	34	35	39	33,17 \pm 5,67	1,02
	2,50 μ L/placa	37	25	24	30	34	26	29,33 \pm 5,28	0,90
	5,00 μ L/placa	21	28	19	36	39	46	31,50 \pm 10,63	0,97

Tabela 18 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA100 nas diferentes condições de teste do hidrolato de *Hamamelis virginiana* e, conseqüentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi a água, enquanto o controlo positivo correspondeu à azida de sódio.

Condição	Concentração	Ensaio 1			Ensaio 2			Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	89	96	103	77	77	86	88,00 \pm 10,35	-
Solvente	5,00 μ L/placa	102	100	95	85	102	100	97,33 \pm 6,56	-
Positivo	5,00 μ g/placa	2192	2604	2476	2892	2324	2640	2521,33 \pm 248,10	25,90
Extrato	0,31 μ L/placa	93	61	115	71	65	92	82,83 \pm 20,77	0,85
	0,63 μ L/placa	65	84	108	91	82	77	84,50 \pm 14,40	0,87
	1,25 μ L/placa	43	75	63	76	98	74	71,50 \pm 18,03	0,73
	2,50 μ L/placa	82	83	91	100	76	92	87,33 \pm 8,62	0,90
	5,00 μ L/placa	76	91	82	90	96	83	86,33 \pm 7,28	0,89

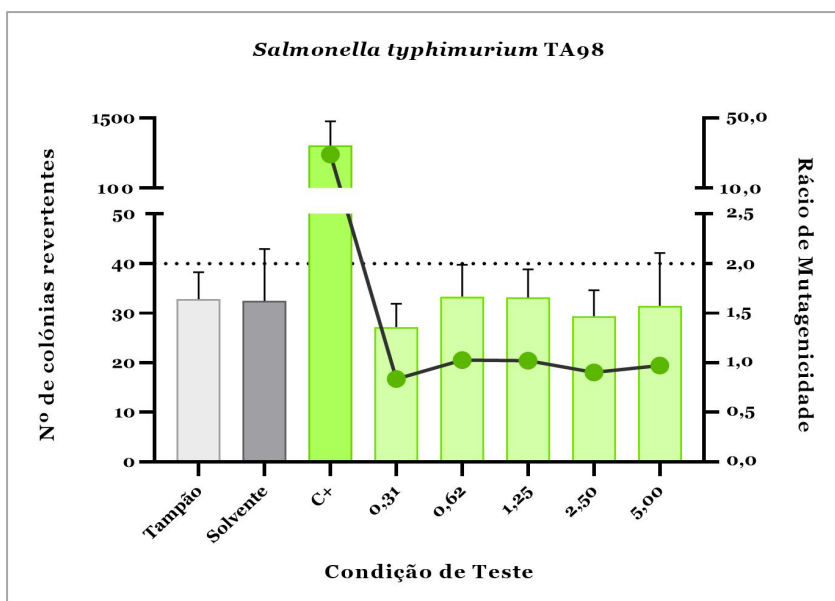


Figura 29 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de *Hamamelis virginiana* na estirpe de *S. typhimurium* TA98. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do hidrolato. As concentrações de teste estão expressas em $\mu\text{L}/\text{placa}$.

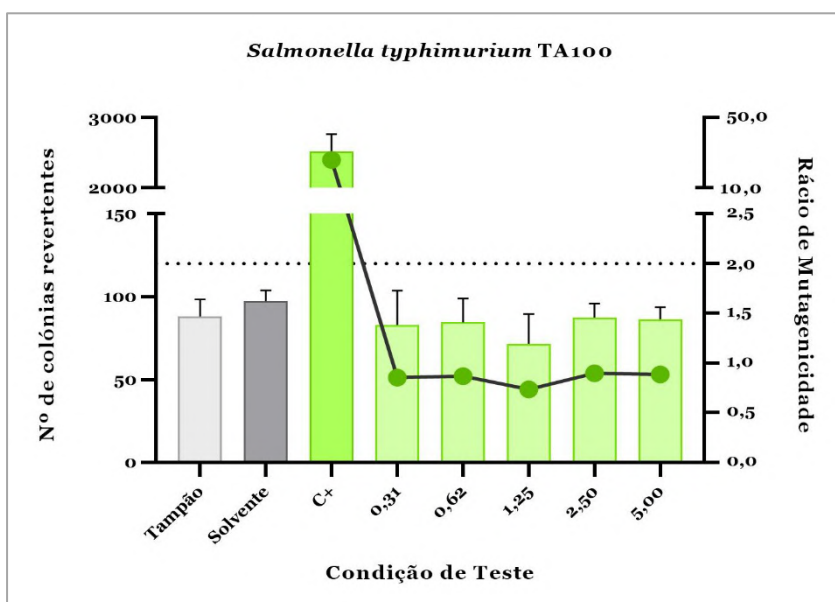


Figura 30 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de *Hamamelis virginiana* na estirpe de *S. typhimurium* TA100. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do hidrolato.

Tabela 19 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA98 nas diferentes condições de teste do hidrolato de *Matricaria chamomilla* e, conseqüentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi a água, enquanto o controlo positivo correspondeu ao 2-nitrofluoreno.

Condição	Concentração	Ensaio 1		Ensaio 2				Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	42	32	27	33	28	35	32,83 \pm 5,42	-
Solvente	5,00 μ L/placa	24	27	28	42	49	25	32,50 \pm 10,41	-
Positivo	5,00 μ g/placa	404	437	732	1324	1238	1561	949,33 \pm 490,91	29,21
Extrato	0,31 μ L/placa	26	35	33	24	39	32	31,50 \pm 5,61	0,97
	0,63 μ L/placa	26	30	33	34	39	32	32,33 \pm 4,32	0,99
	1,25 μ L/placa	31	36	34	35	29	40	34,17 \pm 3,87	1,05
	2,50 μ L/placa	38	40	23	29	31	18	29,83 \pm 8,47	0,92
	5,00 μ L/placa	22	28	24	25	43	37	29,83 \pm 8,33	0,92

Tabela 20 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA100 nas diferentes condições de teste do hidrolato de *Matricaria chamomilla* e, conseqüentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi a água, enquanto o controlo positivo correspondeu à azida de sódio.

Condição	Concentração	Ensaio 1		Ensaio 2				Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	89	96	103	77	77	86	88,00 \pm 10,35	-
Solvente	5,00 μ L/placa	102	100	95	85	102	100	97,33 \pm 6,56	-
Positivo	5,00 μ g/placa	2192	2604	2476	2892	2324	2640	2521,33 \pm 248,10	25,90
Extrato	0,31 μ L/placa	102	100	75	73	64	94	84,67 \pm 16,00	0,87
	0,63 μ L/placa	96	84	62	60	90	74	77,67 \pm 14,83	0,80
	1,25 μ L/placa	104	71	94	127	106	110	102,00 \pm 18,62	1,05
	2,50 μ L/placa	89	71	64	98	134	96	92,00 \pm 24,70	0,95
	5,00 μ L/placa	83	101	110	93	96	73	92,67 \pm 13,13	0,95

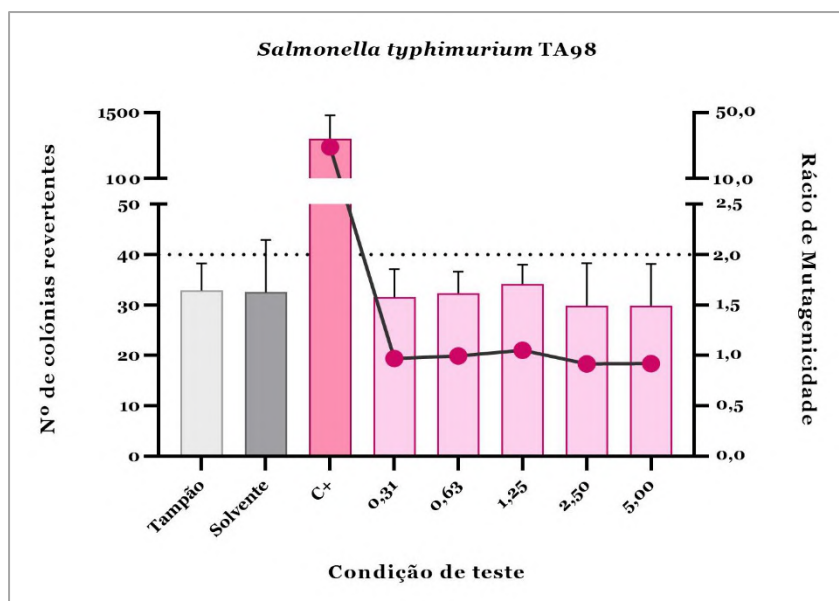


Figura 31 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de *Matricaria chamomilla* na estirpe de *S. typhimurium* TA98. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do hidrolato.

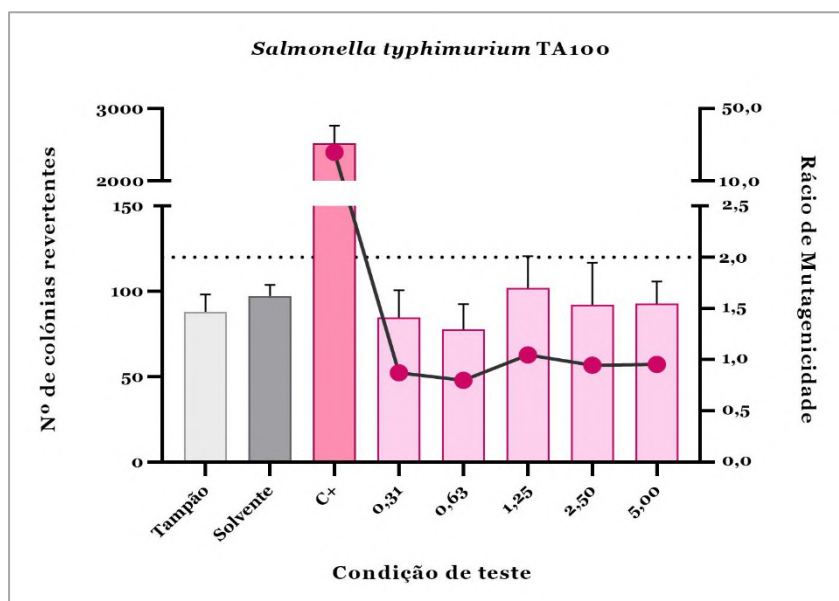


Figura 32 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de *Matricaria chamomilla* na estirpe de *S. typhimurium* TA100. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do hidrolato.

Tabela 21 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA98 nas diferentes condições de teste do hidrolato de *Ocimum basilicum* e, consequentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi a água, enquanto o controlo positivo correspondeu ao 2-nitrofluoreno.

Condição	Concentração	Ensaio 1			Ensaio 2			Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	42	32	27	33	28	35	32,83 \pm 5,42	-
Solvente	5,00 μ L/placa	24	27	28	42	49	25	32,50 \pm 10,41	-
Positivo	5,00 μ g/placa	404	437	732	1324	1238	1561	949,33 \pm 490,91	29,21
Extrato	0,31 μ L/placa	36	42	29	27	26	45	34,17 \pm 8,08	1,05
	0,63 μ L/placa	25	22	26	36	24	23	26,00 \pm 5,10	0,80
	1,25 μ L/placa	27	29	22	24	29	39	28,33 \pm 5,92	0,87
	2,50 μ L/placa	30	23	44	24	40	26	31,17 \pm 8,82	0,96
	5,00 μ L/placa	30	25	31	30	34	37	31,17 \pm 4,07	0,96

Tabela 22 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA100 nas diferentes condições de teste do hidrolato de *Ocimum basilicum* e, consequentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi a água, enquanto o controlo positivo correspondeu à azida de sódio. O asterisco (*) representa uma placa que foi invalidada para o ensaio, devido a contaminação.

Condição	Concentração	Ensaio 1			Ensaio 2			Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	89	96	103	77	77	86	88,00 \pm 10,35	-
Solvente	5,00 μ L/placa	102	100	95	85	102	100	97,33 \pm 6,56	-
Positivo	5,00 μ g/placa	2192	2604	2476	2892	2324	2640	2521,33 \pm 248,10	25,90
Extrato	0,31 μ L/placa	93	76	82	99	98	107	92,50 \pm 11,54	0,95
	0,63 μ L/placa	76	73	67	82	71	72	73,50 \pm 5,09	0,76
	1,25 μ L/placa	92	79	102	89	*	100	92,40 \pm 9,24	0,95
	2,50 μ L/placa	92	83	86	80	*	52	78,60 \pm 15,52	0,81
	5,00 μ L/placa	104	108	75	83	86	71	87,83 \pm 15,12	0,90

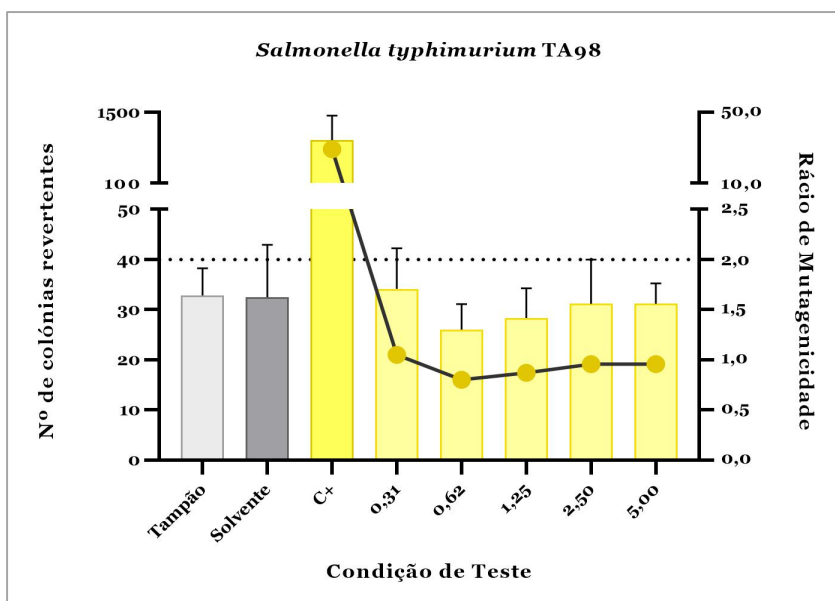


Figura 33 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de *Ocimum basilicum* na estirpe de *S. typhimurium* TA98. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do hidrolato.

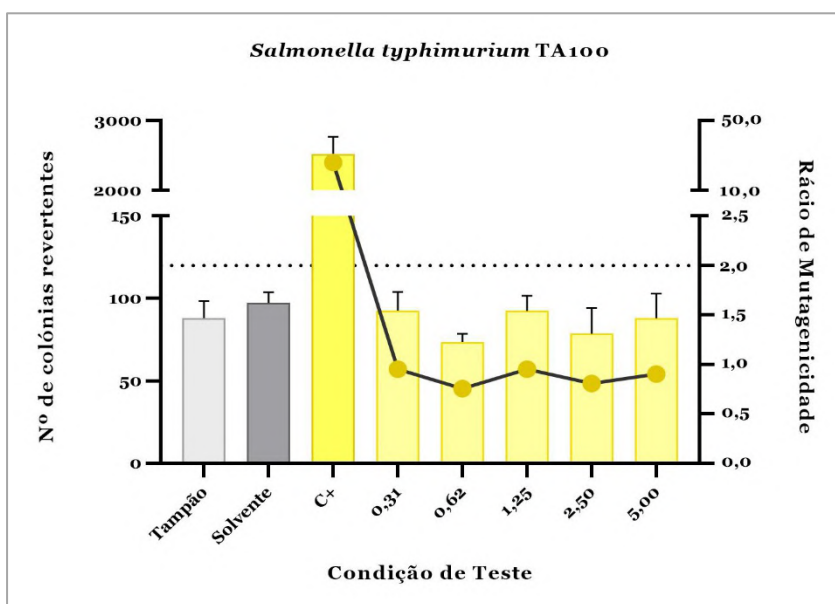


Figura 34 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o hidrolato de *Ocimum basilicum* na estirpe de *S. typhimurium* TA100. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do hidrolato.

Tabela 23 – Combinação dos três critérios para classificação dos resultados, relativamente aos hidrolatos: relação dose-resposta, rácio de mutagenicidade (R.M.) e aumento fora do histórico de controlo (>HC). O limite para determinar o >HC foi o limite superior de alerta do respetivo controlo de solvente (água), nomeadamente:

Hidrolato	Estirpe bacteriana	Dose-resposta	R.M.	> HC	Resultado
H-HV	<i>S. typhimurium</i> TA98	Não	< 2,0	Não	Negativo
	<i>S. typhimurium</i> TA100	Não	< 2,0	Não	
H-MC	<i>S. typhimurium</i> TA98	Não	< 2,0	Não	Negativo
	<i>S. typhimurium</i> TA100	Não	< 2,0	Não	
H-OB	<i>S. typhimurium</i> TA98	Não	< 2,0	Não	Negativo
	<i>S. typhimurium</i> TA100	Não	< 2,0	Não	

Tendo em conta os critérios de classificação mencionados anteriormente, pode-se referir que, para todos os hidrolatos em estudo, os resultados obtidos foram classificados como negativos, nas concentrações e estirpes bacterianas testadas no presente estudo. Esta classificação deve-se ao facto de os três hidrolatos (H-HV, H-MC e H-OB) terem apresentado as seguintes respostas (tabela 23), nas estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100: ausência de dose-resposta; R.M. inferior a dois [2], em todas as concentrações de teste; e aumento dentro do histórico de dados do controlo de solvente, na totalidade de concentrações do hidrolato. Nesse sentido, o R.M. inferior ao limite, em todas as concentrações dos diferentes hidrolatos, foi verificado nas diferentes tabelas presentes ao longo deste capítulo: 17-18, 19-20 e 21-22 para H-HV, H-MC e H-OB, respetivamente. Por outro lado, a partir das figuras 29-34, é possível observar a ausência de uma relação dose-resposta para os três hidrolatos em estudo, em ambas as estirpes bacterianas de teste.

Com base na análise anterior quanto ao potencial mutagénico dos três hidrolatos, é nos possível referir esses extratos em estudo não têm a capacidade de induzir mutações pontuais, do tipo *frameshift* ou por substituição dos pares de bases, no genoma da respetiva estirpe de *S. typhimurium*. Sendo as duas estirpes bacterianas de teste as que apresentam uma maior sensibilidade de deteção, teoricamente, os hidrolatos também não apresentarão mutagenicidade nas restantes estirpes recomendadas pela OCDE. Contudo, futuramente, é necessário realizar esse passo confirmatório para uma compreensão total do potencial mutagénico dos hidrolatos em estudo.

Tabela 24 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA98 nas diferentes condições de teste do OE de *Cupressus lusitanica* e, consequentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi o DMSO, enquanto o controlo positivo correspondeu ao 2-nitrofluoreno.

Condição	Concentração	Ensaio 1			Ensaio 2			Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	42	37	48	53	42	37	43,17 \pm 6,31	-
Solvente	2,50 μ L/placa	44	37	39	45	34	34	38,83 \pm 4,79	-
Positivo	5,00 μ g/placa	843	814	886	684	750	683	776,67 \pm 84,64	20,00
Extrato	0,16 μ L/placa	37	33	44	53	35	27	38,17 \pm 9,13	0,98
	0,31 μ L/placa	40	55	44	50	29	42	43,33 \pm 8,94	1,12
	0,63 μ L/placa	67	33	39	50	57	-	49,20 \pm 13,65	1,27
	1,25 μ L/placa	35	43	45	41	55	39	43,00 \pm 6,81	1,11
	2,50 μ L/placa	48	47	55	47	45	45	47,83 \pm 3,71	1,23

Tabela 25 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA100 nas diferentes condições de teste do OE de *Cupressus lusitanica* e, consequentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi o DMSO, enquanto o controlo positivo correspondeu à azida de sódio.

Condição	Concentração	Ensaio 1			Ensaio 2			Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	92	77	85	91	126	106	96,17 \pm 17,45	-
Solvente	2,50 μ L/placa	87	91	64	106	108	94	91,67 \pm 15,91	-
Positivo	5,00 μ g/placa	3200	2164	3428	2268	2564	2472	2682,67 \pm 514,31	29,27
Extrato	0,16 μ L/placa	88	87	79	93	93	102	90,33 \pm 7,69	0,99
	0,31 μ L/placa	100	78	93	107	120	70	94,67 \pm 18,50	1,03
	0,63 μ L/placa	89	88	107	117	119	116	106,00 \pm 14,17	1,16
	1,25 μ L/placa	108	87	75	119	95	110	99,00 \pm 16,36	1,08
	2,50 μ L/placa	91	104	85	98	122	153	108,83 \pm 25,10	1,19

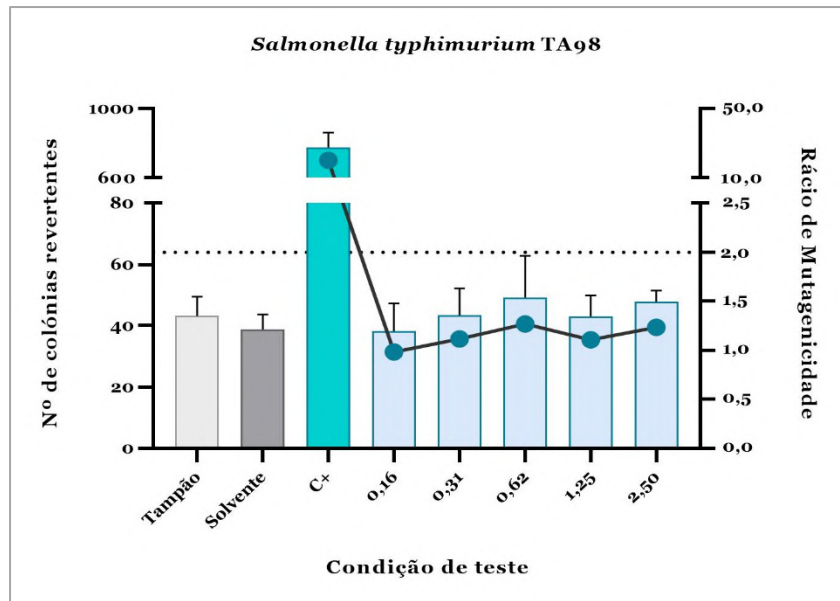


Figura 35 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de *Cupressus lusitanica* na estirpe de *S. typhimurium* TA98. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do OE.

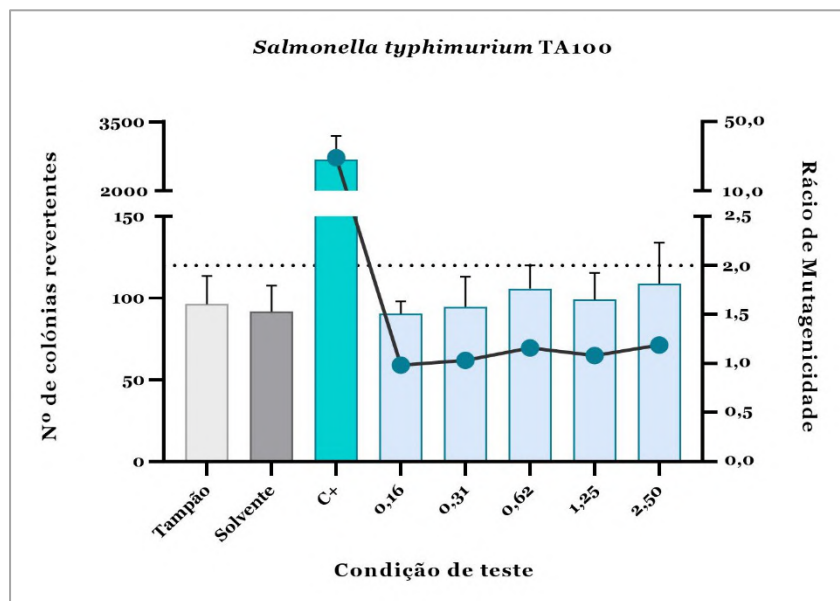


Figura 36 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de *Cupressus lusitanica* na estirpe de *S. typhimurium* TA100. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do OE.

Tabela 26 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA98 nas diferentes condições de teste do OE de *Ocimum basilicum* e, consequentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi o DMSO, enquanto o controlo positivo correspondeu ao 2-nitrofluoreno.

Condição	Concentração	Ensaio 1		Ensaio 2				Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	42	37	48	53	42	37	43,17 \pm 6,31	-
Solvente	2,50 μ L/placa	44	37	39	45	34	34	38,83 \pm 4,79	-
Positivo	5,00 μ g/placa	843	814	886	684	750	683	776,67 \pm 84,64	20,00
Extrato	0,16 μ L/placa	49	33	51	36	28	37	39,00 \pm 9,10	1,00
	0,31 μ L/placa	43	43	44	54	64	65	52,17 \pm 10,42	1,34
	0,63 μ L/placa	40	45	35	80	74	39	52,17 \pm 19,59	1,34
	1,25 μ L/placa	39	38	49	56	54	51	47,83 \pm 7,63	1,23
	2,50 μ L/placa	55	27	42	70	69	43	51,00 \pm 16,86	1,31

Tabela 27 – Valores de colónias revertentes obtidos nos 2 ensaios independentes com a estirpe de *S. typhimurium* TA100 nas diferentes condições de teste do OE de *Ocimum basilicum* e, consequentemente, os respetivos valores de média \pm desvio padrão (DP) e do rácio de mutagenicidade (R.M.). O controlo de solvente foi o DMSO, enquanto o controlo positivo correspondeu à azida de sódio.

Condição	Concentração	Ensaio 1		Ensaio 2				Média \pm DP	R.M.
		1	2	3	4	5	6		
Tampão	50,00 μ L/placa	92	77	85	91	126	106	96,17 \pm 17,45	-
Solvente	2,50 μ L/placa	87	91	64	106	108	94	91,67 \pm 15,91	-
Positivo	5,00 μ g/placa	3200	2164	3428	2268	2564	2472	2682,67 \pm 514,31	29,27
Extrato	0,16 μ L/placa	71	66	54	115	108	109	87,17 \pm 26,44	0,95
	0,31 μ L/placa	63	82	86	104	107	117	93,17 \pm 19,81	1,02
	0,63 μ L/placa	68	77	86	114	104	112	93,50 \pm 19,24	1,02
	1,25 μ L/placa	94	89	78	121	88	126	99,33 \pm 19,49	1,08
	2,50 μ L/placa	75	69	69	102	128	118	93,50 \pm 16,10	1,02

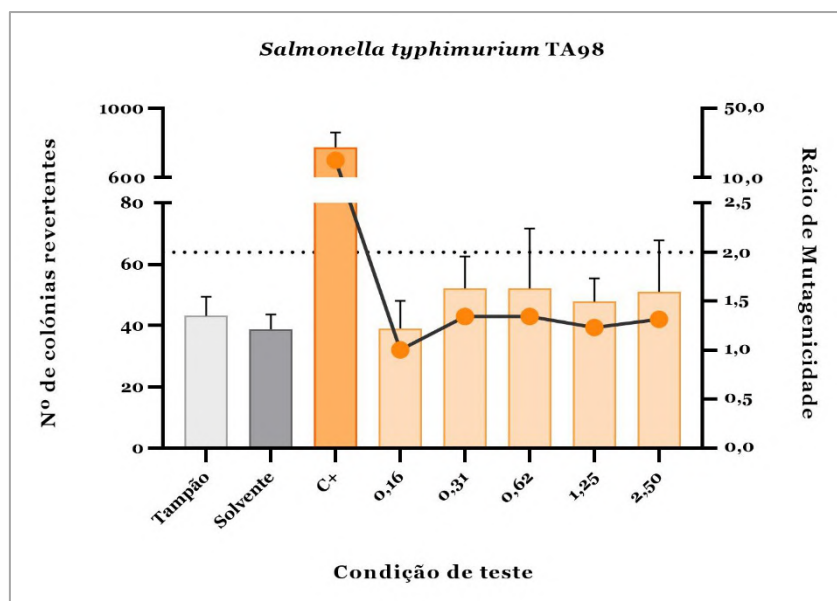


Figura 37– Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de *Ocimum basilicum* na estirpe de *S. typhimurium* TA98. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do OE.

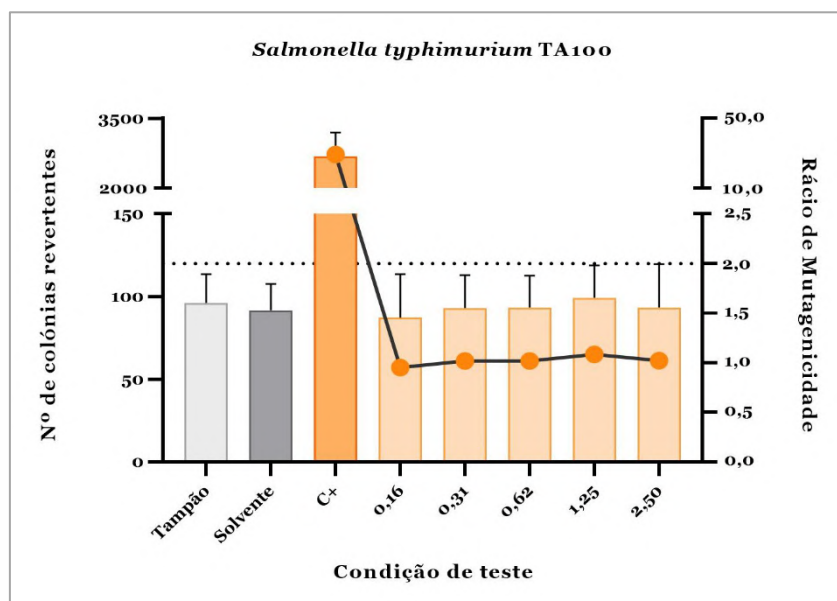


Figura 38 – Gráfico de combinação dos resultados obtidos para o OE de *Ocimum basilicum* na estirpe de *S. typhimurium* TA100. As barras representam a média do número de revertentes da totalidade de ensaios independentes realizados e a linha contínua corresponde ao rácio de mutagenicidade calculado para cada concentração de teste do OE.

Tabela 28 - Combinação dos três critérios para classificação dos resultados, relativamente aos OE: relação dose-resposta, rácio de mutagenicidade (R.M.) e aumento fora do histórico de controlo (>HC). O limite para determinar o >HC foi o limite superior de alerta do respetivo controlo de solvente (DMSO), nomeadamente:

OE	Estirpe bacteriana	Dose-resposta	R.M.	> HC	Resultado
OE-CL	<i>S. typhimurium</i> TA98	Não	< 2,0	Não	Negativo
	<i>S. typhimurium</i> TA100	Não	< 2,0	Não	
OE-OB	<i>S. typhimurium</i> TA98	Não	< 2,0	Não	Negativo
	<i>S. typhimurium</i> TA100	Não	< 2,0	Não	

Quanto aos OE, tanto no OE-CL como no OE-OB, os três critérios de classificação do resultado (tabela 28) foram considerados como: ausência da relação dose-resposta (figuras 35-36 e 37-38, respetivamente); a média do número de revertentes de cada concentração foi inferior ao dobro do número de revertentes do controlo de solvente, o que levou a um R.M. inferior a dois [2], em todas as concentrações de teste de ambos os OE (tabelas 24-25 para o OE-CL e 26-27 para o OE-OB); e o número médio de revertentes das diferentes concentrações encontra-se dentro dos valores históricos de controlo do respetivo solvente. Desse modo, apesar de este tipo de extratos ser normalmente considerado como mais concentrado do que os hidrolatos, os OE em estudo foram também classificados como não mutagénicos, nas concentrações testadas para as estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100. Contudo, contrariamente ao que se poderia esperar, vários estudos têm demonstrado que, geralmente, a maioria dos OE não induz mutagenicidade para as bactérias, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo (15).

Assim sendo, de modo semelhante aos hidrolatos, os OE-CL e OE-OB não têm a capacidade de induzir mutagenicidade no genoma das estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100, em especial ao nível de mutações pontuais do tipo *frameshift* e por substituição dos pares de bases, respetivamente.

2.4. Citotoxicidade dos extratos

I. Objetivo

O presente capítulo tem como objetivo determinar a possível citotoxicidade *in vitro* dos extratos de plantas em estudo, nomeadamente hidrolatos e OE, numa linha celular da pele humana: queratinócitos. Para isso, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT, conforme descrito na ISO/EN 10993-5 - *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, permitindo a determinação quantitativa da viabilidade celular, após exposição aos extratos (136).

II. Materiais e Métodos

i. Linha celular

A linha celular é definida como uma população de células que pode ser mantida em cultura, para crescer e se multiplicar, por um longo período de tempo, conseguindo manter a estabilidade de certos fenótipos e funções. Geralmente, pode ser considerada como clonal, tendo origem numa única célula ancestral comum. Este modelo *in vitro* apresenta diversas vantagens, dentro das quais se destaca a homogeneidade da população celular, a facilidade de crescimento e o facto de poder ser continuamente subcultivada, através de um certo número de passagens, para fornecer um elevado número de células no menor tempo possível (120).

Para a realização deste ensaio, foi utilizada uma linha celular da pele, designada de HaCaT (ATCC-CCS-300493), conhecida por ser um modelo de representação *in vitro* da epiderme humana. As HaCaT são uma linha celular de queratinócitos, isolados por excisão cirúrgica, a partir da pele histologicamente normal de um homem caucasiano de 62 anos. Tendo isto em conta, a designação de “HaCaT” foi definida para indicar a origem e as condições iniciais de crescimento das células (baixa concentração de Ca^{2+} e elevada temperatura). Estas apresentam características aderentes, crescem em monocamada e são espontaneamente imortalizadas, mantendo assim a capacidade total de diferenciação epidérmica. Além disso, o seu cariótipo é classificado como aneuploide e permanecem com propriedades de células basais e não tumorigénicas (69,133–135).

a. Cultura de células

As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose*, suplementado com bicarbonato de sódio, D-glucose, penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino inativado, utilizando frascos de cultura estéreis 75 cm². O meio de cultura foi normalmente renovado por períodos de 48 horas e, quando as células atingiram uma confluência de 80-90%, foram divididas para novos frascos de cultura, dando origem a uma nova subcultura. A linha celular foi mantida na incubadora com as seguintes condições: 37°C com uma atmosfera humidificada de 5% CO₂ (133,134,136).

O processo de subcultura celular, para um novo meio de cultura, foi realizado sempre que as células atingiram cerca de 80-90% de confluência, com o intuito de se promover o prolongamento de vida e/ou expansão do número de células em cultura. É de salientar que se evitou utilizar as células em passagens muito altas, de modo a minimizar o risco de estas sofrerem alterações genéticas e fenotípicas indesejadas. Para a realização do ensaio de MTT, a linha celular foi utilizada entre as passagens 41 e 66 (133,134).

b. Congelamento e descongelamento de células

O congelamento das células é considerado como o melhor método de criopreservação das células a longo prazo, no qual mantêm a sua viabilidade, ocorre a minimização de alterações genéticas e se evita a perda das mesmas por contaminação. Para isso, realizou-se o processo de tripsinização das células até à etapa de centrifugação, como descrito mais adiante no ponto “Tratamento e contagem de células para preparação das placas”. Posteriormente, procedeu-se à ressuspensão do *pellet* celular em meio de cultura, sendo que o volume depende do número de crioviais a preparar, normalmente 700 µL por criovial. Por cada criovial, adicionou-se 20% soro e 10% DMSO de um volume final de 1 mL, no tubo de *falcon*. Pipetou-se 1 mL da suspensão celular preparada para cada criotubo e de seguida, os respetivos crioviais foram colocados no Mr. Frosty, o qual contém isopropanol. Esse recipiente foi seguidamente armazenado a -80°C, durante 24 horas. Após esse período, armazenaram-se alguns crioviais em azoto líquido (133).

Para se descongelar as células, com o intuito de serem utilizadas no ensaio, colocou-se o criovial contendo a suspensão celular congelada no banho, a 37°C. É de salientar que este processo deve ser rápido, tendo-se agitado o criovial no banho para auxiliar o descongelamento. Quando restava apenas um pequeno pedaço de gelo, transferiu-se a suspensão para um tubo *falcon* 15 mL, ao qual se adicionou 9 mL de meio de cultura, realizando uma diluição 1:10 do DMSO presente no criovial. Ressuspendeu-se a mistura

e procedeu-se à centrifugação da mesma a 200 x g, por um período de 5 minutos. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e realizou-se a ressuspensão do *pellet* celular em 5 mL meio cultura. Essa ressuspensão foi transferida para um frasco de cultura 25 cm², o qual foi colocado a incubar, a uma temperatura de 37°C e com uma atmosfera de 5 % CO₂. Dependendo da capacidade de aderência das células, procedeu-se à renovação do meio de cultura por períodos entre 24 e 48 horas (133).

ii. Consumíveis e Equipamentos

- Autoclave
- Balanças analíticas (KERN®)
- Balanças de precisão (RADWAG®; KERN®)
- Banho termostaticado (VWR®)
- Câmara de Neubauer
- Câmaras de fluxo laminar
- Centrífuga (Gyrozen®)
- Criotubos
- *Eppendorfs* (1,5 mL, Labbox; 2,0 mL VWR®)
- Espectrofotômetro de absorvância de microplacas (Bio-Rad)
- Filtros de seringa estéreis 0,22 µm (Branchia)
- Frascos de cultura estéreis (25 e 75 cm²; VWR®)
- Frascos Schott
- Incubadora (LEEC Limited; UniEquip)
- Medidor de pH (Metrohm; Thermo Scientific™)
- Micropipetas (DRAGONLAB; VWR®)
- Microscópios (Motic®; Olympus)
- Pipetador automático (VWR®)
- Pipetas serológicas (10 e 25 mL; VWR®)
- Placa de agitação com aquecimento (J.P. SELECTA®; OVAN)
- Placas de 96 poços (VWR®)
- Placas de Petri (90 mm; VWR®)
- Recipiente de congelamento Mr. Frosty (Thermo Scientific™)
- Seringa (10 e 20 mL; B. Braun)
- Sistema de Purificação de Água Milli-Q (Merck Millipore)
- Sistema de Vácuo

- Tubos de *falcon*
- Vórtex (Falc Instruments)

iii. Reagentes

O soro fetal bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma-Aldrich®), para ser utilizado como componente do meio de cultura celular, necessitou de ser sujeito ao processo de inativação no banho termostatizado a uma temperatura de 56°C, por um período de 30 minutos. Posteriormente, em condições estéreis, distribuiu-se por alíquotas em tubos de *falcon* 50 mL, as quais foram armazenadas a -20°C.

O meio DMEM *Low Glucose* (Biowest®), suplementado com 35,9 mM bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), 25 mM D-glucose anidro (VWR®), mistura de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco™) e 10% FBS inativado (Life technologies), foi utilizado como meio de cultura para as HaCaT, o qual encontrar-se-á mencionado como “meio completo”, ao longo da dissertação. O meio designado “incompleto” diferencia-se do anterior pela ausência de soro. Ambos os meios devem apresentar um pH de aproximadamente 7,2, o qual foi frequentemente verificado por ser um parâmetro essencial para as condições ideais de cultivo. Após preparação, cada um dos meios foi esterilizado através de filtração por uma membrana com um poro de 0,2 µm, sob sistema de vácuo. O armazenamento dos mesmos ocorreu a uma temperatura de 4°C e assim, antes de serem utilizados na linha celular, foram aquecidos no banho a 37°C (69,133).

A água Milli-Q (Merck Millipore) foi utilizada para a preparação de meios de cultura das células e outras soluções utilizadas para a realização do ensaio.

A solução comercial tripsina/EDTA (Gibco™) foi utilizada no processo de tripsinização celular. A enzima proteolítica tripsina tem a capacidade de degradação das ligações entre as células e o frasco de cultura, tal como as interações célula-célula. Enquanto o composto Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) atua como agente quelante, contribuindo para a ação da enzima.

O corante vital azul tripano (Merck) foi utilizado para marcar seletivamente as células mortas, permitindo diferenciá-las das células viáveis, as quais foram subsequentemente contadas na câmara de *Neubauer*.

A água ultrapura (Hikma Farmacêutica) foi aplicada como controlo de solvente dos hidrolatos, apesar de não ser diretamente necessária para a diluição desses extratos, mas principalmente devido aos hidrolatos serem classificados como extratos aquosos.

O composto DMSO (Fisher Scientific™) foi utilizado como solvente dos OE, atuando como agente emulsionante para a dissolução desses extratos hidrofóbicos.

O composto MTT (Alfa Aesar) foi utilizado para medir a viabilidade celular, tendo em conta que apenas as células viáveis e metabolicamente ativas têm a capacidade de converter este sal em formazano.

O solvente isopropanol (Fisher Scientific™) atuou como agente de dissolução dos cristais de formazano formados.

O composto orgânico dodecil sulfato de sódio (SDS do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*; PanReac AppliChem) foi considerado como controlo de morte na realização do ensaio, a uma concentração de 2%.

O PBS foi utilizado para minimizar a possível variação de condições na placa, para dissolver-se o reagente MTT e como solução de lavagem das células. Esta solução foi inicialmente preparada 10 vezes mais concentrada do que a solução pretendida, sendo constituída por: 1,37 M cloreto de sódio (Fisher Scientific™), 0,027 M cloreto de potássio (Labkem), 0,1 M fosfato de sódio dibásico anidro (Fisher BioReagents™) e 0,02 M fosfato de potássio monobásico (ChemLab). Posteriormente, procedeu-se à diluição de 100 mL da solução concentrada em 900 mL água Milli-Q.

iv. Condições de assepsia

Todos os procedimentos relacionados com a execução do ensaio na cultura de células foram realizados em condições de assepsia, nomeadamente em câmaras de fluxo laminar, de modo a evitar contaminações microbianas que afetassem negativamente o ensaio. Antes e após cada utilização do equipamento, procedeu-se ainda à sua desinfeção com solução de etanol a 70%.

O material de laboratório utilizado foi adquirido comercialmente em condições de esterilidade, ou sujeito a processos de esterilização por calor húmido a 121°C (autoclavagem). Os meios de cultura e soluções, antes de serem utilizados na realização do ensaio, foram também esterilizados pelo método anteriormente referido, ou pelo processo de esterilização por filtração sob sistema de vácuo. Além disso, é de referir que um dos compostos utilizados para suplementação do meio de cultura foram os

antibióticos penicilina e estreptomicina, atuando como uma medida de prevenção de contaminações.

V. Determinação da citotoxicidade *in vitro*: Ensaio MTT

1. Tratamento e contagem de células para preparação da placa

As HaCaT são classificadas como células aderentes, sendo assim necessário recorrer ao processo de tripsinização (figura 39). Para isso, quando as células apresentaram a confluência desejada (~80%), descartou-se o meio de cultura presente no frasco e adicionou-se um pequeno volume da solução Tripsina/EDTA 0,05% para lavagem, devido à elevada capacidade aderente das células. Após o descarte, adicionou-se aproximadamente 3 mL da mesma solução e colocou-se na incubadora a 37°C com 5% CO₂, até que, microscopicamente, se verificou a ocorrência de uma significativa desagregação de células da parede do frasco. Posteriormente, pipetou-se 6-7 mL de meio completo, com o intuito do soro presente no meio neutralizar a atividade da enzima, e ressuspendeu-se essa mistura contra a parede do frasco. Transferiu-se a suspensão para um tubo *falcon* e procedeu-se à centrifugação a 125 RCF (Força Centrífuga Relativa, do inglês *Relative Centrifugal Force*), durante 5 minutos. De seguida, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet*, depositado no fundo do tubo, em meio completo. É importante realçar que o volume utilizado na ressuspensão dependeu da quantidade do *pellet* e, subsequentemente, do volume que se pretendia retirar para o frasco da próxima subcultura. Colocou-se 10 µL da ressuspensão celular num *ependorf*, aos quais foi adicionado igual volume de corante azul tripano 0,4% e homogeneizou-se. Dessa mistura, retirou-se 10 µL para contagem microscópica das células viáveis na câmara de *Neubauer*. Posteriormente, para se determinar o volume necessário da suspensão para se alcançar 1 x 10⁴ células por poço, sendo colocados 100 µL por poço, utilizaram-se as seguintes fórmulas (69,136):

[1] N° células/mL = Média do n° de células por quadrante x 2 (fator de diluição) x 10⁴

$$[2] \text{Volume necessário de suspensão celular (mL)} = \frac{10^6 \text{ células}}{\text{N}^\circ \text{ células/mL}}$$

Considerando-se 100 poços por placa como margem de segurança, é importante notar que foram necessárias 10⁶ células por placa.

Tendo em conta os cálculos realizados, diluiu-se o volume de suspensão celular em meio completo, visando obter-se normalmente um volume final de 10 mL. Assim, numa placa estéril de 96 poços, 100 µL de PBS estéril foram colocados nos 36 poços das extremidades

da placa, devido a estes apresentarem uma maior suscetibilidade de variações. Para além dos poços viáveis considerados para as diferentes concentrações do extrato, foi atribuída uma coluna de 6 poços para cada controlo, nomeadamente: morte, solvente e meio de cultura. Consequentemente, em cada poço viável da placa, foram adicionados 100 µL da suspensão celular preparada anteriormente. Por fim, visualizou-se microscopicamente a placa, para garantir a uniformidade das células na sua totalidade, procedendo-se, posteriormente, à incubação dessa placa por um período de 24 horas a 37°C com uma atmosfera de 5% CO₂, o que promoveu a adesão celular em monocamada no poço (69,136).

2. Preparação e adição dos estímulos às células

Hidrolatos

Os hidrolatos, no geral, são considerados extratos solúveis em água, o que permite que sejam direta e totalmente solubilizados em meio completo. Foram preparadas 7 concentrações diferentes em *ependorfs*, ao diluir-se sucessivamente na proporção 1:2, designadamente: 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 e 7,8 µL/mL (tabela 29). Primeiramente, pipetou-se 700 µL de meio completo para cada um dos *ependorfs* e, ao correspondente à maior concentração, adicionou-se 700 µL do hidrolato. Dessa mistura, retirou-se 700 µL para o *ependorf* da concentração de 250 µL/mL e assim sucessivamente para as restantes concentrações. Tanto entre cada diluição, como no final da preparação de todas, homogeneizou-se as soluções com auxílio do vórtex. Paralelamente, preparou-se o controlo de morte, adicionando 200 µL SDS e 800 µL meio completo num *ependorf* e o controlo de solvente, constituído por 700 µL água ultrapura e 700 µL meio completo (figura 40) (136).

Óleos Essenciais

Devido aos OE apresentarem uma elevada hidrofobicidade, foi necessário inicialmente realizar uma mistura do extrato com um agente emulsionante, para assegurar a posterior solubilização do óleo no meio de cultura completo. O DMSO é considerado um dos agentes emulsionantes mais comumente utilizados. Deste modo, foi necessário determinar a sua concentração máxima tolerada pelas células e que, em simultâneo, fosse eficaz na estabilização da emulsão do OE em meio completo. Para isso, a cultura celular de queratinócitos foi sujeita à estimulação com diferentes concentrações de DMSO, embora que a percentagem recomendada desse composto em solução, segundo a norma ISO/EN 10993-5, seja de 0,5 % (136). As concentrações de DMSO em teste,

preparadas em meio completo, foram as seguintes: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o que corresponde, respetivamente, a 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31, 0,16, 0,08 % (v/v).

A mistura deve encontrar-se a uma concentração de 50% (v/v) e por isso, num *ependorf*, colocou-se 200 μL de OE e 200 μL de DMSO e agitou-se vigorosamente no vórtex. Concluída a mistura, preparou-se 7 concentrações sucessivas, através de diluições 1:2, as quais foram: 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 e 0,039 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (tabela 29). Para isso, colocou-se 1400 μL de meio completo no *ependorf* correspondente à maior concentração e 700 μL nos restantes *ependorfs*, com exceção dos controlos. No *ependorf* 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, descartou-se 7 μL de meio completo e adicionou-se o mesmo volume da mistura OE e DMSO, preparada anteriormente. De seguida, retirou-se 700 μL desse *ependorf* para o correspondente à concentração de 1,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, e sucessivamente o mesmo se realizou para as restantes concentrações. Relativamente ao controlo de solvente, a sua preparação foi realizada ao adicionar-se 2,5 μL de DMSO a 1000 μL meio completo num *ependorf*. O procedimento de preparação do controlo de morte foi o mesmo realizado no caso dos hidrolatos. Apesar da utilização do agente emulsionante, foi necessário agitar os *ependorfs* no vórtex entre cada diluição, tal como imediatamente antes desses estímulos serem adicionados à placa de 96 poços.

Assim, no término do período de incubação e após a preparação dos estímulos, removeu-se cuidadosamente o meio completo de todos os poços, de modo que as células permanecessem aderidas ao fundo do poço. 100 μL de cada estímulo foram adicionados a cada poço viável, sendo que cada coluna da placa correspondeu a uma condição de teste (figura 40). É de considerar que a coluna à esquerda dizia respeito ao controlo de morte, seguida das concentrações por ordem decrescente, controlo de solvente e por fim, a última coluna representou o controlo de meio completo, conforme se encontra demonstrado nas figuras 42 e 43. No caso do ensaio de avaliação da citotoxicidade do DMSO, num total de 6 poços por cada coluna de ensaio (n=6), a placa continha apenas o controlo de meio na coluna mais à esquerda, seguido das diferentes concentrações de DMSO por ordem crescente. Após a adição dos estímulos, colocou-se a placa na incubadora durante 24 horas, a 37°C com uma atmosfera de 5% CO_2 , com o intuito de permitir a ação dos extratos de plantas nas células.

Tabela 29 – Resumo das concentrações utilizadas na avaliação de citotoxicidade dos diferentes extratos

Extrato	Planta	Gama de concentrações utilizadas no ensaio (µL/mL)						
Hidrolato	<i>H. virginiana</i>							
	<i>M. chamomilla</i>	7,8	15,6	31,3	62,5	125,0	250,0	500,0
	<i>O. basilicum</i>							
OE	<i>C. lusitanica</i>							
	<i>O. basilicum</i>	0,039	0,078	0,156	0,313	0,625	1,250	2,500

3. Realização do ensaio MTT

O MTT, na forma de pó, foi dissolvido em PBS estéril e agitou-se a mistura no vórtex, dando origem a uma solução *stock* de concentração 5 mg/mL. De seguida, esterilizou-se a solução preparada, por filtração, utilizando um filtro de seringa 0,2 µm, para um *falcon* estéril e armazenou-se a -20°C. De modo a obter-se a solução pretendida com uma concentração 1 mg/mL, procedeu-se à diluição de 1:5 da solução *stock*, previamente descongelada, em meio incompleto (136).

Após o intervalo de tempo referente à incubação, removeu-se os estímulos da placa e pipetou-se 150 µL de PBS estéril para cada poço, com o intuito de lavagem das células para minimizar a possível interferência de vestígios dos extratos na ação do MTT. Aspirou-se o PBS e, na ausência de luz, adicionou-se 100 µL da solução MTT preparada (1 mg/mL) a cada poço. A placa, envolvida em papel de alumínio para evitar a degradação da luz, foi colocada a incubar por um período de 3 a 4 horas a 37°C, com 5% CO₂. Passado o período de incubação, a solução de cada poço foi aspirada cuidadosamente, de modo a não ocorrer perda dos cristais de formazano formados. Recorrendo a uma pipeta multicanal, adicionou-se 100 µL de isopropanol, o qual facilitou a dissolução dos cristais. Por fim, realizou-se a leitura das absorvâncias a 570 nm e 650 nm, no leitor de microplacas (figura 41) (69, 136).

III. Esquema representativo da metodologia realizada

1. Tratamento e contagem de células para preparação das placas

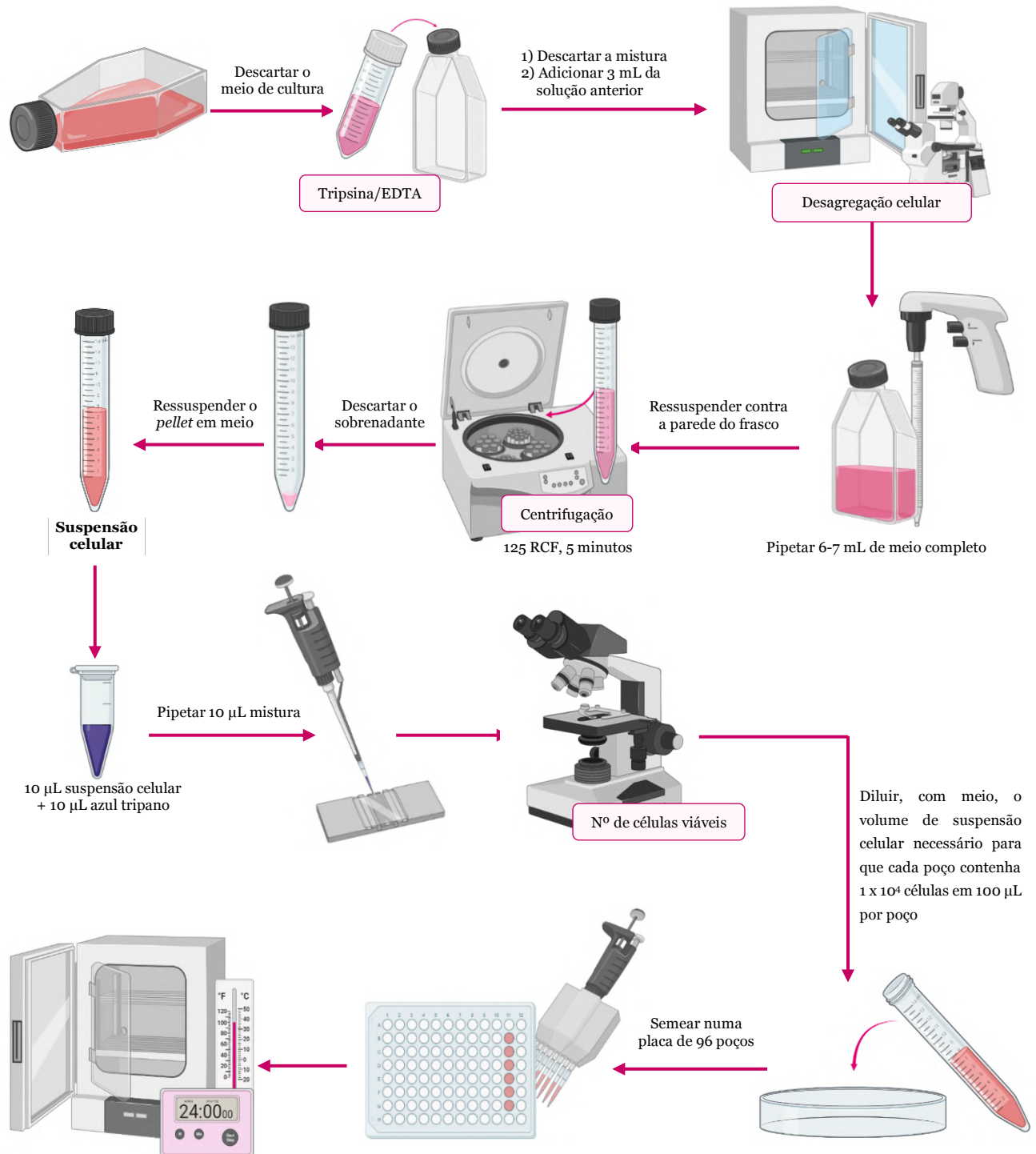
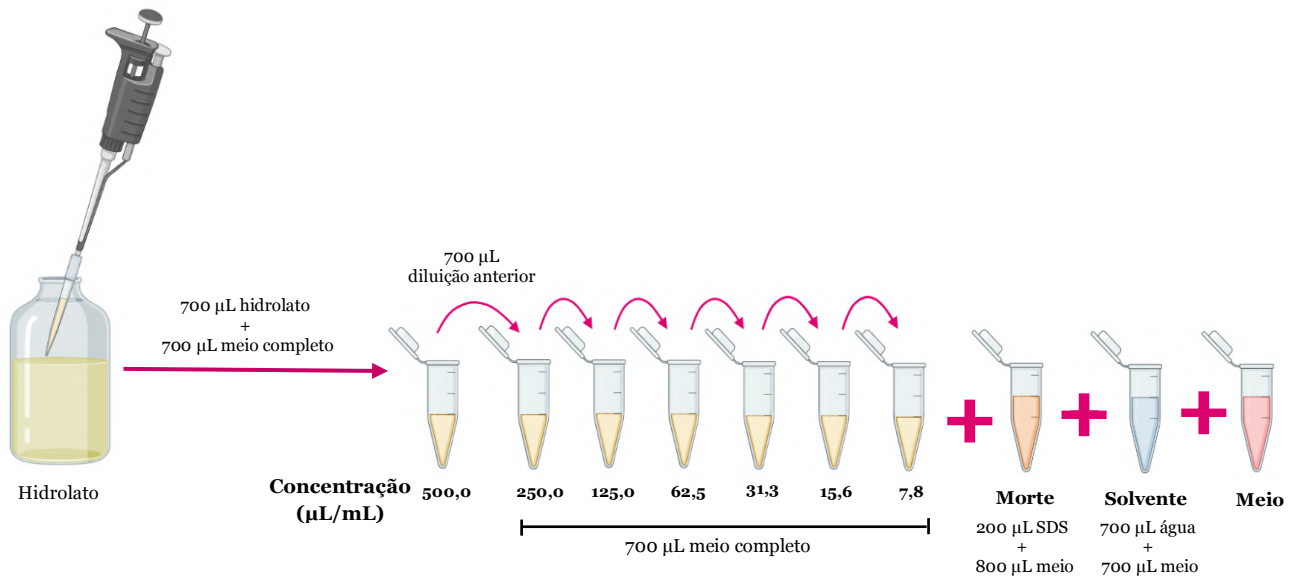


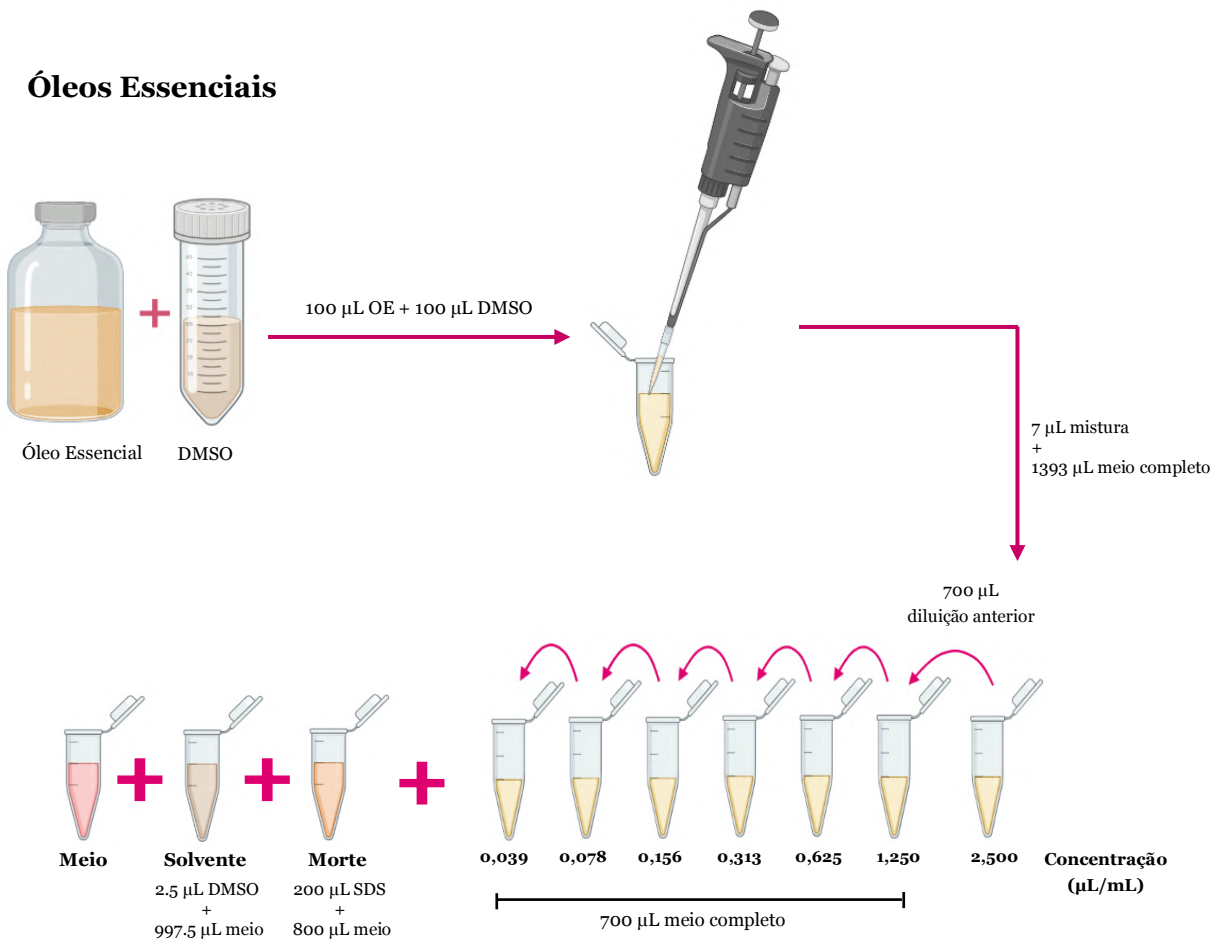
Figura 39 – Esquema representativo de uma das etapas principais do ensaio de MTT, nomeadamente o tratamento e a contagem de células para a subsequente preparação das placas para o cultivo. Foi desenvolvido no programa BioRender.

2. Preparação e adição dos estímulos às células

Hidrolatos



Óleos Essenciais



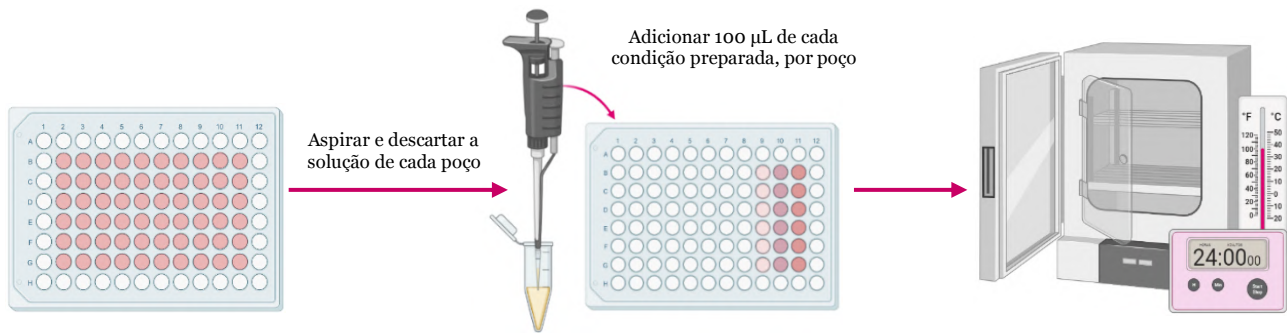


Figura 40 – Esquema representativo da preparação e adição dos estímulos às células, tanto dos hidrolatos como dos OE. Neste estudo, para além dos extratos, foram os incluídos os seguintes controlos: solvente (água ou DMSO, dependendo do extrato), morte (constituído por um composto conhecido por provocar citotoxicidade, nomeadamente o SDS) e o negativo (meio de cultura). As concentrações de teste de ambos os extratos foram preparadas a partir de diluições sucessivas na proporção 1:2 com meio de cultura. Nesse sentido, as concentrações dos hidrolatos foram: 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250 e 500 µL/mL, enquanto as dos OE, devido a serem misturas mais complexas e necessitarem de solubilização prévia com DMSO, foram as seguintes: 0,039, 0,078, 0,156, 0,313, 0,625, 1,25 e 2,5. A ordem de adição dos estímulos na placa encontra-se apresentada na figuras 36 e 37. Esta metodologia aplica-se aos dois tipos de extratos. Foi desenvolvido no programa BioRender.

3. Realização do ensaio MTT

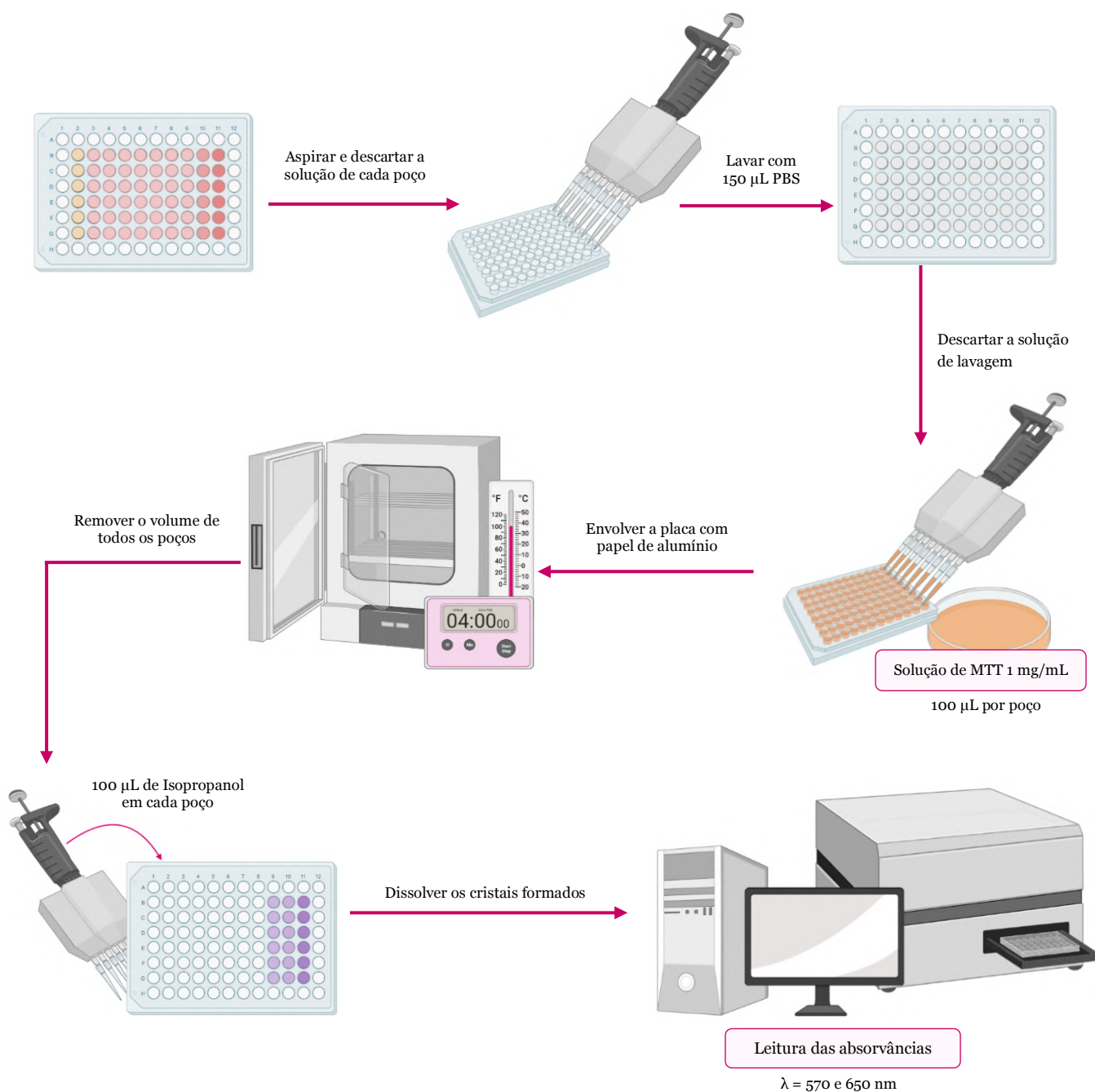


Figura 41– Esquema representativo da etapa correspondente à realização do ensaio de MTT, após a exposição das células aos extratos de plantas e respectivos controles. Foi desenvolvido no programa BioRender.

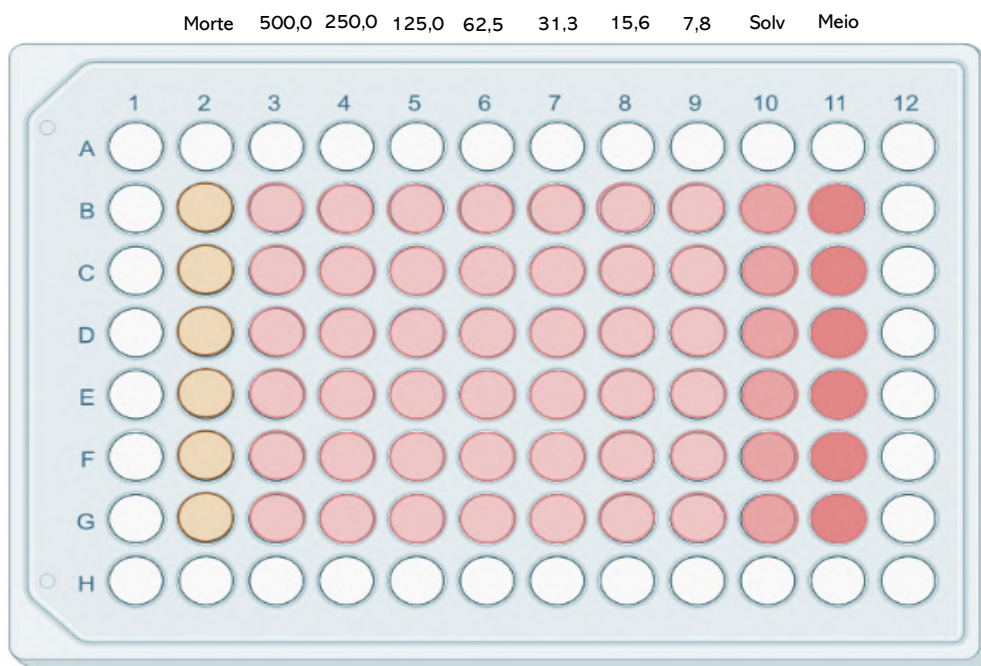


Figura 42 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT, no caso dos hidrolatos. As concentrações de teste dos hidrolatos foram expressas em microlitros por mililitro. “Solv” corresponde ao controle de solvente.

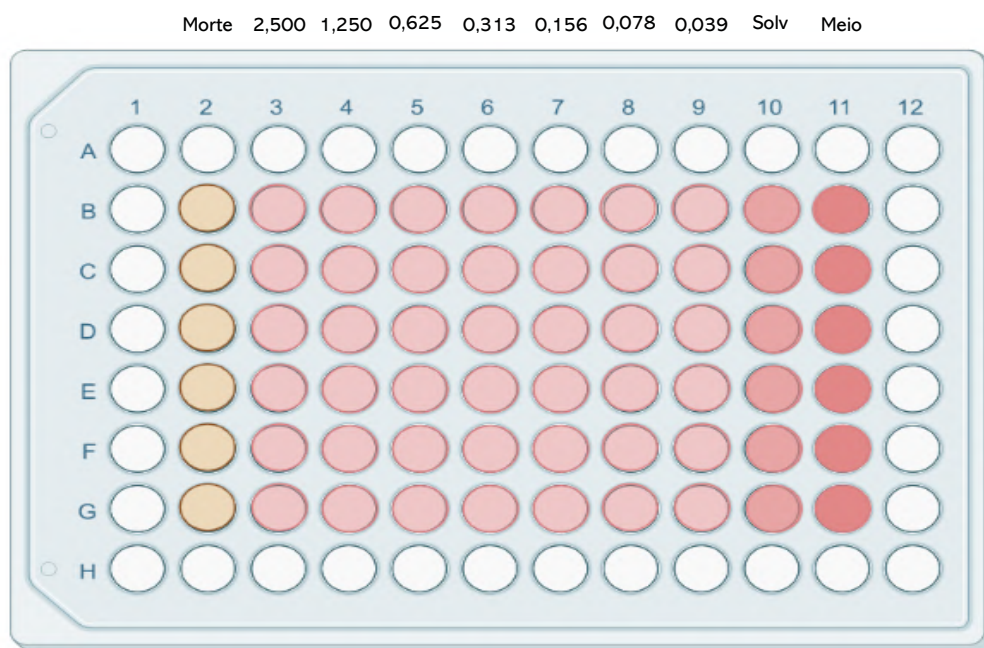


Figura 43 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT, no caso dos OE. As concentrações de teste dos OE foram expressas em microlitros por mililitro. “Solv” corresponde ao controle de solvente.

Legenda:

- Espaços coloridos representam os poços viáveis para a realização do ensaio.
- Espaços a cinzento correspondem aos poços com PBS, os quais não foram utilizados para o ensaio.

IV. Tratamento de Resultados

Cada placa correspondeu a um ensaio, no qual se observou o comportamento da linha celular HaCaT, na presença de um extrato de planta. Foram realizados 6 replicados (n = 6 poços) em cada ensaio, para cada concentração do extrato em estudo e para os controlos (meio, solvente e morte). Por cada extrato, procedeu-se à realização de 2 ensaios independentes, à exceção do H-HV, no qual foram realizados 4 ensaios independentes. Idealmente, os ensaios independentes de cada extrato deveriam apresentar concordância entre si, com um desvio padrão inferior a 20% em todas as condições de teste.

A análise dos resultados foi feita com base no total dos resultados obtidos nos diferentes ensaios independentes, por cada extrato em estudo.

O tratamento e a subsequente análise dos resultados foram realizados através de folhas de cálculo, no programa Microsoft Excel, onde foram introduzidos os valores de absorvância obtidos, e utilizando o programa GraphPad Prism, para conseguir-se a criação dos gráficos e a análise estatística dos dados. Procedeu-se aos seguintes passos:

1. Absorvâncias: Em cada concentração testada e cada controlo, os valores de absorvância medidos a 650 nm foram subtraídos aos respetivos valores de absorvância a 570 nm;
2. Normalização dos resultados: Calculou-se a média dos valores obtidos na subtração anterior (ponto 1), para o controlo de meio;
3. Determinação da percentagem de viabilidade celular: Cada valor de absorvância determinado pela subtração anteriormente calculada (ponto 1) foi multiplicado por 100 e dividido pela média dos valores de absorvância obtidos do controlo de meio (ponto 2). Estes valores representam a percentagem de viabilidade celular por cada ensaio independente, em relação ao controlo de meio que representa a percentagem máxima de viabilidade celular (100%);
4. Determinação do IC₅₀: Realizou-se uma conversão das concentrações para escala logarítmica. Com estes valores, juntamente com os valores obtidos no ponto 3, foi ajustada uma curva sigmoideal no GraphPad Prism. A partir desta curva, foram calculados os valores de IC₅₀;

5. Construção do gráfico de barras e análise estatística: A partir dos valores de viabilidade celular de cada condição (ponto 3), para o total de ensaios independentes de cada extrato em estudo, foi construído um gráfico de barras, no programa GraphPad Prism. Nesse programa, foi ainda realizada uma análise estatística *One-way ANOVA*, a qual permitiu a pesquisa da possível existência de diferenças significativas em termos de viabilidade, entre as células nas condições do controlo de meio e as células tratadas com as diferentes concentrações do extrato em estudo.

V. Resultados e Discussão

O potencial citotóxico dos extratos de plantas em estudo encontra-se analisado e discutido no presente capítulo, a partir dos respetivos perfis de citotoxicidade, obtidos na linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT), aquando da presença desses extratos. Para além disso, este potencial foi também avaliado por comparação dos valores de concentração do extrato capazes de promover a inibição de 50% da viabilidade celular (IC₅₀). Posteriormente, procedeu-se ainda à correlação entre o potencial citotóxico e a composição química dos extratos.

A linha celular utilizada neste estudo foi a HaCaT, classificada como queratinócitos humanos, principalmente devido ao facto de ser um modelo *in vitro* que mimetiza a epiderme. Esta camada tem vindo a ser caracterizada como um dos possíveis principais alvos de aplicação dos extratos de plantas, tendo-se assim considerado o estudo desses extratos para futuras formulações farmacêuticas e cosméticas de aplicação tópica.

A determinação do potencial citotóxico foi realizada a partir da percentagem de viabilidade celular, obtida para cada concentração de teste do respetivo extrato (7,8 – 500 µL/mL dos hidrolatos e 0,039 – 2,5 µL/mL dos OE). Subsequentemente, estas percentagens foram sujeitas a um processo de normalização com o controlo de meio, no qual as células não foram expostas ao extrato de planta, tendo-se assim obtido o valor máximo de viabilidade celular (100%). Após normalização, é possível inferir que a percentagem de viabilidade celular de cada concentração de teste do extrato é inversamente proporcional ao potencial tóxico do respetivo extrato para as células. Portanto, quanto menor for o valor de viabilidade celular obtido, maior será a ação tóxica do respetivo extrato de planta. Paralelamente, a biocompatibilidade dos extratos é analisada com base na informação descrita na ISO/EN 10993-5, onde se considera uma concentração como citotóxica quando a percentagem de viabilidade celular for reduzida para valores inferiores a 70% (136).

Tendo em conta o que se encontra mencionado, as figuras 44-46 representam o potencial citotóxico dos hidrolatos em estudo (H-HV, H-MC, H-OB), nas diferentes concentrações de teste, para a linha celular HaCaT. Assim, como se observa na figura 44, o H-HV apresentou um considerável perfil de biocompatibilidade com as células, visto que este hidrolato foi significativamente citotóxico apenas na concentração mais elevada (500 µL/mL). Para essa concentração, a linha celular apresentou uma redução significativa da sua viabilidade, quando comparadas com o controlo de meio, onde os valores de percentagem de viabilidade celular foram de 17,29% ($p < 0,0001$). Como resumo, da totalidade de concentrações de teste do H-HV, esta foi a única com capacidade de causar

toxicidade para as células, tendo uma percentagem de viabilidade celular substancialmente inferior ao limite dos 70%. Pelo contrário, as duas concentrações mais baixas (7,8 e 15,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) promoveram um aumento de viabilidade celular para valores acima de 100% (115,61% e 106,71%, respetivamente), embora não tenha apresentado significância estatística em relação ao controlo de meio. Por esta razão, existe a possibilidade do H-HV, nas concentrações referidas, ter um efeito mais estimulador do que citotóxico, sobre a viabilidade da linha celular HaCaT.

Quanto ao H-MC, conforme se consegue observar na figura 45, as duas maiores concentrações de teste (250 e 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$) foram responsáveis por reduzir, de forma significativa, a viabilidade da linha celular HaCaT, comparativamente com o controlo de meio. Desse modo, estas concentrações apresentaram valores de percentagem de viabilidade celular inferiores a 70%, nomeadamente 7,06% a 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($p < 0,0001$) e 49,93% a 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($p < 0,0001$). No geral, o potencial citotóxico deste hidrolato foi demonstrado através de uma relação dose-resposta, onde se conseguiu observar percentagens de viabilidade celular inferiores para concentrações mais elevadas do extrato. Contudo, para a concentração mais baixa (7,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) do H-MC, a linha celular apresentou uma ligeira redução da sua viabilidade, comparativamente com as concentrações superiores, tendo sido assim considerada como a exceção à análise geral do perfil citotóxico do hidrolato. Através desta análise, foi possível constatar que o H-MC, em concentrações inferiores a 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$, é biocompatível para a linha celular HaCaT. Por análise da figura 30, é ainda possível destacar o facto de três concentrações de teste (15,6, 31,3 e 62,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) apresentarem valores percentuais de viabilidade celular superiores a 100% do controlo de meio (109,12%, 107,42% e 102,25%, respetivamente), podendo este hidrolato também apresentar algum efeito estimulador sobre a linha celular em estudo.

O H-OB não apresentou citotoxicidade para a linha celular HaCaT, na totalidade de concentrações de teste, devido a terem sido obtidos valores percentuais de viabilidade celular superiores a 70% (figura 46). Para além disso, à exceção da concentração mais elevada (500 $\mu\text{L}/\text{mL}$), é possível indicar que as concentrações de teste deste hidrolato promoveram maioritariamente uma ação estimuladora sobre a linha celular, tendo sido obtidos os seguintes valores de percentagem de viabilidade celular: 116,40% (7,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 115,59% (15,6 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 109,44% (31,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 125,79% (62,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 117,02% (125 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e 103,89% (250 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Contudo, apesar de a concentração mais elevada (500 $\mu\text{L}/\text{mL}$) não ter sido considerada como citotóxica, é importante referir que apresentou significância estatística ($p < 0,001$), relativamente ao controlo de meio. Através da análise descrita, podemos concluir que o H-OB foi considerado como

biocompatível, para concentrações superiores a 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Por observação do perfil de citotoxicidade deste hidrolato (figura 46), é possível verificar que o seu efeito estimulador, não tendo sido citotóxico em nenhuma concentração de teste, não apresenta uma relação dose-resposta para a linha celular HaCaT.

Em resumo, no que diz respeito aos valores de percentagem de viabilidade celular, podemos destacar que o hidrolato mais biocompatível foi o de *Ocimum basilicum* enquanto o hidrolato com uma menor biocompatibilidade com a linha celular HaCaT foi o de *Matricaria chamomilla*. Para além disso, visto que a atividade de um extrato depende da sua composição química, o presente estudo denota que os três hidrolatos em estudo são constituídos por compostos que possam exercer efeito citotóxico ou estimulador sobre a linha celular em estudo, dependendo da concentração utilizada.

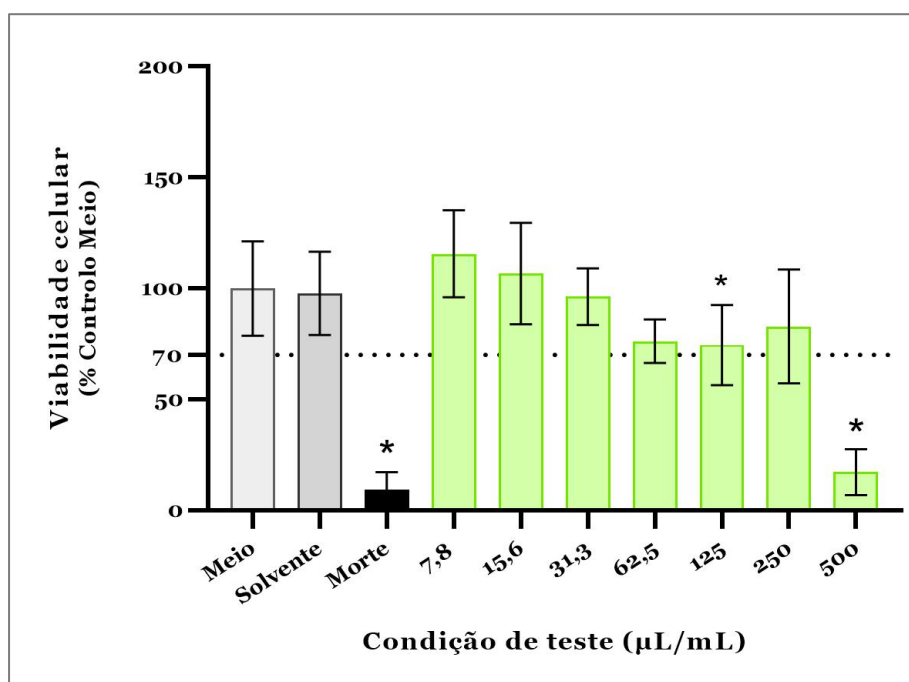


Figura 44 – Efeito citotóxico do hidrolato de *Hamamelis virginiana* para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato. Este parâmetro foi medido através da percentagem de viabilidade celular, comparativamente com o controlo de meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas à água, a uma concentração de 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$, e “Morte” representa o controlo onde as células estiveram em contacto com o SDS (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$). * traduz a diferença significativa, em relação ao controlo de meio, através da análise estatística *One-way ANOVA*.

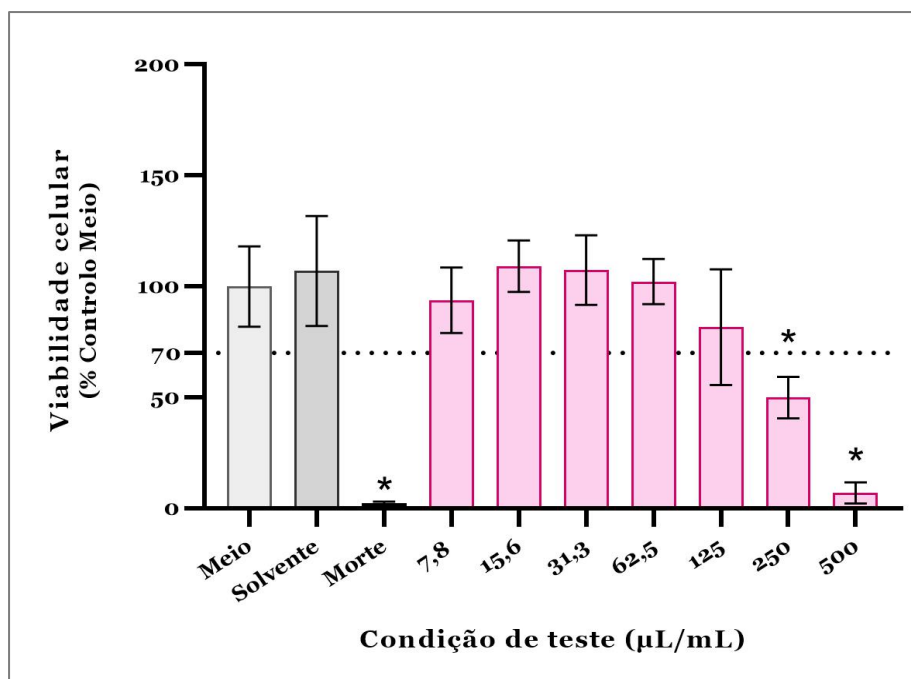


Figura 45 – Efeito citotóxico do hidrolato de *Matricaria chamomilla* para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações (µL/mL) deste extrato. Este parâmetro foi medido através da percentagem de viabilidade celular, comparativamente com o controle de meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas à água, a uma concentração de 500 µL/mL, e “Morte” representa o controle onde as células estiveram em contacto com o SDS (200 µL/mL). * traduz a diferença significativa, em relação ao controle de meio, através da análise estatística *One-way ANOVA*.

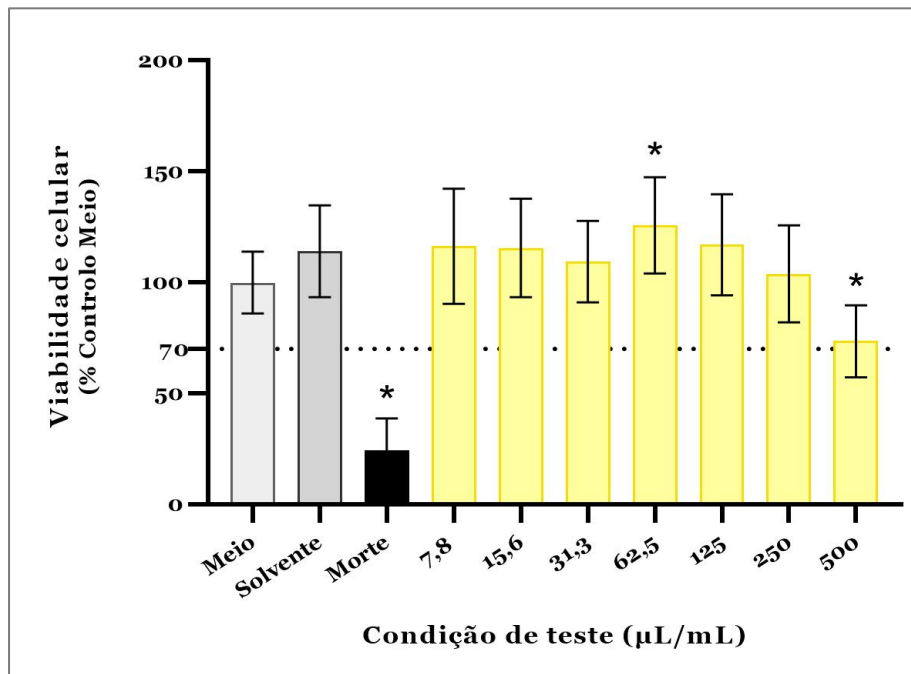


Figura 46 – Efeito citotóxico do hidrolato de *Ocimum basilicum* para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações (µL/mL) deste extrato. Este parâmetro foi medido através da percentagem de viabilidade celular, comparativamente com o controle de meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas à água, a uma concentração de 500 µL/mL, e “Morte” representa o controle onde as células estiveram em contacto com o SDS (200 µL/mL). * traduz a diferença significativa, em relação ao controle de meio, através da análise estatística *One-way ANOVA*.

De igual modo à percentagem de viabilidade celular, relativamente ao IC₅₀, quanto menor for essa concentração de extrato necessária para inibir 50% da viabilidade da linha celular, maior é o respetivo potencial citotóxico. Dessa forma, o H-OB tem um menor potencial citotóxico, visto que o valor de IC₅₀ (> 500 µL/mL) é superior aos que foram obtidos para os restantes hidrolatos em estudo (tabela 30). Mais especificamente, a partir dos respetivos valores de IC₅₀, os três hidrolatos apresentam, por ordem crescente, a seguinte biocompatibilidade com a linha celular HaCaT: H-MC (229,6 µL/mL) < H-HV (322,2 µL/mL) < H-OB (> 500 µL/mL). Assim sendo, esta análise dos valores de IC₅₀ corrobora com os resultados obtidos e analisados, a partir dos valores de percentagem de viabilidade celular dos respetivos hidrolatos.

Tabela 30 – Valores de IC₅₀ (µL/mL) para a linha celular HaCaT, na presença dos hidrolatos em estudo

Hidrolato	IC ₅₀ (µL/mL)	Intervalo de confiança a 95% (µL/mL)	R ²
<i>Hamamelis virginiana</i>	322,2	259,6 a 398,4	0,5791
<i>Matricaria chamomilla</i>	229,6	202,8 a 258,7	0,8405
<i>Ocimum basilicum</i>	> 500,0	n.d.	n.d.

No estudo da possível citotoxicidade do DMSO, tal como se consegue verificar na figura 47, apenas a maior concentração de teste (200 µL/mL) foi responsável por reduzir significativamente a viabilidade da linha celular HaCaT, quando comparada com o controlo de meio, onde o valor de percentagem de viabilidade celular foi de 52,23% (p < 0,0001). Desse modo, foi possível inferir que o DMSO, em concentrações inferiores a 100 µL/mL, apresenta biocompatibilidade com a linha celular HaCaT.

De um modo mais específico, tendo em conta que a mistura de DMSO com o OE tinha uma proporção de 1:1, a concentração máxima de DMSO a utilizar nas diluições dos OE era igual à concentração máxima de OE em teste (2,5 µL/mL). Essa concentração precisa não foi avaliada neste estudo de toxicidade, contudo, na presença de 1,56 e 3,12 µL/mL de DMSO, as células apresentaram uma percentagem de viabilidade celular de 113,19% e 112,35%, respetivamente. Nesse sentido, estes resultados permitiram concluir que este composto, na concentração de 2,5 µL/mL, não apresenta toxicidade para as células, podendo ser utilizado para a solubilização do OE.

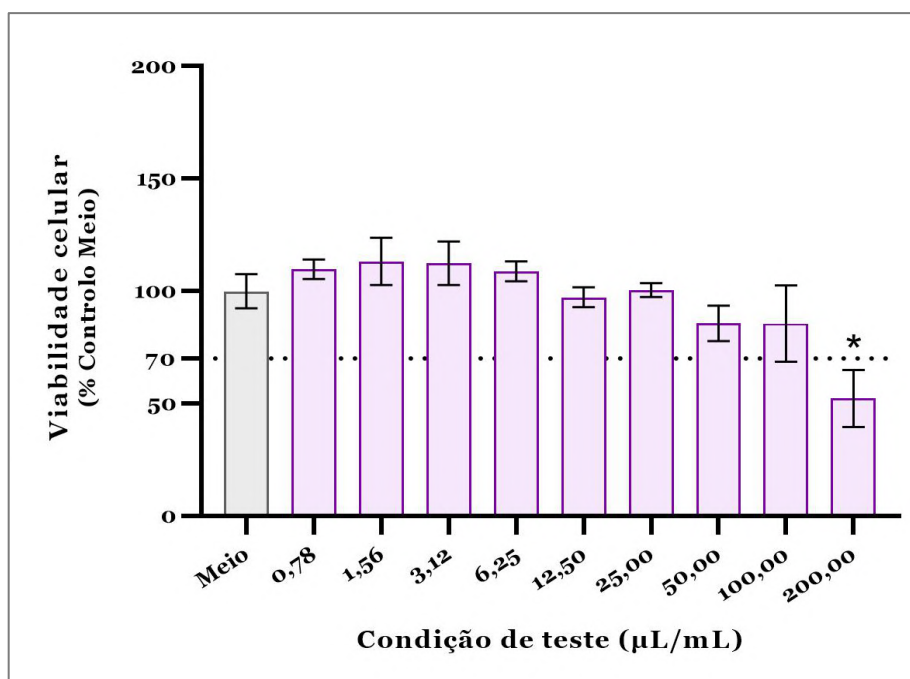


Figura 47 - Efeito citotóxico do Dimetilsulfóxido (DMSO) para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações (µL/mL) deste composto. Este parâmetro foi medido através da percentagem de viabilidade celular, comparativamente com o controlo de meio de cultura completo. * traduz a diferença significativa ($p < 0,0001$), em relação ao controlo de meio, através da análise estatística *One-way ANOVA*.

Relativamente ao OE-CL, a mais alta concentração de teste (2,5 µL/mL) foi a única que apresentou um significativo potencial citotóxico para a linha celular HaCaT, com uma percentagem de viabilidade celular de aproximadamente 18,68%. Apesar deste extrato não ter apresentado um perfil de dose-resposta no presente estudo, consegue-se verificar, por análise da figura 48, a possibilidade de algumas das concentrações de teste do OE-CL (0,156 e 1,25 µL/mL) promoverem um efeito estimulador sobre a linha celular em estudo. Esta hipótese surgiu do facto de que essas concentrações apresentam valores de percentagem de viabilidade celular superiores a 100% do controlo de meio, nomeadamente 102,02% a 0,156 µL/mL e 103,78% a 1,25 µL/mL. Assim sendo, o OE-CL demonstrou ser biocompatível com a linha celular HaCaT, em concentrações inferiores a 1,25 µL/mL.

Como se observa na figura 49, o OE-OB apresentou um baixo perfil de biocompatibilidade com a linha celular HaCaT, visto que este OE foi significativamente citotóxico na maioria das concentrações de teste, à exceção das duas concentrações mais baixas (0,039 e 0,078 µL/mL). Para as concentrações consideradas citotóxicas, a linha celular apresentou uma redução significativa da sua viabilidade, quando comparadas

com o controlo de meio, onde os valores percentuais de viabilidade celular foram os seguintes: 60,09% (0,156 $\mu\text{L}/\text{mL}$, $p < 0,0001$), 49,62% (0,313 $\mu\text{L}/\text{mL}$, $p < 0,0001$), 28,25% (0,625 $\mu\text{L}/\text{mL}$, $p < 0,0001$), 8,54% (1,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, $p < 0,0001$) e 9,61% (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, $p < 0,0001$). Como resumo, essas concentrações de teste do OE-OB foram capazes de causar toxicidade para as células, tendo uma percentagem de viabilidade celular substancialmente inferior ao limite dos 70%. Por sua vez, é de salientar que o perfil de citotoxicidade descrito é dependente da dose, ou seja, o potencial citotóxico deste extrato é tanto maior quanto maior for a concentração utilizada. Assim, apenas as concentrações de 0,039 e 0,078 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do OE-OB são biocompatíveis com a linha celular em estudo (80,39% e 75,14%, respetivamente), embora não tenha qualquer efeito estimulador sobre a mesma.

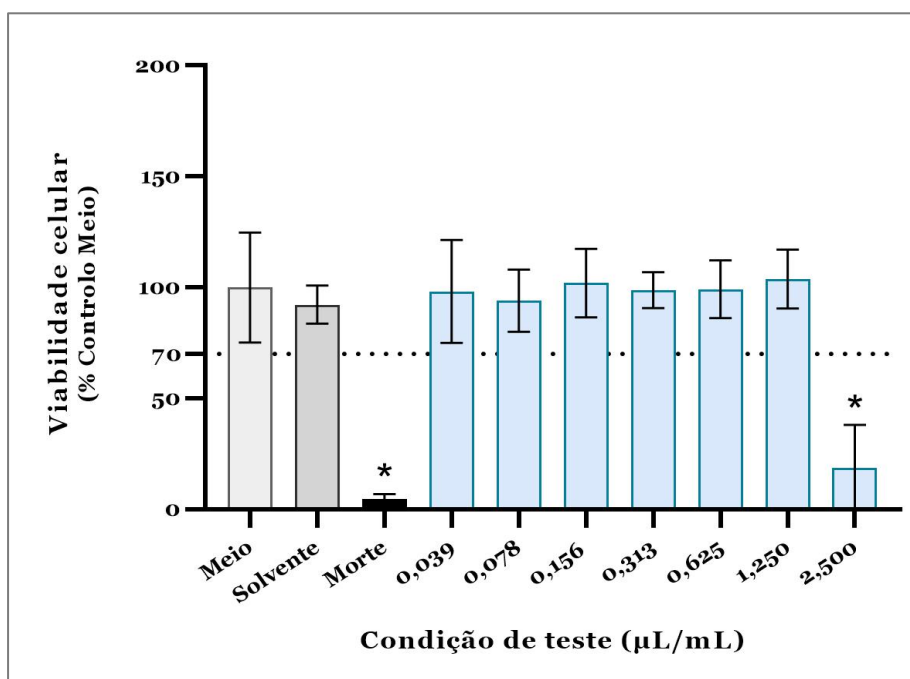


Figura 48 – Efeito citotóxico do OE de *Cupressus lusitanica* para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações ($\mu\text{L}/\text{mL}$) deste extrato. Este parâmetro foi medido através da percentagem de viabilidade celular, comparativamente com o controlo de meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO, a uma concentração de 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, que exprime o efeito deste solvente na maior concentração testada. “Morte” representa o controlo onde as células estiveram em contacto com o SDS (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$). * traduz a diferença significativa, em relação ao controlo de meio, através da análise estatística *One-way ANOVA*.

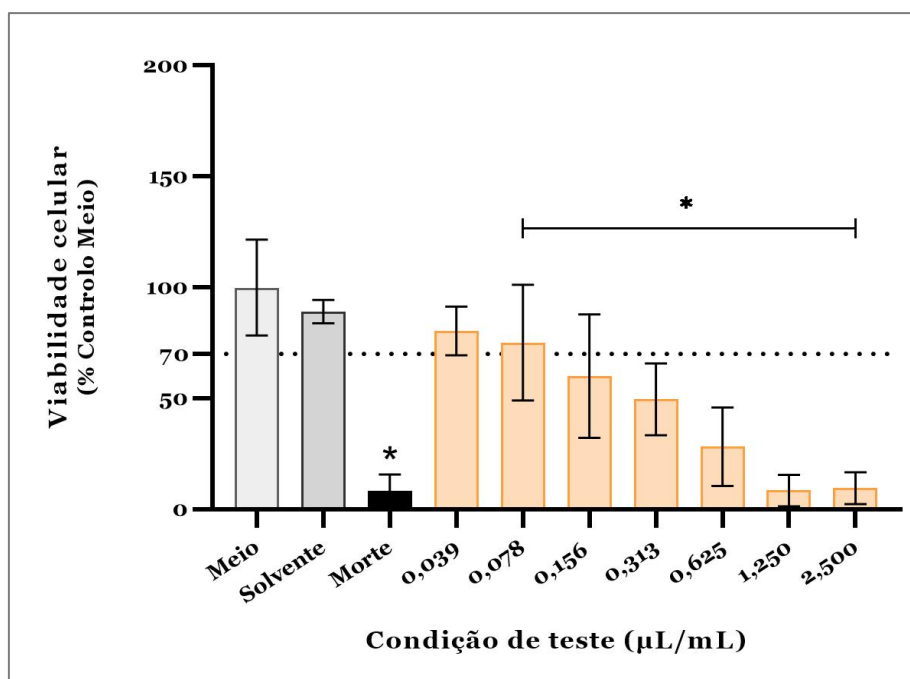


Figura 49 – Efeito citotóxico do OE de *Ocimum basilicum* para a linha celular HaCaT, após exposição de 24 horas a diferentes concentrações (µL/mL) deste extrato. Este parâmetro foi medido através da percentagem de viabilidade celular, comparativamente com o controlo de meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO, a uma concentração de 2,5 µL/mL, que exprime o efeito deste solvente na maior concentração testada. “Morte” representa o controlo onde as células estiveram em contacto com o SDS (200 µL/mL). * traduz a diferença significativa, em relação ao controlo de meio, através da análise estatística *One-way ANOVA*.

No que diz respeito à concentração necessária para inibir 50% da viabilidade da linha celular HaCaT (IC₅₀), conforme se verifica na tabela 31, o OE com um maior potencial citotóxico para as células foi o de *Ocimum basilicum*, tendo apresentado um menor valor de IC₅₀ (0,2393 µL/mL). Assim, é possível inferir quanto à concordância entre as análises realizadas relativamente aos valores de percentagem de viabilidade celular e os valores de IC₅₀, o que permite concluir que, dentro dos OE em estudo, o OE-CL foi o que apresentou uma maior biocompatibilidade celular.

Tabela 31 – Valores de IC₅₀ (µL/mL) para a linha celular HaCaT, na presença dos OE em estudo.

Óleo Essencial	IC ₅₀ (µL/mL)	Intervalo de confiança a 95% (µL/mL)	R ²
<i>Cupressus lusitanica</i>	~ 2,309	n.d.	0,7717
<i>Ocimum basilicum</i>	0,2393	0,1908 a 0,2974	0,7020

3. Discussão Geral

Desde a antiguidade humana, as plantas são conhecidas pela sua vasta diversidade de compostos bioativos, os quais proporcionam uma ampla gama de propriedades biológicas com benefícios para a saúde. Posto isto, na atualidade, tem ressurgido o interesse da população humana por produtos naturais, sendo estes normalmente conhecidos por serem mais sustentáveis, com: custos economicamente reduzidos, maior eficácia terapêutica em comparação com alguns tratamentos de origem sintética, e poucos ou nenhuns efeitos colaterais. Nesse sentido, as indústrias têm acompanhado esta corrente ao incluir componentes das PAM, como os seus extratos, em diversos tipos de formulações, entre as quais se encontram as farmacêuticas e cosméticas (137–139).

Dentro dos extratos de plantas, destacam-se os OE, amplamente conhecidos por diversas propriedades (como biológicas e organoléticas), geralmente obtidos por destilação a vapor do material vegetal. Outro tipo de extratos com significativo interesse para variadas indústrias são os hidrolatos, os quais correspondem a soluções aquosas provenientes do processo de destilação dos OE. Os hidrolatos, ao serem subprodutos, não eram um grande alvo de estudo, até aos dias de hoje. No entanto, foram-lhes reconhecidas várias propriedades organoléticas e biológicas que os tornam fontes naturais de grande valor, muitas das vezes com uma inferior, ou até mesmo isenção, de toxicidade do que os OE, a serem aplicadas em diferentes produtos (16,23).

Contudo, e embora os séculos de uso tradicional aparentemente sustentem o pressuposto empírico de que os produtos naturais são seguros, atualmente há uma crescente preocupação relativamente à eficácia e segurança das plantas, bem como dos seus extratos, a serem aplicadas em produtos consumidos na vida quotidiana da população humana. Neste sentido, paralelamente ao crescente interesse por produtos naturais, as autoridades reguladoras têm vindo a estabelecer legislações rigorosas para esse tipo de produtos, antes de serem comercializados, tal como acontece com as formulações sintéticas (137,139,140).

A avaliação da segurança dos extratos de plantas é imperiosa para a validação do uso dos mesmos em formulações farmacêuticas e cosméticas. Para tal, é necessário realizar vários testes *in vitro*, e por vezes *in vivo*, com o intuito de se conseguirem avaliar diversos parâmetros toxicológicos relevantes, nomeadamente toxicidade aguda e genotoxicidade, onde neste último se inclui a mutagenicidade (52,141). Esta necessidade deve-se ao facto de que a possível presença de compostos com potencial mutagénico/genotóxico ou

citotóxico em extratos de plantas aumenta a preocupação sobre os potenciais riscos para a saúde que possam resultar do uso prolongado de produtos à base desses extratos (142).

O presente estudo teve como objetivo estudar a segurança de cinco extratos de plantas, nomeadamente: hidrolatos de *Hamamelis virginiana*, de *Matricaria chamomilla* e de *Ocimum basilicum*, bem como os OE de *Cupressus lusitanica* e de *Ocimum basilicum*. Para isso, foram estudados os dois seguintes tipos de parâmetros toxicológicos nestes extratos: a genotoxicidade, mais especificamente a mutagenicidade, e a toxicidade aguda, ao nível da citotoxicidade em queratinócitos humanos, com o intuito de estes extratos poderem ser utilizados como ingredientes em futuras formulações farmacêuticas e cosméticas, maioritariamente de aplicação tópica.

Cada atividade biológica do extrato apresenta uma correlação direta com a ação química dos seus constituintes, principalmente os maioritários. Nesse sentido, no início, foi realizada a caracterização fitoquímica, através da técnica de GC-MS, pelo centro produtor CBP-BI que, no âmbito do Projeto InovEP, facultou atenciosamente os respetivos resultados obtidos para o desenvolvimento do presente trabalho. Esta caracterização permitiu, posteriormente, inferir-se quanto à possível relação entre os compostos identificados e os diferentes resultados obtidos nos ensaios dos parâmetros toxicológicos estudados.

Tanto a nível qualitativo como quantitativo, a composição química do extrato, incluindo as estruturas estereoquímicas, pode depender de vários fatores, como: local de origem geográfica da planta, habitat, momento e época da colheita, parte utilizada e qualidade do material vegetal, processamento, armazenamento e, em particular, método de extração (9,11,12,16,23).

Como se encontra descrito na secção dos resultados e subsequente discussão do subcapítulo 2.2., o H-HV é constituído maioritariamente por um monoterpenóide fenólico, o carvacrol (26,80%). Contudo, apresenta também dois compostos (α -terpineol e o éster 2-metil-3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentil de ácido propanoico) que, de um modo conjunto, a sua percentagem total (25,67%), face à percentagem da totalidade de compostos identificados (52,48%), é quase tão significativa como a do composto maioritário. Este resultado corrobora com o que se encontra descrito na literatura, sendo que, dentro da classe dos compostos monoterpénicos, o carvacrol, tal como o geraniol e o linalol, são aqueles que apresentam um maior destaque nesta espécie botânica (108,109,115,116).

O H-MC apresentou o óxido de bisabolol A (80,67%) como o seu composto maioritário, face à percentagem total de compostos presentes neste extrato (94,92%). De acordo com a literatura, nesta espécie botânica, existem quatro quimiotipos dominantes, caracterizados como A, B, C e D, tendo como principais compostos: α -bisabolol, óxido de bisabolol A, óxido de bisabolol B e óxido de bisabolona A, respetivamente (81). Nesse sentido, devido a estes dependerem do respetivo composto maioritário, o H-MC em estudo encontra-se incluído no quimiotipo B.

A composição da parte volátil dos extratos da espécie botânica de *Matricaria chamomilla*, particularmente o conteúdo dos componentes com maior valor, depende de: parte, origem e qualidade da fonte vegetal, fatores genéticos e ambientais. Além disso, existem ainda outros parâmetros que podem afetar o rendimento de extração dos extratos, a sua composição e consequentemente, a sua bioatividade, tais como: época de colheita e métodos de extração utilizados (11).

A composição química dos extratos de *Ocimum basilicum* varia consoante a estação do ano, sendo que os componentes principais, presentes durante uma estação, podem ser triviais ou totalmente ausentes noutra (41,27,98). Diferentes quimiotipos de *Ocimum basilicum* foram reconhecidos, tendo em conta os constituintes predominantes, principalmente do seu OE, sobretudo compostos aromáticos (como, por exemplo, linalol, metil chavicol, cinamato de metilo, metil eugenol, eugenol). Além disso, estes quimiotipos também podem ser conhecidos por designações baseadas nas suas origens geográficas, onde o manjeriço do tipo europeu é considerado o quimiotipo com maior qualidade, contendo linalol e metil chavicol como componentes principais (41,95).

No H-OB, o composto presente em quantidades maioritárias é classificado como fenilpropanóide, sendo designado de eugenol (52,53%). No entanto, existe ainda um outro composto em quantidades significativas, embora inferiores ao eugenol, sendo este o linalol (38,34%). Em suma, estes resultados obtidos para ambos os compostos do hidrolato corroboram com os dados reportados na literatura provenientes de outros estudos acerca desta espécie botânica (121,122).

Dependendo dos diferentes quimiotipos referidos, O OE de manjeriço pode apresentar diversas características, entre as quais se encontram as seguintes: a gama de compostos químicos, cores das flores e folhas, aroma, estado nutricional da planta e, particularmente, a origem da planta e a época de colheita (27,41,98).

De um modo semelhante ao seu subproduto, o OE-OB apresentou o linalol como o respetivo composto maioritário (67,57%), enquanto, apesar de identificado, o eugenol encontra-se presente em quantidades significativamente inferiores (6,09%). Para além destes, embora em ambos os extratos estudados da espécie *Ocimum basilicum* esteja em quantidades pequenas, destaca-se também o eucaliptol (9,33%). Com base na informação anterior, é assim possível concluir que o OE em estudo de *Ocimum basilicum* pertence ao quimiotipo de linalol, podendo até esta espécie botânica corresponder ao manjeriço do tipo europeu.

O OE-CL é constituído maioritariamente por um composto monoterpénico, o sabineno (19,01%). Contudo, apresenta um conjunto de compostos pertencentes à família dos terpenos (terpinen-4-ol e D-limoneno) que, em concomitância, resultam numa percentagem significativamente superior à do composto maioritário (29,57%), tendo em conta a percentagem total de compostos presentes nesse óleo (88,58%).

Tendo em conta os componentes identificados nos cinco extratos de plantas em estudo, é de enfatizar que os terpenos têm se destacado principalmente na área cosmética, devido ao seu baixo poder de irritação, mas também pela sua lipofilicidade que potencializa o processo de penetração cutânea. Para além disso, ambos os tipos de extratos também podem ser administrados por outras vias no organismo humano (oral, inalatória ou distribuição pelo ar) (18). Nesse sentido, de um modo geral, os OE são compostos fundamentais na indústria cosmética, porque, além de conferirem aroma agradável aos produtos, são também capazes de atuar como conservantes e agentes ativos e, simultaneamente, proporcionar diversos benefícios ao organismo humano. Apesar de os hidrolatos não serem muito estudados até à data, também há a possibilidade de exercerem essas ações mencionadas, embora provavelmente com uma menor intensidade (17).

Os dois parâmetros toxicológicos em estudo foram analisados para os cinco extratos de plantas. Relativamente à genotoxicidade, esta abordagem de segurança deve-se ao facto de a fixação dos danos no ADN, na forma de mutações genéticas, danos cromossómicos ou por recombinação, ser geralmente considerada como essencial para os efeitos hereditários e no processo de diversas etapas de malignidade. Desse modo, as alterações genéticas em células (somáticas e germinativas) estão associadas a vários efeitos adversos à saúde, os quais podem ocorrer mesmo em baixos níveis de exposição. Nas células somáticas, estas alterações são responsáveis por uma variedade de doenças genéticas, podendo também estar relacionadas com o desenvolvimento de cancro e condições degenerativas. Distinguem-se das células germinativas, nas quais a presença

de mutações pode desencadear abortos espontâneos, infertilidade e doenças hereditárias (56,57). Tendo em conta as consequências da genotoxicidade no organismo humano, a avaliação desse potencial é considerado como um componente básico no estudo de segurança dos extratos de plantas (56).

Posto isto, o potencial genotóxico, mais propriamente ao nível das mutações genéticas, foi avaliado através do teste de mutação reversa bacteriana (Ames), em duas estirpes de *S. typhimurium* (TA98 e TA100). O estudo da mutagenicidade tem uma elevada importância, sendo, ainda nos dias de hoje, frequentemente utilizado como *screening* da atividade genotóxica, em particular na indústria farmacêutica.

No teste de Ames, por recomendação da OCDE, normalmente são utilizadas cinco estirpes bacterianas (62). Contudo, como referido anteriormente, existe uma significativa discordância entre a comunidade científica e os subsequentes estudos. No presente trabalho, utilizaram-se apenas as estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100, devido a estas, segundo (Williams et al., 2019), apresentarem uma capacidade de deteção da maioria dos compostos mutagénicos (93%), sendo assim conhecidas por terem uma maior sensibilidade de deteção (63).

Os critérios de classificação de um resultado positivo no teste de Ames, de acordo com (Levy et al., 2019b), foram considerados os seguintes: o rácio de mutagenicidade (R.M.), o aumento relacionado com a concentração (dose-resposta) e o aumento fora dos intervalos históricos do controlo (118).

Assim sendo, tendo em conta os critérios mencionados, a totalidade de hidrolatos em estudo (H-HV, H-MC e H-OB) foi classificada como não mutagénica, nas concentrações e estirpes bacterianas testadas no presente estudo, devido a terem apresentado resultados negativos nas diferentes abordagens de classificação: ausência de dose-resposta, R.M. inferior a dois em todas as concentrações de teste, bem como aumento dentro do intervalo histórico do controlo de solvente, na totalidade de concentrações. Essa classificação quanto à mutagenicidade permite inferir que os três hidrolatos não têm a capacidade de induzir mutações pontuais, do tipo *frameshift* ou por substituição dos pares de bases (G/C), no genoma da estirpe bacteriana de *S. typhimurium* correspondente.

Relativamente ao H-HV, os resultados negativos obtidos quanto ao seu potencial mutagénico revigoram as informações geralmente descritas na literatura, as quais descrevem que a espécie botânica em causa tem sido considerada como um ingrediente com ausência de toxicidade (115). Contudo, tendo sido identificado em concentrações

significativas no hidrolato em questão, é importante destacar que, de acordo com (Bakkali et al., 2008), o α -terpineol foi considerado significativamente ativo, quanto ao seu perfil de mutagenicidade. Para além disso, nesse mesmo estudo, o composto maioritário do H-HV (carvacrol) exerceu um efeito mutagénico fraco. Apesar destas informações, o H-HV não apresentou mutagenicidade, podendo o efeito dos compostos ser dependente da dose (15).

Para o H-MC, não foram identificados flavonoides no estudo de caracterização fitoquímica deste extrato, estando estes normalmente em quantidades significativamente pequenas, devido a serem produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas. De acordo com o estudo de (Johnson et al., 2018), um composto pertencente a essa classe, designado por quercetina, e a sua respetiva forma glicosilada (isoquercetina) podem apresentar algum grau de genotoxicidade/carcinogenicidade, embora geralmente não estejam presentes em níveis de preocupação toxicológica nas formulações (76). Posto isto, os resultados negativos obtidos no teste de Ames para o H-MC podem estar relacionados com a ausência de flavonoides, pelo menos identificados em quantidades significativas. É de realçar que se deve ter uma persistente atenção quanto à constituição química do extrato, sendo que geralmente tem uma correlação com as suas atividades, nomeadamente a atividade mutagénica. Embora todas as possíveis ações tóxicas descritas acerca da utilização da *Matricaria chamomilla*, de acordo com o conhecimento até à data, esta espécie apresenta baixa toxicidade em determinadas concentrações (38). Contudo, dentro dos outros parâmetros toxicológicos recomendados, a determinação dos possíveis efeitos de sensibilização da pele dos seus constituintes é crítica para a segurança dos consumidores, quando esta planta, na forma de extratos, é utilizada em produtos de aplicação tópica (89).

De um modo semelhante ao extrato anterior, no H-OB, dentro da classe dos fenilpropanóides, o metil eugenol e o estragol não foram identificados no processo de caracterização fitoquímica. Contudo, uma preocupação com a espécie botânica em causa e os respetivos extratos está relacionada com a presença de quantidades razoavelmente elevadas de alguns compostos dessa classe, devido ao facto de que, segundo o que se encontra reportado no relatório do Comité da EU de medicamentos à base de plantas, existem suspeitas de que os dois componentes mencionados possam ser caracterizados com um perfil cancerígeno e/ou genotóxico (11,103). Desse modo, o metil eugenol não deve ser, por exemplo, adicionado intencionalmente como ingrediente cosmético ou, no caso de se utilizar algum OE que contenha este composto, as respetivas concentrações não devem ultrapassar aquelas que se encontram regulamentadas (17).

No entanto, a ausência de um destes compostos no processo de caracterização pode estar relacionada com a possível ausência de mutagenicidade deste hidrolato, nas concentrações e estirpes bacterianas testadas no teste de mutação reversa bacteriana. Ainda assim, o eugenol, tendo sido identificado como composto maioritário, pode apresentar algum grau de genotoxicidade. Contudo, segundo (Mohammadi Nejad et al., 2017), esta resposta genotóxica é dependente da concentração utilizada do composto e, para além disso, está principalmente relacionada com os seus metabolitos reativos ou compostos produzidos pelo seu processo de recombinação (143). Neste sentido, como o estudo do potencial mutagénico foi realizado apenas na ausência de ativação metabólica, pode ser uma explicação para os resultados do H-OB no teste de Ames terem sido de carácter negativo.

Os dois OE em estudo (OE-CL e OE-OB) apresentaram resultados negativos no ensaio de avaliação da mutagenicidade, nos três critérios de classificação mencionados, tal como os hidrolatos. Desse modo, concluiu-se que, nas concentrações e estirpes bacterianas testadas, os OE-CL e OE-OB também não têm a capacidade de induzir mutações pontuais, do tipo *frameshift* ou por substituição dos pares de bases. Como reforço dos resultados obtidos, sabe-se que, a nível bibliográfico, existe a informação de que uma grande vantagem dos OE é o facto de que, geralmente, não apresentam riscos genotóxicos de longo prazo, podendo até apresentarem uma significativa capacidade antimutagénica, a qual pode ter ligação com a atividade anticarcinogénica (15).

Apesar da antiga origem da espécie botânica de *Cupressus lusitanica*, os estudos acerca da mesma e as suas subseqüentes informações, a nível científico, ainda são limitados nos dias de hoje. Posto isto, embora os resultados do teste de Ames tenham sido de carácter negativo, a escassa informação acerca da planta, e ainda mais do seu extrato em estudo (OE), impossibilitou-nos de fazer qualquer tipo de correlação entre os resultados e a respetiva composição química do OE-CL. Para além disso, os possíveis compostos de serem identificados neste extrato apresentam significativas variações, entre os estudos já existentes, o que ainda dificulta mais o processo de análise. Contudo, pelo menos a nível de mutagenicidade, o OE-CL demonstrou ser seguro para as concentrações estudadas, nas estirpes bacterianas de teste. Neste sentido, os resultados obtidos no presente trabalho permitiram suprimir, de um certo modo, a lacuna ainda existente no conhecimento científico sobre esta espécie botânica e os seus respetivos extratos.

Ainda sobre a espécie botânica de *Ocimum basilicum*, embora os resultados do hidrolato, pelo menos a nível da mutagenicidade, sejam semelhantes ao dos OE no presente trabalho, os dados toxicológicos dos diferentes extratos de *Ocimum basilicum* podem

apresentar uma considerável variabilidade (103). Esta condição pode depender dos seguintes parâmetros: tipo de extrato, heterogeneidade do perfil bioquímico do material vegetal, idade e altura da planta, parte e quimiotipo da planta. Assim sendo, na ausência de qualquer variação entre as mencionadas, é possível inferir que o OE-OB não apresentou atividade mutagénica, para as concentrações e estirpes bacterianas utilizadas no teste de Ames. Estes resultados podem dever-se à ausência dos compostos com possível perfil genotóxico/cancerígeno (metil eugenol e estragol), ou até pelo facto de o eugenol estar presente em quantidades vestigiais relativamente ao composto maioritário deste extrato. Em suma, à parte de todas as informações descritas acerca dos potenciais componentes presentes nos extratos de manjeriço e das exceções referidas, a maioria dos componentes, principalmente do seu OE, foi reconhecida como segura pela FDA, bem como pela Comissão Europeia, corroborando isto com os resultados obtidos no teste de Ames (93).

Paralelamente ao estudo de genotoxicidade, foi avaliada a toxicidade aguda dos cinco extratos de plantas. Para isso, avaliou-se a sua citotoxicidade, através do ensaio de MTT, numa linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT), a qual serviu como modelo de estudo da biocompatibilidade celular com os extratos.

O estudo da viabilidade celular tem uma elevada importância no processo de avaliação dos extratos de plantas, de modo a conseguir-se obter uma previsão, *in vitro*, da sua segurança como ingredientes em formulações cosméticas e farmacêuticas. Para além disso, este estudo também permite determinar a gama de concentrações biocompatíveis desses extratos, para se correlacionar a eficiência do extrato com a sua segurança.

A linha celular HaCaT foi escolhida como modelo celular para o processo de avaliação da biocompatibilidade dos extratos, devido ao objetivo final de aplicação dos mesmos ser em produtos cosméticos e farmacêuticos de aplicação tópica. Nesse sentido, foi necessário analisar o comportamento da linha celular de queratinócitos humanos, quando expostos aos extratos de plantas em estudo. As células HaCaT são consideradas como um modelo de representação *in vitro* das células epidérmicas, tendo estas diversas funções biológicas, entre as quais se destacam as suas funções estrutural e protetora (134).

Desse modo, nos ensaios de citotoxicidade celular, conseguiu-se verificar que os três hidrolatos em estudo (H-HV, H-MC e H-OB) têm a capacidade de promover uma significativa viabilidade nas células HaCaT. Embora em concentrações máximas diferentes, a totalidade destes extratos demonstrou uma elevada biocompatibilidade,

incluindo valores percentuais de viabilidade celular superiores a 70% na maioria das concentrações de teste.

Dentro dos hidrolatos em estudo, os valores de concentração para os quais o respectivo hidrolato tem a capacidade de inibir 50% da viabilidade celular da linha HaCaT foram, crescentemente, os seguintes: $IC_{50} = 229,6 \mu\text{L/mL}$ (H-MC), $IC_{50} = 322,2 \mu\text{L/mL}$ (H-HV) e $IC_{50} > 500,0 \mu\text{L/mL}$ (H-OB). Desse modo, o H-OB exerce uma menor atividade citotóxica, visto ser o hidrolato com um maior valor de IC_{50} , como demonstrado. Contrariamente aos restantes, o hidrolato menos biocompatível (H-MC) promoveu uma diminuição significativa da viabilidade celular nas duas maiores concentrações de teste.

Relativamente aos OE, comprovou-se que o OE-CL promoveu uma significativa viabilidade celular na linha HaCaT, com um valor de IC_{50} de aproximadamente $2,309 \mu\text{L/mL}$. Segundo (Kamatenesi-Mugisha et al., 2013), em estudos descritos na literatura, este OE demonstrou valores de DL_{50} (dose letal mediana) baixos e, por consequência, uma elevada toxicidade, em comparação com outros dois extratos (aquoso e etanólico), principalmente devido à sua natureza complexa (125). Contudo, os resultados obtidos neste trabalho não corroboram com essa possível toxicidade, visto que, abaixo da concentração correspondente ao IC_{50} , todas as concentrações de teste apresentaram valores de viabilidade celular superiores a 70%. Por isso, essas concentrações foram consideradas como biocompatíveis com a linha celular, podendo ser, futuramente, aplicadas em diversas formulações.

Comparativamente com o anterior, o OE-OB exerce uma maior atividade citotóxica, onde o seu valor de IC_{50} foi de $0,2393 \mu\text{L/mL}$. Tal como era expectável, apesar de ser a mesma espécie botânica, o OE-OB apresentou uma marcante diferença na biocompatibilidade celular, em comparação com o respectivo hidrolato, mesmo em concentrações cem vezes menores. Assim sendo, é possível concluir que apenas as duas concentrações mais baixas de OE-OB ($0,039$ e $0,078 \mu\text{L/mL}$) demonstraram ser biocompatíveis com as células HaCaT. Dentro da composição química deste extrato, mesmo sem ser em quantidades maioritárias, encontra-se o eugenol, o qual se encontra estabelecido na literatura como um composto possivelmente citotóxico, embora normalmente estudado em células de origem cancerígena. Contudo, também de acordo com a literatura, alguns dos mecanismos de citotoxicidade celular apresentam uma relação de dependência com a concentração utilizada, o que pode justificar a ausência de toxicidade no H-OB, embora, nesse subproduto, o eugenol esteja presente como composto maioritário.

As suposições anteriores recaem no conhecimento de que, apesar das quantidades percentuais dos componentes químicos, os OE contêm um amplo número de constituintes, o que faz com que não apresentem especificidade para os alvos celulares. Geralmente, os compostos com maior lipofilicidade são relatados como os mais tóxicos e a membrana citoplasmática é, muitas vezes, o principal local de ação tóxica (15). De facto, os componentes lipofílicos dos OE, ao terem uma alta afinidade e conseguirem penetrar as membranas citoplasmáticas e os organelos das células, podem causar rutura estrutural das suas diferentes camadas de polissacáridos, ácidos gordos e fosfolípidos (15,105). Para além disso, nas células eucarióticas, os OE podem ainda provocar a despolarização das membranas mitocondriais, através de diversos mecanismos (diminuição do potencial de membrana, capacidade de afetar o ciclo do canal iónico de cálcio), e o processo de redução do gradiente de pH, ao afetarem a bomba de prótons e ATP. A partir desses mecanismos, estes extratos conseguem alterar a fluidez das membranas, tornando-as anormalmente permeáveis, o que pode resultar na libertação de radicais, citocromo C, íões de cálcio e proteínas. Devido a isto, o mecanismo de permeabilização das membranas mitocondriais, tanto a nível externo como interno, desencadeia a morte celular apoptótica ou necrótica e, conseqüentemente, o processo de citotoxicidade. Esta característica dos OE pode estar relacionada com a sua atividade antioxidante, visto que estes extratos, ao danificarem as estruturas celulares, podem atuar como pró-oxidantes nas proteínas e no ADN, havendo a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*). Nesse sentido, com base nessa atividade, a possível citotoxicidade dos OE, a nível aceitável em termos de toxicidade, pode torná-los agentes antissépticos e antimicrobianos de interesse em produtos de consumo humano (15).

Em concomitância com a análise da citotoxicidade dos diferentes extratos, verificou-se que se o efeito citotóxico analisado era devido ao extrato em si e não, apenas devido ao efeito da privação do meio de cultura, especialmente nas concentrações mais elevadas. Para isso, avaliou-se o respetivo solvente utilizado na maior concentração de teste, colocando o volume da concentração mais alta do respetivo extrato, mas de solvente. Assim sendo, procedeu-se da seguinte forma: 700 µL/mL de água para os hidrolatos e 2,5 µL/mL de DMSO nos OE.

A partir dessa análise dos solventes, verificámos que a privação de 50% do meio de cultura completo não afetou o comportamento das células, visto que a sua percentagem de viabilidade celular foi semelhante à do controlo de meio, em ambos os extratos de plantas em estudo. Tanto nos hidrolatos como nos OE, ainda existiram alguns resultados em que o potencial citotóxico do extrato mostrou-se superior ao do solvente, o que parece

confirmar que o efeito desses extratos se deve simplesmente à respectiva citotoxicidade, e não à do solvente utilizado.

Como conclusão do estudo de citotoxicidade celular, é possível inferir que todas as concentrações superiores aos valores de IC₅₀ obtidos representam um perfil de toxicidade para a linha celular HaCaT. Desse modo, para uma futura e possível aplicação dos cinco extratos de plantas, as concentrações a utilizar de cada um em formulações cosméticas e farmacêuticas têm de ser inferiores aos respectivos valores de IC₅₀, de modo a não representarem toxicidade celular para os consumidores.

Realça-se que, por limitações do teste de Ames, mencionadas na respectiva diretriz da OCDE, as concentrações estudadas nesse método foram significativamente inferiores às do ensaio de MTT.

Para aplicação farmacêutica e cosmética, os hidrolatos podem ser, então, a opção mais plausível a nível de segurança, visto que não apresentaram potencial mutagénico para as concentrações e estirpes bacterianas estudadas, bem como pelo facto de terem apresentado uma elevada biocompatibilidade com a linha celular HaCaT em concentrações consideravelmente superiores. Assim sendo, os resultados indicam que os hidrolatos podem ser considerados como seguros em baixas concentrações.

Os OE, ainda que tenham uma maior intensidade das suas propriedades, apresentaram um potencial não mutagénico, na gama de concentrações testadas. Contudo, principalmente o OE-OB, foi considerado como menos biocompatível do que os hidrolatos, à exceção do OE-CL, o qual apresentou biocompatibilidade celular na maioria das concentrações testadas. Deste modo, o OE-CL pode ser considerado seguro nessas concentrações, enquanto o OE-OB é apenas em baixas concentrações.

Porém, devido à área de estudo da toxicidade ser elevadamente ampla, serão ainda necessários mais estudos para uma completa confirmação das informações bibliográficas existentes e dos resultados obtidos no presente trabalho para os cinco extratos de plantas.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

A utilização das plantas, principalmente como fonte natural com propriedades terapêuticas, advém do início da humanidade. Nos dias de hoje, os OE têm cada vez mais importância em diversas indústrias, sendo comumente aplicados em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentares. Apesar do menor conhecimento acerca dos hidrolatos que ainda se presencia, estes extratos têm demonstrado cada vez um maior valor biológico, mesmo tendo um grau de intensidade inferior ao dos OE.

Na atualidade, estamos perante uma nova tendência global para produtos naturais e sustentáveis, o que tem levado a uma crescente e contínua valorização das plantas e os seus respetivos extratos na sociedade atual e nas diferentes indústrias. Este ressurgimento das plantas para a vida quotidiana da população tem, por sua vez, promovido um aumento no número de estudos acerca das suas propriedades com benefícios para a saúde humana. Para além disso, tem havido um acompanhamento por parte das autoridades reguladoras, com o objetivo de uma legislação mais harmonizada, mas também com uma maior preocupação quanto à segurança e eficácia dos extratos para uma possível aplicação em diversas formulações. Desse modo, existe a tentativa de disseminar o pressuposto empírico de que os produtos naturais são absolutamente seguros, devido a serem constituídos por plantas.

Nesse sentido, o presente estudo procurou avaliar o potencial genotóxico, mais especificamente ao nível da mutagenicidade, e citotóxico de cinco extratos de plantas diferentes, bem como os seus compostos ativos. Os extratos de plantas estudados foram os seguintes: hidrolatos de *Hamamelis virginiana*, *Matricaria chamomilla* e *Ocimum basilicum*, e os OE de *Cupressus lusitanica* e *Ocimum basilicum*.

A totalidade de extratos de plantas estudados não apresentou atividade mutagénica, nas estirpes e concentrações de teste. Quanto à citotoxicidade, os extratos em estudo demonstraram uma significativa biocompatibilidade com as células, à exceção do OE-OB que foi classificado como o mais citotóxico, com valores de IC₅₀ mais baixos.

Com base nos resultados, foi possível concluir que os três hidrolatos podem ser considerados seguros em baixas concentrações, tendo sido não mutagénicos e biocompatíveis. Embora os OE tenham apresentado um notável perfil de segurança relativamente ao potencial de mutagenicidade, o de *Ocimum basilicum* evidenciou uma menor biocompatibilidade, mesmo em baixas concentrações.

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho sustentam a importância de uma contínua valorização dos hidrolatos para futuras aplicações, tanto na indústria cosmética como farmacêutica.

No entanto, futuramente, torna-se indispensável dar continuidade a este estudo, de modo a avaliar o potencial genotóxico, ao nível das aberrações cromossômicas, nomeadamente numéricas e estruturais. Para isso, é recomendado, pelas autoridades reguladoras, a realização de um ensaio *in vitro* em células de mamíferos, sendo o ensaio de micronúcleo o mais amplamente utilizado, com o intuito de aumentar o espectro de possíveis eventos genéticos detetados. Para além disso, a bateria composta pelo teste de Ames e pelo ensaio *in vitro* em células de mamíferos permite detetar 99% dos compostos genotóxicos (63).

No sentido de completar a determinação do perfil de segurança dos extratos de plantas, seria interessante estudar os restantes parâmetros toxicológicos recomendados pelas autoridades reguladoras, como, por exemplo, a fototoxicidade, a irritação dérmica, a sensibilização cutânea, entre outros.

5. Bibliografia

1. INFARMED. Decreto de Lei n.º 176/2006 de 30 de Agosto (Estatuto do Medicamento) (2006). Available from: www.infarmed.pt
2. Diretiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004. Jornal Oficial da União Europeia (2004).
3. Vlietinck, A., Pieters, L., Apers, S. (2009). Legal requirements for the quality of herbal substances and herbal preparations for the manufacturing of herbal medicinal products in the European Union. *Planta Medica*, 75: 683–688.
4. Jakubczyk, K., Tuchowska, A., Janda-Milczarek, K. (2021). Plant hydrolates – Antioxidant properties, chemical composition and potential applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 142.
5. Molnar, M., Mendešević, N., Šubarić, D., Banjari, I., Jokić, S. (2017) Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions. *Chemistry Central Journal*, 11(1): 78.
6. Žlabur, J.Š., Žutić, I., Radman, S., Pleša, M., Brnčić, M., Barba, F.J., et al. (2020). Effect of Different Green Extraction Methods and Solvents on Bioactive Components of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Flowers. *Molecules*, 25, 810).
7. Poonkodi, K. (2016). Chemical composition of essential oil of *Ocimum basilicum* L. (Basil) and its biological activities – an overview. *Journal of Critical Reviews*, 3 (3): 56-62.
8. Chaudhri, S.K., Jain, N.K. (2009). History of cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3 (3): 164–167.
9. De Groot, A., Schmidt, E. (2016). Essential Oils - Part II: General Aspects. *Dermatitis*, 27 (2): 43–49.
10. Mulat, M., Khan, F., Muluneh, G., Pandita, A. (2020). Phytochemical Profile and Antimicrobial Effects of Different Medicinal Plant: Current Knowledge and Future Perspectives. *Current Traditional Medicine*, 6 (1): 24–42.
11. Sarkic, A., Stappen, I. (2018). Essential oils and their single compounds in cosmetics-a critical review. *Cosmetics*, 5 (11). MDPI AG.
12. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). (2016). Guidance on essential oils in cosmetic products.
13. Di Vito, M., Smolka, A., Proto, M.R., Barbanti, L., Gelmini, F., Napoli, E., et al. (2021). Is the antimicrobial activity of hydrolates lower than that of essential oils?, *Antibiotics*, 10, 88.

14. Ademiluyi, A.O., Oyeleye, S.I., Oboh, G. (2016). Biological activities, antioxidant properties and phytoconstituents of essential oil from sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Comparative Clinical Pathology*, 25 (1): 169–76.
15. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
16. Aziz, Z.A.A., Ahmad, A., Setapar, S.H.M., Karakucuk, A., Azim, M.M., Lokhat, D., et al. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19 (13): 1100–1110.
17. Sharmeen, J.B., Mahomoodally, F.M., Zengin, G., Maggi, F. (2021), Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules*, 26, 666.
18. Abelan, U.S., de Oliveira, A.C., Cacoci, É.S.P., Martins, T.E.A., Giacon, V.M., Velasco, M.V.R., et al. (2021). Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 00: 1-12.
19. Asbahani, A. El, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483: 220–243.
20. Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Guido, F., Kiliçarslan, Ö., et al. (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complement Altern Med*, 19: 146.
21. Stanojevic, L.P., Marjanovic-Balaban, Z.R., Kalaba, V.D., Stanojevic, J.S., Cvetkovic, D.J., Cakic, M.D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 20 (6): 1557–1569.
22. Sokovicx, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2019). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15 (11): 7532–7546.
23. Aćimović, M., Tešević, V., Smiljanić, K., Cvetković, M., Stanković, J., Kiproviski, B., et al. (2020). Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced Technologies*, 9 (2): 54–70.
24. Carvalho, I.T., Estevinho, B.N., Santos, L. (2016). Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38 (2): 109–119.

25. D'Amato, S., Serio, A., López, C.C., Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*. 86: 126–37.
26. ISO 9235-2021 (E): Aromatic natural raw materials - Vocabulary. (2021), 3^a ed.
27. Li, Q.X., Chang, C.L. (2015) Basil (*Ocimum basilicum* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 25: 231–238.
28. Smigielski, K.B., Prusinowska, R., Bemska, J.E. (2016). Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils and Hydrolates from Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 19 (2): 492–498.
29. Giannenas, I., Sidiropoulou, E., Bonos, E., Christaki, E., Florou-Paneri, P. (2020). The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives. In: *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health*. Elsevier, p. 1–18.
30. Rosa, R.L., Barcelos, A.L.V., Bampi, G. (2012). Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste-SC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14 (2): 306-310.
31. Brenner, G.M., Stevens, C.W. (2018). *Pharmacology*. Fifth edition. Philadelphia PA: Elsevier Inc, Cap. 1: 3-47.
32. Silva dos Santos, D., Barreto, R.S.S., Serafini, M.R., Gouveia, D.N., Marques, R.S., Nascimento, L.C., Nascimento, J.C., Guimarães, A.G. (2019). Phytomedicines containing *Matricaria* species for the treatment of skin diseases: A biotechnological approach. *Fitoterapia*, 138.
33. Martins, J.C. (2013). Medicamentos à base de plantas: Contributo para o aproveitamento dos recursos naturais nacionais. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia I*, 5: 22- 38.
34. Khair-ul-Bariyah, S., Ahmed, D., Ikram, M. (2012). *Ocimum Basilicum*: A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies. *Pakistan Journal of Chemistry*, 2 (2): 78–85.
35. Srivastava, J.K., Shankar, E., Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (review). *Molecular Medicine Reports*, 3 (6): 895–901.
36. Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M.K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 5 (9): 82–95.
37. Monteiro, S. C., Brandelli, C.L.C. (2017). *Farmacobotânica*, Artmed, Vol. 5, p. 40–51.

38. Barnes, J., Anderson, L.A., David, J., Barnes, P., Phillipson, A., Phillipson, D. (2007). *Herbal Medicines*, Pharmaceutical Press, 3th edition.
39. Sharifi-Rad, M., Nazaruk, J., Polito, L., Morais-Braga, M.F.B., Rocha, J.E., Coutinho, H.D.M., et al. (2018). *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. *Microbiological Research*, 215: 76–88.
40. Miraj, S., Alesaeidi, S. (2016). A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuitta chamomile* (chamomile). *Electron Physician*, 8 (9): 3024–3031.
41. Filip, S. (2017). Basil (*Ocimum basilicum* L.) a Source of Valuable Phytonutrients. *International Journal of Clinical Nutrition & Dietetics*. 3: 118.
42. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 7 (1): 1–7.
43. Directiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* (2001).
44. INFARMED. Circular Informativa N.º 111/CD/8.1.6. Repositório de Relatórios Periódicos de Segurança (2015).
45. Ferreira, M.S., Palmeira-de-Oliveira, A., Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, R., Sousa-Lobo, J.M., Almeida, I.F. (2021). Regulamentação dos produtos cosméticos: uma perspetiva da evolução em Portugal e na União Europeia. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 10 (1): 4–18.
46. Draelos, Z.D. (2015). Cosmetic Drugs of Antiquity. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14 (4): 267.
47. Parecer do Comité Económico e Social Europeu (CESE) sobre o tema "Reforçar o setor industrial europeu dos produtos de cuidados pessoais, de higiene corporal e de beleza" (Parecer 2017/C 034/05).
48. INFARMED. Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de Setembro - Legislação Farmacêutica Compilada (2008). Available from: www.infarmed.pt.
49. Saha, R. (2012). Cosmeceuticals and herbal drugs: Practical uses. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3 (1): 59–65.
50. União Europeia. Regulamento (CE) N.º1223/2009 Do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*. (2009), 151.
51. Pauwels, M., Rogiers, V. (2010). Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: A legally imposed challenge to science. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 243 (2): 260–274.

52. European Commission. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), 30-31 March 2021. (The SCCS Notes of Guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 11th revision, SCCS/1628/21).
53. INFARMED. Circular Informativa N.º 032/CD/100.20.200. Medicamentos à base de plantas indevidamente classificados como cosméticos (2019). Available from: www.infarmed.pt.
54. Dreger, M., Wielgus, K. (2013). Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Polonica*, 59 (4): 142–156.
55. Parasuraman, S. (2011). Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2 (2): 74–79.
56. EFSA Scientific Committee. (2011) Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9 (9): 2379
57. Food and Drug Administration (FDA), Center of Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). (2012). Guidance for Industry S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> (accessed on 24th February 2022).
58. Iordache, A., Culea, M., Gherman, C., Cozar, O. (2009). Characterization of some plant extracts by GC-MS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 267 (2): 338–342.
59. EURL ECVAM DB-ALM (2015). DB-ALM Method Summary n.º. 30: Bacterial reverse mutation test (Ames test), last update on 20th June 2015.
60. EURL ECVAM DB-ALM (2008). DB-ALM Protocol n.º 30: The Ames Test (with *S. typhimurium*), last update in December 2008. Available from: <https://cidportal.jrc.ec.europa.eu>
61. Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (1–2): 29-60.
62. OECD (2020), Guideline for testing of chemicals Test No 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidel. Test. Chem. 24.
63. Williams, R. V., DeMarini D.M., Stankowski, L.F., Escobar, P.A., Zeiger, E., Howe J., et al. (2019). Are all bacterial strains required by OECD mutagenicity

- test guideline TG471 needed?. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 848.
64. Maron, D.M. & Ames, B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113 (3-4): 173-215.
 65. Çelik, T. A. (2018). Introductory Chapter: Cytotoxicity. In: Cytotoxicity. IntechOpen, p. 3-6.
 66. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods, 65: 55-63.
 67. Twentyman, P.R., Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. British Journal of Cancer, 56: 279-285.
 68. Tonder A.v., Joubert, A.M., Cromarty, A.D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Research Notes, 8 (1): 47.
 69. López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P., Sába, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. Journal of Functional Biomaterials, 5 (2): 43–57.
 70. Meerloo, J.v., Kaspers, G.J.L., Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Ian A. Cree (ed.), Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 731, 20: 237–245.
 71. Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L. (2013). Cell Viability Assays. Cell Viability Assays. 2013. In: In: Markossian, S., Grossman, A., Brimacombe, K., et al. Assay Guidance Manual.
 72. Gardiner, P. (2007). Complementary, Holistic, and Integrative Medicine: Chamomile. Pediatrics in Review, 28 (4).
 73. Murti, K., Panchalm M.A., Gajera, V., Solankin, J. (2012). Pharmacological Properties of *Matricaria recutita*: A Review. Pharmacologia, 3 (8): 348-351.
 74. Sharafzadeh, S., Alizadeh, O. (2011). German and Roman Chamomile. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 01 (10): 1-5.
 75. World Health Organization. WHO Library Cataloguing in Publication Data. WHO monographs on selected medicinal plants, Flos Chamomillae (1999), 2^aed., Vol. 1, p. 86-92.
 76. Johnson, W., Boyer, I., Bergfeld, W.F., Belsito, D. V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., et al. (2018). Amended Safety Assessment of *Chamomilla recutita*-Derived

- Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 37 (supplement 3): 51S-79S.
77. Ela, M.A., El-Lakany, A., Hijazi, M.A. (2011). General Introduction on Family Asteracea. *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 18: 376-400.
 78. Zadeh, J.B., Kor, N.M., Kor, Z.M. (2014). Chamomile (*Matricaria recutita*) As a Valuable Medicinal Plant. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (3): 823-829
 79. Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S.L., Kaushik, D. (2010). Pharmacological Potential of *Matricaria recutita* - A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2 (1): 12-16.
 80. Avonto, C., Wang, Z., Ahn, J., Verma, R.P., Sadrieh, N., Dale, O., et al. (2021). Integrated Testing Strategy for the Safety of Botanical Ingredients: A Case Study with German Chamomile Constituents. *Applied In Vitro Toxicology*, 7 (3): 129–143.
 81. Khan, I.A., Abourashed, E.A. (2010). Leung's Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics, 3rded., p. 74-76, 169-173.
 82. Shafique, M., Khan, S. J., Khan, N.H. (2011). Study of antioxidant and antimicrobial activity of Sweet basil (*Ocimum basilicum*) essential oil. *Pharmacology*, 1: 105-111.
 83. Chalchat, J.C., Özcan, M.M. (2008). Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry*, 110 (2): 501–503.
 84. El-Soud, N.H.A, Deabes, M., El-Kassem, L.A., Khalil, M. (2015). Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3 (3): 374–379.
 85. Ch, M.A., Naz, S.B., Sharif, A., Akram, M., Saeed, M. (2015). Biological and Pharmacological Properties of the Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *British Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 7 (5) :330–339.
 86. Baritoux, O., Richard, H., Touche, J., Derbesy, M. (1992). Effects of Drying and Storage of Herbs and Spices on the Essential Oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 7: 267-271.
 87. Jain M.L., Jain, S.R. (1972). Therapeutic utility of *Ocimum basilicum* var. *album*. *Planta Medica*, 22 (5): 66-70.
 88. Avetisyan, A., Markosian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N., Babayan, A., Aloyan, S., Trchounian, A. (2017). Chemical composition and some biological activities

of the essential oils from basil *Ocimum* different cultivars. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17 (1).

89. Al-Maskri, A.Y., Hanif, M.A. Yahya, Al-Maskari, M. Y., Abraham, A.S., Al-sabahi J.N., Al-Mantheri, O. (2011). Essential Oil from *Ocimum basilicum* (Omani Basil): A Desert Crop. Natural Product Communications, 6 (10): 1487 – 1490.
90. Singletary, K.W. (2018). Basil: A Brief Summary of Potential Health Benefits. Nutrition Today, 53 (2): 92–97.
91. Faivre, C., Ghedira, K., Goetz, P., Le Jeune, R. (2009). *Hamamelis virginiana* L. (hamamelidaceae). Phytotherapie, 7: 215–220.
92. Shahrajabian, M.H., Sun, W., Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. International Journal of Food Properties, 23 (1): 1961–1970.
93. Do Nascimento, L.D., de Moraes, A.A.B., da Costa, K.S., Galúcio, J.M.P., Taube, P.S., Costa, C.M.L., et al. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: new findings and potential applications. Biomolecules, 10, 998.
94. Rubab, S., Hussain, I., Khan, B.A., Unar, A.A., Abbas, K.A., Khichi, Z.H., et al. (2017). Biomedical Description of *Ocimum basilicum* L. Journal of Islamic International Medical College (JIIMC). 12 (1): 59–67.
95. Makri, O., Kintzios, S. (2008) *Ocimum* sp. (Basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 13 (3): 123–150.
96. Watt, M.S., Palmer, D.J., Dungey, H., Kimberley, M.O. (2009) Predicting the spatial distribution of *Cupressus lusitanica* productivity in New Zealand. Ecological Management & Restoration, 258 (3): 217–223.
97. Miraj, S., Kiani, S. (2016). Study of pharmacological effect of *Ocimum basilicum*: A review. Der Pharmacia Lettre, 8 (9): 276–280.
98. Özcan, M., Chalchat, J.C. (2002). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. Czech Journal of Food Sciences, 20 (6): 223–228.
99. Ismail, M. (2006). Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum* essential oil. Pharmaceutical Biology., 44 (8): 619–626.
100. Hasegawa, Y., Tajima, K., Toi, N., Sugimura, Y. (1997). Characteristic Components Found in the Essential Oil of *Ocimum basilicum* L. Flavour and Fragrance Journal, 12: 195–200.
101. Tateo, F. (1989). The composition of various oils of *Ocimum basilicum* L. Journal of Essential Oil Research, 1 (3): 137–138.

102. Purushothaman, B., PrasannaSrinivasan, R., Suganthi, P., Ranganathan, B., Gimbun, J., Shanmugam, K. (2018). A comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *Journal of Natural Remedies*, 18 (3): 71–85.
103. Sestili, P., Ismail, T., Calcabrini, C., Guescini, M., Catanzaro, E., Turrini, E., et al. (2018). The potential effects of *Ocimum basilicum* on health: a review of pharmacological and toxicological studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*.
104. Kathirvel, P., Ravi, S. (2012) Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Natural Product Research*, 26 (12): 1112–1118.
105. Kavooosi, G., Amirghofran, Z. (2017). Chemical composition, radical scavenging and antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*.
106. Weber, R.W. (2012). Allergen of the month - Witch Hazel. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 109 (5).
107. Duckstein, S.M., Lorenz, P., Stintzing, F.C. (2012) Conversion of phenolic constituents in aqueous *Hamamelis virginiana* leaf extracts during fermentation. *Phytochemical Analysis*, 23 (6): 588–597.
108. Engels, G., Brinckmann, J. (2017) With Hazel. (*Hamamelis virginiana*, Hamamelidaceae). *HerbalGram*, 116, 8–19.
109. Trüeb, R. (2014). North American virginian witch hazel (*Hamamelis virginiana*): Based scalp care and protection for sensitive scalp, red scalp, and scalp burn-out. *International Journal of Trichology*, 6 (3): 100–103.
110. Engel, R., Gutmann, M., Hartisch, C., Kolodziej, H., Nahrstedt, A. (1998) Study on the composition of the volatile fraction of *Hamamelis virginiana*. *Planta Medica*, 64 (3): 251–258.
111. Hughes-Formella, B.J., Filbry, A., Gassmueller, J., Rippke, F. (2002). Anti-Inflammatory Efficacy of Topical Preparations with 10% Hamamelis Distillate in a UV Erythema Test. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15: 125-132.
112. Weaver, R.E. (1971). The Witch Hazel Family (Hamamelidaceae). *Arnoldia*, 31 (6): 349-365.
113. Burlando, B., Verotta, L., Cornara, L., Bottini-Massa, E. (2010) *Herbal Principles in Cosmetics: Properties and Mechanisms of Action*. CRC Press, 4: 363-367.
114. Hatmaker, E.A., Wadl, P.A., Mantooth, K., Scheffler, B.E., Ownley, B.H., Trigiano, R.N. (2015). Development of microsatellites from *Fothergilla* ×

- intermedia* (Hamamelidaceae) and cross transfer to four other genera within Hamamelidaceae. *Applications in Plant Sciences*, 3 (4): 1400123.
115. Cosmetic Ingredient Review. (2018). Safety Assessment of *Hamamelis virginiana* (Witch Hazel)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. Draft Final Report for Panel Review.
 116. Colantonio, S., Rivers, J.K. (2017). Botanicals with dermatologic properties derived from first nations healing: Part 2—plants and algae. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*.
 117. Rostami-Vartooni, A., Nasrollahzadeh, M., Alizadeh, M. (2016). 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*, 680: 309–314.
 118. Levy, D.D., Zeiger, E., Escobar, P.A., Hakura, A., Van der Leede, B J. M., Kato, M., et al. (2019b). Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 848: 403074.
 119. Tavares, C.S., Martins, A., Miguel, M.G., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Gameiro, J.A., et al. (2020). Bioproducts from forest biomass II. Bioactive compounds from the steam-distillation by-products of *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cistus ladanifer* L. wastes. *Industrial Crops and Products*, 158: 112991.
 120. Cui, Z. (2011). Introduction. In: Moo-Young, M. *Comprehensive Biotechnology*. 2^a Ed. Burlington: Academic Press, Vol. 5, Cap. 5.01.
 121. Selim, S.A., Adam, M.E., Hassan, S.M., Albalawi, A.R. (2014). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14: 179.
 122. Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Mulinacci, N., Heimlep, D. (2002) HPLC Quantification of Flavonoids and Biflavonoids in Cupressaceae Leaves. *Chromatographia*, 56: 469-474.
 123. Kuate, J.R., Bessière, J.M., Vilarem, G., Zollo, P.H.A. (2006) Chemical composition and antidermatophytic properties of the essential oils from leaves, flowers and fruits of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 693-697.
 124. Kratz, D., Wendling, I., Brondani, G.E., Dutra, L.F. (2010). Propagação assexuada de *Cupressus lusitanica*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 30 (62): 161–164.

- 125.** Kamatenesi-Mugisha, M., Buyungo, J.P., Ogwal, P., Kasibante, A., Deng, A.L., Ogendo, J.O., Mihale, M.J. (2013). Oral acute toxicity study of selected botanical pesticide plants used by subsistence farmers around the Lake Victoria Basin. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 7 (3): 93–101.
- 126.** Press JR, Short M, Turland NJ. *Flora of Madeira*. Stationery Office/Tso., editor. 1994.
- 127.** Carmo, M.M., Frazzino, S. (1989) The Essential Oil of *Cupressus lusitanicus* Mill. *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 185-186.
- 128.** Guimarães, R., Sousa, M.J., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 32 (2): 152–156.
- 129.** Bett, P.K., Deng, A.L., Ogendo, J.O., Kariuki, S.T., Kamatenesi-Mugisha, M., Mihale, J.M., et al. (2016). Chemical composition of *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus saligna* leaf essential oils and bioactivity against major insect pests of stored food grains. *Industrial Crops and Products*, 82: 51–62.
- 130.** Gadek, P.A., Quinn, C.J. (1985). Biflavones of the subfamily Cupressoideae. *Phytochemistry*, 24: 267-272.
- 131.** Harraz, F.M., Hammada, H.M., El-Hawiet, A., Radwan, M.M., Wanas, A.S., Eid, A.M., ElSohly, M.A. (2020). Chemical constituents, Antibacterial and Acetylcholine esterase inhibitory activity of *Cupressus macrocarpa* leaves. *Natural Product Research*, 34 (6): 816–822.
- 132.** Levy, D.D., Hakura, A., Elespuru, R.K., Escobar, P.A., Kato, M., Lott, J., Moore, M.M., Sugiyama, K. (2019a). Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 848: 403075.
- 133.** Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 106, p. 761-771.
- 134.** Wilson, V.G. (2014). Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. *Methods Molecular Biology*, 1195: 33–41.
- 135.** CLS Product Information. General Characteristics, Culture Conditions and Handling of HaCaT. CLS Cell Lines Service GmbH.
- 136.** ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. (2009.)
- 137.** Elvin-Lewis, M. (2005). Safety Issues Associated with Herbal Ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 50: 219–313.

- 138.** Schmidt, B., Ribnicky, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T., Raskin, I (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism*, 57 (7 Suppl. 1): S3-S9.
- 139.** Knöss, W., Chinou, I. (2012). Regulation of medicinal plants for public health - European community monographs on herbal substances. *Planta Medica*, 78: 1311–1316.
- 140.** Eren, Y. (2016). Mutagenic and cytotoxic activities of *Limonium globuliferum* methanol extracts. *Cytotechnology*, 68 (5): 2115–2124.
- 141.** SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). Addendum to the SCCS's Notes of Guidance (NoG) for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 8th Revision (SCCS/1501/12), 9 April 2014, SCCS/1532/14, revision of 22 October 2014.
- 142.** Marques, R.C.P., De Medeiros, S.R.B., Da Silva Dias, C., Barbosa-Filho, J.M., Agnez-Lima, L.F. (2003). Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536 (1–2): 117–120.
- 143.** Nejad, S.M., Özgüneş, H., Başaran, N. (2017). Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14 (2): 201–206.

6. ANEXOS

Anexo I - Relatório de segurança [proveniente de (50)]

O relatório de segurança é um importante componente do FIP, estando os requisitos mínimos para a sua elaboração enunciados no anexo I do Regulamento n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo aos produtos cosméticos. Com base nessas informações, a 25 de novembro de 2013, foi publicado um documento que consiste nas orientações para aplicação do anexo apresentado. Contudo, a respetiva explicação de cada um dos requisitos encontra-se claramente descrita num documento de suporte posteriormente publicado pela SCCS, designado por *Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic ingredients and their Safety Evaluation* (52). Para além disso, nesse documento de suporte, está também apresentado um documento para avaliação de um ingrediente cosmético, no âmbito de: especificações químicas e físicas, estudo de exposição e toxicocinética e a avaliação toxicológica.

22.12.2009	PT	Jornal Oficial da União Europeia	L 342/79
------------	----	----------------------------------	----------

ANEXO I
RELATÓRIO DE SEGURANÇA DO PRODUTO COSMÉTICO

O relatório de segurança do produto cosmético deve, no mínimo, conter o seguinte:

PARTE A – Informação sobre a segurança do produto cosmético

- 1. Composição qualitativa e quantitativa do produto cosmético**
Composição quantitativa e qualitativa do produto cosmético, incluindo a identidade química das substâncias (nomeadamente, denominação química, INCI, CAS, EINECS/ELINCS, quando possível) e função prevista. No caso dos compostos odoríficos e aromáticos, essas informações limitar-se-ão à designação e ao número de código da substância e à identificação do fornecedor.
- 2. Características físico-químicas e estabilidade do produto cosmético**
Características físicas e químicas da substância, das matérias-primas, bem como do produto cosmético.
Estabilidade do produto cosmético em condições de armazenagem razoavelmente previsíveis.
- 3. Qualidade microbiológica**
Especificações microbiológicas da substância ou mistura e do produto cosmético. Deve dedicar-se uma atenção especial aos cosméticos usados à volta dos olhos, nas mucosas em geral, na pele lesionada, em crianças com menos de três anos, nas pessoas idosas e pessoas com resposta imunitária comprometida.
Resultados do ensaio de eficácia dos conservantes.
- 4. Impurezas, vestígios, informações sobre o material de embalagem**
Pureza das substâncias e misturas.
Se estiverem presentes vestígios de substâncias proibidas, provas da sua inevitabilidade técnica.
Características relevantes do material de embalagem, em especial a pureza e a estabilidade.
- 5. Utilização normal e razoavelmente previsível**
Utilização normal e razoavelmente previsível do produto cosmético. A justificação deve basear-se, em especial, nas advertências e outras explicações na rotulagem do produto cosmético.
- 6. Exposição ao produto cosmético**
Dados sobre a exposição ao produto cosmético tendo em consideração os resultados da secção 5 relativamente a:
 - 1) Local(is) de aplicação;
 - 2) Área superficial de aplicação;
 - 3) Quantidade de produto cosmético aplicado;
 - 4) Duração e frequência de aplicação;
 - 5) Via(s) de exposição normal(is) e razoavelmente previsível(is);
 - 6) População visada (ou exposta). Deve igualmente ter-se em conta a exposição potencial de uma determinada população específica.

O cálculo da exposição deve também ter em conta os efeitos toxicológicos a considerar (por exemplo, a exposição pode ter de ser calculada por unidade de superfície da pele ou por unidade de peso corporal). Deve igualmente atender-se à possibilidade de uma exposição secundária por vias diferentes das que resultam da aplicação directa (por exemplo, inalação inadvertida de aerossóis, ingestão inadvertida de produtos cosméticos para os lábios, etc.).

Deve dedicar-se uma atenção especial aos eventuais impactos na exposição resultantes da dimensão das partículas.

7. Exposição às substâncias

Dados sobre a exposição às substâncias presentes no produto cosmético para os parâmetros toxicológicos relevantes, tendo em consideração a informação constante da secção 6.

8. Perfil toxicológico das substâncias

Sem prejuízo do disposto no artigo 18.º, perfil toxicológico da substância contida no produto cosmético para todos os parâmetros toxicológicos relevantes. Deve dar-se especial ênfase à avaliação da toxicidade local (irritação cutânea e ocular), sensibilização cutânea e, no caso de absorção de UV, toxicidade fotoinduzida.

Devem ter-se em conta todas as vias de absorção, bem como o cálculo dos efeitos sistémicos e de margem de segurança (Mds) com base em níveis de efeitos adversos não observáveis (NEANO). A falta destas considerações deve ser devidamente justificada.

Deve dedicar-se especial atenção aos eventuais impactos no perfil toxicológico resultantes de:

- dimensão das partículas, incluindo nanomateriais,
- impurezas nas substâncias e nas matérias-primas utilizadas, e
- interação entre substâncias.

Qualquer interpolação deve ser devidamente fundamentada e justificada.

Deve identificar-se claramente a fonte da informação.

9. Efeitos indesejáveis e efeitos indesejáveis graves

Todos os dados sobre efeitos indesejáveis e efeitos indesejáveis graves do produto cosmético ou, sempre que tal for relevante, de outros produtos cosméticos. Inclui-se a apresentação de dados estatísticos.

10. Informação sobre o produto cosmético

Outras informações relevantes, por exemplo estudos existentes realizados com voluntários humanos ou as conclusões comprovadas e devidamente fundamentadas das avaliações de risco realizadas noutras áreas relevantes.

PARTE B – Avaliação da segurança do produto cosmético

1. Conclusão da avaliação

Declaração sobre a segurança do produto cosmético, como se refere no artigo 3.º

2. Advertências e instruções de utilização a inscrever no rótulo

Declaração sobre a necessidade de incluir no rótulo qualquer advertência ou instrução de utilização específica, em conformidade com o disposto na alínea d) do n.º 1 do artigo 19.º.

3. Fundamentação

Explicação da fundamentação científica que conduziu à conclusão da avaliação constante da secção 1 e à declaração constante da secção 2. Esta explicação deve basear-se nas descrições efectuadas na parte A. Sempre que tal for relevante, devem calcular-se margens de segurança e efectuar a respectiva discussão.

Deve proceder-se, nomeadamente, a uma avaliação específica dos produtos cosméticos destinados às crianças com menos de três anos e dos produtos cosméticos destinados exclusivamente à higiene íntima externa.

Devem avaliar-se as eventuais interações entre as substâncias presentes no produto cosmético.

A análise, ou não, dos diferentes perfis toxicológicos deve ser devidamente justificada.

Devem ser devidamente analisados os impactos da estabilidade sobre a segurança dos produtos cosméticos.

4. Credenciais do avaliador e aprovação da parte B

Nome e endereço do avaliador da segurança.


Comprovativo das qualificações do avaliador da segurança.

Data e assinatura do avaliador da segurança.

—


Anexo II - Relatórios de análise cromatográfica para caracterização fitoquímica dos extratos de plantas em estudo

Hidrolato de *Hamamelis virginiana*




Relatório de análise GC-MS

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



Relatório de análise GC-MS

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



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 SCIION-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%.

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


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





Relatório de análise GC-MS

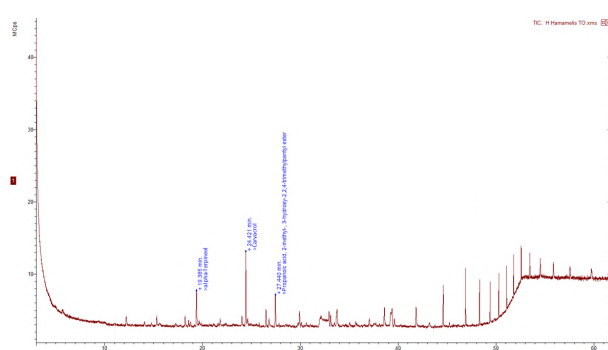
Amostra: Hidrolato de *Hamamelis virginiana*
Data da análise: 20/04/2021



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	12,07			2,66E+06	15,83	4,24		
2	15,24			2,63E+06	15,66	4,20		
3	18,17			2,33E+06	13,87	3,72		
4	19,35	α-Terpineol	C ₁₅ H ₂₄ O	90,5	9,28E+06	55,22	14,80	1189 1188,85
5	24,42	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	91,5	1,68E+07	100,00	26,80	1299 1311,51
6	26,48			4,51E+06	26,82	7,19		
7	27,45	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

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

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





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



Hidrolato de *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

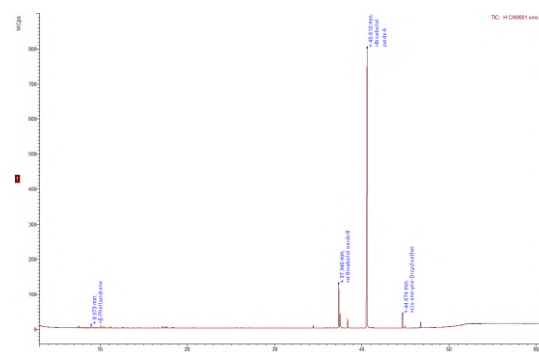
cbpbi@ipcib.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>



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

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

Hidrolato de *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 eucaliptol, 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

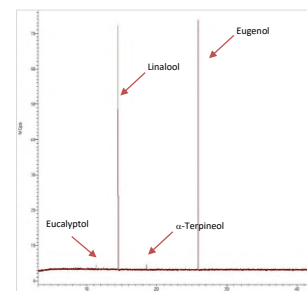
cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>



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

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

Óleo Essencial de *Cupressus lusitanica*



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Óleo Essencial de *Cupressus lusitanica*
Folha
Data da análise: 06/01/2020

Detalhes da Análise Cromatográfica:

O perfil volátil do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* 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 1 mL/min.

A amostra do óleo essencial foi previamente diluída (1:200) com um solvente orgânico (pentano) e foi injetada no GC-MS (1 µL), no qual se utilizou 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 **α-pineno**, **γ-terpinene**, **β-Myrcene** 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

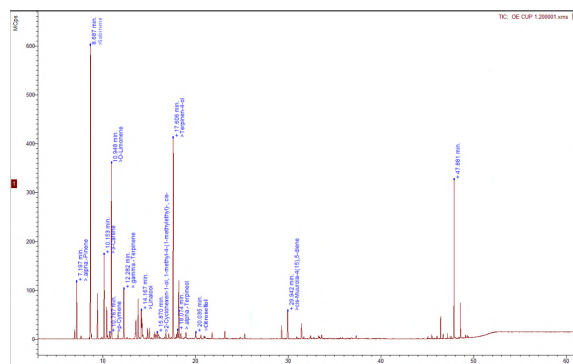
cbpbi@ipcb.pt
Telef. 272 339 900
<http://cbpbi.ipcb.pt/>



Relatório de análise GC-MS

Amostra: Óleo Essencial de *Cupressus lusitanica*
Folha
Data da análise: 06/01/2020

Cromatograma do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* 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	7,05	α-pinene	C ₁₀ H ₁₆	95,6	3,16E+08	14,38	2,73	937	900,82
2	7,43	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	94,0	1,17E+08	5,34	1,01	951	910,26
3	8,62	Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	96,3	2,20E+09	100,00	19,01	974	939,45
4	9,37	β-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	97,0	3,45E+08	15,67	2,98	991	957,84
5	10,09	3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	95,6	6,80E+08	30,92	5,88	1011	975,56
6	10,37	α-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	94,6	2,56E+08	11,65	2,22	1017	982,47
7	10,89	D-Limonene	C ₁₀ H ₁₆	97,3	1,44E+09	65,27	12,41	1018	995,25
8	11,61	2-Heptanol, acetate	C ₉ H ₁₈ O ₂	91,9	5,98E+07	2,72	0,52	1045	1012,97
9	12,23	γ-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	96,5	4,22E+08	19,19	3,65	1060	1028,13
10	13,55	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	95,6	1,85E+08	8,43	1,60	1088	1060,44
11	13,78	2-Nonanone	C ₉ H ₁₈ O	93,3	3,61E+08	16,43	3,12	1092	1066,26
12	14,13	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	96,5	2,51E+08	11,42	2,17	1099	1074,72
13	14,20	2-Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	95,2	1,85E+08	8,41	1,60	1102	1076,41

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/>

14	14,79	β-Thujone	C ₁₀ H ₁₆ O	95,1	9,87E+07	4,48	0,85	1114	1090,91
15	15,00				1,09E+08	4,93	0,94		
16	15,83	2-cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-cis	C ₁₀ H ₁₆ O	92,1	9,05E+07	4,11	0,78	1122	1116,55
17	16,79	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	93,5	6,57E+07	2,98	0,57	1167	1140,23
18	17,59	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	94,2	1,99E+09	90,24	17,16	1177	1159,71
19	18,19	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	95,7	5,46E+08	24,83	4,72	1189	1174,58
20	20,02	Citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	93,4	7,36E+07	3,34	0,64	1228	1219,56
21	21,79				7,41E+07	3,37	0,64		
22	23,17				7,58E+07	3,44	0,65		
23	29,29				1,43E+08	6,49	1,23		
24	29,94	cis-Muurola-4(15),5-diene	C ₁₃ H ₂₄	95,0	3,07E+08	13,97	2,66	1463	1463,21
25	31,43	Zonarene	C ₁₃ H ₂₄	93,7	1,58E+08	7,19	1,37	1527	1499,87
26	33,61				6,38E+07	2,90	0,55		
27	46,43				1,17E+08	5,34	1,01		
28	47,88	Sclareol	C ₂₀ H ₃₈ O	80,3	6,82E+08	30,97	5,89	2227	2139,09
29	48,56				1,66E+08	7,56	1,44		

% Total de compostos identificados:	88,58
-------------------------------------	-------

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/>

Óleo Essencial de *Ocimum basilicum*



LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS

Relatório analítico / Essential oil analysis report

1. IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA, CLIENTE / Client Identification

Nome/Name: CICS-UBI- Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Morada/ Address: Avenida Infante D. Henrique

6200-506 Covilhã

Telefone/ Phone: 275 329 002/3

NIF/VAT: 502 083 514

E-mail: cics@fcsaude.ubi.pt

2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant identification

Nome científico / Scientific name: *Ocimum basilicum*

Nome vulgar / Common name: Manjeriço

Mês e ano de colheita / Harvest month, year: Agosto, 2018

Parte da planta utilizada / Plant part:

Local da colheita, País / Place, Country:

Origem da planta / Origin of the plant:

Modo biológico/Organic farming:

Cultivada/Cultivated:

Espontânea/Wild harvest:

3. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA / Sample identification

Código da amostra / Sample code: OE4-2022

Método de extração / Extraction procedure:

Tempo de extração / Extraction time:

Data da amostra / Sample date:

Rendimento de extração (% v/pf ou v/ps) / Yield (% v/fw or v/dw):

Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: *Ocimum basilicum*

Título: FMQ – Relatório Analítico – Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GGQ Edição/Revisão: 1/0
Referências: FMQ – Receção de Amostras; Ficha de Análises CBPBI

Página 1 de 4



LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS

Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA

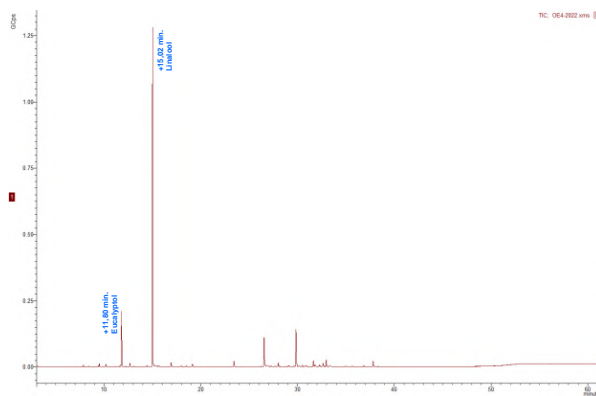
A amostra do óleo essencial foi previamente diluída com um solvente orgânico (n-Pentane, VWR, Lote: 18Z0366) e injetada no GC-MS (1 µL), no qual se utilizou um split de 1:80. A temperatura inicial do forno foi programada para 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C, finalmente aumenta até 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.

Identificação dos compostos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). 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.

Equipamento: BRUKER SCION 456-GC-MS com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS.

Cromatograma da amostra de óleo essencial/ Chromatogram of essential oil sample:



Título: FMQ – Relatório Analítico – Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GGQ Edição/Revisão: 1/0
Referências: FMQ – Receção de Amostras; Ficha de Análises CBPBI

Página 2 de 4



LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS

Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica/ Chromatographic analysis:

T.R.	Área	%		Nome do composto	Fórmula Mol.	Grau de Conf.	
		Composto maioritário	% Composto				
1	7,86	1,52E+07	0,32	0,22	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	91,5
2	9,41	6,93E+06	0,15	0,10	Thujene	C ₁₀ H ₁₆	92,6
3	9,51	2,91E+07	0,61	0,41	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	94,1
4	10,18	2,48E+07	0,52	0,35	β-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	93,4
5	11,73	5,44E+06	0,11	0,08	D-Limonene	C ₁₀ H ₁₆	94,0
6	11,80	6,56E+08	13,81	9,33	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₆ O	96,4
7	12,67	4,29E+07	0,90	0,61	β-Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	94,8
8	14,42	9,84E+06	0,21	0,14	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	91,7
9	15,02	4,76E+09	100,00	67,57	Linalool	C ₁₀ H ₁₆ O	94,4
10	18,42	5,65E+07	1,19	0,80	Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	95,4
11	18,93	6,04E+06	0,13	0,09	Borneol	C ₁₀ H ₁₆ O	90,7
12	18,50	8,78E+06	0,18	0,12			
13	19,12	4,07E+07	0,86	0,58	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₆ O	91,6
14	23,43	7,46E+07	1,57	1,06	Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	94,2
15	26,54	4,28E+08	9,01	6,09	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	96,7
16	28,01	4,31E+07	0,91	0,61	β-Elementene	C ₁₀ H ₁₆	92,3
17	29,09	1,04E+07	0,22	0,15	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	89,6
18	29,83	4,65E+08	9,78	6,61	α-Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	95,5
19	29,90	5,33E+06	0,11	0,08	α-Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	92,6
20	30,49	1,75E+07	0,37	0,25	Humulene	C ₁₅ H ₂₄	91,4
21	30,89	8,32E+06	0,17	0,12	cis-Muurolo-4(15),5-diene	C ₁₅ H ₂₄	90,7
22	31,63	8,31E+07	1,75	1,18	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	94,2
23	31,81	2,30E+07	0,48	0,33			
24	32,26	1,33E+07	0,28	0,19	Bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	90,3
25	32,65	2,83E+07	0,60	0,40	δ-Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	91,8
26	32,97	8,97E+07	1,89	1,27	γ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	96,3
27	37,81	8,93E+07	1,88	1,27	t-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	91,4
		99,55		% de compostos identificados			

Título: FMQ – Relatório Analítico – Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GGQ Edição/Revisão: 1/0
Referências: FMQ – Receção de Amostras; Ficha de Análises CBPBI

Página 3 de 4


Anexo III – Proposta de protocolo para o processo de implementação do teste de mutação reversa bacteriana

Após o processo de implementação e subsequente validação do teste de mutação reversa bacteriana no nosso laboratório, acadêmico e não-proficiente, procedeu-se ao desenvolvimento de uma proposta de protocolo para este ensaio *in vitro*, utilizando as cinco estirpes bacterianas recomendadas pela OCDE (62). Contudo, a implementação e validação foi apenas realizada nas estirpes de *S. typhimurium* TA98 e TA100.

Durante a componente experimental deste trabalho, em específico do teste de Ames, seguimos a diretriz publicada pela OCDE (62), como documento orientador para o processo de implementação. No entanto, quando começamos a implementar o protocolo, usando a diretriz da OCDE como linha de base para as informações, advieram várias incertezas nos diferentes passos do ensaio, porque o documento não segue um modelo de protocolo passo a passo detalhado. Posto isto, isso deixou-nos com a necessidade de consultar literatura adicional para informações mais detalhadas (60,62,64). Ainda assim, vários detalhes metodológicos específicos estavam em falta ou dispersos em diversas literaturas. Por fim, constatamos que grande parte dessas especificidades está agora divulgada na série de documentos gerados a partir do 7º Workshop Internacional sobre testes de genotoxicidade, os quais abordam e discutem a necessidade de atualização da diretriz da OCDE, garantindo assim a correta implementação e desempenho do teste.

Tendo em conta essas falhas, acreditamos que seria necessário um documento integrativo ou uma diretriz da OCDE atualizada, elaborada como um modelo passo a passo, incluindo todas as informações acrescidas geradas por especialistas que trabalharam nos documentos referenciados acima. Este novo documento integrativo será uma ferramenta extremamente vantajosa para a implementação do método em laboratórios de pesquisa novos ou inexperientes. A elaboração de um protocolo detalhado também garantirá a uniformidade entre os laboratórios e, conseqüentemente, entre as publicações científicas, aumentando a qualidade dos dados publicados. Utilizando a própria experiência como estudo de caso para a implementação do teste Ames no nosso laboratório, desenvolvemos um documento preliminar, composto por todas as etapas que foram implementadas e validadas até ao momento. O seguinte protocolo resultou da compilação de informação dispersa por diferentes literaturas de referência, divulgando em cada ponto, a origem de onde a informação foi recolhida. Também incluímos uma seção

detalhada sobre a análise dos resultados e os critérios que devem ser aplicados para interpretar os resultados obtidos, pois esses pontos específicos não foram abordados em detalhe na diretriz da OCDE (62) e no Protocolo DB ALM n° 30 (60).



**Report of the Ames test
implementation at an academic
research laboratory**

Margarida Maria, Ana Sofia Oliveira, Carlos Gaspar,
Joana Rolo, Ana Palmeira-de-Oliveira

July 2022

University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Index

1. Introductory note.....	3
2. General considerations	5
3. Method principle	6
4. Equipment and material needed to carry out the test	8
4.1. Equipment.....	8
4.2. Reagents	9
5. Experiment preparation	10
5.1. Preparation of solutions	10
6. Bacterial strains	17
6.1. Storage and maintenance of bacterial strains	17
6.2. Confirmation of genotype of the test bacterial strains	19
6.3. Thawing the bacterial strains	25
6.4. Microbial growth curves	26
7. Test execution	27
7.1. Positive controls	27
7.2. Negative (or solvent) controls	28
7.3. Re-isolation of strains	30
7.4. Controls' verification test	30
7.5. Toxicity verification of test substances	34
7.6. Pre-incubation method without metabolic activation	36
7.7. Pre-incubation method with metabolic activation	37
8. Interpretation of results	38
9. Definitions	42
10. References	43
11. Annexes	44
A. Confirmation of the genotype of the strains	44
B. Pre-incubation method, without or with metabolic activation	48

Page 2 of 48

1. Introductory note

The present document refers to a protocol proposal for the bacterial reverse mutation test (Ames) to assess the mutagenic potential of different substances. This protocol resulted from the implementation process and validation of the Ames test, in a non-proficient academic lab, as a part of a master's dissertation and a PhD thesis performed at Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior (Portugal).

As the Ames test is still one of the most applied methods to evaluate the mutagenic potential of chemicals for different applications, its correct use and application presents as a valued tool in research labs that perform translational research.

During our work, we followed the published OCDE guideline (OECD, 2020), as a guiding document for the implementation process. However, as we started to implement the protocol, using the OCDE guideline as the baseline for information, we were left with several uncertainties at different points of the experiment, as the document does not follow a detailed step by step protocol template. This has left us with the need to consult additional literature for more detailed information (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000; Mutagenicity, 2008). Still, several specific methodological details were missing or scattered across different literature. We finally found that most of these specificities are now disclosed in the series of documents generated from the 7th International Workshop on genotoxicity testing, which address and discuss the need for an actualization of the OCDE guideline, thus ensuring the correct implementation and performance of the test.

We believe that an integrative document or an updated OECD guideline, elaborated as a point-by-point template, including all the additions generated by experts that worked on the abovementioned documents, is of need. This new integrative document will be an extremely advantageous tool for the implementation of the method in new or unexperienced research labs. The elaboration of a detailed protocol will also ensure uniformity among laboratories and consequently, the amount generated by scientific publications, overall increasing the quality of generated data.

Using our own experience as a case study for the implementation of the Ames test in a non-proficient academic lab, we generated a preliminary document, composed of all the steps that were implemented and validated so far in our lab. The present protocol resulted from the compilation of information that was scattered across different reference literature, disclosing at each point, the origin from which the information was collected. We also included a detailed section about the analysis of results, and criteria that should be applied to interpret the obtained results, as these specific points were not addressed in detail in the OECD guideline and DB-ALM Protocol n° 30.

Page 3 of 48

We hope that this document, consisting of a preliminary protocol, can contribute to the creation of a uniformed document, to be implemented in different labs, thus allowing the standardization of one of the most applied methods to address the mutagenicity of a test substance.

2. General considerations

The bacterial reverse mutation test, commonly known as the Ames test, uses strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, dependent on certain amino acids, to detect point mutations (substitution, addition or deletion) of one or more base pairs of DNA. Through the use of these prokaryotic organisms, this test allows to detect mutations capable of reversing pre-existing mutations in the strains used in the assay, restoring the functional capacity of the bacterium to synthesize its essential amino acid. Bacteria with the reverse mutation are detected by their ability to grow in the absence of the amino acid essential for the multiplication process of the respective wild-type strain.

The Ames test is commonly used to screen the genotoxic activity of compounds, in particular the point mutation-inducing activity (mutagenicity). Previous studies have shown that many of the compounds that are positive in the Ames test also show mutagenic activity in similar assays. However, there are mutagens that are not detected by this test, and these failures can be attributed to:

1. specific nature of the detected genetic endpoint
2. differences in metabolic activation
3. differences in bioavailability.

On the other hand, factors that enhance the sensitivity of the test can lead to an overestimation of the mutagenic activity. Furthermore, this test may not be suitable for the analysis of certain classes of chemicals, such as highly bactericidal compounds (antibiotics) and those that are thought or known to specifically interfere with the cell replication system in mammals (topoisomerase inhibitors or nucleotide analogues). In these cases, *in vitro* mammalian gene mutation testing may be the most appropriate test.

Although many of the positive responses obtained for specific compounds using the Ames test are also carcinogenic in mammals, the correlation is not absolute. Carcinogens may not be detected, because they act through other mechanisms or mechanisms that are not implicit in bacterial cells.

3. Method principle

Bacterial cell suspensions are exposed to the test substance, in the presence and absence of an exogenous metabolic activation system. In either of the possible methods (plate incorporation and preincubation), these suspensions are mixed with top agar and plated on a glucose minimal agar medium. After 48-72 hours of incubation, the reverting colonies are counted and compared to the number of spontaneous reverting colonies present on the control plates.

Histidine-dependent strains of *Salmonella typhimurium* and tryptophan-dependent *Escherichia coli* strains are used to test the mutagenicity of substances. Each strain contains a different type of mutation in its essential amino acid metabolism operon, namely histidine in *S. typhimurium* and tryptophan in *E. coli* strains (Table 1). In addition, they also include other mutations that increase their ability to detect mutagens. One of these mutations (*rfa*), present only in *S. typhimurium*, leads to the partial loss of the lipopolysaccharide barrier that surrounds the bacterium, increasing its permeability to larger molecules (such as crystal violet). Another type of mutation (*uvrB* in *S. typhimurium* and *uvrA* in *E. coli*) consists of the deletion of a gene that encodes the DNA excision repair system, increasing its sensitivity in the process of detecting mutagens. However, the *uvrB* mutation extends through the *bio* gene and, consequently, these bacteria also need biotin to multiply. *S. typhimurium* strains TA98, TA100 and *E. coli* strain contain the R-factor plasmid (pKM101), which mutate with certain mutagens that are more difficult to detect by strains that do not have this plasmid. In both *E. coli* and *S. typhimurium*, the pKM101 plasmid enhances spontaneous and chemical mutagenesis, improving the error-prone DNA repair system that is normally present in these organisms.

At least five strains of bacteria, belonging to the set of strains recommended by the OECD, must be used in this assay:

- a. *S. typhimurium* TA98;
- b. *S. typhimurium* TA100;
- c. *S. typhimurium* TA1535;
- d. *S. typhimurium* TA1537;
- e. *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101).

The first four strains mentioned above (items a. to d.) have GC base pairs at the primary reversal site, not being able to detect hydrazines and oxidizing mutagens. These substances can be detected by the strain mentioned in the last paragraph (point e.), which has AT base pairs at the primary reversal site. For the detection of crosslinking agents, it is necessary to include an additional strain that is proficient in DNA repair, for example, *S. typhimurium* TA102 or *E. coli* WP2 (pKM101), as suggested in the OECD 471 guideline.

Table 1 - Types of mutation in the bacterial strains to be used in the assay.

Histidine metabolism operon (<i>S. typhimurium</i>)					LPS	DNA Repair	R-factor (pKM101)
<i>hisC3076</i>	<i>hisD6610</i>	<i>hisD3052</i>	<i>hisG46</i>	<i>hisG428</i>			
		TA98			<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+
			TA100		<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+
TA1537			TA1535		<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	-
Tryptophan metabolism operon (<i>E. coli</i>)							
<i>trpE65</i>							
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)					WT	Δ <i>uvrA</i>	+

Legend: (WT) wild-type; (*rfa*) has a mutation for partial loss of the lipopolysaccharide barrier; (Δ *uvrB*) deletion of the gene encoding the DNA repair system; (*r/-*) with or without plasmid pKM101/pAQ1, respectively.

Despite the recommended number of bacterial strains to be used, that are disclosed in the OECD TG471 guideline, a significant disagreement among the scientific community has already been reported regarding the necessity and obligation of this high number of strains to perform the Ames test. (Williams et al., 2019), by analyzing the performance of certain bacterial strains, concluded that *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 are, in general, sufficient to detect most mutagenic compounds (93%). Furthermore, by carrying out a subsequent *in vitro* assay to evaluate another genetic endpoint (as chromosomal aberrations), it is possible to achieve a detection percentage comparable to that obtained when using the 5 strains in the Ames test (99%).

4. Equipment and material needed to carry out the test

During the experiment, the following equipment and reagents may be required:

A. Equipment

- 96-well plates
- Aluminium foil
- Analytical balance
- Autoclave
- Automatic pipettor
- Centrifuge
- Cryotubes
- Digital colony counter
- Eppendorfs
- Erlenmeyer flasks (100 mL)
- Falcon tubes (15 and 50 mL)
- Heating plate
- Incubator
- Inoculating loops
- Laminar Flow Hood
- Magnetic stirrer
- Micropipettes (P20, P200, P1000 and multichannel)
- Orbital shaker
- Pasteur pipette
- PCR tubes
- Petri dishes
- pH meter
- Precision balance
- Schott flasks
- Serological or graduated pipettes (5, 10 and 25 mL)
- Stereo microscope
- Syringes and respective filters (0.2 μ m)
- Thermostated bath
- UV-Vis spectrophotometer
- Vortex

B. Reagents

- 2-aminoanthracene (CAS: 613-13-8)
- 2-nitrofluorene (CAS: 607-57-8)
- 9-aminoacridine (CAS: 90-45-9)
- Agar bacteriologique type E
- Ampicillin trihydrate (CAS: 7177-48-2)
- Buffered peptone water
- Citric acid 1-hydrate (CAS: 5949-29-1)
- Crystal violet (CAS: 548-62-9)
- D (+)-biotin (CAS: 58-85-5)
- D-Glucose anhydrous (CAS: 50-99-7)
- Dibasic potassium phosphate (CAS: 7758-11-4)
- Dimethyl sulfoxide (CAS: 67-68-5)
- L (-)-Tryptophan (CAS: 73-22-3)
- L-Histidine (CAS: 71-00-1)
- Magnesium sulfate heptahydrate (CAS: 10034-99-8)
- Meat peptone
- Milli-Q water
- N-methyl- N-nitro-N-nitrosoguanidine [(MNNG), CAS: 70-25-7]
- Nutrient Agar DEV
- Sodium ammonium phosphate
- Sodium azide 5% (w/v) (CAS: 26628-22-8)
- Sodium chloride (CAS: 7647-14-5)
- Sodium hydroxide (CAS: 1310-73-2)
- Sodium phosphate dibasic anhydrous (CAS: 7558-79-4)
- Sodium phosphate monobasic (CAS: 7558-80-7)
- Brain Heart Infusion broth
- Glycerol
- D-glucose-6-phosphate (CAS: 56-73-5)
- Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP; CAS: 53-59-8)
- Magnesium chloride (CAS: 7786-30-3)
- Potassium chloride (CAS: 7447-40-7)
- S9 fraction of Sprague-Dawley rat liver
- Phosphate-buffered saline (PBS)

5. Experiment preparation

Before the experiment, the following solutions must be prepared according to all the details described below.

5.1 – PREPARATION OF SOLUTIONS

A. Vogel-Bonner E medium (50x) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

For 1000 mL of medium, add:

- 10 g magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 100 g citric acid 1-hydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 500 g dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4)
- 175 g sodium ammonium phosphate ($\text{Na}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 650 mL Milli-Q water

1. In the order indicated above, dissolve the salts in the volume of Milli-Q water, with the aid of heating and stirring.

NOTE: Allow one salt to completely dissolve before adding the next.

2. Adjust the volume to 1000 mL.
3. Autoclave for 15 minutes at 121°C.
4. Store at room temperature.

B. Glucose solution (25% w/v)

- 250 g dextrose (D-Glucose anhydrous)
- 700 mL Milli-Q water

1. Dissolve the glucose in water, using a magnetic stirrer and a hot plate.
2. Add water to make up a volume of 1000 mL.
3. Sterilize the solution by vacuum filtration with a 0.2 µm membrane.
4. Store the filtered solution at 5 ± 3°C.

C. Minimal glucose agar plates (GM) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- 15 g agar
- 900 mL Milli-Q water
- 20 mL Vogel-Bonner E medium (50 x) (autoclaved)

Page 10 of 48

- 20 mL glucose solution (25% w/v) (filtered)

NOTE: Regardless of the concentration of glucose solution used, it must be at a final concentration of 0.5% (v/v) in the GM agar solution.

1. Add the agar to the volume of Milli-Q water in a 1000 mL Schott flask and autoclave for 15 minutes at 121°C.
2. After the above solution and the Vogel-Bonner E medium (50x) reach a temperature of approximately 65°C, pipette autoclaved solution into the sterile medium and homogenize. Subsequently, pipette the sterile glucose solution into the mixture and homogenize completely.
3. Dispense about 25 mL into Petri dishes.
4. After solidifying, store at 5 ± 3°C.

NOTE: Bear in mind that the plates must be at room temperature before being used and must not have excess water, must preferably be completely dry.

D. Sodium Phosphate Buffer (0.1 mM, pH 7.4) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- Reagent A: 0.1 M monobasic sodium phosphate solution
 - I. 13.8 g sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - II. 1000 mL Milli-Q water
- Reagent B: 0.1 M dibasic sodium phosphate solution
 - I. 14.2 g sodium phosphate dibasic anhydrous ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - II. 1000 mL Milli-Q water

1. Prepare both solutions described and homogenize.
2. Vigorously mix 120 mL of reagent A with 880 mL of reagent B.
3. Adjust the pH of the mixture to 7.4.
4. Autoclave for 15 minutes at 121°C.
5. Store at room temperature.

E. Biotin solution (0.01% w/v) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- 0.01 g D(+)-biotin
- 100 mL Milli-Q water

1. Dissolve the biotin in Milli-Q water, with stirring and heating.
2. Sterilize by filtration, using a syringe, with a 0.2 µm membrane.
3. Store the solution at 4°C.

Page 11 of 48

F. Histidine solution (0.5% w/v) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- 0.5 g L-histidine
- 100 mL Milli-Q water

1. Dissolve the L-histidine in Milli-Q water, by stirring.
2. Autoclave for 15 minutes at 121°C.
3. Store the solution at 4°C.

G. Tryptophan solution (0.25 mM)

- 0.051 g L(-)-tryptophan
- 1000 mL Milli-Q water

1. Dissolve the tryptophan in Milli-Q water, by stirring.
2. Sterilize the solution by filtration, using a 0.2 µm membrane.
3. Store the filtered solution at -20°C.

H. NaOH solution (0.02 M)

- 0.16 g sodium hydroxide (NaOH)
- 200 mL Milli-Q water

1. Slowly dissolve the sodium hydroxide in Milli-Q water, by stirring.
2. Store at room temperature.

I. Ampicillin solution (0.8% w/v) (Maron & Ames, 1983)

- 0.8 g ampicillin trihydrate
- 100 mL NaOH solution (0.02 M)

1. Dissolve the ampicillin in the NaOH solution (0.02 M) by stirring.
2. Sterilize by filtration, using a syringe, with a 0.2 µm membrane filter.
3. Store the solution at -20°C.

I. Enriched GM agar plates for genotype confirmation assay (Mortelmans & Zeiger, 2000)

Before preparing the plates, it is necessary to prepare the GM agar medium and subsequently add the following compounds as needed. Therefore, for the prepared volume of GM agar (point C), you will need to:

Page 12 of 48

- For **Biotin plates**: Add 8 mL of sterile biotin solution (0.01% w/v), mix well and pour about 25 mL into sterile Petri dishes.
- For **Histidine plates**: Add 8 mL of sterile histidine solution (0.5% w/v), mix well and pour about 25 mL into sterile Petri dishes.
- For **Biotin/Histidine plates**: Add 8 mL of sterile biotin solution (0.01% w/v) and 8 mL of sterile histidine solution (0.5% w/v), mix well and pour approx. 25 mL in sterile Petri dishes.
- For **Biotin/Histidine/Ampicillin plates**: Add 8 mL of the biotin solution (0.01% w/v), 8 mL of the histidine solution (0.5% w/v) and 3 mL of the ampicillin solution (0.8% w/v), mix well and pour about 25 mL into sterile Petri dishes.
- For **Tryptophan plates**: Add 8 mL of sterile tryptophan solution (0.25 mM), mix well and pour about 25 mL into sterile Petri dishes.
- For **Tryptophan/Ampicillin plates**: Add 8 mL of tryptophan solution (0.25 mM) and 3 mL of ampicillin solution (0.8% w/v). Mix well and pour about 25 mL into sterile Petri dishes.

NOTE: The volume of the tryptophan solution used in the preparation of the respective plates was adopted based on the volumes of the solutions for the biotin/histidine plates, described in the literature. **However, it has not yet been experimentally validated in our lab.**

All enriched GM agar plates should be identified and stored at $5 \pm 3^\circ\text{C}$ until further use.

NOTE: Before use, the plates must be at room temperature and preferably completely dry.

J. Crystal violet solution (0.1% w/v) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- 0.1 g crystal violet
- 100 mL Milli-Q water

1. Dissolve the crystal violet in Milli-Q water and mix well.
2. Store at room temperature, in the absence of light.

K. Oxoid nutrient broth No.2 medium

- 8.6 g buffered peptone water
- 4.3 g meat peptone
- 4.25 g sodium chloride
- 1000 mL Milli-Q water

1. Dissolve all components in Milli-Q water, using agitation.
2. Adjust the pH of the mixture to 7.5.
3. Autoclave for 15 minutes at 121°C .

Page 13 of 48

4. Filter with a vacuum system, in order to minimize the risk of contamination.
5. Store the solution at 4°C .

L. Brain Heart Infusion (BHI) – Glycerol Medium:

- 80 mL BHI medium
- 20 mL glycerol

1. Prepare the volume of BHI medium according to the manufacturer's instructions.
2. Add the glycerol to the medium and homogenize.
3. Autoclave for 15 minutes at 121°C .
4. Store the solution at 4°C .

M. Biotin/histidine solution (0.5 mM) (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- 0.124 g D(+)-biotin
- 0.096 g L-histidine
- 1000 mL Milli-Q water

1. Dissolve the biotin and histidine by stirring in Milli-Q water.
2. Sterilize the solution by filtration, using a vacuum system.
3. Store the solution at 4°C .

N. Top Agar medium supplemented with biotin/histidine (5 mM) or tryptophan (Mortelmans & Zeiger, 2000)

- 6 g agar
- 6 g sodium chloride
- 900 mL Milli-Q water
- 100 mL of biotin/histidine solution (0.5 mM) or tryptophan solution (0.25 mM)

1. Dissolve the agar and NaCl in Milli-Q water.
2. Autoclave for 15 minutes at 121°C and store at room temperature.
3. On the day of the test, first melt the medium in the microwave, or in a boiling water bath.
4. After melting, supplement the medium with the biotin/histidine (or tryptophan) solution and mix vigorously.
5. Keep the medium in a water bath, at a temperature of approximately 50°C , until it is used in the assay.

Page 14 of 48

O. Nutrient Agar (DEV) Plates: Prepare according to the manufacturer's instructions.

P. Controls of standard mutagenic compounds to be used in the test without metabolic activation (stock concentration of 1 mg/mL)

- 0.01 g standard mutagenic compound
- 10 mL appropriate solvent (**Milli-Q water**: sodium azide; **DMSO**: 9-aminoacridine, 2-nitrofluorene and MNNG)

1. Homogenize well and store at room temperature in a sealed box, away from the light.

Q. Controls of standard mutagenic compounds to be used in the test with metabolic activation (0.1 mg/mL)

- 0.001 g standard mutagenic compound (2-aminoanthracene)
- 10 mL DMSO

1. Homogenize well and store at room temperature in a sealed box.

NOTE: The preparation of this standard mutagen control solution has not been experimentally validated in our lab.

R. Phosphate-buffered saline (PBS 1X)

- 1.37 M sodium chloride
- 0.027 M of potassium chloride
- 0.1 M dibasic sodium phosphate
- 0.02 M monobasic potassium phosphate

1. Prepare the solution 10 times more concentrated, by completely dissolving the mentioned compounds in Milli-Q water.
2. Dilute 100 mL of the previously prepared solution (point R.1.) in 900 mL Milli-Q water.
3. Autoclave for 15 minutes at 121°C .
4. Store at room temperature.

Page 15 of 48

- S. **S9 Activation Mix** (1.6 g/L D-glucose-6-phosphate; 3.5 g/L NADP; 1.8 g/L magnesium chloride; 2.7 g/L potassium chloride; 12.8 g/L dibasic sodium phosphate; 2.8 g/L monobasic sodium phosphate; 10% S9 fraction of Sprague-Dawley rat liver) (Gatehouse, 2012)
- 0.036 g of D-glucose-6-phosphate
 - 0.078 g of NADP
 - 0.04 g of magnesium chloride
 - 0.06 g of potassium chloride
 - 0.284 g of dibasic sodium phosphate
 - 0.062 g of monobasic sodium phosphate
 - 20 mL Milli-Q water
1. Dissolve the mentioned compounds in Milli-Q water and mix vigorously.
 2. Filter aseptically with a 0.2 µm membrane filter.
 3. Aliquot 9 mL of the filtered mixture into a sterile 15 mL falcon tube.
 4. Store at 4°C until testing.
 5. Immediately before the assay, or previously (maximum 1 hour before), supplement the 9 mL previously aliquoted with 1 mL of rat liver S9 fraction.
- NOTE:** The S9 fraction must be aliquoted and stored at -20°C.
6. Keep the mixture at 4°C, or on ice, until it is used in the test.
- NOTE:** The preparation presented for the S9 activation mix is described in the literature, however it was not experimentally validated by our work group.

6. Bacterial strains

This Ames test protocol was performed and validated with the following two bacterial strains obtained commercially from the Czech Culture Collection (CCM):

- *Salmonella typhimurium* TA98 (CCM 3811);
- *Salmonella typhimurium* TA100 (CCM 3812);

6.1. Storage and maintenance of bacterial strains

FREEZING

The cryovials containing the collection strain in suspension are stored at -80°C. For its preparation, the strain must be thawed and then subcultured in a solid medium, according to the manufacturer's instructions. From the culture present in the respective plate, several cryovials are prepared for the subsequent creation of a laboratory cell bank, which can be defined as "mother cultures".

Preparation of Strains' Master Stock and Working Stock

In addition to the previously prepared mother culture, it is also convenient to have frozen Master stocks of each strain, prepared from the overnight bacterial inoculum. In addition, working stock cultures must also be prepared, frozen in single-use cryotubes, which will be used later for inoculation of bacterial cultures for subsequent assays.

Procedure:

1. Thaw the cryovial from the mother culture at room temperature.
2. Take a certain volume of the thawed cryovial, which corresponds to the calibration volume of the sterile loop used, and spread it on a plate of GM agar supplemented (biotin/histidine/ampicillin for TA98 and TA100, biotin/histidine for TA1535 and TA1537 and tryptophan/ampicillin for *E. coli*), to obtain a pure and isolated colony.
3. Incubate for 48 hours at 37 ± 1°C.
4. Inoculate an isolated colony into 20 mL of Oxoid nutrient broth No.2 medium in a previously autoclaved 100 mL Erlenmeyer flask.
5. Place the prepared cultures on the orbital shaker for 9-10 hours at 120-150 rpm (ideally 120) and 37 ± 1°C.

NOTE: To perform the assays, it is important that the bacterial strains are at the beginning of the stationary phase, so monitoring is advised, by reading the optical densities throughout the growth curve. This will allow to establish a microbial growth curve for each strain. In addition, simultaneously to the reading of the optical densities, the number of CFU/mL should be counted, in order to confirm

if the frozen cultures will present the number of CFU/mL necessary to proceed with the test (point 6.4.). CFU count can be performed by drop dilution method in order to minimize the workload.

6. In a sterile falcon tube (15 mL), pipette 9 mL of the bacterial suspension obtained and 1 mL of the cryopreserving agent DMSO. This reagent must be sterile and can be preliminary autoclaved.
7. In previously autoclaved cryovials (2 mL), pipette 1 mL of the previously prepared mixture (Master stocks type 1). Simultaneously, from this same mixture, pipette 100 µL into autoclaved PCR tubes (Working stocks). Between each addition, shake the falcon tube vigorously with the mixture.
8. Identify the vials with details about the freezing process (strain, date, growth conditions, freezing medium).
9. Immediately freeze the different vials of cultures at -80°C to minimize possible DMSO toxicity.
10. Add the remaining volume of the bacterial suspension to a sterile falcon tube (15 mL).
11. Centrifuge the mixture at 1000 rpm for 20 minutes.
12. Discard the supernatant and resuspend the pellet in BHI-glycerol liquid culture medium. The volume of the medium used normally corresponds to the number of cryovials to be prepared.
13. Divide the mixture into cryovials (2 mL), previously autoclaved, in a pipetted volume of 1 mL (Master stocks type 2).
14. Identify the cryovials and freeze at -80°C.

Simultaneously with this freezing process, confirmation of the genotype must be carried out, as explained in the following point (point 6.2.). Additionally, the optical density (OD) and the number of CFU/mL present in the bacterial suspension to be frozen, should be determined. If the number of CFU/mL of the frozen cultures is not the intended (>10⁹) and/or the phenotypic characteristics are not met, the cryovials previously prepared must be discarded. On the other hand, if the above parameters are met, it is recommended to carry out the thawing process of one aliquot of each strain (point 6.3.), in order to confirm the characteristics of its growth in a solid medium (purity). The phenotypic and growth characteristics of Master stock cultures should be checked periodically every year to produce new working stock cultures. As for working stock cultures, they are for a single-use per test, so any unused volume should be discarded immediately.

6.2. Confirmation of the genotype of the test bacterial strains

The genotype of the strains must be confirmed when:

- the strains are received;
- a new set of frozen bacteria is prepared;
- the number of spontaneous reverse mutation colonies is outside the normal limits stipulated by the laboratory (control historical data);
- there is a loss of sensitivity to standard mutagens (positive controls).

Two types of cultures can be used to carry out genotype confirmation tests:

- from the thawed culture, namely at the time of reception of the strains or when a new set of stock cultures is prepared (type 1);
- from the inoculum of the bacterial strain (type 2), proceeding in the same way to the freezing process. To do this, a single colony is selected and re-suspended in 20 mL of Oxoid nutrient broth N°2 medium and subsequently incubated at 37°C and 120 rpm, on the orbital shaker.

Confirmation of the genotype of the strains aims to prove the dependence of amino acids and the presence of other mutations responsible for increasing the ability to detect mutagenic compounds.

This study includes five mandatory steps for all *S. typhimurium* strains:

- biotin dependence;
- histidine dependence;
- biotin/histidine dependence;
- presence of *rfa* mutation;
- presence of *uvrB* mutation.

An additional step must be followed for strains carrying the plasmid (such as TA98 and TA100), where resistance to ampicillin (pKM101) is assessed.

In the case of the *E. coli* strain, its genotype must be confirmed by checking:

- tryptophan dependence;
- presence of the *uvrA* mutation;
- ampicillin resistance.

NOTE: The following procedures describe the performance of the genotype confirmation assay, starting from the type 2 cultures. In the case of the type 1 culture, a certain volume of the thawed cryovial must be removed, using a sterile loop, and spread on the respective plates.

• Biotin dependence

The mutation of the *uvrB* gene, present in all strains of *S. typhimurium*, irreversibly extends through the *bio* gene and, consequently, bacteria also require biotin for their multiplication process (EURL ECVAM DB-ALM, 2015; Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000). That said, the absence of growth in this type of selective plates demonstrates the biotin dependence of the strains.

Procedure:

- Pipette 100 µL of the bacterial strain inoculum onto a GM agar plate supplemented with histidine (0.5% w/v) and run a single sweep across it, using an inoculating loop.
- Incubate the plates for 48 hours at 37 ± 1°C.

No growth should occur.

However, although this step is recommended in some published protocols, it can be neglected since the mutation that excludes the *bio* gene cannot be reversed. The presence of the *uvrB* gene mutation can be used to confirm this dependence, since it is intrinsically correlated with the dependence of biotin.

• Histidine dependence

Each strain of *S. typhimurium* has a different type of mutation in the histidine metabolism operon, making them unable to synthesize its essential amino acid (EURL ECVAM DB-ALM, 2015). Thus, this his - characteristic of the strains is confirmed by demonstrating the dependence of histidine for their growth on selective agar plates.

Procedure:

- Pipette 100 µL of the bacterial strain inoculum onto a biotin-supplemented GM agar plate (0.01% w/v) and run a single sweep across it, using an inoculating loop.
- Incubate plates at 37 ± 1°C for 48 hours.

No growth should occur.

• Biotin/histidine dependence

Growth on plates supplemented with biotin and histidine demonstrates the dependence of these molecules on all strains of *S. typhimurium*.

Procedure:

- Pipette 100 µL of the bacterial strain inoculum onto a GM agar plate supplemented with biotin (0.01% w/v) and histidine (0.5% w/v) and run a single sweep across it, using an inoculating loop.
 - Incubate plates at 37 ± 1°C for 48 hours.
- Growth** should occur in all *S. typhimurium* strains.

• Tryptophan dependence

The *E. coli* strain has a mutation in the tryptophan metabolism operon (*trpE5*), which is responsible for its inability to synthesize its essential amino acid, making it dependent on tryptophan to multiply (EURL ECVAM DB-ALM, 2015). Thus, the comparison between the absence of growth on plates not supplemented with tryptophan and the growth on plates supplemented with this amino acid demonstrates the dependence of this amino acid in the *E. coli* strain.

Procedure:

- Pipette 100 µL of the bacterial strain inoculum onto a non-supplemented GM agar plate and make a single sweep across it, using an inoculating loop.
- Proceed in the same way as in sub-point 1, on a GM agar plate supplemented with tryptophan (0.25 mM).
- Incubate plates for 48 hours at 37 ± 1°C.

The **absence of growth** of the *E. coli* strain on ~~not-supplemented plates~~, simultaneously with the **growth** of the strain on ~~tryptophan-supplemented plates~~, confirms the amino acid dependence.

• Presence of *rfa* mutation

The *rfa* mutation, present only in *S. typhimurium* strains, promotes the partial loss of the lipopolysaccharide (LPS) layer that surrounds the bacterium, increasing the permeability to macromolecules (such as crystal violet), which normally cannot penetrate the membrane (EURL ECVAM DB-ALM, 2015; Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000). For this reason, strains with this type of mutation are sensitive to crystal violet, unable to multiply in its presence.

Procedure:

1. Pipette 100 µL of the bacterial strain inoculum onto a GM agar plate supplemented with biotin (0.01% w/v) and histidine (0.5% w/v), and inoculate its entire surface.
2. Make a well in the centre of the plate using a sterile Pasteur pipette, cut at the 1 mL mark under aseptic conditions.
3. Pour the crystal violet solution (0.1% w/v) into the well with a sterile Pasteur pipette.
4. Incubate at 37 ± 1°C for 48 hours.

After the incubation period, a **clear zone of microbial growth inhibition** should appear around the well, indicating the presence of the *rfa* mutation in all *S. typhimurium* strains.

• **Presence of *uvrA/uvrB* mutation**

The *uvr* mutation (type A in *E. coli* and B in *S. typhimurium* strains) consists of the deletion of a gene that encodes the DNA excision repair system, increasing its sensitivity in the detection of mutagenic compounds. Thus, the presence of this type of mutation can be confirmed by demonstrating greater sensitivity to ultraviolet light (EURL ECVAM DB-ALM, 2015; Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

Procedure:

1. Pipette 100 µL of the inoculum of *S. typhimurium* and *E. coli* strains onto a GM agar plate supplemented with biotin (0.01% w/v)/ histidine (0.5% w/v) and tryptophan, respectively.
2. Inoculate the entire surface of the plates.
3. In the laminar flow hood, uncover the plate and cover half of the plate with sterile aluminium foil.
4. Irradiate with UV light for 10 seconds and cover the plate again.
5. Incubate for 48 hours at 37 ± 1°C.

Strains with the *uvrA/uvrB* mutation should **only show growth in the plate area that has not been exposed to UV light**.

As mentioned earlier, the *uvrB* mutation irreversibly extends through the *bio* gene, which makes an assessment of biotin dependence unnecessary (Maron & Ames, 1983).

• **Presence of plasmid pKM101**

The presence of the pKM101 plasmid in certain strains triggers the reversal process with several mutagenic compounds, which are more difficult to be detected by strains that do not have this plasmid. In that sense, the plasmid enhances chemical and spontaneous mutagenesis by improving the error-prone DNA repair system. This molecule confers resistance to ampicillin, and the antibiotic is considered a convenient marker to detect the presence of the plasmid in bacteria (EURL ECVAM DB-ALM, 2015; Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

Procedure:

1. Pipette 100 µL of the inoculum of *S. typhimurium* and *E. coli* strains onto a GM agar plate supplemented with biotin/histidine/ampicillin and tryptophan/ampicillin, respectively. Strains that do not have this type of plasmid (such as TA1535 and TA1537) should be tested in the same way on GM agar plates supplemented with biotin/histidine/ampicillin, in order to verify the ampicillin activity.
2. Incubate plates at 37 ± 1°C for 48 hours.

There should be **growth on the plate inoculated with the strains that have the pKM101 plasmid** and there should be **no growth on the control plates** (strains without plasmid).

Table 2 – Summary of expected results in the genotype confirmation assay of the different bacterial strains.

Bacterial strain	Phenotypic characteristic to be evaluated	Expected Outcome
All strains of <i>Salmonella typhimurium</i>	Biotin dependence	• Absence of microbial growth (not mandatory)
	Histidine dependence	• Absence of microbial growth
	Biotin and histidine dependence	• Occurrence of microbial growth
	Presence of <i>rfa</i> mutation	• Clear absence of microbial growth around the well
	Presence of <i>uvrB</i> mutation	• Occurrence of growth only in the area of the plaque that has not been exposed to ultraviolet light
Strain of <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> pKM101	Presence of plasmid pKM101	• Occurrence of growth on the plates with the strains that have the pKM101 plasmid (TA98 and TA100) • No growth in control plates (with plasmid-free strains)
	Tryptophan dependence	• No growth of the strain on the control plates (not supplemented) • Presence of microbial growth on tryptophan-supplemented plates
	Presence of <i>uvrA</i> mutation	• Occurrence of growth only in the area of the plaque that has not been exposed to ultraviolet light
	Presence of plasmid pKM101	• Occurrence of microbial growth on the plate

6.3. Thawing the bacterial strains (Levy et al., 2019a; Mortelmans et al., 2000)

As mentioned in point 6.1., in order to confirm the growth conditions of previously frozen bacterial cultures, proceed as follows:

Procedure:

1. Thaw one cryovial of each type of Master stock cultures (Oxoid medium + DMSO and BHI + glycerol medium) at room temperature.
2. Dip a sterile loop into the bacterial culture and streak across a plate of GM agar supplemented with biotin/histidine/ampicillin (TA98 and TA100), biotin/histidine (TA1535 and TA1537) or tryptophan/ampicillin (*E. coli*).
Simultaneously, proceed in the same way on a plate of Nutrient agar medium for both cultures of all bacterial strains, for the purpose of comparison.
3. Incubate plates at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24-48 hours.
NOTE: Strains on Nutrient agar plates need only 24 hours of incubation to show significant growth. However, at least 48 hours of incubation is required to achieve good growth on GM agar plates.
4. Check the purity, morphology and growth of bacterial cultures on both plates.

If the bacterial cultures have the desired growth and purity conditions, before each assay, the following process must be carried out by thawing a working stock of the strain.

Procedure:

1. Thaw a vial of the strain's working stock at room temperature.
2. Dip a sterile loop into the bacterial culture and streak across a plate of GM agar supplemented with biotin/histidine/ampicillin (TA98 and TA100), biotin/histidine (TA1535 and TA1537) or tryptophan/ampicillin (*E. coli*).
3. Incubate plates at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 hours.

6.4. Microbial growth curves (Levy et al., 2019a; Maron & Ames, 1983)

Microbial growth curves for each strain should be performed in order to monitor the ability of the cultures to reach the beginning of the stationary phase and determine the respective period of time required. This procedure must be carried out whenever new Master stocks and working stocks are prepared, in order to control the behaviour of the strains. For this, the growth must be followed by periodic readings, at 1-hour intervals, of the optical density (OD) and, simultaneously, through the process of dilution and subsequent plating, in order to obtain a correlation of the OD with the number of CFU.

According to (Maron & Ames, 1983), the growth period should not exceed 16 hours. That said, a growth curve must be performed until this maximum time, in order to verify the moment of the curve in which the cultures are at the beginning of the stationary phase and, concomitantly, reach a OD_{600} of at least 1×10^9 CFU/mL (ideally between $1 \cdot 2 \times 10^9$ CFU/mL).

Procedure:

1. After the incubation period of the plates with the culture from the working stock (point 6.3), inoculate an isolated colony in 20 mL of Oxoid nutrient broth No.2 medium, in a 100 mL Erlenmeyer flask previously autoclaved.
2. Place the prepared inoculum on the orbital shaker at 120 rpm and $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
3. Measure the optical density of the cultures at 600 nm at approximately hourly intervals.
4. In each period, simultaneously with the previous step, proceed with the drop dilution method.
 - 4.1. In a 96-well plate, in triplicate ($n = 3$ wells), pipette 20 μL of the bacterial inoculum.
 - 4.2. Add 180 μL of PBS to the previous wells and resuspend the mixture.
 - 4.3. Pipette 20 μL of each prepared suspension and transfer to the next column ($n = 3$ wells) using a multichannel pipette.
 - 4.4. Add 180 μL of PBS to the previous wells and resuspend the mixture, which will correspond to the 10^2 dilution. Proceed like this successively until the 10^6 dilution, where the 20 μL of the mixture must also be discarded.
 - 4.5. With the multichannel pipette, pipette 5 μL of the triplicates of each dilution onto a non-selective plate (namely Nutrient agar medium), obtaining a vertical profile of three drops for each dilution.
 - 4.6. After complete drying of the drops, invert and incubate the plates at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 12-24 hours.

NOTE: It should be noted that bacterial strains (mainly TA100) on Nutrient Agar DEV medium grow very fast, so colonies must be counted after a maximum incubation period of approximately 12 hours.

- 4.7. Count the colonies at all countable dilutions, for later calculation of the number of CFU/mL.

By performing and validating the growth curves for *S. typhimurium* strains TA98 and TA100, our working group concluded that the ideal time period for their cultures to reach the beginning of the stationary phase corresponds to 13 hours of growth, which was adopted for proceeding with the Ames test. However, it is recommended that each laboratory carry out this step to determine the growth period of their bacterial cultures.

Furthermore, it should be noted that the growth curves for *S. typhimurium* strains TA1535 and TA1537 and *E. coli* were not experimentally performed and validated in our laboratory.

7. Test execution

EXPOSURE CONCENTRATIONS (Levy et al., 2019a; OECD, 2020)

Consideration must be given to the solubility of the test substance in the final mixture. This factor must be evaluated through the precipitation in the final mixture, under the conditions of the test, which must be evident to the naked eye. **The maximum recommended substance concentration is 5 mg/plate or 5 μL /plate.** For substances that are non-cytotoxic and insoluble in these amounts, one or more of these insoluble concentrations in the final mixture should still be tested. The precipitate should not interfere with the final result.

It is advisable to analyse a minimum of 5 different concentrations for the first experiment, at equal spacing intervals. The most common choices of spacing type are as follows: half log, 1:3 or 1:2 dilution, these smaller intervals being significantly used when investigating the dose-response relationship. Testing samples at a concentration higher than recommended (5 mg/mL or 5 μL /mL) may be considered when it is necessary to evaluate substances that contain potentially mutagenic impurities.

7.1. Positive controls (OECD, 2020; Mortelmans et al., 2000)

When performing the assay, the OECD-recommended bacterial strain-specific positive controls should also be included (Table 3). Preliminarily, the maximum concentration to be used for each positive control, without causing toxicity to the strains (point 7.4.), should be studied.

Table 3 – Standard mutagens to be used in positive controls, in assays without and with metabolic activation.

Substance [CAS No.]	Bacterial strain	Stock solution concentration
Sodium azide [26628-22-8]	TA1535 TA100	1.0 mg/mL
2-nitrofluorene [607-57-8]	TA98	
9-aminoacridine [90-45-9]	TA1537	
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [70-25-7] (MMNG)	<i>E. coli</i> strains	0.1 mg/mL
2-aminoanthracene [613-13-8]	For all strains in the assay with metabolic activation	

7.2. Negative (or solvent) controls (Levy et al., 2019a)

The negative control is used as a reference and the solvent control is the solvent used to dissolve the sample (usually water), both of which do not contain the test substance and are treated in the same way as the sample. These last mentioned controls are necessary to establish the number of spontaneous revertants for each strain. In case of test substances that are not soluble in water, they must be dissolved in other suitable solvents, e.g. Dimethylsulfoxide (DMSO). However, these solvents may present toxicity to bacteria at higher concentrations, so it is necessary to determine, prior to the test, the maximum concentration that can be used without causing toxicity and interfering with microbial growth. Any compound used as control should not exhibit a chemical reaction with the test substance, nor should it cause a decrease in bacterial viability, indicated by lower revertant counts or a reduction in background lawn in the solvent control, compared to negative control (such as water or buffer) and consistent with the laboratory's acceptance criteria, based on its history.

Evaluation of the spontaneous mutation rate (Maron & Ames, 1983)

Spontaneous reverse mutation of amino acid-dependent strains is measured concurrently with mutagenicity assays and is expressed as the number of colonies whose mutation has reversed, per plate. Each strain spontaneously reverts at a characteristic frequency (Table 4).

The number of colonies that spontaneously revert after incubation for 72 hours depends on the final total plate count, which is related to the concentration of histidine, or tryptophan, present in the top agar medium. The number of spontaneous mutant colonies does not depend on the initial number of bacteria (10^8 per 100 μ L of suspension added).

It is advisable to include 3 spontaneous mutation check control plates, for each strain, in each major mutagenicity assay. Higher than normal reversion rates may indicate contamination or accumulation of reverse mutations, due to a high number of subcultures and therefore the strain should be recovered by re-isolation from existing frozen cultures (point 7.3.). Furthermore, consistently high spontaneous values can sometimes be attributed to the presence of mutagens in the environment of the bacterial strain. It is expected that there will be some variation in the number of spontaneous revertants obtained between laboratories, and these values must be updated in a specific record for this purpose (historical data). The values presented in Table 4 are indicative, according to what is described in the literature.

Table 4 - Number of spontaneous revertants characteristic of each strain (Levy et al., 2019b).

Bacterial strain	Number of expected spontaneous revertants	
	Without metabolic activation	With metabolic activation
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5-20	5-20
<i>S. typhimurium</i> TA1537	5-20	5-20
<i>S. typhimurium</i> TA98	20-50	20-50
<i>S. typhimurium</i> TA100	75-200	75-200
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	97-384	97-384

A decrease in the frequency of spontaneous reverse mutation in strains with plasmid pKM101, accompanied by an increased sensitivity to ampicillin, is indicative of the loss of this component. Therefore, these strains can be monitored, and total loss of plasmid can be avoided by growing them overnight from the frozen mother culture in Oxoid broth No. 2, to which 25 μ g/mL ampicillin should be added. To determine the proportion of cells that remain with the plasmid, culture 10^6 cells overnight, diluted in phosphate buffer, and place 0.1 mL of this culture on plates (in triplicate) with

nutrient agar, with and without the addition of ampicillin. These plates should be incubated at 37 ± 1 °C. Thereafter, the average number of colonies on plates with ampicillin should be the same as that on plates without this antibiotic, indicating that all bacteria have the plasmid pKM101. If necessary, the strain can be re-isolated from growth on ampicillin plates.

7.3. Re-isolation of strains (Maron & Ames, 1983)

The process of re-isolation of bacterial strains, as mentioned above, should be carried out when the number of spontaneous revertants is above the historical values for the control. In this step, strains should be subcultured from their frozen stock cultures onto plates with GM agar supplemented with biotin/histidine or tryptophan. In the case of strains that have the plasmid pKM101, the medium should also be supplemented with ampicillin.

Procedure:

1. Dip a sterile loop into the freshly thawed mother culture (or scrape bacteria from the surface of a frozen culture).
2. Make a single streak over a plate of GM supplemented agar, using an inoculating loop.
3. Incubate for 48 hours at 37 ± 1 °C.
4. With a sterile loop, choose an isolated colony for overnight growth in Oxoid nutrient broth No. 2.
5. New stock cultures can be prepared from these culture(s).

7.4. Controls' verification test

In this preliminary assay, it is only necessary to evaluate one plate per test condition.

NOTE: Our working group only experimentally validated the concentrations of the different controls in *S. typhimurium* strains TA98 and TA100.

Procedure:

1. Identify the sterile falcon tubes and plates with the GM agar medium to be used in the test.
2. Prepare the 5 dilutions of the solvent control, more specifically DMSO (0.3, 0.6, 1.25, 2.5 and 5 μ L/plate), in sterile eppendorfs, as follows:
 - A. In eppendorf of the concentration of 5 μ L/plate concentration, place 100 μ L of the pure control compound.
 - B. In the remaining eppendorfs, preliminarily, pipette 50 μ L of sterile buffer.

- C. Pipette 50 µL of the previously prepared eppendorf (point 2.A) into the eppendorf corresponding to 2.5 µg/plate.
- D. Resuspend the above mixture and pipette 50 µL into the eppendorf of the next dilution (1.25 µg/plate).
- E. Carry out the same procedure for the subsequent dilutions (0.6 and 0.3 µg/plate).
- F. In other eppendorfs, pipette 180 µL of sterile buffer into each.
- G. Pipette 20 µL of each previously prepared dilution into the respective eppendorf with buffer.

3. Prepare the water dilution (solvent control) as follows:

- A. Pipette 180 µL of sterile buffer into a sterile eppendorf.
- B. Add 20 µL of ultrapure water to the eppendorf with buffer.

4. Prepare the 5 dilutions of the positive controls in sterile eppendorfs:

The most commonly adopted type of spacing between concentrations is the one with a dilution factor equal to 2, and the following have been validated:

- 2-NITROFLUORENE: 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 µg/plate
- SODIUM AZIDE: 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 µg/plate
- 9-AMINOACHRIDINE
- N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE
- 2-AMINOANTHRACENE

Within the group of positive controls for the different strains, our working group carried out exclusively the validation of the test concentrations for 2-nitrofluorene (TA98) and sodium azide (TA100). In addition to the need for each laboratory to validate the remaining standard compounds, it is recommended to also confirm the conditions of the compounds validated and adopted by our working group.

Considering that the stock solution of the validated positive controls, without metabolic activation, is at a concentration of 1 mg/mL, the procedure is as follows:

- A. In the eppendorf of the concentration of 20 µg/plate, place 200 µL of the pure control compound.
- B. In the remaining eppendorfs, preliminarily pipette 100 µL of sterile buffer.
- C. Pipette 100 µL of the previously prepared eppendorf (point 4.A) into the eppendorf corresponding to 10 µg/plate.

- D. Resuspend the above mixture and pipette 100 µL into the eppendorf of the next dilution (5 µg/plate).
- E. Carry out the same procedure for the subsequent dilutions (2.5 and 1.25 µg/plate).
- F. In another 5 eppendorfs, pipette 180 µL of sterile buffer into each.
- G. Pipette 20 µL of each previously prepared dilution into the respective eppendorf with buffer.

NOTE: The procedure for the remaining mutagenic control compounds should be similar, and may differ only in the test concentrations to be validated.

5. Add to each respective sterile falcon tube:

- A. 500 µL of sterile buffer;
- B. 50 µL of control compound (buffer, dilutions of solvent control - water and DMSO - or positive control dilutions previously prepared).

6. When the bacterial inoculum reaches the beginning of the stationary phase, as intended and determined above, add 100 µL of this suspension to each tube prepared in the previous step.

NOTE: Simultaneously with this step, it is recommended to monitor the optical density and determine the number of CFU/mL in each assay in order to verify the growth conditions of the bacterial culture (as described in point 6.4).

7. Vortex all tubes.

8. Incubate in the oven for 20 minutes at 37 ± 1°C, without shaking.

9. Melt the top agar in the bath at 90 °C and supplement with the biotin/histidine solution (0.5 mM) or tryptophan (0.25 mM) solution. Before being used, top agar must be kept at a temperature of ≈ 50°C.

10. Add 2.0 mL of top agar supplemented with biotin/histidine or tryptophan to each tube containing *S. typhimurim* and *E. coli*, respectively. This step should be performed for each strain, using a sterile serological pipette for each of the bacterial strains.

NOTE: Although the pipette is not in direct contact with the mixture present in the tube, it is recommended that this pipetting step be performed from the lowest to the highest test concentration of each extract, in order to minimize possible influences.

11. Vortex the tube, pour onto GM agar plates and evenly distribute the mixture, making circular movements with the plate.

12. Invert when solid and incubate at 37 ± 1°C for 72 hours.

13. Count the colonies present on each plate and express the results as the number of revertants per plate.

NOTE: In the case of manual counting, on plates with significantly more revertant colonies (>300), count ¼ or half of the plate in an attempt to minimize counting error.

Most of the standard mutagenic compounds used as positive controls show high mutagenicity and possible toxicity to bacteria, so the maximum concentrations to be used in the assay are usually significantly lower than the maximum concentration allowed by the OECD (5 mg/plate). **Toxicity in the Ames test is qualitatively assessed, based on visualization of the background lawn**, in which a significant reduction reflects the death of bacteria or inhibition of their growth. In addition, toxicity could **also be observed through a decrease in the number of revertant colonies** compared to cultures that were exposed to lower concentrations of the compound. Otherwise, when the compounds do not show toxicity, a background layer of bacteria dependent on the amino acid, namely the ones present in the top agar medium, can be observed around the revertant colonies, with the naked eye or through microscopic visualization. Care must be taken to avoid misidentifying this type of colonies as revertant colonies, so confirmation can be carried out through the process of subculture of these colonies corresponding to the strains of *S. typhimurium* and *E.coli*, on GM agar plates with only biotin (no histidine) and unsupplemented GM agar, respectively. In this type of plates, if they are truly revertant colonies, they will have the ability to multiply in the absence of histidine or tryptophan.

In this preliminary test to evaluate the toxicity of the controls and consequent determination of the range of concentrations to be used, there is no interlaboratory agreement regarding the use of only the two bacterial strains with greater sensitivity (TA98 and TA100), or the need to use the five strains of test. However, in either of the above options, **the concentration at which there is a significant reduction in the background lawn and/or the number of revertant colonies is generally defined as the maximum concentration to be used in the test**. When a test substance is toxic, the maximum number of revertant colonies normally occurs at a concentration lower than the concentration at which toxicity was observed.

Controls, especially positive ones, should be used at a concentration optimized for each laboratory conditions, and a concentration should be chosen that will reliably induce a clear increase in the number of revertant colonies, compared to solvent controls. For this reason, according to what is described in the literature, **choosing a concentration that is in the middle of the dose-response curve of each positive control increases the probability of detecting possible changes in sensitivity in the detected mutations**. However, this optimal concentration for each positive control may vary between bacterial strains and inter-laboratory.

The number of revertants, obtained for all types of controls, but mainly those from solvent control, must be consistent with the values described in the literature for each bacterial strain. Each laboratory must define acceptable control limits, which must not be exceeded during subsequent tests, thus enabling the development of a history of values to support the decision to accept or reject a test based on the values obtained. In this same sense, it is recommended to create control charts, using the values obtained for each negative and solvent control. Thus, an assay should be considered invalid if the number of reverting colonies present in solvent control, is outside of the predetermined control limits (point 8), or if it shows some type of compromise (such as contamination).

7.5. Toxicity verification of test substances

The possible toxicity of different concentrations of the test substances must be evaluated, preliminarily to the tests. In the case of liquid solutions (such as hydrolates and essential oils, EOs), the maximum concentration allowed by the OECD is 5 µL/plate. Due to the chemical composition of hydrolates, the maximum concentration to be initially tested may be the one recommended by the OECD. In contrast, EOs are known to be more concentrated than hydrolates and, due to the need for prior solubilization in DMSO (1:1 dilution), the maximum concentration that can be tested is generally 2.5 µL/plate, considering already the previous dilution. However, in order to decide the maximum concentration of EO, the maximum concentration of DMSO must be considered, without causing toxicity to bacteria (validated in point 7.4.). As with the controls, in this assay, only one plate per test condition needs to be evaluated.

Procedure:

1. Identify the sterile falcon tubes and plates with the GM agar medium to be used in the test.
2. Prepare the 5 dilutions of the test substances, more specifically the hydrolates (0.3, 0.6, 1.25, 2.5 and 5 µL/plate) and the EO (0.16, 0.3, 0.6, 1.25 and 2.5 µL/plate), in sterile eppendorfs, as follows:

HYDROLATES

- A. In an eppendorf for the concentration of 5 µL/plate, place 100 µL of the pure hydrolate.
- B. For the rest, preliminarily, pipette 50 µL of sterile buffer.
- C. Pipette 50 µL of the previously prepared eppendorf (subpoint A) into the eppendorf corresponding to 2.5 µL/plate.
- D. Resuspend the above mixture and pipette 50 µL into the eppendorf of the next dilution (1.25 µL/plate).

- E. Carry out the same procedure for the subsequent dilutions (0.6 and 0.3 µL/plate).
- F. In other eppendorfs, pipette 180 µL of sterile buffer into each.
- G. Pipette 20 µL of each previously prepared dilution into the respective eppendorf with buffer.

ESSENTIAL OILS

- A. In the eppendorf for the concentration of 2.5 µL/plate, proceed with the 1:1 dilution of the EO with the DMSO, where you must place: 50 µL of DMSO and the same volume of pure EO (if the concentration of 2.5 µL of DMSO/plate did not show toxicity in previous assays).
- B. For the rest, preliminarily, pipette 50 µL of sterile buffer.
- C. Pipette 50 µL of the previously prepared eppendorf (subpoint A) into the eppendorf corresponding to 1.25 µL/plate.
- D. Resuspend the above mixture and pipette 50 µL into the eppendorf of the next dilution (0.6 µL/plate).
- E. Carry out the same procedure for the subsequent dilutions (0.3 and 0.16 µL/plate).
- F. In other eppendorfs, pipette 180 µL of sterile buffer into each.
- G. Pipette 20 µL of each previously prepared dilution into the respective eppendorf with buffer.

NOTE: In both types of extracts, between each dilution, the mixture must be shaken or resuspended vigorously.

3. Add to each sterile falcon tube:
 - A. 500 µL of sterile buffer;
 - B. Based on the dilutions previously prepared, by pipetting 50 µL of each condition, this will include the recommended maximum 5 µL per plate.
In the case of **positive** and **solvent controls** (water or DMSO), the dilution of the adopted concentration is prepared in the same way as the previous test. As for the negative control, 50 µL of sterile buffer should be pipetted directly into the corresponding tube;
4. When the bacterial inoculum reaches the beginning of the stationary phase, as determined above, add 100 µL of this suspension to each previously prepared tube.

NOTE: Simultaneously with this step, it is recommended to monitor the optical density and determine the number CFU/mL in each assay.

5. Vortex all tubes.
6. Incubate in the oven for 20 minutes at 37 ± 1°C without shaking.
7. Melt the top agar in the bath at 90°C and supplement with the solution of biotin/histidine (0.5 mM) or tryptophan (0.25 mM). Before being used, it must be kept at a temperature of = 50°C.
8. Add 2.0 mL of top agar supplemented with biotin/histidine or tryptophan to each tube containing *S. typhimurium* and *E. coli*, respectively. This step should be performed, using a sterile serological pipette, for each of the bacterial strains.
9. Vortex the tube, pour onto GM agar plates and evenly distribute the mixture, making circular movements with the plate.
10. Invert when solid and incubate at 37 ± 1°C for 72 hours.
11. Count the colonies present on each plate and express the results as the number of revertants per plate.

NOTE: This pre-assay, where the toxicity of the two types of test substances was evaluated, was experimentally validated only on *S. typhimurium* strains TA98 and TA100.

7.6. Pre-incubation method without metabolic activation

After determining the concentration ranges to be tested for each test substance, based on the results obtained in the toxicity assessment tests, the same procedure must be carried out for all test conditions of the different test substances, for all bacterial strains. The only difference is the fact that triplicates are used in each test condition (including controls), for an adequate estimate of variation. Duplicate conditions are also acceptable, but only when a scientifically supported reason is presented. The loss of a plate does not necessarily invalidate the entire assay performed.

In addition, it is recommended to perform at least two independent assays, using the same test conditions and procedures, in order to be able to assess the reproducibility of the observed response.

7.7. Pre-incubation method with metabolic activation

NOTE: The following procedure, regarding the metabolic activation assay, has not been experimentally validated by our working group.

In the Ames test, a form of *in vitro* metabolizing system is usually included, because these prokaryotic organisms, commonly known as bacteria, have a significantly limited ability to endogenously metabolize xenobiotics. However, many carcinogenic/mutagenic compounds are not capable of interacting with DNA unless they have undergone some degree of metabolism. Therefore, to improve the detection capability of the greatest possible number of mutagenic compounds of this test system, it is recommended to incorporate a post-mitochondrial fraction supplemented with cofactor (S9), prepared from rodent livers treated with enzyme-inducing agents (such as Aroclor 1254), or a combination of phenobarbitone and β -naphthoflavone.

The procedure is carried out in the same way as the assay without metabolic activation, for all conditions of the test substances, on all bacterial strains. All conditions are evaluated in triplicate in at least two independent trials. The only change to make, compared to the assay without metabolic activation, is to replace the buffer with the S9 activation mix, using exactly the same volume (500 μ L) in the tubes.

8. Interpretation of results

Data should be presented as the number of reverse mutated colonies per plate. Control counts (positive, solvent and negative) should also be reported for assays with and without metabolic activation. More specifically, the individual plate count, mean number of reverting colonies and standard deviation should be reported for each test substance condition across all independent assays, as well as for all types of controls.

Solvent control counts are not acceptable if they are significantly close to zero. In addition, the assay should not be accepted if there are no revertants on any of the solvent control plates for a bacterial strain.

In order to obtain greater precision, it is recommended to define limits that support the decision to accept or reject an assay, depending on the values of the solvent (or negative) controls. Although there is no globally accepted standard statistical parameter, Levy et al. (2019b) recommend that the mean \pm 2 times the standard deviation is a good starting point to be considered as an alert threshold, which highlights the need for a possible intervention to investigate the problem, before it is necessary to reject results obtained in several assays. Furthermore, the mean \pm 3 times the standard deviation can be considered as the rejection limit, which, if exceeded, emphasizes that this assay should be considered invalid.

Currently, the determination of a positive result is performed by applying various data evaluation procedures, with the results of solvent controls as a comparison. Likewise, for a positive control value to be valid, it must meet the laboratory's criteria for a positive response. In the literature, the most commonly used approaches for classifying a positive result are: **the mutagenicity ratio and statistical analysis.**

(Maron & Ames, 1983) addresses the mutagenicity ratio, calling it the "double rule", referring that a test substance has a negative response if the mutagenicity ratio, which is obtained by comparing the number of induced revertants with spontaneous revertants, is less than 2 times. However, this criterion used alone does not distinguish between strains with a higher number of spontaneous revertants and those with a lower number. On the other hand, as mentioned in the OECD standard, statistical significance should not be used as the only determining factor for a positive response. Furthermore, so far, there are some disagreements regarding this type of analysis, due to the fact that there is still no single type of distribution and a defined p-value to be used in this type of test.

That said, (Levy et al., 2019b) refer to the need to consider other criteria, in order to ensure that the random values obtained during the test are not misclassified as positive results. In this sense, three approaches were suggested for the possible classification of a positive result, namely:

1. the mutagenicity ratio;
2. the concentration-related increase;
3. the increase outside the historical control ranges.

In the first approach, the mutagenicity ratio should be calculated for each test condition in the totality of independent assays, in each bacterial strain, compared to the solvent control, using the following formula:

$$\text{Mutagenicity Ratio} = \frac{\text{Average number of revertants observed in the test condition}}{\text{Mean number of spontaneous revertants}}$$

Taking into account what was mentioned above about this criterion, it was validated that the limit of the mutagenicity ratio for a negative response should be 2, for strains with a greater number of spontaneous revertants (greater than 20); and 3 for the strains with a lower number (less than 20), in order to increase the detection sensitivity.

As for the concentration-related increase, this parameter means a progressive number of revertants at increasing concentrations, in which there is minimal or no evidence of toxicity of the test substance to bacteria. If there is a plateau or a significant drop in the number of revertants at higher concentrations, this is an indication of toxicity of the test substance, as mentioned above. As an aid in determining the possible dose-response, statistical trend tests can be used, **in which high concentration values that show signs of toxicity, should be excluded.**

The last mentioned approach is intended to verify that the average number of revertants induced by the test substance is outside the laboratory's history ranges, relative to solvent controls, based on the alert limits (mean \pm 2 times the standard deviation).

Thus, the working group of (Levy et al., 2019b) reached consensus that a **response is clearly positive** if, for at least one strain, with or without metabolic activation, **all of the following criteria are met:**

- Increase in the number of revertants related to concentration (dose-response);
- Mutagenicity ratio greater than 2 or 3, depending on the bacterial strain, in at least one concentration of the test substance;
- Increase out of historical solvent control data (including alert limits) by at least one test concentration.

A substance for which the results do not meet the above criteria can be considered **non-mutagenic** in this test and should be considered negative in all strains. In addition to these approaches, attention should be paid to whether the response is consistent with what is known about the responsiveness of different bacterial strains.

By combining the 3 criteria approaches, the results can be classified as follows:

Table 5 – Combination of the three parameters for classification of results (Levy et al., 2019b).

DOSE-RESPONSE	MUTAGENICITY RATIO	OUT OF HISTORY	RESULT
Yes	Yes	Yes	Positive
Yes	Yes	No	Likely positive
Yes	No	Yes	Likely positive
Yes	No	No	Inconclusive
No	Yes	Yes	Inconclusive
No	Yes	No	Inconclusive
No	No	Yes	Likely negative
No	No	No	Negative

A substance is considered **mutagenic** if a positive response is observed in at least one strain/activation combination, irrespective of whether other strains have been tested or their responses. Responses that are **likely positive/negative** or **inconclusive** generally need to be repeated, where it is recommended to incorporate changes to the protocol in an attempt to emphasize or refute the initial response observed. If repeat testing does not resolve these types of results, the result should be designated as "equivocal".

Results obtained without and with metabolic activation should be compared, also considering the applicability of the test substance. It may be necessary to use another type of metabolic activation (for example, of a reducing nature).

A **positive Ames test result** indicates that the substance induces point mutations by base substitution, frameshifts or crosslinking activity in the *S. typhimurium* and/or *E. coli* genome (Table 6). Negative results indicate that, under the conditions of the assay, the test substance is non-mutagenic in the strains tested.

Table 6 - Type of mutations detected by each strain.

STRAIN	SPECIE	GENOTYPE	DNA REPAIR	MUTAGENIC EVENT
TA98	<i>S. typhimurium</i>	hisD3052 rfa Δgal chi bio uvrB	-	frameshift
TA100	<i>S. typhimurium</i>	hisG46 rfa Δgal chi bio uvrB	-	base pair replacement (G-C)
TA1535	<i>S. typhimurium</i>	hisG46 rfa Δgal chi bio uvrB	-	base pair replacement (G-C)
TA1537	<i>S. typhimurium</i>	hisC3076 rfa Δgal chi bio uvrB	-	frameshift
WP2 uvrA (pKM101)	<i>E. coli</i>	trpE65 uvrA	-	base pair replacement (A-T)

9. Definitions

- CFU:**
 Colony forming units counted on agar-containing culture media (usually non-selective), after inoculation and incubation under specific conditions.
- Inoculum:**
 A suspension of microorganism prepared from a bacterial colony (from the plate inoculated with the working stock culture) in Oxoid medium, for a defined period of time and with a known optical density and microbial concentration.
- Master stock cultures:**
 Cultures of microorganisms prepared from the suspension of the strain from the collection vial or newly arrived at the laboratory. Two types of Master stock can be prepared: overnight bacterial suspension in Oxoid medium, where the cryopreserving agent DMSO (type 1) is added directly; bacterial suspension obtained through the process of resuspension of the pellet, after centrifugation, with BHI-glycerol medium (type 2). They are both frozen at -80°C.
NOTE: Type 1 Master stock cultures are described in the literature specifically for this assay.
- Test substances:**
 Different types of extracts from different plants (hydroalcoholic, hydrolate, essential oil, aqueous, methanolic, ethanolic).
- Working stock cultures:**
 Cultures of microorganisms prepared from the overnight bacterial suspension in Oxoid medium, to which the cryopreserving agent DMSO was later added. They must be divided into single-use frozen cryovials, which will be used for subculture on solid media and subsequent preparation of the inoculum, from a colony, in each assay.

10. References

- EURL ECVAM DB-ALM (2015), *DB-ALM Method Summary n°30: Bacterial reverse mutation test (Ames test)*, last update on 20 June 2015.
- Levy, D. D.; Hakura, A.; Elespuru, R. K.; Escobar, P. A.; Kato, M.; Lott, J.; Moore, M. M. & Sugiyama, K. ichi (2019a), *Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission*, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 848, 403075. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.07.005.
- Levy, D. D.; Zeiger, E.; Escobar, P. A.; Hakura, A.; van der Leede, B. Jan M.; Kato, M.; Moore, M. M. & Sugiyama, K. ichi (2019b), *Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test)*, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 848, 403074. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.07.004.
- Maron, D.M. & Ames, B.N. (1983), *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*, Mutation Research, 113 (3-4), 173-215. DOI: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- Mortelmans, K. & Zeiger, E. (2000), *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455 (1–2), 29-60. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00064-6.
- OECD (2020), *Guideline for testing of chemicals Test No 471: Bacterial Reverse Mutation Test*. Oecd Guidel. Test. Chem. 24.
- Williams, R. V.; DeMarini, D. M.; Stankowski Jr., L. F.; Escobar, P. A.; Zeiger, E.; Howe, J.; Elespuru, R. & Cross, K. P. (2019), *Are all bacterial strains required by OECD mutagenicity test guideline TG471 needed?*, Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 848, 503081. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.503081.

11. Annexes

A. CONFIRMATION OF THE GENOTYPE OF THE STRAINS

The following tables represent a possible model to be used to record the results obtained in the genotype confirmation assay of the different bacterial strains, which include: the phenotypic characteristics to be evaluated, their expected result and space to fill in the respective result obtained in that assay.

NOTE: Despite the expected result in the biotin dependence of *Salmonella typhimurium* strains, as mentioned above, it is emphasized that microbial growth can often occur on plates supplemented only with histidine, probably due to the fact that the strains' need for this molecule is extremely small, so it can be satisfied by trace amounts present in the inoculation medium. Taking this into account, optionally, the evaluation of this phenotypic trait can be disregarded, since the *uvrB* mutation that excludes the *bio* gene cannot be reversed, being correlated with the presence of this mutation.

Date: _____

Test: _____

<i>Salmonella typhimurium</i> TA98		
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS TO ASSESS	EXPECTED OUTCOME	RESULT OBTAINED
Biotin dependence	Absence of growth	
Histidine dependence	Absence of growth	
Biotin/histidine dependence	Occurrence of growth	
Presence of <i>rfa</i> mutation	No growth, round the well	
Presence of <i>uvrB</i> mutation	No growth (area exposed to UV light)	
Presence of plasmid pKM101	Occurrence of growth	

<i>Salmonella typhimurium</i> TA100		
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS TO ASSESS	EXPECTED OUTCOME	RESULT OBTAINED
Biotin dependence	Absence of growth	
Histidine dependence	Absence of growth	
Biotin/histidine dependence	Occurrence of growth	
Presence of <i>rfa</i> mutation	No growth, round the well	
Presence of <i>uvrB</i> mutation	No growth (area exposed to UV light)	
Presence of plasmid pKM101	Occurrence of growth	

Date: _____

Test: _____

<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535		
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS TO ASSESS	EXPECTED OUTCOME	RESULT OBTAINED
Biotin dependence	Absence of growth	
Histidine dependence	Absence of growth	
Biotin/histidine dependence	Occurrence of growth	
Presence of <i>rfa</i> mutation	No growth, round the well	
Presence of <i>uvrB</i> mutation	No growth (area exposed to UV light)	
Presence of plasmid pKM101	No growth, just a control plate	

<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537		
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS TO ASSESS	EXPECTED OUTCOME	RESULT OBTAINED
Biotin dependence	Absence of growth	
Histidine dependence	Absence of growth	
Biotin/histidine dependence	Occurrence of growth	
Presence of <i>rfa</i> mutation	No growth, round the well	
Presence of <i>uvrB</i> mutation	No growth (area exposed to UV light)	
Presence of plasmid pKM101	No growth, just a control plate	

Page 46 of 48

Date: _____

Test: _____

<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)		
PHENOTYPIC CHARACTERISTICS TO ASSESS	EXPECTED OUTCOME	RESULT OBTAINED
Tryptophan dependence	Plaque <u>not supplemented</u> : No growth	
	Supplemented plate: Occurrence of growth	
Presence of <i>uvrA</i> mutation	No growth (area exposed to UV light)	
Presence of plasmid pKM101	Occurrence of growth	

Page 47 of 48

B. PRE-INCUBATION METHOD, WITHOUT OR WITH METABOLIC ACTIVATION

The following tables represent a possible model to be used to record the results obtained when performing the method by pre-incubation, without or with metabolic activation.

Date: _____

Test Extracts: _____

Bacterial Strain: _____

Test: _____

Test Condition	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Buffer (Control)			
Positive (_____)			
Solvent (_____)			
Extract _____ - C1			
Extract _____ - C2			
Extract _____ - C3			
Extract _____ - C4			
Extract _____ - C5			

Test Condition	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Buffer (Control)			
Positive (_____)			
Solvent (_____)			
Extract _____ - C1			
Extract _____ - C2			
Extract _____ - C3			
Extract _____ - C4			
Extract _____ - C5			

Test Condition	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Buffer (Control)			
Positive (_____)			
Solvent (_____)			
Extract _____ - C1			
Extract _____ - C2			
Extract _____ - C3			
Extract _____ - C4			
Extract _____ - C5			
Extrato _____ - C5			

Page 48 of 48

Anexo IV – Comunicações e publicações científicas ao longo do desenvolvimento da dissertação

1. Comunicação Oral 1

Maria, M; Rolo, J; Oliveira, AS; Gaspar, C; Palmeira-de-Oliveira, R; Gonçalves, JC; Delgado, F; Martinez-de-Oliveira, J; Palmeira-de-Oliveira, A. (2022), “Estudo da atividade mutagénica e genotóxica de extratos de plantas”. III Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, Castelo Branco, Portugal – 24 a 25 de março de 2022.

2. Publicação: Artigo

Maria, M; Rolo, J; Oliveira, AS; Gaspar, C; Palmeira-de-Oliveira, R; Gonçalves, JC; Delgado, F; Martinez-de-Oliveira, J; Palmeira-de-Oliveira, A. (2022), “Estudo da atividade mutagénica e genotóxica de extratos de plantas”. Actas Portuguesas de Horticultura, nº37: p. 139-147.

3. Comunicação Oral 2

Maria, M; Oliveira, AS; Rolo, J; Gaspar, C; Palmeira-de-Oliveira, R; Martinez-de-Oliveira, J; Palmeira-de-Oliveira, A. (2022), “*In vitro* safety assessment of plant hydrolates: cytotoxic and genotoxic potential”. XVII International CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal – 20 a 21 de julho de 2022.