

Estudo da estabilidade da atividade antioxidante de óleos essenciais com interesse para a indústria cosmética

Após realização da Prova Pública

Catarina Alexandra dos Anjos Batista

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

Orientadora: Prof.^a Doutora Joana Rita Gonçalves Rolo
Coorientador: Prof. Doutor Ângelo Filipe Santos Luís

Dezembro de 2022

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Catarina Alexandra dos Anjos Batista, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10631 de Bioquímica da Faculdade 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 27 /12 /2022

Catarina Alexandra dos Anjos Batista

Folha em branco

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós, por toda a compreensão, apoio e paciência expressada ao longo da minha vida acadêmica.

Folha em branco

Agradecimentos

É com enorme satisfação que termino esta etapa que expresso aqui os meus agradecimentos aqueles que me acompanharam, cooperaram e apoiaram esta caminhada.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora e ao meu Coorientador, Professora Doutora Joana Rita Gonçalves Rolo e Professor Doutor Ângelo Filipe Santos Luís, pela oportunidade de integrar a equipa e de desenvolver o seguinte trabalho. Por toda a paciência, disponibilidade, apoio traduzido em todas as palavras de incentivo, otimismo, pelas críticas construtivas, mas principalmente por todos os ensinamentos e pelas práticas científicas que transmitiram ao longo deste percurso.

À toda a equipa do laboratório de Microbiologia II, do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), em particular à Ana Sofia Oliveira, pela disponibilidade prestada, paciência, conselhos e pela partilha de conhecimento contribuindo assim para a minha formação académica.

À Universidade da Beira Interior, e a todas as pessoas envolvidas no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), que me disponibilizaram os meios necessários para a execução deste trabalho de dissertação.

Aos meus pais e ao meu irmão, agradeço pelo apoio incondicional, amor, carinho, paciência e pela força transmitida nos momentos mais difíceis durante esta caminhada. Sem vocês nada disto seria possível, e por isso, as palavras não serão suficientes para exprimir o meu muito obrigado.

Aos meus avós, primos e tios, que sempre me deram uma palavra amiga e por todo o apoio e carinho ao longo desta jornada.

Aos meus amigos, em especial, à Andreia e a Margarida, que estiveram sempre presentes, agradeço pela amizade, pelo que vivemos juntas, pelo apoio e carinho nomeadamente nos momentos mais difíceis. À Vinhas que apesar de ser minha colega de laboratório, entrou na minha vida no início da vida académica, obrigado pelo apoio, pelos jantares, e principalmente pela amizade.

Por último, este trabalho de dissertação enquadra-se no projeto INOVEP-Inovação com Extratos de Plantas (Nº33815, Centro 2020), pelo que direciono os meus sinceros agradecimentos pelo financiamento pois permitiu desenvolver o trabalho de investigação ao longo desta dissertação.

Folha em branco

Resumo

Os produtos cosméticos representam um papel relevante tanto no bem-estar físico como no âmbito social do consumidor atual, incentivando assim a indústria cosmética a criar produtos novos de forma a colmatar as exigências crescentes da sociedade atual.

Quando presentes na composição de uma formulação cosmética, os antioxidantes podem atuar de duas maneiras distintas, podendo inibir a oxidação dos restantes ingredientes, mas também podem ter um papel como ingrediente ativo quando integrados em formulações de aplicação tópica com função antienvelhecimento, uma vez que atuam de maneira a manter a quantidade de antioxidantes presentes na pele. Substâncias de origem natural, tais como os óleos essenciais das mais diversas plantas aromáticas, surgem como uma possível alternativa aos compostos sintéticos, para aplicação como antioxidante em produtos cosméticos como ingrediente ativo.

As plantas *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e o fruto *Citrus sinensis*, bastante consumidos em Portugal, possuem óleos essenciais, com elevado interesse, tendo vindo recentemente a ser analisados em relação às suas atividades biológicas.

Este estudo pretende analisar quimicamente os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e de *Citrus sinensis*, e estudá-los quanto às suas atividades antioxidante e citotóxica, na perspetiva de serem empregues como ingredientes com função antioxidante em formulações cosméticas.

Os resultados obtidos permitiram inferir que a atividade antioxidante dos óleos essenciais em estudo concede-lhes a potencialidade de serem utilizados como ingredientes antioxidantes naturais em formulações cosméticas, que estes são seguros quando utilizados na gama de concentrações compatíveis com o seu limite de segurança ao nível da atividade citotóxica em estudo, 0,008 a 0,004% (v/v). É de referir que o óleo que demonstrou ser mais antioxidante tanto na capacidade de redução de radicais livres como na inibição da peroxidação lipídica foi o óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, contudo é de salientar que também foi aquele que apresentou uma maior citotoxicidade. Por outro lado, o óleo essencial de *Citrus sinensis* apesar de ter demonstrado ser o mais biocompatível com a linha celular de

queratinócitos humanos, HaCat, foi aquele que demonstrou uma capacidade elevada de inibir a peroxidação lipídica.

Este trabalho é assim considerado uma avaliação primária das potencialidades dos óleos essenciais, pelo que será interessante futuramente desenvolverem-se estudos que englobem outras avaliações das mais diversas atividades biológicas, mas também da sua eficácia e segurança.

Palavras-chave

Atividade antioxidante; Atividade citotóxica; *Citrus sinensis*; *Ocimum basilicum*; Óleo essencial; *Origanum vulgare*; Produtos cosméticos; *Syzygium aromaticum*

Folha em branco

Abstract

Cosmetic products play an important role in both the physical and social well-being of today's consumer, thus encouraging the cosmetics industry to create new products to meet the growing demands of today's society.

When present in the composition of a cosmetic formulation, antioxidants can act in two distinct ways. They can inhibit the oxidation of the other ingredients, but they can also play a role as an active ingredient when integrated into topical formulations with an anti-aging function, since they act to maintain the amount of antioxidants present in the skin.

Substances of natural origin, such as the essential oils of various aromatic plants, emerge as a possible alternative for synthetic compounds, for application as an antioxidant in cosmetic products as an active ingredient.

The plants *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* and the fruit *Citrus sinensis*, widely consumed in Portugal, have essential oils, with high interest, so recently these have been analysed in relation to their biological activities.

This study aims to analyse chemically the essential oil of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, and *Citrus sinensis*, and to study them for their antioxidant and cytotoxic activities, with the perspective of being employed as ingredients with antioxidant function in cosmetic formulations.

The results obtained allowed us to infer that the antioxidant activity of the essential oils and the expression oil under study gives them the potential to be used as natural antioxidant ingredients in safe cosmetic formulations when used in the concentration range compatible with their safety limit at the level of cytotoxic activity under study, 0.008 to 0.004% (v/v). It should be noted that the oil that proved to be most antioxidant in both free radical scavenging capacity and inhibition of lipid peroxidation was the essential oil of *Syzygium aromaticum*, however it should be noted that it was also the one that showed the highest cytotoxicity. Otherwise, the essential oil of *Citrus sinensis* despite having shown to be the most biocompatible with the human keratinocyte cell line, HaCat, was the one that demonstrated a high ability to inhibit lipid peroxidation.

This work is thus considered a primary evaluation of the potential of essential oils and expression oil, so it will be interesting to develop future studies that encompass

other evaluations of the most diverse biological activities, but also of their efficacy and safety.

Keywords

Antioxidant activity; *Citrus sinensis*; Cosmetic products; Cytotoxic activity; Essential oil; *Ocimum basilicum*; *Origanum vulgare*; *Syzygium aromaticum*

Folha em branco

Índice

Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Cosméticos	1
1.1.1. Legislação e definição de cosméticos	2
1.1.2. Antioxidantes na cosmética	3
1.1.2.1. Antioxidantes Sintéticos	4
1.1.2.2. Antioxidantes Naturais	5
1.2. Óleo Essencial	6
1.2.1. Aplicação de óleos essenciais	8
1.2.2. Óleos como antioxidantes	9
1.2.3. Citotoxicidade dos óleos essenciais	11
1.3. Plantas com Interesse para a cosmética	12
1.3.1. <i>Syzygium aromaticum</i>	13
1.3.2. <i>Ocimum basilicum</i>	14
1.3.3. <i>Origanum vulgare</i>	15
1.3.4. <i>Citrus sinensis</i>	16
1.4. Objetivo Geral	17
Capítulo 2. Desenho Experimental	19
Capítulo 3. Atividade Antioxidante	21
3.1. Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH	21
3.1.1. Considerações gerais	21
3.1.1.1. Objetivo	22
3.1.2. Parte Experimental	22
3.1.2.1. Materiais e Métodos	22
3.1.2.1.1. Reagentes	22
3.1.2.1.2. Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH	23
3.1.2.2. Esquema Representativo da metodologia aplicada	27
3.1.2.3. Tratamento de Resultados	30
3.1.3. Discussão de Resultados	31
3.1.3.1. Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	36
3.1.3.2. Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	37
3.1.3.3. Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	39
3.1.3.4. Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	41
3.1.4. Conclusão e Perspetivas Futuras	42
3.2. Sistema β -Caroteno/Ácido linoleico	43

3.2.1. Considerações Gerais	43
3.2.1.1. Objetivo	44
3.2.2. Parte Experimental	44
3.2.2.1. Materiais e Métodos	44
3.2.2.1.1. Reagentes	44
3.2.2.1.2. Determinação da atividade antioxidante	44
3.2.2.2. Esquema representativo da metodologia aplicada	46
3.2.3. Tratamento de Resultados	48
3.2.4. Discussão de Resultados	48
3.2.4.1. Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	52
3.2.4.2. Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	53
3.2.4.3. Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	54
3.2.4.4. Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	56
3.2.5. Conclusão e Perspetivas futuras	57
Capítulo 4. Atividade citotóxica	59
4.1. Considerações gerais	59
4.1.1. Objetivo	59
4.2. Parte Experimental	60
4.2.1. Materiais e Métodos	60
4.2.1.1. Células	60
4.2.1.2. Reagentes	60
4.2.1.3. Determinação da citotoxicidade in vitro	61
4.2.2. Esquema representativo da metodologia aplicada	64
4.2.3. Tratamento de Resultados	65
4.3. Discussão de Resultados	66
4.4. Conclusão e Perspetivas Futuras	71
Capítulo 5. Estabilidade Acelerada	73
5.1. Considerações gerais	74
5.1.1. Objetivo	74
5.2. Parte Experimental	74
5.2.1. Materiais e Métodos	74
5.2.1.1. Reagentes	74
5.2.1.2. Características organoléticas	74
5.2.1.3. Ensaio de Estabilidade acelerada	75
5.2.2. Esquema representativo da metodologia executada	75
5.3. Discussão de Resultados	76
5.3.1. Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	76

5.3.2. Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	78
5.3.3. Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	79
5.3.4. Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	81
5.4. Conclusão e Perspetivas Futuras	83
Capítulo 6. Composição Química	84
6.1. Considerações gerais	84
6.2. Parte Experimental	84
6.2.1. Materiais e Métodos	84
6.3. Discussão de Resultados	85
6.3.1. Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	85
6.3.2. Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	86
6.3.3. Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	87
6.3.4. Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	88
6.4. Conclusão	88
Capítulo 7. Discussão geral	90
Capítulo 8. Conclusão e Perspetivas futuras	96
Capítulo 9. Referências Bibliográficas	99
Anexo 1- Validação da reta de calibração do ensaio de redução do radical DPPH	105
Anexo 2- Validação da reta de calibração do ensaio de redução do radical DPPH após o ensaio de estabilidade acelerada	105
Anexo 3- Validação do antioxidante BHT no sistema β -Caroteno/Ácido linoleico	106
Anexo 4- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>S.aromaticum</i> da alíquota inicial	107
Anexo 5- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>S.aromaticum</i> sujeita à temperatura ambiente	107
Anexo 6- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>O.basilicum</i> da alíquota inicial	108
Anexo 7- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>O.basilicum</i> sujeita à temperatura ambiente	108
Anexo 8- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>O.vulgare</i> da alíquota inicial	109
Anexo 9- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>O.vulgare</i> sujeita à temperatura ambiente	109
Anexo 10- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>C.sinensis</i> da alíquota inicial	110
Anexo 11- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de <i>C.sinensis</i> sujeita à temperatura ambiente	110

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1: Fotografia de *Syzygium aromaticum* (Jardim botânico UTAD)

Figura 2: Fotografia de *Ocimum basilicum* (Jardim botânico UTAD)

Figura 3: Fotografia de *Origanum vulgare* (Jardim botânico UTAD)

Figura 4: Fotografia de *Citrus sinensis* (Jardim botânico UTAD)

Figura 5: Esquema representativo do design experimental desenvolvido durante a realização do estudo

Figura 6: Reação do radical DPPH

Figura 7: Esquema representativo da metodologia executada para determinar a capacidade antioxidante por redução do DPPH: determinação da gama de trabalho

Figura 8: Esquema representativo da metodologia aplicada para determinar a capacidade antioxidante por redução do DPPH: preparação da placa padrão com DPPH e o antioxidante padrão, ácido ascórbico

Figura 9: Esquema representativo da metodologia efetuada para determinar a capacidade antioxidante por redução do DPPH: preparação da placa com amostra em estudo

Figura 10: Representação esquemática da placa padrão (96 poços) para a determinação do EC_{50} do ácido ascórbico e do DPPH no estudo da capacidade antioxidante por redução do DPPH

Figura 11: Representação esquemática da placa de 96 poços para a determinação do EC_{50} dos óleos essenciais em estudo para consequentemente estudar a capacidade antioxidante da amostra

Figura 12: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β - Caroteno: preparação das diluições dos óleos essenciais em estudo em metanol

Figura 13: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β - Caroteno: preparação da emulsão de β - Caroteno

Figura 14: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β - Caroteno: preparação da emulsão branco

Figura 15: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β -Caroteno: preparação dos tubos de teste com as amostras, tubos de controlo e o tubo branco

Figura 16: Reação da conversão do MTT em formazano

Figura 17: Esquema representativo da metodologia desempenhada no estudo da atividade citotóxica dos óleos em estudo pelo ensaio MTT

Figura 18: Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada na execução do ensaio de MTT para os óleos essenciais em estudo

Figura 19: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas expostas a diferentes concentrações do solvente DMSO. “Meio” corresponde a células sujeitas ao meio de cultura completo. “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test

Figura 20: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *S. aromaticum*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test

Figura 21: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. basilicum*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test

Figura 22: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *C. sinensis*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test

Figura 23: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test

Figura 24: Esquema representativo da metodologia adotada para o ensaio de estabilidade acelerada à temperatura ambiente

Figura 25: Esquema representativo da metodologia executada para o ensaio de estabilidade acelerada dos óleos em estudo com exposição direta á luz dos mesmos

Figura 26: Fotografias da alíquota do óleo essencial de *S. aromaticum* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições

Figura 27: Fotografias da alíquota do óleo essencial *O. basilicum* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições

Figura 28: Fotografias da alíquota do óleo essencial de *O. vulgare* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições

Figura 29: Fotografias da alíquota do óleo essencial de *C. sinensis* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *S. aromaticum* em estudo.

Tabela 2 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *O. basilicum* em estudo.

Tabela 3 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *O. vulgare* em estudo.

Tabela 4 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *C. sinensis* em estudo.

Tabela 5 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) do antioxidante padrão, ácido ascórbico

Tabela 6- Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare*.

Tabela 7- Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à temperatura de 5°C do ensaio de estabilidade acelerada.

Tabela 8- Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à temperatura de 50°C do ensaio de estabilidade acelerada.

Tabela 9- Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à temperatura ambiente do ensaio de estabilidade acelerada.

Tabela 10 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à luz do ensaio de estabilidade acelerada.

Tabela 11: Valores do IC₅₀ dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum*, *O.vulgare* e do antioxidante BHT.

Tabela 12: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de 5°C do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Tabela 13: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de 50°C do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Tabela 14: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de temperatura ambiente do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Tabela 15: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de temperatura ambiente do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Tabela 16: Concentrações biocompatíveis do óleo essencial de *S. aromaticum*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, e de *C. sinensis* e do solvente DMSO para a linha celular HaCat.

Tabela 17: Descrição das características organolépticas das alíquotas do óleo essencial de *S.aromaticum* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 18: Descrição das características organolépticas das alíquotas do óleo essencial de *O. basilicum* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 19: Descrição das características organolépticas das alíquotas do óleo essencial de *O. vulgare* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 20: Descrição das características organolépticas das alíquotas do óleo essencial de *C. sinensis* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 21: Composição dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Tabela 22: Composição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade

relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Tabela 23: Composição dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Tabela 24: Composição do óleo essencial de *Citrus sinensis* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adesina Trifosfato
BHA	β -Hidroxiácido
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CBP-BI	Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1,-difeníl-2-picríl-hidrazil
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
SFB	Soro Fetal Bovino
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
HaCat	Linha celular de queratinócitos humanos
IFSCC	International Federation of Societies of Cosmetics Chemists
ISO	International Standard Organization
MTT	Metiltiazolildifeníl-tetrazólio Bromido
PBS	Solução Salina com Tampão Fosfato
PG	Propil Galato
RCF	Força Centrífuga Relativa
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
TBHQ	Terc-butíil-hidroquinona

Folha em branco

Comunicações científicas apresentadas no âmbito desta dissertação

Batista, C.; Rolo, J., Luís, Â., Oliveira, AS., Gaspar C., Palmeira-de-Oliveira, R.; Martinez-de-Oliveira, J.; Palmeira-de-Oliveira., “Study of cytotoxicity and antioxidant capacity of essential oils of interest for the cosmetic industry”. Comunicação em Poster. III Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, Castelo Branco, Portugal – 24 a 26 de março 2022.

Batista, C.; Rolo, J., Luís, Â., Oliveira, AS., Gaspar C., Palmeira-de-Oliveira, R.; Martinez-de-Oliveira, J.; Palmeira-de-Oliveira., “Study of the stability of the antioxidant activity of essential oils with interest for the cosmetic industry”. Comunicação Oral. XVII Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal – 20 a 21 de julho 2022.

Folha em Branco

Capítulo 1

Introdução

1.1. Cosméticos

Uma das grandes questões que se tem colocado na comunidade científica é quando datar a primeira vez da utilização de cosméticos. [1,2] Todavia, durante escavações arqueológicas confirmou-se que o uso de cosméticos remonta à idade da pedra, quando o homem utilizava cores para atrair animais bem como marcar o homem, pintando a sua pele. [1,3] Assim, pode afirmar-se que desde a sua origem, a cosmética tem vindo a evoluir e a acompanhar as necessidades do homem conforme a sua evolução. [2] Em relatos sobre o antigo Egito demonstra-se que esta civilização recorria ao uso de óleos como uma forma de proteção contra os elementos da natureza, como queimaduras solares, mas também contra a secura da pele provocada pelo vento e irritações por picadas de insetos. [1,2,4] A ligação dos cosméticos com a religião tem também a sua relevância, dependendo assim também de muitas das tradições análogas à mesma. [1,2,3]

Desde a antiguidade que o ser humano tem o hábito de sujeitar as suas partes externas do corpo a diversas modificações, devido a diversos fatores, com a finalidade de melhorar a hipótese de sucesso tanto laboral como social, inclusive nas suas relações interpessoais. Assim, pode-se afirmar que estas modificações têm como fim um aumento na autoestima do ser humano. Deste modo, o uso de cosméticos encontra-se associado a um contexto diferente na sociedade atual em relação às sociedades primordiais. [2] Uma vez que a aparência desempenha um papel relevante tanto para o bem-estar físico como social, tal como anteriormente referido, esta reflete-se em indivíduos que possuem uma capacidade mais positiva de inserção na sociedade, sendo considerados mais cooperativos em múltiplos níveis da sociedade. Por conseguinte, os cosméticos nos dias que correm são utilizados para higiene pessoal, proteção contra fatores ambientais, prevenção do envelhecimento, e de uma forma genérica ajudar os indivíduos a possuírem uma vida mais plena e satisfatória. [1,2].

Ao longo do tempo a importância dos cosméticos foi aumentando bem como a sua utilização no quotidiano da sociedade atual. [2] Posto isto, as grandes empresas dedicadas à produção de cosméticos geram mil milhões de euros em receitas durante um ano.[4] Com o crescente aumento do mercado ao nível da indústria cosmética é fundamental que ocorra um controlo e monitorização constante desta, no que concerne a possíveis ingredientes tóxicos como também na necessidade de suprimir e colmatar as exigências crescentes do consumidor atual na criação de novos produtos. [5]

1.1.1 Legislação e definição de cosméticos

Derivada da palavra grega “kosmtikos” que significa “habilidade na decoração” ou “adorno” surge a palavra cosméticos.[3,4] Um produto cosmético, de acordo com o Artigo 2.1 (a) do Regulamento Europeu nº1223/2009, é definido como “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais”. Para além disto, o documento refere ainda a definição de substância, no Artigo 2.1 (b) como “um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de fabrico, incluindo todos os aditivos necessários para preservar a sua estabilidade e todas as impurezas derivadas do processo utilizado, mas excluindo todos os solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição”, já no Artigo 2.1 (c) encontra-se a definição de mistura uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias”. [6] Em suma, de uma forma genérica, um cosmético é qualquer preparação complexa, uma vez que na sua constituição podem ser encontradas distintas substâncias bem como elementos específicos, destinada a ser usado no corpo humano (pele, olhos, boca, cabelo ou unhas) com o intuito de melhorar a aparência da pele e do odor corporal, mas também com o objetivo de proteger o mesmo. [1,7,8]

Em resposta à procura de retardar o envelhecimento e ao mesmo tempo prevenir o aparecimento de problemas de saúde, as diversas indústrias ligadas ao setor, entre elas, a química e a farmacêutica, encontram-se sob pressão. Deste modo, surge o termo “cosmecêutica” que resulta da simbiose de produtos cosméticos com produtos farmacêuticos, de uma maneira geral, é definido como cosmética que possui ação terapêutica. Este conceito é assim uma integração interdisciplinar da física, química e biologia. [4]. Englobando produtos que contêm funções relacionados com a pele, possuindo um efeito benéfico na mesma, todavia não se considera que tenham um efeito terapêutico biológico. [4,5,7,8] Contudo, este termo ainda provoca controvérsia entre a comunidade científica pois ainda não apresenta um estatuto legal. [5]

Todos os cosméticos licenciados não podem de forma alguma alterar ou danificar o equilíbrio fisiológico da pele do ser humano, conseqüentemente todos os produtos assim devem ser considerados seguros aquando da sua utilização. [1] Com o surgimento de novos ingredientes e com a acelerada industrialização foi de extrema importância a criação de inúmeras diretivas e regulamentos com o intuito de controlar a utilização dos ingredientes garantindo assim a segurança do consumidor. Ao nível mundial apenas três

regulamentos representam os principais mercados cosméticos, nomeadamente a União Europeia, Japão e Estados Unidos. [1,5,6]

1.1.2. Antioxidantes na cosmética

A cosmética de aplicação tópica tem como finalidade proteger a pele humana contra os danos causados por diversas causas, entre elas, a radiação ultravioleta (UV) e pelos radicais livres. Estes danos são denominados danos oxidativos podendo ter uma origem endógena, caso ocorra uma desregulação no sistema enzimático com função antioxidante ou exógena, provenientes da consequência da exposição a determinados fatores ambientais, como o tabagismo, poluentes ambientais ou radiação. É de salientar que os danos oxidativos são considerados como uma das causas primárias no que diz respeito ao envelhecimento da pele. [7,9]

O oxigénio biológico sofre uma série de reações de redução durante o processo de respiração celular para formar energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), pois é o aceitador de eletrões na cadeia transportadora de eletrões. Todavia, quando surgem problemas no fluxo de eletrões, são gerados radicais livres, inclusive espécies reativas de oxigénio (ERO). No entanto, os radicais livres também podem ser derivados do azoto e do enxofre. [9,10]

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um eletrão livre na sua camada mais externa, sendo consequentemente bastante instáveis e reativos que, facilmente reagem com biomoléculas como lípidos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos com o propósito de atingir a estabilidade. [7,9-10]

A produção de ERO é contínua e espontânea uma vez que são subprodutos do metabolismo celular, principalmente do processo de respiração celular que ocorre na mitocôndria. No entanto, as concentrações fisiológicas podem ser considerados fundamentais para a função celular normal. Assim, a formação de ERO é crucial para a manutenção da homeostase celular, sendo isto conseguido através de um sistema de defesa antioxidante intrínseco que permite manter um equilíbrio entre a produção e a eliminação destas espécies reativas, protegendo assim o organismo de danos oxidativos gerados pela sua acumulação. Contudo, quando há uma desregulação do sistema de defesa antioxidante intrínseco, quer por uma produção excessiva de ERO, quer por uma deficiência do sistema antioxidante, surge o designado stresse oxidativo. Este fenómeno desregula uma série de funções celulares através da oxidação de diversas biomoléculas, que quando ocorre em células da pele pode provocar uma diminuição da capacidade de

auto-renovação, perda da elasticidade, pigmentação, refletindo o envelhecimento deste órgão. [7,9,10]

Desta forma, a adição de antioxidantes em cosméticos de aplicação tópica, é necessária para manter a quantidade de antioxidantes na pele. Assim, a estes antioxidantes dá-se o nome de antioxidantes exogénes. No entanto, para além de aplicação tópica podem ser administrados por via oral ou por via da dieta. Estes têm como principal função a proteção da pele dos danos causados pelas reações de oxidação, mas também de reparar possíveis danos que possam já existir. [9-12]

Presentes nas preparações cosméticas, os antioxidantes possuem duas funções, atuam como ingredientes ativos, sendo que para isto é necessário estes serem estáveis, mas também como protetores de outros ingredientes contra a oxidação. Os antioxidantes devem permanecer estáveis no produto, não reagindo com outras substâncias. [7,9,11]

Mediante o seu modo de atuação, os antioxidantes podem ser classificados como primários, se atuarem diretamente sobre os radicais livres doando-lhes um átomo de hidrogénio que resulta numa substância mais estável, ou como secundários, se reagem com determinadas enzimas iniciadoras da formação de ERO ou com o oxigénio iniciador da cadeia, retardando a taxa da reação que forma as ERO, eliminando os iniciadores. Os antioxidantes possuem diferentes modos de atuação, podem prevenir a criação de ERO, sequestrar energia e eletrões e por fim podem ativar ou desativar radicais livres que participem na formação dos mesmos. [1]

1.1.2.1. Antioxidantes sintéticos

Na perspetiva de se obter um sistema padrão de medição da atividade antioxidante para comparar com os antioxidantes naturais, surgem os antioxidantes sintéticos. [10,12]

Os antioxidantes sintéticos são utilizados na indústria em vez dos naturais, uma vez que o seu custo é mais baixo, possuem uma vasta disponibilidade, mas também são considerados bastante estáveis e com um bom desempenho em relação à sua função. Entre os mais usuais encontram-se o β -hidroxiácido (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG).[13]

Tanto o PG como o TBHQ são muito utilizados na indústria alimentar, uma vez que são reconhecidos como antioxidantes seguros para proteger óleos, gorduras e alimentos contra a formação de peróxidos. O TBHQ quando sujeito a elevadas temperaturas possui uma alta estabilidade sendo considerado o melhor antioxidante para óleos que se destinem a fritura. O PG atua sinergicamente tanto com o BHA como o TBHQ, contudo não é muito resistente ao calor, apresentando, no entanto, uma considerável solubilidade

em água. É de realçar que o uso do PG remonta a 1948 sendo encontrado com a função de estabilizador de alimentos, materiais de embalagem de cosméticos. Em relação ao BHA, este é uma mistura de dois isómeros (2-BHA e 3-BHA) e é caracterizado por ser insolúvel em água e possui um efeito sinérgico com o PG e o BHT. Relativamente a este último, o BHT possui propriedades bastante similares ao anterior, porém não se mostra tão eficaz devido à presença de dois grupos butil que resulta num maior impedimento estereoquímico que o BHA. [10,14-15]

Apesar de os antioxidantes sintéticos serem muito estudados principalmente no que se refere à sua toxicidade inerente, recentes estudos mostram que a ingestão destes a longo prazo levanta sérios problemas de saúde em consequência da sua carcinogénese, inclusive já se demonstrou que os antioxidantes BHA e BHT são responsáveis por efeitos adversos a nível hepático. [10,12-13,16] Esta conclusão é corroborada por XU et al. uma vez que afirmam que tanto o BHA como o BHT e consequentemente os seus metabolitos possuem toxicidade em células hepáticas de ratos, induzindo carcinogénese. Nesta ótica, a tendência para substituir os antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais tem vindo a ter um forte crescimento, principalmente na indústria cosmética. [17]

1.1.2.2. Antioxidantes naturais

Na perspetiva de responder às exigências do consumidor devido a uma maior sensibilização do mesmo para questões ambientais e para produtos com rótulos mais limpos e ingredientes naturais, a indústria tem vindo a diminuir o uso de substâncias sintéticas e a recorrer à sua substituição por alternativas naturais. Assim, a utilização de extratos de plantas está cada vez mais em voga em diversos produtos cosméticos comerciais. [10,13,16,18]

As plantas são consideradas uma fonte de antioxidantes naturais uma vez que os compostos fenólicos nelas presentes são responsáveis pela sua atividade antioxidante, e estes podem provir de todas as partes das plantas, como por exemplo, frutas, raízes, casca e folhas. Para além de produzirem compostos fenólicos vegetais, as plantas produzem um espetro de metabolitos secundários como alcaloides, terpenos, terpenoides entre outros. É de realçar que todos os metabolitos desempenham um papel importante na proteção da planta contra efeitos indesejáveis. [10,16]

A maioria dos compostos fenólicos para além de serem caracterizados como compostos bioativos no reino vegetal, também estão integrados na dieta humana, sendo consumidos como preparações medicinais. Conhecidos pela sua função protetora, os compostos fenólicos possuem uma vasta gama de propriedades biológicas como antioxidante,

antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-mutagénica, e o conjunto destas resulta nos efeitos protetores para a saúde. [10,16]

Apesar de os compostos fenólicos serem o principal grupo de antioxidantes naturais, existem mais duas classes de compostos de extrema relevância, as vitaminas e os carotenoides ou tetraterpenos. [13]

Da classe das vitaminas destacam-se as vitaminas, A, E e C. Esta última para além de ser um forte antioxidante também é usada em cosméticos de ação tópica pois tem a função de despigmentação, sendo ainda um importante cofator de determinadas enzimas para a formação de colagénio. A vitamina E é considerada a principal antioxidante da fase lipídica do corpo humano, existindo oito formas moleculares distintas, sendo que todos estes isómeros se encontram disponíveis na dieta. Contudo, o ser humano recorre principalmente ao isómero α -tocoferol, tendo em vista a sua principal função, a de prevenir a peroxidação lipídica. Foi demonstrado que a aplicação tópica da vitamina E restaura a defesa antioxidante da pele. É de realçar que estudos relacionaram a vitamina C com a vitamina E pois, apresentam uma relação de co-dependência, ou seja, a vitamina C previne a oxidação da vitamina E, resultando assim também numa regeneração e reciclagem da atividade da última. [9,19]

Em relação aos carotenoides estes são caracterizados por serem pigmentos produzidos naturalmente pelas plantas, sendo o β -caroteno um dos mais conhecidos. Estudos indicam que os carotenoides têm como principal função proteger o ser humano de danos causados pela radiação ultravioleta. [19]

Em suma este espetro de compostos é habitualmente utilizado em produtos cosméticos como princípio ativo contra o envelhecimento da pele. Como muitos destes compostos têm origem vegetal visto que são produzidos pelas plantas podem ser considerados extratos com potencial na criação de formulações cosméticas de aplicação tópica. [9,19]

1. 2. Óleo Essencial

A Organização Internacional para a Padronização (*ISO*) define que um óleo essencial pode ser obtido por um processo de destilação de qualquer parte de uma planta, sendo a mais comum a hidrodestilação, ou da expressão da casca quando se refere a citrinos. [20-25]

Os óleos essenciais geralmente são extraídos de variadas plantas aromáticas que usualmente se localizam em países de zonas temperadas e tropicais, como os países

mediterrâneos, representando uma fração importante nas farmacopeias tradicionais. [20-25]

Os óleos essenciais são considerados uma mistura complexa e heterogênea de compostos bioativos, caracterizada por ser líquida, volátil, com um forte odor distintivo, geralmente a sua densidade é inferior à da água, não sendo solúveis em água, sendo conseqüentemente solúveis em compostos orgânicos.

Os compostos bioativos resultantes do metabolismo secundário das plantas, pertencem, principalmente à família dos terpenos, englobando monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e tetraterpenos. No entanto, um outro grupo que se pode encontrar na sua constituição é o grupo dos compostos aromáticos e alifáticos. Tanto a família dos terpenos como os compostos aromáticos são caracterizados por possuírem um baixo peso molecular. Usualmente, a mistura pode conter na sua constituição aproximadamente entre 20 a 60 compostos, todavia entre estes, destacam-se sempre dois ou três compostos maioritários em concentrações mais elevadas, entre 20 a 70%. A composição química que posteriormente vai resultar na qualidade do óleo essencial depende de inúmeros fatores entre eles, altura da colheita, parte da planta utilizada, localização, composição do solo, clima, mas também com o método de obtenção do óleo. [18,23]

Os metabolitos secundários são sintetizados por todos os órgãos vegetais sendo que, posteriormente, são armazenados em células secretoras e epidérmicas, cavidades, canais ou tricomas glandulares, que se encontram presentes em várias partes da planta como flores, raízes, frutos, folhas, entre outras. A técnica de eleição para analisar a composição dos óleos essenciais é a cromatografia gasosa, dado que fornece informação sobre os compostos e a percentagem correspondente aos mesmos em relação ao total de compostos, surge ainda, diversas vezes, associada à espectrofotometria de massa. [20,23,26] Apesar de se pressupor empiricamente que as atividades biológicas inerentes aos óleos derivam dos compostos maioritários, o mesmo pode não acontecer, pois tem de se ter em mente que os óleos são uma mistura de compostos que não podem ser vistos de forma individual. Os compostos minoritários também são responsáveis pelo odor, textura entre outras características que indireta ou diretamente têm influência nas bioatividades associadas aos óleos essenciais. Deste modo, para a realização de testes biológicos tem de se considerar um óleo como um todo, e não como compostos individuais, devido ao efeito sinérgico entre todos os compostos. [22-23]

1.2.1. Aplicações de óleos essenciais

A utilização de óleos essenciais remonta aos tempos do antigo Egito onde as mulheres os utilizavam devido ao facto de possuírem um odor doce e delicado com a finalidade de melhorar esteticamente a sua feminilidade. Além disso, a civilização egípcia também recorria ao uso de óleos essenciais em cerimónias religiosas, em cosmética e para fins medicinais. Assim, considera-se que o antigo Egito corresponde ao início da utilização de óleos essenciais. Posteriormente, estas práticas foram adotadas tanto pelas mulheres gregas como as romanas. Por volta da mesma época o uso de plantas aromáticas passou a ser incorporado no sistema médico ayurvédico indiano. Já na Europa, o uso de óleos essenciais remonta ao Renascimento quando estes se começaram a usar em aromaterapia. [20,21]

Associados às plantas aromáticas e aos seus óleos encontram-se inúmeros fins terapêuticos, como por exemplo, alívio da dor, cuidado da pele, alívio da tensão e relaxamento, sendo que para isto podem ser inalados, difundidos ou massajados na pele. [27] Atualmente, os consumidores são sujeitos à ansiedade, assim a aromaterapia visa ter um efeito ansiolítico, desta forma o óleo essencial de lavanda, através da inalação numa quantidade de 2 gotas em 30 minutos, resultou numa diminuição da ansiedade, da mesma forma tem um efeito positivo sobre a latência, duração e qualidade do sono, a . Os resultados para uma eficácia maior no que diz respeito ao relaxamento e à sedação bem como na redução da ansiedade e stresse foram encontrados quando se utiliza uma mistura de óleo essencial de lavanda e óleo de bergamota. Um óleo essencial que tem vindo a atrair interesse devido às suas ações sedativas e relaxantes. Foi demonstrado que este óleo essencial devido à sua composição, onde predomina o limoneno possui uma atividade depressora no sistema nervoso central. Em períodos de exposição prolongado à dor foi constatado que a aromaterapia com óleo essencial de lavanda levou a uma diminuição substancial do índice de dor dos doentes. [28-29]

Nas últimas décadas o consumidor tem vindo cada vez mais a preocupar-se com os possíveis riscos dos ingredientes sintéticos nas formulações na saúde humana. Assim, com o crescente aumento por parte dos consumidores por produtos naturais, as indústrias farmacêutica e cosmética têm vindo a ser pressionadas a procurar alternativas às substâncias sintéticas ao incorporar nos produtos substâncias de origem natural com a mesma função e eficácia, dando assim valor a substâncias cuja utilização remonta à antiguidade, como os óleos essenciais. [18,20,28]

Os óleos essenciais para além de terem um papel importante na proteção das plantas de que são extraídos, apresentam um espectro de atividades biológicas tais como: antisséptica,

anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana e antioxidante, o que os torna ingredientes promissores para incorporar em produtos cosméticos. [18,20,28]

Embora nos produtos cosméticos, os óleos essenciais sejam empregues pelo seu aroma, estando presentes como ingredientes em formulações de aplicação tópica e capilar, inúmeros óleos apresentam uma atividade de extrema importância para a cosmética, a propriedade antioxidante. Nesta ótica, na área da cosmética surgiu um novo termo que é a junção de produtos cosméticos com produtos farmacêuticos, resultando em produtos cosméticos com propriedade farmacológicas, assim alia-se o poder das atividades biológicas dos óleos essenciais aos produtos cosméticos, resultando numa melhoria da saúde e da beleza, sendo que estes produtos têm cada vez mais procura por parte do consumidor ao longo dos anos. Alguns óleos essenciais já são utilizados com diferentes finalidades, entre as quais, reparar e combater o envelhecimento da pele, proteção dos dentes, melhorar o odor quando aplicados em desodorizantes, perfumes, entre outras. [23,27-28]

Em suma, os óleos essenciais mostram-se como potenciais substâncias para produtos de origem natural, visto que o conjunto das suas propriedades os tornam deveras atrativos para a indústria cosmética, com o propósito de colmatar os atuais interesses e necessidades dos consumidores. [28]

No entanto, é de realçar que os consumidores pressupõem o princípio de que o natural é seguro, porém desconhecem frequentemente que os produtos naturais são constituídos por misturas complexas de diversos compostos químicos que podem resultar em reações adversas. Deste modo, é necessário caracterizar quimicamente os extratos naturais em relação à sua composição, potencial citotóxico e determinar a atividade antioxidante. [7,10,16]

1.2.2. Óleos essenciais como antioxidantes

Os óleos essenciais são fontes naturais de alguns compostos fenólicos o que levou a comunidade científica a avaliar e a estudar a atividade antioxidante dos mesmos. No entanto não se pode apenas relacionar a atividade antioxidante aos compostos fenólicos, mas sim ao conjunto de compostos presentes na sua constituição, havendo assim um efeito sinérgico entre todos os compostos. [7,11]

Para que um antioxidante possa funcionar como ingrediente ativo é necessário que seja estável, dado que problemas de estabilidade acarretam problemas na formulação do cosmético. Desta forma, é necessário otimizar a concentração do antioxidante selecionado,

e para além disto a sua coloração e propriedades não devem sofrer alterações no processo de produção e armazenamento. Por tudo isto, é necessário determinar e avaliar a capacidade antioxidante por diversos métodos para assim se resolverem as inúmeras questões relativas à sua atividade. [7]

Geralmente, para a determinação *in vitro* da atividade antioxidante são utilizados métodos espectrofotométricos, sendo que estes se baseiam na reação entre antioxidante com radicais livres, e podem ser classificados em duas classes conforme estas reações. A primeira categoria baseia-se na transferência de um eletrão (ET) e a segunda classe tem como base a transferência de um átomo de hidrogénio (HAT). Os ensaios da primeira classe são baseados na medição da capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, este irá mudar a sua coloração aquando da sua redução e esta mudança depende da sua concentração na amostra. Os métodos HAT baseiam-se na capacidade de um antioxidante doar átomos de hidrogénio ao radical livre inativando o mesmo. [7,10]

Entre os métodos ET ressalta o método de sequestração do DPPH. Este é um radical livre de coloração roxa, caracterizado por uma banda de absorção a 517 nm. Se na amostra estiver presente um antioxidante, este ao reagir com o radical DPPH, vai reduzi-lo resultando numa alteração da cor roxa para amarela. O método é considerado como um ensaio simples, fácil, económico e eficaz que requer pequenas quantidades de amostra, neste caso, óleo essencial, por ensaio o que o torna um método rentável, sendo considerado como um dos métodos indiretos mais antigos para a determinação da atividade antioxidante. [7,10]

O sistema β -Caroteno/Ácido linoleico pertence à categoria dos métodos HAT. Este método consiste na oxidação do β -Caroteno induzida por produtos resultantes da degradação oxidativa do ácido linoleico, permitindo estimar a capacidade de compostos antioxidantes presentes, neste caso os óleos essenciais, de sequestrar o radical peróxido do ácido linoleico LOO•. Assim, pode-se afirmar que este ensaio determina a capacidade dos antioxidantes presentes numa amostra em retardar ou inibir a peroxidação lipídica. [10,62]

Desta forma, os óleos essenciais apresentam-se como potenciais agentes antioxidantes de origem natural induzindo um interesse das indústrias cosméticas e farmacêutica em substituir os antioxidantes sintéticos por antioxidantes de origem natural, originando produtos mais naturais, tão procurados pela sociedade atual, com o objetivo de não combater apenas a oxidação natural que a que o produto está sujeito, mas também para prevenir o stresse oxidativo resultante do envelhecimento da pele. [11,22]

1.2.3. Citotoxicidade dos óleos essenciais

O uso de ingredientes naturais, como os óleos essenciais, em formulações, está cada vez mais em voga, para o tratamento de distúrbios dermatológicos como, inflamação, acne, dermatite atópica, entre outros. Por terem uma origem natural, a conotação de segurança é muitas vezes atribuída, contudo está relatado que inúmeros extratos de plantas provocam efeitos adversos sobre o corpo humano, entre eles, fenómenos de irritação cutânea, sensibilização de contacto ou reações alérgicas. [23,30]

O estudo da toxicidade celular, designada também por citotoxicidade, é o ensaio *in vitro* utilizado regularmente quando se pretende estudar o potencial tóxico de uma determinada substância, neste caso, óleo essencial, com o propósito de avaliar o potencial do ingrediente ser incorporado numa formulação cosmética de aplicação tópica. Os testes de citotoxicidade baseiam-se na estimulação direta de camadas de células com diversas concentrações da substância, da qual se pretende analisar o perfil citotóxico. As células destinadas a este tipo de ensaio são linhas celulares como fibroblastos e queratinócitos, sendo esta última representante da camada mais externa da pele, a epiderme. [30,31]

O carácter lipofílico característico de óleos essenciais confere-lhes a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática resultando num desregulamento da estrutura das distintas camadas que a constituem, fosfolípidos, polissacarídeos e ácidos gordos e consequente permeabilização destas biomoléculas. Assim, pode-se afirmar que nas células eucarióticas, os óleos essenciais provocam a despolarização das membranas das mitocôndrias, induzindo uma diminuição no potencial de membrana, uma desregulação de diversos canais iónicos, redução do pH, um colapso da bomba de prótons e como consequência a depleção da *pool* de ATP. Como resultado da alteração da fluidez da membrana, esta torna-se anormalmente permeável, levando a uma perda de radicais, citocromo C, iões e proteínas, originando stress oxidativo e uma falha bioenergética, culminando em morte celular por apoptose e necrose. [23] O óleo essencial de *Citrus sinensis* possui toxicidade nas seguintes linhas celulares, HGF (fibroblastos gengivais humanos primários), HeLa (linha imortal humana do cancro cervical) mas também na linha celular do cancro da mama MCF-7 (Kammoun et al. 2021, Alexa VT et al. 2022). No que se refere ao óleo essencial de *Ocimum basilicum* este é citotóxico para a linha celular do cancro do colón e do adenocarcinoma colorretal, HT-29 e Caco-2, respetivamente (Dolghi et al. 2021). O óleo essencial de *Origanum vulgare* em múltiplos estudos demonstrou ser citotóxico para a linha celular do hepatoma humano, HepG2, e para a linha do adenocarcinoma gástrico humano, AGS (Lombrea et al. 2020, Elshafie et al. 2017). Por fim, em relação ao óleo essencial de *S. aromaticum*, Alexa VT et al. (2022) mostraram que este óleo essencial entre os outros estudados foi o mais citotóxico na linha

celular HGF (fibroblastos gengivais humanos primários). É de salientar que no mesmo estudo realizado por Alexa VT et al. (2022), o óleo essencial de *C.sinensis* foi o mais biocompatível.

Em suma, é necessário traçar o perfil citotóxico dos óleos essenciais antes da sua incorporação em formulações cosméticas de aplicação tópica, nunca esquecendo que a toxicidade pode variar entre óleos essenciais da mesma espécie de planta, conforme as condições de crescimento da planta e sobre as quais se realiza a extração do óleo essencial.

Para se realizar o estudo da atividade citotóxica de um óleo essencial pode-se recorrer a diversos métodos *in vitro*, entres eles, o método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT – *Microculture Tetrazolium Assay*). Este tem como base a redução do sal de tetrazólio por enzimas mitocondriais em cristais insolúveis de formazano que apresentam uma coloração roxa característica. Sendo impermeáveis às membranas celulares, estes vão acumular-se no interior das células, que se vai traduzir no número de células metabolicamente viáveis, sendo deste modo considerado um método indireto na avaliação da toxicidade celular dos óleos em estudo. [38]

1.3. Plantas aromáticas com interesse na cosmética

As plantas aromáticas e medicinais são consideradas uma fonte de diversos compostos bioativos que possuem ação medicamentosa em tratamentos tradicionais. Além disso, as plantas aromáticas constituem uma fonte de óleos essenciais, que devido às suas características a nível do aroma e sabor são diversas vezes utilizados. Atualmente são amplamente utilizadas na produção de corantes naturais, perfumes, indústria alimentar e cosmética. [39,40]

Existem 400.000 espécies conhecidas de plantas aromáticas e medicinais, das quais aproximadamente 2000 espécies derivam de 60 famílias que possuem óleos essenciais, como por exemplo a família *Lamiaceae* e *Myrtaceae*. [39,40]

Na indústria cosmeceútica, diversos óleos têm sido utilizados especialmente o de laranja devido às suas propriedades, sendo assim os óleos da família *Citrus* s os responsáveis pela maior parte dos sabores e fragâncias naturais. [39,40]

Tanto as plantas da família *Lamiaceae* como da família *Myrtaceae* são amplamente usadas em perfumaria e cosmética devido às suas fragâncias. Na família *Lamiaceae* pode-se encontrar a espécie *Origanum vulgare* e a espécie *Ocimum basilicum*. Pertencente à

família *Myrtaceae* encontra-se a espécie *Syzygium aromaticum*. Todas estas espécies são conhecidas devido às propriedades dos seus óleos essenciais. [39,40]

1.3.1. *Syzygium aromaticum*

Pertencente à família *Myrtaceae*, o género *Eugenia* é oriundo da Austrália e dos Trópicos, como a América Tropical. Estas plantas são frequentemente conhecidas por serem ricas em óleos essenciais possuindo um longo espetro de bioatividades, como por exemplo, anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobiana, entre outras. [41-43]

Syzygium aromaticum L. ou *Eugenia caryophyllata*, mais vulgarmente conhecido como Cravinho, em Portugal (Figura 1), é uma das especiarias mais utilizadas em diversas partes do mundo. Caracterizada por ser uma planta aromática nativa da Indonésia, atualmente é plantada em várias partes do mundo como a Índia, China e Indonésia. [41-43]

Com uma altura de 10 a 20 metros, com folhas em forma de lança e flores amareladas, a planta *Syzygium aromaticum* L. é caracterizada pelo seu cheiro fenólico forte e um gosto acentuado, contudo o seu óleo essencial é um líquido incolor ou de coloração amarela extraído dos botões secos das flores. [41-43]

Historicamente *Syzygium aromaticum* L. era usado como forma de pagamento a trabalhadores do antigo Egipto. Atualmente é utilizado na medicina tradicional para o tratamento da diarreia, gastrite, mas também como antipirético, ansiolítico, analgésico e anti-inflamatório. Já o botão floral é usado para o tratamento de diversas doenças alérgicas, e em determinados países asiáticos é utilizada para o tratamento de dores de cabeça, dentárias e respiratórias. O seu uso vai desde a incorporação deste em medicamentos indianos (ayurvédicos), chineses, unani e de medicamentos que têm por base plantas ocidentais. [41-43]

Estudos prévios reportaram que o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. é um potente antifúngico, anticarcinogénico, antialérgico e possui atividade antimutagénica. O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. demonstrou ter capacidade para inibir o crescimento dos seguintes fungos, *Candida albicans* como constatado por Cox et al., *Tricophyton mentagrophytes* como foi comprovado por Tampieri et al. Em relação à sua atividade como anticarcinogénico foi reportado por Zheng et al., e potencial antimutagénico demonstrado por Miyazawa and Hisana. É de salientar que Namiki comprovou que o eugenol (composto maioritário do óleo essencial de cravinho) induziu apoptose em células cancerígenas humanas, contudo mais recentemente Ogunwande et al

e Yoo et al. evidenciaram que este óleo essencial possui ação contra as linhas celulares tumorais humanas PC-3 e Hep G2. [44-46]

O cravinho representa uma das maiores fontes vegetais de compostos fenólicos, como flavonoides, ácido hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico. O eugenol é o composto maioritário desta planta aromática. Este é descrito como um composto com interesse uma vez que é capaz de inibir mediadores pró-inflamatórios, reduzir a síntese de prostaglandinas, induzir a apoptose por reduzir citocinas inflamatórias, mas também de inibir a formação de radicais livres e prevenir o aparecimento de mutações nas células.

Além disso, devido à sua fragrância, o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* L. apresenta um elevado interesse devido ao seu potencial para ser integrado numa formulação cosmética como ingrediente, pois apresenta um vasto leque de bioatividades relevantes para a indústria cosmética. [41-43]



Figura 1: Fotografia de *Syzygium aromaticum* (Jardim botânico UTAD).

1.3.2. *Ocimum basilicum*

O género *Ocimum* pertencente à família *Lamiaceae* compreende mais de 150 espécies distribuídas pelas regiões temperadas do globo. A família *Lamiaceae* é conhecida devido às propriedades medicinais que lhe são associadas. As espécies desta família oriundas da região do mediterrâneo são utilizadas desde a antiguidade tanto na culinária como especiaria e na medicina popular. [47-51]

O *Ocimum basilicum* mais habitualmente designado como manjeriço (Figura 2) é caracterizado por ser uma planta perene e de cultivo em várias zonas do globo como Europa, América, Austrália e Leste da Ásia. [47-51]

Para além de ser usado como especiaria, o *O. basilicum* tem sido utilizado na medicina popular como anti-inflamatório e analgésico. Historicamente, o seu uso está associado à medicina Uyghur para prevenir e tratar diabetes e problemas cardiovasculares. Já na medicina indiana Siddha o objetivo de usar *O. basilicum* era como forma de tratamento de acne. Tradicionalmente, a sua utilização está associada ao tratamento de dores de cabeça,

diarreia e disfunções renais. Contudo, também é utilizado na indústria farmacêutica bem como na indústria da perfumaria. [47-52]

Recentemente o interesse do óleo essencial proveniente da planta *O. basilicum* tem vindo a sofrer um crescente aumento pois este óleo demonstra potencial como antimicrobiano e antioxidante. [47-51]

O óleo essencial de *O. basilicum* exibe um largo espectro de compostos químicos que dependem de inúmeros fatores tais como origem da planta, cor da folha entre outras. Todavia, de um modo geral, pode afirmar-se que o composto maioritário é o monoterpene linalool. Este está associado a diversas bioatividades entre elas, atividade antioxidante, anti-inflamatória, mas também anticancerígena. [47-51]

As múltiplas atividades biológicas relacionadas com o óleo essencial de *O. basilicum* juntamente com o seu aroma, tornam este óleo essencial como uma potencial fonte de utilizações benéficas tanto na aromaterapia como na indústria da perfumaria. [47-51]



Figura 2: Fotografia de *Ocimum basilicum* (Jardim botânico UTAD).

1.2. *Origanum vulgare*

Derivado de uma palavra grega surge a designação da espécie *Origanum vulgare*, pertencente à família *Lamiaceae*. Esta espécie é nativa da região do Mediterrâneo, é considerada uma planta aromática perene com 30 a 50 cm de altura, a sua flor possui uma coloração branca ou roxa e as suas folhas são dentadas. [51,53-56]

A espécie *O. vulgare* é vulgarmente conhecida como orégãos (Figura 3), erva aromática muito utilizada na cozinha como condimento, é cultivada a altitudes de 400 a 1800 metros em lugares ensolarados. [53-56]

Na antiguidade, apesar de ser utilizado na culinária, *O. vulgare* era também usado na medicina tradicional devido aos seus efeitos na saúde, nomeadamente contra problemas respiratórios, mas também para tratar constipações, indigestões e como antisséptico.

Historicamente, a planta tem sido utilizada em preparações medicinais com a finalidade de tratar problemas menstruais e tosse. Frequentemente é utilizado como lavagem para dermatoses, tratamento da hepatite, artrite e reumatismo. As folhas são usadas como tratamento de problemas pulmonares e renais, por meio de um chá medicinal. [53-56,52]

O óleo essencial de *O. vulgare* é constituído por uma diversidade de compostos e a concentração destes depende de vários fatores como a localização geográfica, a parte da planta usada, da espécie e do método de extração. Porém, o composto maioritário é o carvacrol. Caracterizado por ser um monoterpene, o carvacrol, possui diversas atividades biológicas, entre elas a atividade antioxidante uma vez que este previne a oxidação de lípidos, apesar disso o seu uso não é recomendado como conservante alimentar pois possui um odor forte afetando as propriedades organolépticas dos alimentos. Contudo, o óleo essencial desta planta aromática é reconhecido por possuir atividade antisséptica, inseticida, entre outras. [53-56]

Em virtude das bioatividades acima enumeradas, o óleo essencial de *O. vulgare* possui um elevado interesse como ingrediente a incluir numa formulação cosmética. [53-56]



Figura 3: Fotografia de *Origanum vulgare* (Jardim botânico UTAD).

1.3. *Citrus sinensis*

O género *Citrus* pertence à família *Rutaceae*, sendo considerado o género com mais relevância no cultivo de árvores de fruto do mundo. [57-62]

A espécie *Citrus sinensis*, mais usualmente designada pela árvore de fruto Laranja (figura 4), representa um dos maiores grupos cítricos cultivados globalmente, sendo responsável por 70% da produção total de espécies de *Citrus*. Proveniente da Ásia, atualmente é cultivada por todo o Pacífico e zonas quentes do mundo. A laranja é assim uma árvore de fruto perene que tem a capacidade de se adaptar a variados climas. A árvore tem de altura 9 a 10 metros, com espinhos nos ramos. O pericarpo é constituído por pequenas glândulas de óleo aromático responsáveis pelo cheiro característico da laranja. [57-62]

Consumida por ser uma reconhecida fonte de vitamina C, que é um poderoso antioxidante, o seu uso traduz-se em tratamentos para doenças como cólicas, obstipação, diarreia, distúrbios menstruais, depressão, entre outros. [57-62]

O óleo essencial de *C. sinensis* é caracterizado por possuir várias atividades biológicas, tais como antifúngica, antioxidante, anti-proliferante, sedativa, ansiolítica, entre outras. [57-62]

C. sinensis é rica em compostos resultantes do metabolismo secundário muitas vezes responsáveis pelas propriedades reconhecidas ao fruto. O óleo essencial de *C. sinensis* possui na sua constituição, o monoterpeno, *D*-limoneno, sendo esta a forma ativa do limoneno. Este composto é responsável por diversas bioatividades, entre elas, encontram-se a atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, entre outras. [57-62,52]

Posto isto, a espécie *C. sinensis* é considerada uma boa fonte de compostos que possuem potencial de incorporação como ingredientes em formulações medicamentosas. [57-62]



Figura 4: Fotografia de *Citrus sinensis* (Jardim botânico UTAD).

1.4. Objetivo Geral

Esta dissertação teve como principal objetivo analisar a caracterização e aplicabilidade de três óleos essenciais provenientes de *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e de *Citrus sinensis*, obtidos por métodos de extração distintos, como ingredientes de interesse para a indústria cosmética.

Numa perspetiva mais detalhada podem-se especificar os principais objetivos para o desenvolvimento deste trabalho prático:

- Caracterizar quimicamente os óleos em estudo;
- Determinar *in vitro* o perfil antioxidante dos óleos recorrendo-se ao método do DPPH e ao método β -Caroteno/Ácido linoleico

- Determinar *in vitro* a atividade citotóxica dos óleos na linha celular representativa de queratinócitos humanos, HaCat;
- Estudar a estabilidade da atividade antioxidante dos óleos recorrendo-se a testes de estabilidade acelerada;
- Estabelecer uma relação com as atividades estudadas antes e depois do ensaio de estabilidade.

Capítulo 2

Desenho Experimental

Com o objetivo de obter respostas para os objetivos propostos foi necessário realizar previamente um desenho experimental. Com esta finalidade incluiu-se no estudo um óleo essencial proveniente da expressão da casca de *Citrus sinensis* (Ervas Catitas, Portugal), para além deste foram utilizados três óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de *Syzygium aromaticum* (BonEscient, França), *Origanum vulgare* (F.J.Campos, Pontinha, Portugal) e *Ocimum basilicum* (doação de produtor local, Covilhã, Portugal). É de salientar que todos os óleos são comerciais, obtidos através de pequenas empresas dedicadas à produção de óleos essenciais de produção biológica.

Sendo considerados como compostos instáveis devido à sua composição, é necessário estudar a estabilidade dos óleos essenciais. Contudo, primeiramente estudou-se a capacidade antioxidante pelos seguintes métodos, o método de redução do radical DPPH e do sistema β -Caroteno/Ácido linoleico. Com a perspectiva de os óleos em estudo poderem ser potenciais ingredientes cosméticos, é fundamental estudar a sua biocompatibilidade. Para isto procedeu-se à realização do ensaio MTT na linha celular de queratinócitos humanos (HaCat). Para o estudo da estabilidade dos quatro óleos essenciais realizou-se um ensaio de estabilidade acelerada, onde alíquotas dos diferentes óleos em estudo foram sujeitas a temperaturas distintas (ambiente, 5°C e a 50°C) e expostas à luz, durante 8 semanas. Após o término deste período, para verificar se a capacidade antioxidante dos óleos em estudo sofreu alterações ou se se manteve constante, aplicaram-se novamente os ensaios relativos ao estudo da capacidade antioxidante acima referidos. É de salientar que se realizou o estudo de identificação e quantificação dos compostos que constituem cada óleo essencial por recurso à cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC-MS), em alíquotas que não sofreram nenhum ensaio e nas alíquotas que foram sujeitas à temperatura ambiente.

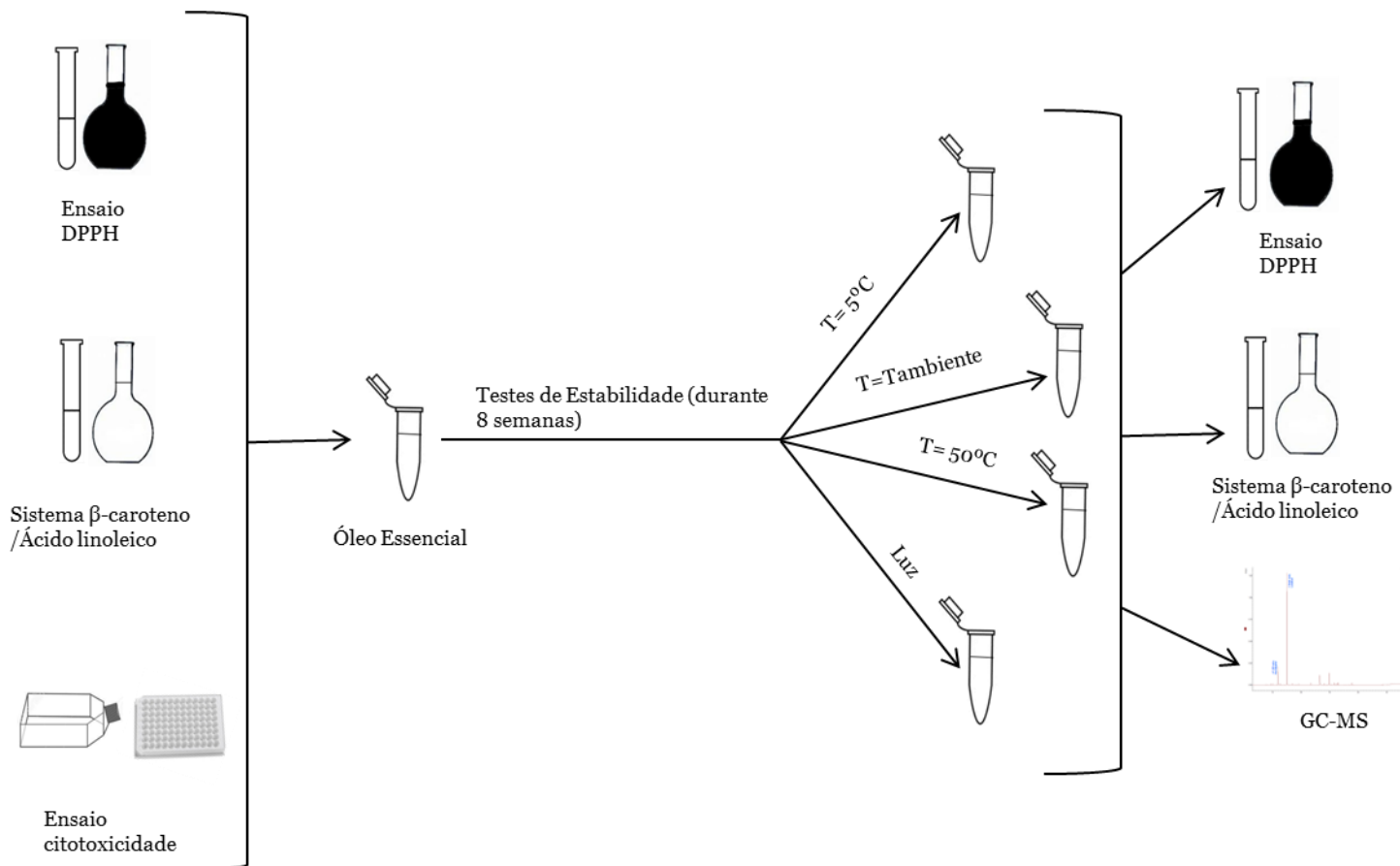


Figura 5: Esquema representativo do desenho experimental executado

Capítulo 3

Atividade Antioxidante

3.1 Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH

3.1.1 Considerações gerais

Para estudar a capacidade antioxidante de diferentes amostras, estão descritos inúmeros métodos *in vitro*, tais como, o ensaio de redução de DPPH, o ensaio de redução de DMPD, o ensaio da absorção de radicais oxigenados (ORAC), entre outros. [10,63-64]

O ensaio de redução do DPPH foi executado neste estudo pois é descrito como sendo um método simples, económico e eficiente que permite avaliar a capacidade antioxidante de compostos, como por exemplo amostras líquidas, que sejam capazes de doar um átomo de hidrogénio à molécula 2,2,-difeníl-1-picril-hidrazil (DPPH). O radical DPPH é considerado um radical livre estável, não necessitando de ser gerado, possuindo um eletrão desemparelhado o que resulta na sua coloração distintiva, uma cor violeta profunda, caracterizada por uma banda de absorção máxima numa solução orgânica aos 517 nm. Este método baseia-se na capacidade de uma amostra antioxidante doar um átomo de hidrogénio ao radical dando assim origem a forma reduzida deste. Esta redução é demonstrada pela perda gradual da coloração púrpura e pelo aparecimento da cor amarela, característica da forma reduzida do radical. A capacidade antioxidante da amostra em estudo é tanto maior quanto menor for a quantidade de radical DPPH não reduzido, consistindo então de um método indireto para a avaliação da capacidade antioxidante. [10,63-64]

No que diz respeito à interpretação dos resultados esta traduz-se no parâmetro concentração eficiente também designado por EC_{50} , isto é, a concentração de amostra que tem a capacidade para reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH e posteriormente o valor do Índice de Atividade Antioxidante (IAA). É ainda de referir que o ensaio possui um composto controlo cuja atividade antioxidante é estudada e conhecida, como por exemplo o ácido ascórbico. O ensaio pode ser utilizado em solventes orgânicos e por isso o composto selecionado para a ocorrência da reação foi o metanol, uma vez que facilita a extração dos compostos antioxidantes que estejam presentes na amostra em estudo. [10,63-64]

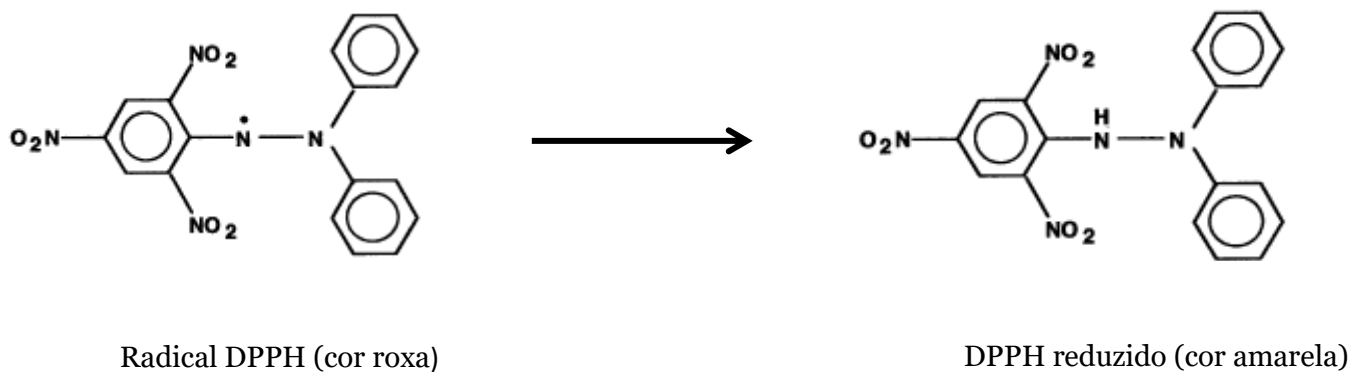


Figura 6: Reação do radical DPPH adaptado da referência 63.

3.1.1.1. Objetivo

Este ensaio tem como objetivo determinar a capacidade antioxidante *in vitro* dos quatro óleos em estudo, provenientes das espécies *S. aromaticum*, *O. basilicum*, *O. vulgare* e *C. sinensis*, por meio da análise da capacidade que estes possuem em reduzir o radical DPPH.

3.1.2. Parte Experimental

3.1.2.1. Materiais e Métodos

3.1.2.1.1. Reagentes

Foi preparada uma solução de 50 mL de DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) com uma concentração de 0,05 mg/mL. Para isto, foi preparada uma dissolução de 0,0025 g de DPPH em 1 mL de metanol (Fisher Scientific, Reino Unido), que posteriormente foi diluída em metanol num balão volumétrico de 50 mL.

Para controlo positivo foi preparada uma solução de ácido ascórbico (Fisher Scientific, Reino Unido), da mesma forma como se encontra descrito acima, uma solução de 50 mL a 0,05 mg/mL. Primeiramente foi preparada uma dissolução de 0,0026 g de ácido ascórbico em 1 mL de metanol, num eppendorf que de seguida foi dissolvida em metanol num balão volumétrico de 50 mL.

Ponderações

Quando expostas à luz tanto a solução de DPPH e de ácido ascórbico degradam-se, sendo assim necessário que todo o material empregue no ensaio seja revestido com papel de alumínio para assim garantir que as soluções não comprometam os resultados do ensaio. Por possuírem uma taxa de degradação de 2-4 % por semana, ambas as soluções devem ser mantidas a 4°C, todavia antes da sua utilização estas devem estar à temperatura ambiente.

3.1.2.1.2 Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, adaptado (62), do mesmo modo para todos os óleos em estudo.

Este tipo de metodologia pressupõe da necessidade de inclusão de um controlo positivo, composto que para esta atividade já se encontra descrito na literatura, certificando a correta manipulação do procedimento. Na presente dissertação, o composto usado foi o ácido ascórbico, mais conhecida como Vitamina C.

1. Avaliação da capacidade antioxidante da amostra

Para averiguar quais as concentrações que se podem abranger na gama de trabalho, foram preparadas diluições sucessivas da amostra em estudo, em falcons de 15 mL. Com esse propósito prepararam-se 5 falcons com 9 mL de metanol cada um, sendo que no primeiro foi adicionado 1 mL do óleo essencial em estudo, correspondendo assim a uma diluição de 1:10. De seguida, a partir do primeiro falcon, foram efetuadas diluições sucessivas (1:10) em metanol, procedendo-se da mesma forma, adicionando-se 1 mL do falcon anterior ao falcon seguinte. Antes e após as diluições as soluções foram homogeneizadas e para tal recorreu-se a um agitador vortex. Posteriormente, foi retirado 1 mL de cada uma das diluições para um falcon previamente revestido com papel de alumínio, respetivo a cada diluição. A estes foi adicionado 1 mL da solução de DPPH anteriormente preparada a 0,05 mg/mL. Todos os falcons foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos para garantir que a reação de redução tinha ocorrido verificando-se uma alteração da coloração da solução de roxo (DPPH não reduzido) para amarelo (DPPH reduzido).

Concluído o tempo de incubação, foi comprovado que se obteve um gradiente de redução de DPPH pelo óleo em estudo, de amarelo para roxo. Assim, foi possível selecionar a gama

de trabalho, que corresponde às diluições a partir das quais se observa o aparecimento da cor amarela e uma perda gradual da cor roxa.

2. Determinação do valor de EC₅₀

Para este ensaio foi necessário a preparação de 2 placas de 96 poços não estéreis, onde uma representa a análise do DPPH e do ácido ascórbico e a outra placa serve para a análise dos óleos essenciais em estudo.

Com uma pipeta multicanal foi adicionado 100 µL de metanol em todos os poços exceto nos poços da coluna 1. Na primeira placa, considerada a placa padrão, foi adicionado 300 µL de ácido ascórbico a 0,05 mg/mL aos poços, D1, E1, F1, G1, H1, e seguidamente fizeram-se diluições sucessivas de 200 µL nos 100 µL que se encontravam distribuídos ao longo da placa. Para o DPPH a 0,05 mg/mL procedeu-se de igual forma, para as linhas A1, B1 e C1. Deste modo as diluições obtidas são de 1:1,5. Posteriormente à realização das diluições, adicionou-se 100 µL de metanol aos poços das linhas A, B e C, de forma a garantir um volume final em cada poço de 200 µL. Por último, foi adicionado 100 µL de DPPH aos poços das linhas F a H. Como as soluções são sensíveis à luz, a placa foi envolvida em papel de alumínio e posta a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a absorvância de cada poço foi medida num leitor de microplacas a 517 nm.

No que diz respeito à preparação da segunda placa, isto é, a placa com os óleos em estudo, procedeu-se de igual forma num primeiro momento, ou seja, colocou-se 100 µL de metanol em todos os poços exceto nos poços da coluna 1. A seguir adicionou-se 300 µL da diluição do óleo essencial em estudo ao poço A1, B1 e C1 e diluiu-se seriadamente 200 µL nos 100 µL de metanol que já se encontrava em todos os poços da placa. Foi repetido o mesmo procedimento para as linhas D1, E1 e F1, sendo obtidos diluições 1:1,5. Finalmente adicionou-se 100 µL da solução de DPPH aos poços das linhas A a C e metanol às linhas D, a F. Envolveu-se a placa com papel de alumínio e colocou-se a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Findo o período de incubação, verificou-se visualmente o perfil sequencial de redução do DPPH (de amarelo para roxo). Por fim a absorvância de cada poço da placa foi lida num leitor de microplacas (Biorad, Tóquio, Japão) a 517 nm.

As tabelas seguintes de 1 a 4 apresentam a concentrações em teste para os óleos essenciais.

Tabela 1 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *S. aromaticum* em estudo.

Óleo Essencial	Condição	Concentração (%)
<i>S. aromaticum</i>	Inicial	0,1 (Diluição 1:1000)
	5°C	0,01 (Diluição 1:10000)
	50°C	0,01 (Diluição 1:10000)
	T _{ambiente}	0,01 (Diluição 1:10000)
	Luz	0,01 (Diluição 1:10000)

Tabela 2 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *O. basilicum* em estudo.

Óleo Essencial	Condição	Concentração (%)
<i>O. basilicum</i>	Inicial	0,1 (Diluição 1:1000)
	5°C	0,1 (Diluição 1:1000)
	50°C	0,1 (Diluição 1:1000)
	T _{ambiente}	0,1 (Diluição 1:1000)
	Luz	0,1 (Diluição 1:1000)

Tabela 3 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *O. vulgare* em estudo. “Ensaio não realizado” – amostra indisponível para realizar o ensaio.

Óleo Essencial	Condição	Concentração (%)
<i>O. vulgare</i>	Inicial	1 (Diluição 1:100)
	5°C	1 (Diluição 1:100)
	50°C	1 (Diluição 1:100)
	T _{ambiente}	1 (Diluição 1:100)
	Luz	Ensaio não realizado

Tabela 4 - Tabela resumo da concentração para analisar a atividade antioxidante do óleo essencial *C. sinensis* em estudo. “Ensaio não realizado” – amostra indisponível para realizar o ensaio.

Óleo Essencial	Condição	Concentração (%)
<i>C. sinensis</i>	Inicial	Puro
	5°C	Puro
	50°C	Ensaio não realizado
	T _{ambiente}	1 (Diluição 1:10)
	Luz	Ensaio não realizado

3.1.2.2 Esquema representativo da metodologia aplicada

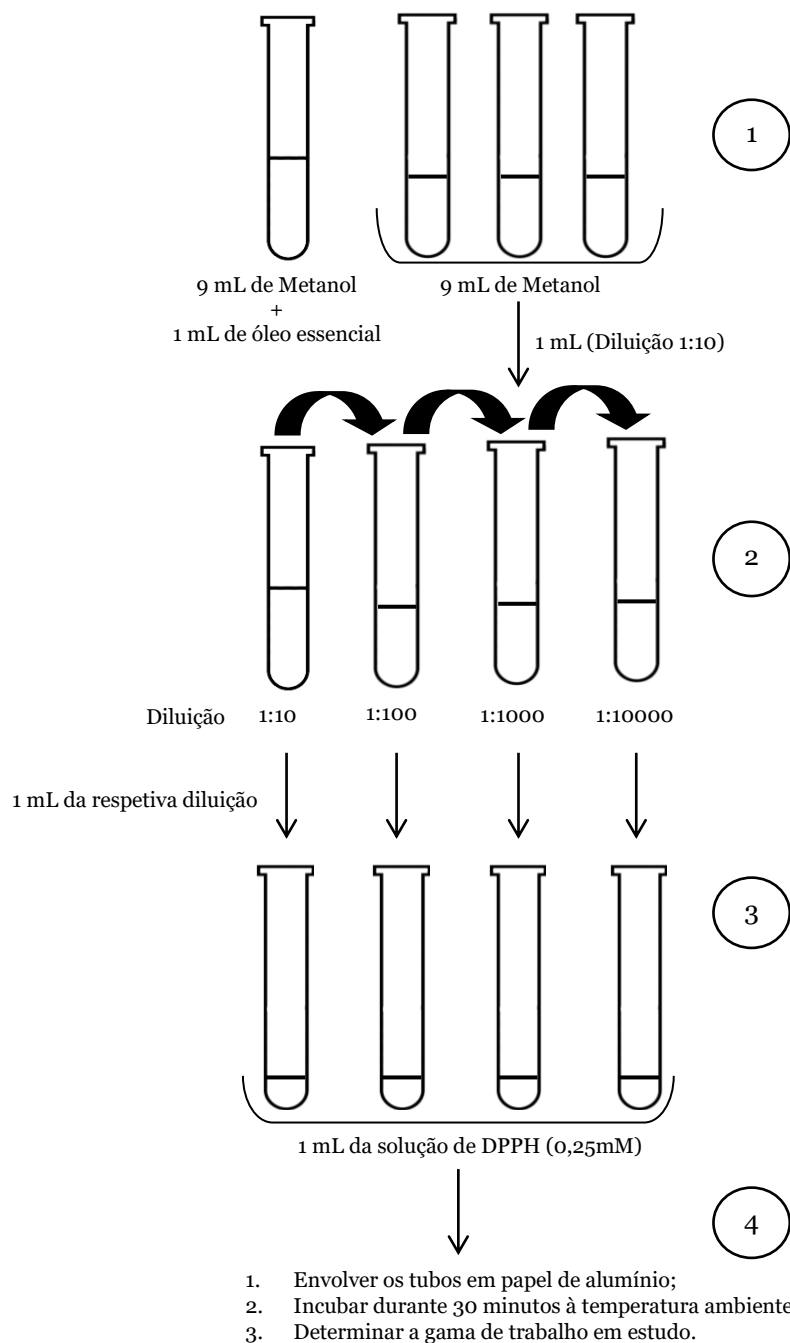
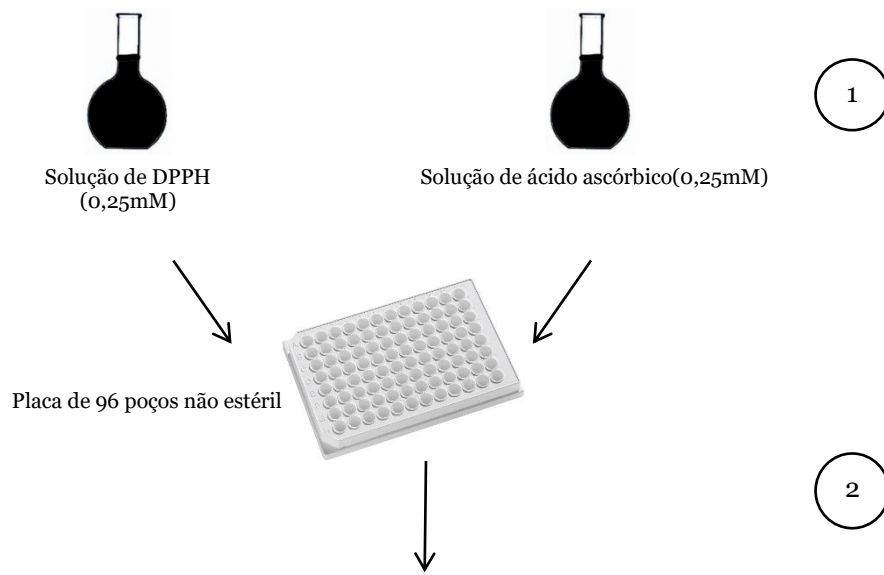


Figura 7: Esquema representativo da metodologia realizada para determinar a capacidade antioxidante por redução do DPPH: determinação da gama de trabalho. Os números demonstram a ordem dos passos pelo qual se procedeu na elaboração do método.



1. Diluições das respectivas soluções nos poços reservados para cada solução;
2. Envolver em papel de alumínio;
3. Incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos,
4. Ler absorvância da placa a 517 nm

Figura 8: Esquema representativo da metodologia aplicada para determinar a capacidade antioxidante por redução do DPPH: preparação da placa padrão com DPPH e o antioxidante padrão, o ácido ascórbico. A numeração representa a ordem dos passos durante a realização do ensaio.

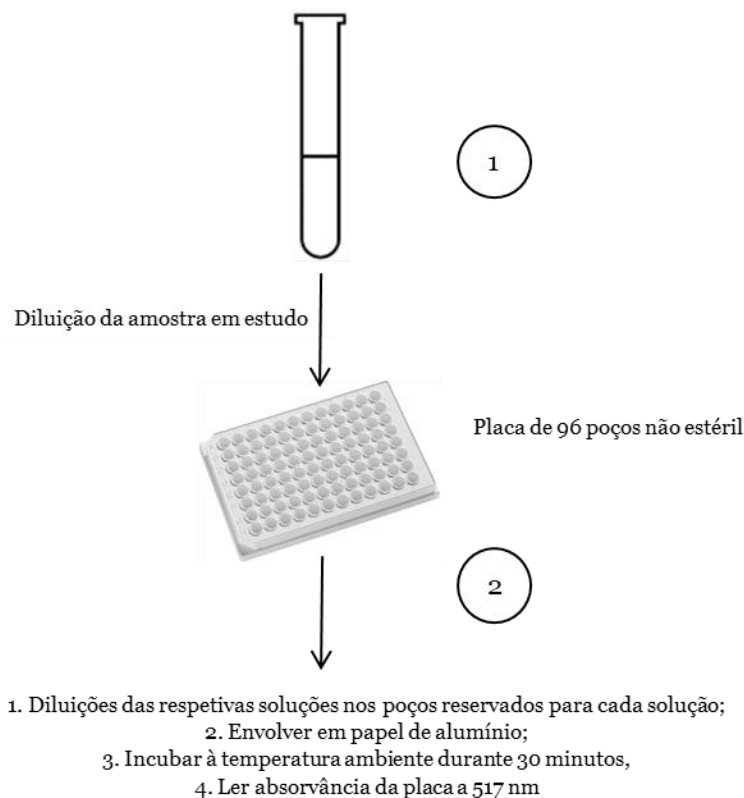


Figura 9: Esquema representativo da metodologia efetuada para determinar a capacidade antioxidante por redução do DPPH: preparação da placa com amostra em estudo. A numeração representa a ordem dos passos durante a realização do ensaio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha	Concentração (mg/mL)											
	0,0250	0,0167	0,0111	0,0074	0,0049	0,0033	0,0022	0,0015	0,0010	0,0007	0,0004	0,0003
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 10: Representação esquemática da placa padrão (96poços) para a determinação do EC₅₀ do Ácido ascórbico e do DPPH no estudo da capacidade antioxidante por redução do DPPH.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços não esteril;
- Os espaços a cinzento-escuro correspondem aos poços que contiveram as diluições de DPPH em metanol;
- A coloração cinzenta reflete os poços com as diluições do Ácido ascórbico em metanol e DPPH;

Os espaços a cinzento-claro representam os poços com as diluições de Ácido ascórbico apenas em metanol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha	Concentração (µL/mL)											
	100	67	44	30	20	13	9	6	4	3	2	1
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 11: Representação esquemática da placa de 96 poços para a determinação do EC₅₀ dos óleos essenciais em estudo para consequentemente estudar a capacidade antioxidante da amostra.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços não estéril;
- Os espaços a cinzento-escuro correspondem aos poços que contiveram as diluições do óleo essencial em estudo em metanol e DPPH;
- A coloração cinzenta reflete os poços apenas com as diluições do óleo essencial em estudo em metanol

3.1.2.3. Tratamento dos resultados

Para a análise dos resultados obtidos neste método, realizaram-se 4 ensaios independentes para cada óleo essencial. Assim realizaram-se dois ensaios antes de se proceder ao ensaio de estabilidade acelerada e dois ensaios para cada uma das alíquotas que foram sujeitas às condições do teste de estabilidade, perfazendo um total de quatro ensaios independentes. Teve-se em conta as absorvâncias das soluções nas placas de 96 poços de cada ensaio lidas a 517 nm, num leitor de microplacas.

O tratamento e posterior análise dos resultados foi conseguido recorrendo a folhas de cálculo do Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016), onde foram introduzidos os valores das absorvâncias obtidas, procedendo-se aos passos abaixo descritos:

1. Construção da curva de calibração do DPPH: os valores da absorvância do DPPH nas diferentes concentrações, assim como estas, foram introduzidas na folha de cálculo correspondente ao ensaio a fim de se construir a curva de calibração do DPPH e obter o declive da mesma. É de frisar que o coeficiente de correlação (R) da reta resultante deve ser superior a 0,97 e esta deve ser construída com um mínimo de cinco valores.

2. Construção da reta padrão do controlo- Determinação da EC₅₀: na folha de cálculo foram introduzidos os valores de absorvância dos poços que continham ácido ascórbico sem adição de DPPH, calculando a média que foi subtraída à média das absorvâncias das concentrações de ácido ascórbico com adição de DPPH. Posteriormente, o valor de EC₅₀ do ácido ascórbico foi calculado, utilizando a equação da reta de calibração, obtendo então a concentração de DPPH que não foi reduzida em cada poço. Em seguida foi calculada a concentração de DPPH que foi efetivamente reduzida, procedendo-se à subtração dos valores obtidos anteriormente (concentração inicial de DPPH). Seguidamente foi calculada a percentagem de redução do DPPH, multiplicando a concentração de DPPH que foi reduzida por 100 e dividindo pela concentração inicial de DPPH, e com estes valores foi construída a respetiva equação da reta que representa a percentagem de redução. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,90 sendo construída com um mínimo de cinco valores. Por fim o valor de EC₅₀ foi calculado através da equação da reta da percentagem de redução do DPPH.
3. Determinação do EC₅₀ dos óleos essenciais em estudo: Foi realizado o mesmo procedimento descrito no ponto 2 apenas se substituiu os valores de absorvância do ácido ascórbico pelos valores de absorvância obtidos para os óleos essenciais em estudo.
4. Determinação do Índice de Atividade Antioxidante (IAA): Após calculado o EC₅₀ procedeu-se ao cálculo do IAA. Este foi conseguido pela divisão do EC₅₀ obtido no ponto 3 pela concentração máxima de DPPH utilizada no ensaio.

3.1.3. Discussão de resultados

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. sinensis*, *S. aromaticum*, *O. basilicum* e de *O. vulgare* é analisada e discutida neste capítulo, por meio da capacidade de o óleo conseguir reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH, (Concentração Eficiente: EC₅₀) e, por conseguinte, comparar a atividade obtida para o óleo essencial com um composto conhecido cujo a sua atividade é conhecida, o ácido ascórbico. Posteriormente esta atividade é relacionada com a composição química do óleo essencial.

O ácido ascórbico, frequentemente mais conhecido como Vitamina C, é descrito na literatura como o composto padrão amplamente utilizado no método do DPPH, uma vez que para além de ser um forte agente redutor, também a sua atividade antioxidante é bem definida. Todavia, a sua atividade depende de inúmeros fatores como a concentração inicial tanto do DPPH como do ácido ascórbico, o tempo de reação, entre outras. Assim,

com as diversas variáveis enumeradas anteriormente, torna-se difícil estabelecer relações entre os variados estudos.

No presente estudo ambas as soluções de DPPH e de ácido ascórbico apresentavam uma concentração inicial de 0,0250 mg/mL, apresentando esta última uma média de valores dos dois ensaios realizados de EC₅₀ de 1,4712 µg/mL (tabela 5).

No que diz respeito à análise dos resultados obtidos para cada óleo essencial, analisaram-se os valores de EC₅₀ e o Índice de Atividade Antioxidante (IAA). Com base no valor obtido de IAA, é possível classificar uma amostra quanto à sua atividade antioxidante: se $IAA \leq 0,5$ a atividade antioxidante é pobre, $0,5 < IAA \leq 1,0$ a atividade antioxidante é moderada, $1,0 < IAA < 2,0$ a atividade antioxidante é forte e por último se $IAA \geq 2,0$ a atividade antioxidante é muito forte.

Tabela 5 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) do antioxidante padrão, ácido ascórbico.

	EC₅₀ (µg/mL)	Média	IAA	Média
Ácido ascórbico	1,2634 ————— 1,6797	1,4712	0,0198 ————— 0,0149	0,0174

Tabela 6 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respetivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare*.

Óleo essencial	EC ₅₀ (µg/mL)	Média	IAA	Média																		
<i>C.sinensis</i>	23,7973	24,8894 (±1,5445)	0,0001	0,0001 (±0,0000)																		
	25,9816		0,0001		<i>S.aromaticum</i>	0,0008	0,0007 (±0,0001)	2,86	3,18 (±0,45)	0,0007	3,49	<i>O.basilicum</i>	0,0016	0,0016 (±0,0000)	1,53	1,57 (±0,06)	0,0016	1,61	<i>O.vulgare</i>	0,3383	0,3078 (±0,0432)	0,01
<i>S.aromaticum</i>	0,0008	0,0007 (±0,0001)	2,86	3,18 (±0,45)																		
	0,0007		3,49		<i>O.basilicum</i>	0,0016	0,0016 (±0,0000)	1,53	1,57 (±0,06)	0,0016	1,61	<i>O.vulgare</i>	0,3383	0,3078 (±0,0432)	0,01	0,01 (±0,00)	0,2772	0,01				
<i>O.basilicum</i>	0,0016	0,0016 (±0,0000)	1,53	1,57 (±0,06)																		
	0,0016		1,61		<i>O.vulgare</i>	0,3383	0,3078 (±0,0432)	0,01	0,01 (±0,00)	0,2772	0,01											
<i>O.vulgare</i>	0,3383	0,3078 (±0,0432)	0,01	0,01 (±0,00)																		
	0,2772		0,01																			

Tabela 7 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à temperatura de 5°C do ensaio de estabilidade acelerada.

Condição	Óleo Essencial	EC ₅₀ (µg/mL)	Média	IAA	Média
Temperatura 5°C	<i>C.sinensis</i>	18,9896	17,3214 (±2,3592)	0,0001	0,0002 (±0,0001)
		15,6531		0,0002	
	<i>S.aromaticum</i>	0,0005	0,0007 (±0,0002)	4,62	3,90 (±1,02)
		0,0008		3,18	
	<i>O.basilicum</i>	0,0055	0,0047 (±0,0012)	0,45	0,55 (±0,14)
		0,0038		0,65	
	<i>O.vulgare</i>	0,0641	0,0552 (±0,0126)	0,04	0,05 (±0,01)
		0,0463		0,05	

Tabela 8 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à temperatura de 50°C do ensaio de estabilidade acelerada.

Condição	Óleo Essencial	EC ₅₀ (µg/mL)	Média	IAA	Média
Temperatura 50°C	<i>S.aromaticum</i>	0,0003	0,0003 (±0,0000)	9,79	9,24 (±0,78)
		0,0003		8,68	
	<i>O.basilicum</i>	0,0061	0,0051 (±0,0014)	0,41	0,51 (±0,14)
		0,0041		0,61	

Tabela 9 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respetivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à temperatura ambiente do ensaio de estabilidade acelerada.

Condição	Óleo Essencial	EC ₅₀ (µg/mL)	Média	IAA	Média
Temperatura ambiente	<i>C.sinensis</i>	2,0057	2,7854 (±1,1027)	0,0012	0,001 (±1,1027)
		3,5651		0,0007	
	<i>S.aromaticum</i>	0,0006	0,0007 (±0,0001)	4,06	3,85 (±0,30)
		0,0007		3,64	
	<i>O.basilicum</i>	0,0043	0,0046 (±0,0004)	0,58	0,55 (±0,04)
		0,0048		0,52	
	<i>O.vulgare</i>	0,0749	0,0720 (±0,0066)	0,03	0,04 (±0,01)
		0,0655		0,04	

Tabela 10 - Valores de EC₅₀ (µg/mL) e do respectivo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) das alíquotas dos óleos essenciais de *C.sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeitos à luz do ensaio de estabilidade acelerada.

Condição	Óleo Essencial	EC ₅₀ (µg/mL)	Média	IAA	Média
Luz	<i>S.aromaticum</i>	0,0005	0,0005 (±0,0000)	4,76	4,96 (±0,28)
		0,0005		5,16	
	<i>O.basilicum</i>	0,0082	0,0069 (±0,0018)	0,31	0,38 (±0,10)
		0,0056		0,45	
	<i>O.vulgare</i>	0,0170	0,0203 (±0,0047)	0,15	0,13 (±0,03)
		0,0236		0,11	

3.1.3.1 Óleo Essencial de *Citrus sinensis*

O óleo essencial de *C. sinensis* apresentou atividade antioxidante numa concentração de 100%, isto é, puro, necessitando de um período superior ao recomendado, isto é, 30 minutos, para se verificar um perfil sequencial de redução do radical de DPPH, apresentando uma média de valores de Ec₅₀ de 24,8894 µg/mL e consequentemente um valor de IAA de 0,0001 (tabela 6), o que corresponde a uma atividade antioxidante pobre. Sendo um óleo essencial, este é uma mistura de compostos, porém existe um composto maioritário, no caso do óleo essencial da casca da laranja o composto é o D-limoneno, um monoterpeno com atividade antioxidante eficaz contra a peroxidação lipídica e contra os radicais livres induzidos pelo dano celular. (61)

Contudo, comparando a concentração necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH, verificou-se que é necessária uma concentração muito elevada em comparativamente com o antioxidante padrão e com os restantes óleos essenciais em estudo. Assim conclui-se que o óleo essencial de *C. sinensis* é o menos eficaz em transferir um eletrão de forma a reduzir o radical DPPH, resultando numa atividade antioxidante baixa.

Após as alíquotas de óleo serem sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada, verificou-se se a atividade antioxidante se manteve estável ou sofreu alterações. Apenas as alíquotas

que estiveram sujeitas à temperatura de 5°C e à temperatura ambiente, foram elegíveis para a realização do ensaio. Em ambas as alíquotas constatou-se que a atividade antioxidante sofreu alterações, uma vez que o EC₅₀ e o IAA aumentaram. Porém, entre as alíquotas também se verificaram diferenças no EC₅₀ e respetivo IAA. Na alíquota sujeita a temperatura de 5°C, o ensaio de redução de DPPH realizou-se com uma concentração de óleo a 100%, ou seja, puro, sendo necessária uma concentração média capaz de reduzir o radical DPPH de 17,3214 µg/mL (tabela 7), resultando num IAA de 0,0002. No que diz respeito à alíquota sujeita à temperatura ambiente o EC₅₀ é de 2,7854 µg/mL (tabela 9), resultando assim num IAA superior aos obtidos anteriormente, de 0,001, e a concentração inicial é de 10%, uma vez que se procedeu a uma diluição de 1:10. Comparando só as concentrações utilizadas do óleo essencial verificou-se que seria expectável que o EC₅₀ e o IAA fossem superiores na alíquota que sofreu a diluição, o que foi confirmado com os resultados obtidos. Uma das possíveis razões para o aumento do EC₅₀ e do IAA na alíquota sujeita à temperatura ambiente é a sinergia entre o composto maioritário *D*-limoneno e o composto linalool, uma vez que individualmente ambos possuem atividade antioxidante, resultando assim numa interação entre os compostos para aumentar a atividade antioxidante do óleo essencial de *C. sinensis*.

De uma forma geral, pode-se concluir que a atividade antioxidante do óleo essencial de *C. sinensis* aumentou nas alíquotas em estudo, comparativamente com a alíquota inicial, uma vez que esta é aquela que apresenta um maior EC₅₀ e consequentemente um IAA inferior. Todavia, pode-se concluir que a estabilidade acelerada, aumenta a atividade antioxidante do óleo essencial de *C. sinensis* demonstrando que com o avançar do tempo, a percentagem de compostos vai variando resultando num aumento das bioatividades, devido a estes reagirem de uma forma sinérgica.

3.1.3.2 Óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

O óleo essencial de *S. aromaticum*, é reconhecido na literatura como um óleo com um poder antioxidante elevado, e o mesmo foi comprovado com os resultados obtidos neste estudo. A concentração ideal para estudar a atividade antioxidante foi a concentração de 0,1% (diluição 1:1000), uma vez que foi nesta concentração que se encontrou o perfil sequencial de redução do radical de DPPH. Realizando dois ensaios independentes averiguou-se que a média de EC₅₀ é de 0,0007 µg/mL, traduzindo num IAA de 3,18 (tabela 6), e segundo a classificação de IAA, este óleo possui uma atividade antioxidante muito forte. Comparativamente com o antioxidante padrão, o óleo essencial mostrou ser mais eficaz uma vez que possui um EC₅₀ inferior.

Quimicamente, o óleo essencial de *S. aromaticum* possui na sua constituição o composto maioritário eugenol, descrito na literatura como um potente composto antioxidante. Assim pode-se considerar que o possível responsável pela atividade antioxidante é o eugenol.

As alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade foram estudadas para averiguar se a atividade antioxidante sofreu alterações ou se manteve constante. É de salientar que todas as alíquotas foram analisadas uma vez que eram elegíveis para a realização do ensaio.

A alíquota sujeita a temperatura de 5°C mostrou um ligeiro aumento do IAA, no entanto não é um aumento muito significativo, uma vez que a média do IAA dos dois ensaios é de 3,90 (tabela 7). Com isto pode-se afirmar que a atividade antioxidante a 5°C não sofreu modificações podendo ser considerada constante quando comparada com a alíquota inicial. Contudo a concentração de teste é inferior à concentração da alíquota inicial, ou seja, trabalhou-se com uma concentração de 0,01% (diluição de 1:10000) em vez de 0,1%, assim pode-se concluir que a percentagem de eugenol será maior fazendo com que seja necessário menos quantidade de óleo para obter a redução de 50 % da concentração inicial de DPPH, mantendo o IAA praticamente constante.

No que diz respeito à alíquota que se manteve à temperatura ambiente, a concentração de teste foi de 0,01%, e o EC₅₀ médio para os dois ensaios foi de 0,0007 µg/mL, mostrando que é necessário menos quantidade de amostra para reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH quando comparada com o EC₅₀ do ensaio inicial (0,0007 µg/mL) (tabela 9). Porém o IAA obtido para a alíquota à temperatura ambiente foi aproximadamente igual ao da alíquota a 5°C, o que mostrou que a atividade antioxidante se manteve constante entre estas duas alíquotas, mas também como o aumento não é muito significativo afirma-se que se manteve constante com o IAA inicial pois ambos se encontram com a mesma ordem de grandeza. Pode-se concluir que apesar de ser necessário uma quantidade inferior de amostra para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, mas o IAA manteve-se constante.

As alíquotas em que se constatou um aumento da atividade antioxidante foi a alíquota sujeita a 50°C e a alíquota exposta à luz. Apesar disso ambas as alíquotas foram testadas a uma concentração de 0,01% como as alíquotas anteriores, então pode-se afirmar que o EC₅₀ será inferior ao do ensaio inicial. A alíquota exposta à luz apresentou um EC₅₀ de 0,0005 µg/mL traduzindo num IAA de 4,96 (tabela 10), sendo considerado uma atividade antioxidante muito forte uma vez que ultrapassa o valor de 2,00 no IAA. A alíquota com um IAA superior de 9,24 é a alíquota que se manteve a 50°C, sendo que é a alíquota que

apresenta o EC_{50} mais baixo entre todas as alíquotas em estudo, de 0,0003 $\mu\text{g/mL}$. Em ambas as alíquotas pode-se concluir que a atividade antioxidante aumentou significativamente podendo traduzir-se num aumento da concentração do composto maioritário, eugenol, possivelmente devido à evaporação de diversos compostos que inicialmente podiam ter um comportamento que interferisse com o composto maioritário levando a uma diminuição da bioatividade do mesmo.

Em suma, o valor de EC_{50} diminuiu em todas as alíquotas demonstrando assim a diminuição da concentração necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, contudo a alíquota a 5°C e à temperatura ambiente foram aquelas em que a atividade antioxidante se manteve constante. É de salientar que todas as alíquotas apresentaram um EC_{50} inferior ao do antioxidante padrão, comprovando assim o interesse deste óleo como antioxidante natural.

3.1.3.3 Óleo essencial de *Ocimum basilicum*

O óleo essencial de *O. basilicum* foi testado a uma concentração de 0,1% (diluição de 1:1000), possuindo um EC_{50} médio entre dois ensaios independentes de 0,0016 $\mu\text{g/mL}$, resultando consequentemente num IAA de 1,57 (tabela 6), sendo considerada uma atividade antioxidante forte.

Quimicamente, o óleo essencial de *O. basilicum* possui um composto maioritário, o linalool, composto conhecido pela sua atividade antioxidante, contudo também apresenta numa percentagem razoável o eucaliptol. Embora o linalool seja um composto descrito como um potente antioxidante, o seu poder pode estar a ser diminuído pela percentagem de eucaliptol encontrada no óleo essencial de *O. basilicum*, justificando assim o IAA obtido para este óleo.

Quando comparado com o antioxidante padrão utilizado verificou-se que este apresenta um EC_{50} de 1,4712 $\mu\text{g/mL}$, superior ao do EC_{50} do óleo essencial de *O. basilicum*, demonstrando assim que o óleo essencial tem uma atividade antioxidante superior.

Após o estudo de estabilidade acelerada, constatou-se que todas as alíquotas eram adequadas para a realização do ensaio de redução do radical DPPH.

No que diz respeito à alíquota a 5°C a concentração testada foi a mesma que a inicial, ou seja, 0,1% (diluição de 1:1000), resultando num EC_{50} de 0,0047 $\mu\text{g/mL}$ e consequentemente um IAA de 0,55 (tabela 7), o que traduz que a atividade antioxidante sofreu uma redução significativa, passando de um antioxidante forte para uma atividade

antioxidante moderada. O resultado de IAA era expectável uma vez que o EC_{50} é superior em relação ao EC_{50} inicial, demonstrando que é necessária uma concentração mais elevada de óleo essencial para reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH, logo a atividade antioxidante será menor.

A alíquota exposta à temperatura de 50°C mostrou um comportamento semelhante à alíquota de 5°C, resultando num EC_{50} de 0,0051 µg/mL, superior ao inicial o que vai traduzir numa diminuição do IAA, dando origem a uma atividade antioxidante moderada, pois o IAA é de 0,51 (tabela 8).

Com um comportamento semelhante as alíquotas anteriormente referidas, a alíquota sujeita à temperatura ambiente possui um EC_{50} de 0,0046 µg/mL e um IAA de 0,55 (tabela 9), qualificando assim a atividade antioxidante desta alíquota como moderada. Comparando as três alíquotas expostas a temperaturas diferentes pode-se concluir que o IAA se manteve constante entre as três alíquotas, deduzindo-se assim que as estas possuem a mesma constituição, sendo o composto maioritário, o linalool seguido do eucaliptol contudo em relação à amostra inicial este último encontra-se em maior percentagem o que pode induzir a diminuição da atividade antioxidante nas alíquotas sujeitas às diferentes temperaturas, uma vez que pode aumentar uma outra bioatividade, estando esta camuflada na amostra inicial uma vez que a percentagem era mais baixa o que não interferia com a atividade antioxidante do linalool.

Em relação à alíquota exposta à luz, o valor de EC_{50} médio foi de 0,0069 µg/mL, superior a todos os EC_{50} obtidos para as anteriores alíquotas, o que se vai refletir numa diminuição do IAA, sendo este de 0,38 (tabela 10) com uma concentração de teste de 0,1% (diluição de 1:1000). Estes resultados podem derivar de um aumento da percentagem de diversos compostos que competem com o linalool e diminuem a atividade antioxidante do óleo essencial de *O. basilicum*.

Em suma, a alíquota do ensaio inicial foi aquela que demonstrou um comportamento antioxidante forte, até mais que o antioxidante padrão e que as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada. Contudo, apesar de todas as alíquotas em estudo serem testadas à mesma concentração da alíquota inicial, 0,1%, o EC_{50} e consequentemente o IAA sofreram alterações, mais concretamente o EC_{50} foi superior em todas as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade que se traduz numa diminuição do IAA. Por isso conclui-se que com o ensaio de estabilidade houve um aumento de percentagem de diversos compostos entre eles o eucaliptol que competem com o linalool e diminuem a eficácia deste como um composto antioxidante.

3.1.3.4. Óleo essencial de *Origanum vulgare*

O óleo essencial de *O. vulgare* foi testado a uma concentração inicial de 1% (diluição 1:100), resultando num EC_{50} de 0,3078 $\mu\text{g/mL}$, e como o valor obtido é elevado, como consequência o IAA vai ser baixo, sendo este de 0,01 (tabela 6). Com o valor obtido de IAA, podemos concluir que a atividade antioxidante do óleo essencial de *O. vulgare* é pobre uma vez que se é inferior a 0,5.

Na sua constituição o óleo essencial de *O. vulgare* é composto por inúmeros compostos entre eles, o carvacrol, sendo este o composto maioritário, e o *D*-limoneno. Apesar de ambos os compostos possuírem atividade antioxidante, conclui-se que estes compostos não são eficazes a reduzir o radical DPPH, traduzindo a baixa atividade antioxidante obtida.

Contudo, comparando com o antioxidante padrão, o ácido ascórbico, este apresenta um EC_{50} superior (1,4712 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 5) ao obtido do óleo essencial em estudo, demonstrando assim que o óleo essencial de *O. vulgare* possui uma maior atividade antioxidante que o antioxidante padrão.

Com o fim do ensaio de estabilidade acelerada apenas três das quatro alíquotas foram selecionadas para a repetição do ensaio de redução do radical DPPH, pois apenas estas apresentam as condições necessárias à sua realização.

A alíquota sujeita à temperatura de 5°C foi testada a uma concentração de 1% (diluição 1:100), resultando num valor obtido de EC_{50} de 0,0552 $\mu\text{g/mL}$ e de IAA de 0,05 (tabela 7), sendo classificada como uma atividade antioxidante pobre uma vez que é inferior a 0,5. Comparando com o antioxidante padrão o óleo essencial em estudo possui um EC_{50} inferior o que traduz uma maior atividade antioxidante do óleo. Contudo comparativamente com a amostra inicial o aumento do IAA foi pouco significativo o que pode traduzir que a atividade antioxidante se manteve praticamente estável.

Em relação à alíquota exposta à temperatura ambiente, este apresentou uma média de EC_{50} de 0,0720 $\mu\text{g/mL}$ e um IAA de 0,04 (tabela 9), o que representa uma atividade antioxidante pobre. Apesar disso, pode-se concluir que as alíquotas sujeitas a diferentes temperaturas se encontram com atividade antioxidantes semelhantes o que pode significar que a composição do óleo essencial de *O. vulgare* é similar. Comparativamente com a composição da amostra inicial, o composto maioritário é o mesmo, o carvacrol, porém a percentagem de *D*-limoneno é inferior, o que pode indicar que este último

composto poderia interferir com a atividade do carvacrol levando a uma diminuição da bioatividade do mesmo.

No que diz respeito à alíquota exposta à luz, esta foi aquela onde se mostrou um aumento significativo da atividade antioxidante uma vez que o EC_{50} obtido foi de 0,0203 $\mu\text{g/mL}$ resultando num IAA de 0,13 (tabela 10), contudo continua a possuir uma atividade antioxidante pobre, uma vez que o IAA é abaixo de 0.5.

É de salientar que todas as alíquotas apresentaram um EC_{50} inferior ao valor obtido para o antioxidante padrão, confirmando que o óleo essencial é mais eficaz na redução do radical DPPH.

Apesar de a amostra inicial e as alíquotas referentes ao teste de estabilidade terem sido testadas à mesma concentração, 1% (diluição 1:100), a atividade antioxidante não se mostrou constante. Assim não se pode considerar que a atividade antioxidante do óleo essencial de *O. vulgare* seja estável ao longo do tempo

3.1.4. Conclusões e Perspetivas futuras

O ensaio de redução do radical de DPPH mostrou ser um método eficaz para avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais em estudo, já que permitiu verificar a estabilidade da bioatividade nas diferentes alíquotas.

O óleo que demonstrou uma atividade antioxidante superior foi o óleo essencial de *S. aromaticum*, mantendo constante o seu IAA demonstrando ser um óleo estável em diferentes condições. Contudo, o óleo essencial que sofreu um decréscimo significativo na sua atividade antioxidante foi o óleo de *O. basilicum*, resultando assim numa atividade antioxidante pouco estável ao longo do tempo. Apesar disso, todos os óleos essenciais, exceto o óleo essencial de *C. sinensis*, mostraram ter um comportamento mais antioxidante que o ácido ascórbico, corroborando assim a hipótese da sua utilização como ingredientes ativos em produtos cosméticos, nomeadamente em cosméticos antienvhecimento, principalmente o óleo essencial de *S. aromaticum*.

Futuramente, para uma melhor análise do óleo essencial de *C. sinensis* poderá ser interessante diminuir a concentração inicial de DPPH, facilitando assim a redução do DPPH por parte dos compostos do óleo em questão. No que diz respeito aos óleos essenciais seria importante estudar isoladamente os compostos maioritários de cada óleo para confirmar a sua contribuição na atividade antioxidante associada aos óleos em estudo.

3.2. Sistema β -Caroteno/Ácido linoleico

3.2.1 Considerações gerais

Os organismos vivos encontram-se cada vez mais expostos a radicais livres, podendo estes ser provenientes do metabolismo como subprodutos ou da oxidação de diferentes moléculas como por exemplo de lípidos (peroxidação lipídica). Todavia, a oxidação é considerada um processo essencial para todos os organismos, dado que a energia resultante é necessária para o bom funcionamento dos mesmos, porém quando existe um desequilíbrio entre os radicais livres e as defesas antioxidantes ocorre o que se denomina de stresse oxidativo. Este desregula um espectro de funções celulares levando ao aparecimento de diversas patologias. Uma vez que a eliminação de radicais é inerente à defesa antioxidante, é de extrema relevância avaliar a eficácia de diversos antioxidantes como o exemplo dos óleos essenciais na eliminação dos radicais livres, sendo que para isto foram desenvolvidos diversos métodos *in vitro* onde se engloba o sistema β -Caroteno/Ácido linoleico. [10,65-69]

Considerado como um dos métodos mais utilizados por ser rápido e eficaz, o ensaio β -Caroteno/Ácido linoleico, baseia-se na capacidade de a amostra conseguir retardar ou inibir a peroxidação lipídica. Este consiste na oxidação do β -Caroteno induzida pelos produtos resultantes da peroxidação lipídica do ácido linoleico, como o radical peróxido LOO \cdot . Assim, o método funciona numa emulsão de β -Caroteno que é descolorada pelos radicais livres gerados pela oxidação do ácido gordo insaturado em causa, o ácido linoleico, promovida pela indução térmica, 50°C, e pela presença de oxigénio, este último proveniente da água destilada saturada com oxigénio. A perda de coloração é medida espectrofotometricamente a 470 nm. [10,65-69]

No que concerne aos resultados, estes são apresentados pela percentagem de inibição da oxidação do β -Caroteno e a respetiva concentração que inibe 50 % da oxidação (IC₅₀) de cada óleo essencial em estudo. [10,65-69]

3.2.1.1. Objetivo

Este ensaio tem como objetivo determinar a capacidade antioxidante *in vitro* dos quatro óleos essenciais em estudo, provenientes das espécies *S. aromaticum*, *O. basilicum*, *O. vulgare* e *C. sinensis*, através da capacidade que estes apresentam em inibir ou retardar a peroxidação lipídica. Para este propósito utilizou-se o Sistema β -Caroteno/Ácido linoleico, possibilitando obter valores de IC₅₀ para cada óleo essencial em estudo, bem como

analisar e comparar o poder antioxidante dos mesmos e com um antioxidante sintético, o BHT.

3.2.2. Parte Experimental

3.2.2.1. Materiais e Métodos

3.2.2.1.1. Reagentes

Uma solução de β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) foi preparada em clorofórmio (Pronalab, Lisboa, Portugal) de forma a estar numa concentração de 20 mg/mL.

O uso de ácido linoleico (Thermofisher scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) deve-se ao facto deste ácido ser um lípido que sofre peroxidação lipídica quando está sujeito às seguintes condições, calor (50°C) e xigénio, libertando radicais hidroperóxidos que atacam a molécula altamente insaturada do β -caroteno.

O Tween 40 (Thermofisher scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) foi usado para emulsionar o ácido linoleico em água destilada-.

O metanol (Honeywell, Muskegon, Estados Unidos da América) foi utilizado como solvente para os óleos em estudo.

3.2.2.1.2. Determinação da atividade antioxidante

Para determinar a capacidade antioxidante por este método foi necessário preparar diferentes diluições dos óleos em metanol com concentrações distintas (5%; 3,75%; 2,5%; 1,25%; 0,5%; 0,25% (V/V)).

Uma emulsão de β -caroteno foi preparada da seguinte maneira: num balão de fundo redondo (500 mL) foram adicionados 500 μ L da solução de β -caroteno numa concentração de 20 mg/mL em clorofórmio, 120 μ L de ácido linoleico, juntamente com 1200 μ L de Tween e 3 mL de clorofórmio. Após homogeneização, a mistura foi evaporada num evaporador rotativo a vácuo durante 5 minutos a 45°C, para que o clorofórmio fosse removido da mistura. Imediatamente a seguir, foram lentamente adicionados ao resíduo 300 mL de água destilada saturada com oxigénio que foi agitada vigorosamente para se formar uma emulsão.

A emulsão considerada como o branco foi preparada num balão de fundo redondo (100 mL), ao qual se adicionaram 40 µL de ácido linoleico, 400 µL de Tween e 1 mL de clorofórmio. Procedeu-se do mesmo modo que a emulsão de β-caroteno no que diz respeito à evaporação do clorofórmio. Por fim adicionaram-se 100 mL de água destilada saturada com oxigénio.

Em tubos de ensaio colocaram-se 300 µL das diluições dos óleos preparadas anteriormente e adicionaram-se 5 mL da emulsão de β-caroteno, fazendo-se duplicados para cada concentração de teste. Nos tubos de controlo, também em duplicado, colocaram-se 300 µL de metanol e 5 mL da emulsão de β-caroteno, não se colocou o antioxidante pois pretende-se que nestes tubos ocorra peroxidação lípica. No que diz respeito ao tubo do branco este foi preparado da seguinte maneira: adicionaram-se 300 µL de metanol e 5 mL da emulsão branco. Após a preparação de todos os tubos, estes foram sujeitos a agitação e colocados num banho de água a 50 °C durante 2 horas.

As absorvâncias dos tubos contendo o branco e o controlo foram lidas a 470 nm ao tempo zero (t= 0h) Após as 2 horas de incubação, as absorvâncias de todos os tubos inclusive o tubo do branco e do controlo foram medidas a 470 nm..

A atividade antioxidante foi medida em termos de percentagem inibição da oxidação do β-Caroteno pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{amostra}^{t=2h} - Abs_{controlo}^{t=2h})}{(Abs_{controlo}^{t=0h} - Abs_{controlo}^{t=2h})}$$

Onde $Abs_{amostra}^{t=2h}$ refere-se à absorvância da amostra em estudo após as duas horas de incubação, $Abs_{controlo}^{t=2h}$ corresponde à absorvância do controlo após as duas horas de incubação e por fim $Abs_{controlo}^{t=0h}$ diz respeito à absorvância inicial do controlo.

3.2.2.2. Esquema Representativo da metodologia aplicada



Diluições em metanol nas concentrações (5%; 3,75%; 2,5%; 1,25%; 0,5%; 0,25% (V/V)).

Figura 12: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β -Caroteno: preparação das diluições dos óleos em estudo em metanol.

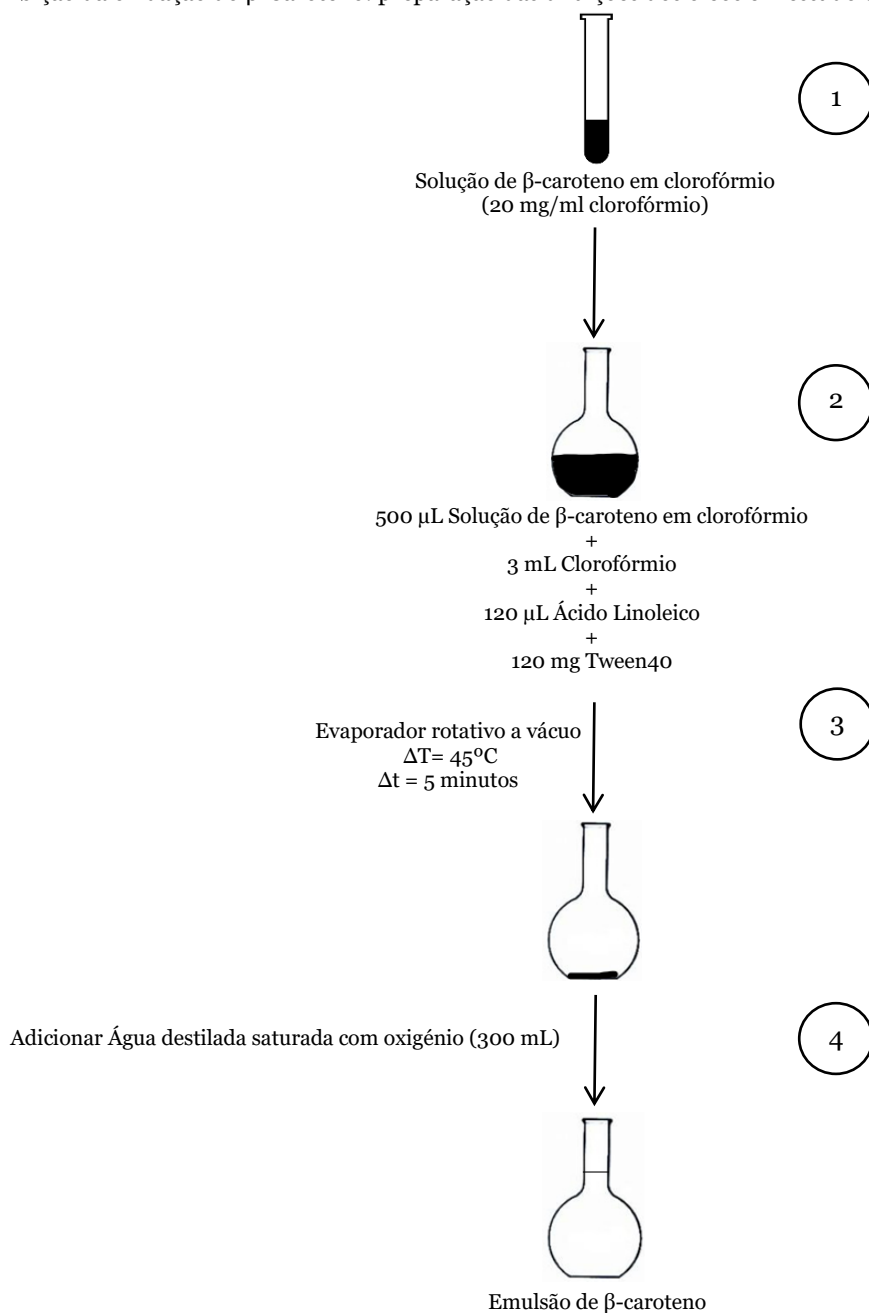


Figura 13: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β -Caroteno: preparação da emulsão β -Caroteno.

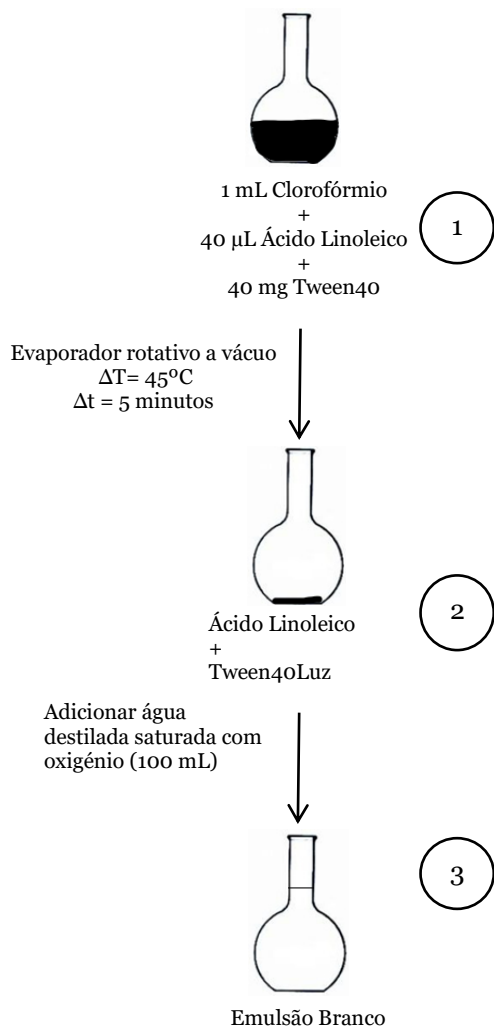


Figura 14: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β -Caroteno: preparação da emulsão branca.

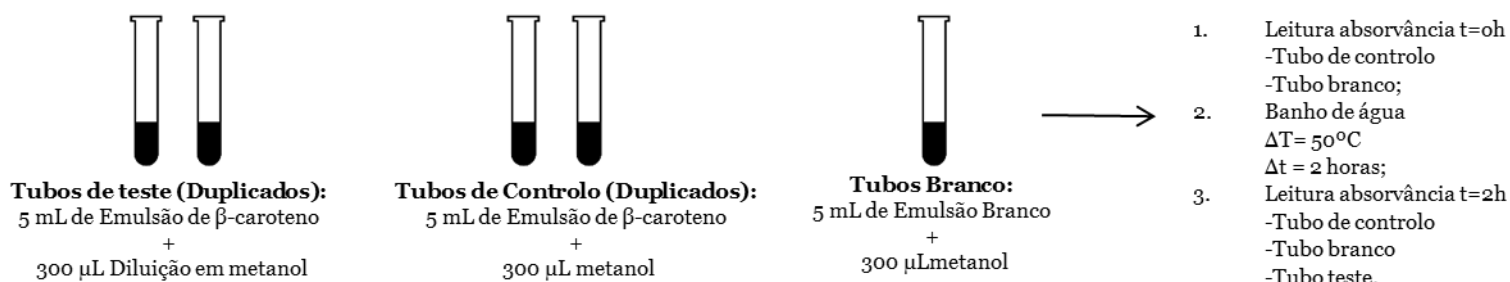


Figura 15: Esquema representativo da metodologia executada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da oxidação do β -Caroteno: preparação dos tubos de teste com as amostras, tubos de controle e o tubo branco.

3.2.2.3. Tratamento de resultados

Para efetuar a análise dos resultados obtidos no sistema β -Caroteno/ácido linoleico realizou-se um ensaio independente para cada alíquota sujeita às diferentes condições no ensaio de estabilidade acelerada, mas também se efetuou um ensaio independente aos óleos pré-estabilidade. A análise baseou-se nas absorvâncias obtidas após leitura num espectrofotómetro a 470 nm das soluções de teste.

O tratamento e posterior análise foi alcançado recorrendo ao uso de folhas de cálculo do Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016), nestas foram introduzidos os valores das absorvâncias obtidas, procedendo-se aos seguintes passos:

1. Introduzir os valores de absorvância obtidos para os tubos controlo na folha de cálculo correspondente ao ensaio. É de salientar que esta medição foi feita às zero horas e após as duas horas em que as amostras se encontram num banho a 50°C;
2. Após as duas horas, as absorvâncias lidas após esse tempo, foram introduzidas na folha de cálculo anterior;
3. Para a construção da curva que representa a percentagem de inibição da oxidação do β -Caroteno em função da concentração do óleo procedeu-se à seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Abs_{amostra}^{t=2h} - Abs_{controlo}^{t=2h})}{(Abs_{controlo}^{t=0h} - Abs_{controlo}^{t=2h})}$$

O coeficiente de correlação (R) foi superior a 0,95 para todas as curvas, pois uma vez que se efetuaram duplicadas para cada concentração e para os tubos de teste, o resultado corresponde a duas curvas distintas.

4. O valor de IC₅₀ foi calculado através da substituição do y da curva por 50 obtendo a concentração que inibe 50% da oxidação do β -Caroteno. Posteriormente calcula-se a média dos dois IC₅₀ obtidos juntamente o desvio padrão.
5. Por fim, foi calculado o coeficiente de variação (CV) recorrendo à divisão do valor do desvio padrão pela média obtida, multiplicando por 100. O valor resultante não deverá ultrapassar cerca de 20%.

3.2.3. Discussão de resultados

A atividade antioxidante dos quatro óleos em estudo é analisada e discutida neste capítulo, por meio da capacidade da amostra em inibir 50 % da oxidação do β -Caroteno (IC₅₀) e posteriormente comparar o valor obtido com um antioxidante comercial, servindo este como um composto padrão, o BHT.

De um modo geral, pode-se afirmar que a absorvância aumenta conforme o aumento das concentrações, isto é, quanto maior a concentração prevê-se que a absorvância será maior,

traduzindo-se numa maior capacidade em inibir a oxidação do β -Caroteno, o que é expectável pois é nas concentrações maiores onde os compostos antioxidantes se encontram igualmente em maior concentração.

Tabela 11: Valores do IC₅₀ dos óleos essenciais de *C. sinensis*, *S.aromaticum*, *O.basilicum*, *O.vulgare* e do antioxidante BHT.

Óleo essencial	IC₅₀ (% V/V)	Média
<i>C.sinensis</i>	0,59	0,60 (± 0,01)
	0,60	
<i>S.aromaticum</i>	0,58	0,55 (± 0,05)
	0,51	
<i>O.basilicum</i>	0,92	0,88 (± 0,07)
	0,83	
<i>O.vulgare</i>	1,60	1,62 (± 0,04)
	1,65	
BHT	7,70 (± 0,62)	----

Tabela 12: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de 5°C do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Condição	Óleo Essencial	IC ₅₀ (%V/V)	Média	
Temperatura 5°C	<i>C.sinensis</i>	0,55	0,56 (± 0,01)	
		0,56		
	<i>S.aromaticum</i>	2,83	2,72 (± 0,15)	
		2,61		
	<i>O.basilicum</i>	1,14	1,12 (± 0,02)	
		1,10		
	<i>O.vulgare</i>	1,03	0,99 (± 0,06)	
		0,95		
		BHT	7,70 (± 0,62)	----

Tabela 13: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de 50°C do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Condição	Óleo Essencial	EC ₅₀ (µg/mL)	Média	
Temperatura 50°C	<i>S.aromaticum</i>	1,09	0,97 (± 0,17)	
		0,85		
	<i>O.basilicum</i>	1,04	1,02 (± 0,04)	
		0,99		
		BHT	7,70 (± 0,62)	----

Tabela 14: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de temperatura ambiente do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Condição	Óleo Essencial	IC ₅₀ (% V/V)	Média	
Temperatura ambiente	<i>C.sinensis</i>	0,67	0,66 (± 0,01)	
		0,66		
	<i>S.aromaticum</i>	0,94	0,95 (± 0,01)	
		0,96		
	<i>O.basilicum</i>	1,11	1,08 (± 0,04)	
		1,05		
	<i>O.vulgare</i>	1,16	1,14 (± 0,03)	
		1,12		
		BHT	7,70 (± 0,62)	----

Tabela 15: Valores do IC₅₀ do óleo essencial de *C.sinensis*, *S. aromaticum*, *O.basilicum* e *O.vulgare* sujeito as condição de temperatura ambiente do teste do ensaio de estabilidade acelerada e do antioxidante BHT

Condição	Óleo Essencial	IC ₅₀ (% V/V)	Média	
Luz	<i>S.aromaticum</i>	0,92	0,91 (± 0,02)	
		0,89		
	<i>O.basilicum</i>	1,27	1,18 (± 0,12)	
		1,10		
	<i>O.vulgare</i>	1,81	1,63 (± 0,12)	
		1,45		
		BHT	7,70 (± 0,62)	----

3.2.3.1 Óleo Essencial *Citrus sinensis*

Analisando os tubos visualmente, pode-se afirmar que estavam transparentes o que poderia significar que o óleo essencial não teve a capacidade de inibir a peroxidação lipídica como se verifica nos tubos de controle que possuem a mesma coloração pois não contêm nenhum antioxidante, contudo, após as leituras das absorvâncias e o respectivo tratamento de resultados, verificou-se que este óleo para além de possuir um IC₅₀ menor que o do antioxidante BHT, era também o segundo mais antioxidante no espectro dos quatro óleos em estudo.

Quando comparado com os resultados obtidos pelo método de redução do DPPH, verificou-se que o óleo essencial foi mais eficaz em inibir a peroxidação lipídica prevenindo assim a oxidação do β-Caroteno do que em sequestrar radicais livres reduzindo estes, como o radical de DPPH.

Em relação ao estudo da capacidade antioxidante do óleo essencial sujeito ao ensaio de estabilidade, em inibir 50 % da oxidação de β-Caroteno apenas se pôde testar em duas condições, a temperatura de 5°C e à temperatura ambiente, uma vez que nas condições de temperatura de 50°C e à luz, o óleo não se manteve estável, evaporando nas duas condições, sendo não elegível para a realização do ensaio presente neste capítulo nem do ensaio de redução do DPPH.

Entre as condições analisadas verificou-se que a atividade se manteve na mesma ordem de grandeza da atividade obtida para óleo essencial antes do ensaio de estabilidade acelerada. Comparando o óleo essencial de *C. sinensis* sujeito às condições de estabilidade, verificou-se que este possui uma menor capacidade de inibição quando sujeito à temperatura ambiente, pois apresenta um maior IC₅₀ (0,66 ±0,01) (Tabela 14).

Analisando o resultado obtido do óleo que foi mantido a 5°C comparando com o óleo não sujeito a condição de estabilidade, estes mantiveram um IC₅₀ relativamente próximo, de 0,56 (%V/V) (tabela 11) e 0,60 (%V/V) (Tabela 12), respetivamente. Estes valores podem significar que a composição química do óleo não deve ter sofrido alterações significativas, como é expectável, pois a temperaturas mais baixas as taxas de reação são inferiores.

Ao comparar a composição química do óleo essencial de *C. sinensis* que foi sujeito à temperatura ambiente durante 8 semanas com o óleo que não sofreu ensaio de estabilidade, verificou-se que a percentagem dos compostos químicos que o constituem variam, apesar de o composto maioritário ser o mesmo, o *D*-limoneno, o linalool está

presente em maior concentração na amostra que foi sujeita ao ensaio de estabilidade, o que pode justificar o ligeiro aumento da concentração que inibe 50 % da oxidação do β -Caroteno, pois no espectro de teste deste óleo a amostra que possui um maior IC_{50} é a que foi sujeito à condição de temperatura ambiente.

Em suma pode-se afirmar que no óleo proveniente de *C. sinensis* não houve uma variação significativa do óleo essencial no que diz respeito à atividade antioxidante, podendo referir-se que a sua capacidade antioxidante se manteve estável e praticamente intacta.

3.2.3.2. Óleo Essencial de *Syzygium aromaticum*

Os tubos de ensaio contendo como antioxidante o óleo de *S. aromaticum* visualmente em todas as concentrações demonstraram manter a coloração laranja característica do β -Caroteno, concluindo assim que o óleo essencial em questão foi capaz de inibir a oxidação do β -Caroteno, o que por fim foi confirmado pela leitura das absorvâncias e posteriormente pelo tratamento de resultados, que é demonstrada na tabela 16.

Comparando o valor obtido para o IC_{50} do óleo essencial de *S. aromaticum*, ($0,55 \pm 0,05$), com o valor do IC_{50} do antioxidante padrão utilizado ($7,70 \pm 0,62$) (Tabela 11), verifica-se que o óleo possui uma maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica, traduzindo-se na necessidade de uma menor concentração para inibir 50 % da oxidação do β -Caroteno. Analisando o conjunto de óleos essenciais usados neste estudo, constatou-se que o óleo de *S. aromaticum* é o que possui um IC_{50} menor, assim é aquele que possui uma maior capacidade antioxidante. Estes resultados mostraram uma correlação com os resultados obtidos no ensaio de redução do DPPH, onde o mesmo óleo se mostrou ser um dos mais eficientes em reduzir o radical DPPH.

No óleo em questão todas as alíquotas que foram sujeitas ao ensaio de estabilidade foram testadas relativamente à sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica. Ao comparar as alíquotas que foram sujeitas à temperatura ambiente e $50^{\circ}C$, e à luz verificou-se que estas não apresentam uma diferença significativa na capacidade antioxidante, uma vez que todas se encontram na mesma ordem de grandeza, como é demonstrado nas tabelas nas tabelas 14,13 e 15, respetivamente.

No que concerne à alíquota de óleo que se manteve a $5^{\circ}C$ verificou-se uma diminuição da atividade antioxidante, que se traduz num maior IC_{50} ($2,72 \pm 0,15$) (Tabela 12). Contudo em relação ao antioxidante padrão, BHT, o óleo mostrou-se um melhor antioxidante pois é necessário uma menor concentração de óleo para inibir 50 % da oxidação de β -Caroteno, o mesmo se reflete com as 3 condições referidas anteriormente.

Analisando os resultados obtidos pode-se prever que a composição química tenha alterado durante a realização do ensaio de estabilidade acelerada. Apesar de ser o segundo óleo mais antioxidante em 3 condições diferentes no conjunto dos óleos em estudo, constatou-se que existem diferenças entre as alíquotas que foram sujeitas às 4 condições de teste e a amostra que não foi sujeita ao ensaio de estabilidade.

Conclui-se que apesar de o composto maioritário ser o eugenol, tem de se compreender o óleo essencial como uma mistura de compostos que atuam sinergicamente entre si, como se pode verificar na capacidade antioxidante, o que pode justificar as diferenças obtidas entre as alíquotas sujeitas as condições de estabilidade, e entre estas e a amostra inicial que não foi submetida ao ensaio de estabilidade, pois esta última é a que apresenta uma maior capacidade antioxidante na inibição da peroxidação lipídica, pois é aquela que não sofreu alterações a nível químico, como se demonstrou nas alíquotas de estabilidade.

É de salientar que o resultado obtido por este método não corrobora os resultados obtidos pelo método de redução de DPPH, pois neste, o óleo demonstrou uma maior capacidade em sequestrar os radicais livres, tanto na amostra que não foi sujeita ao ensaio de estabilidade, como nas alíquotas que foram sujeitas às condições de estabilidade, sendo que nestas, a capacidade antioxidante aumentou.

Em suma, comparando todos os resultados obtidos para a análise da inibição da peroxidação lipídica, constatou-se que em 3 condições do ensaio de estabilidade acelerada, a capacidade antioxidante sofreu uma diminuição, mas constante nestas 3 condições, o mesmo não se verificou na condição referente à temperatura de 5°C, onde o óleo mostrou um comportamento menos antioxidante, porém, o óleo mostrou-se mais abtioxidante em todas as condições que o antioxidante sintético BHT. Todavia, o óleo que mostrou um IC₅₀ inferior, foi a amostra que não foi sujeita a nenhuma condição de estabilidade, demonstrando assim uma maior capacidade em inibir a oxidação do β-Caroteno.

3.2.3.3. Óleo essencial de *Ocimum basilicum*

Os tubos de ensaio contendo o óleo essencial de *O. basilicum* visualmente apresentavam uma diminuição sequencial da cor conforme a diminuição da concentração de óleo, traduzindo-se numa diminuição da atividade antioxidante. Deste modo, constatou-se que o óleo essencial de *O. basilicum* teve uma maior eficiência em inibir a peroxidação lipídica nas concentrações mais elevadas quando comparada com as concentrações mais baixas.

Após o tratamento de resultados, verificou-se que este óleo apresentou um IC₅₀ de 0,88 ± 0,07 (%V/V), isto é, a concentração que inibe 50 % da oxidação do β-Caroteno, é de 0,88

(%V/V). Quando comparado com o antioxidante sintético, BHT, verificou-se que o BHT possui um $IC_{50} = 7,70 \pm 0,627$ (%V/V), assim, é necessária uma maior concentração de BHT para se obter a inibição de 50 % do β -Caroteno, enquanto para o óleo essa concentração é inferior, como demonstrado na tabela 11.

Em relação a todas as alíquotas que foram sujeitas às condições de estabilidade, estas foram testadas para a capacidade de o óleo essencial de *O. basilicum* inibir a peroxidação lipídica, pois todas as alíquotas estavam elegíveis para a realização do ensaio.

Comparando todos os valores obtidos de IC_{50} para todas as alíquotas das condições sujeitas ao ensaio de estabilidade, verificou-se que em todas as condições a capacidade antioxidante se encontra na mesma ordem de grandeza, concluindo assim que a capacidade antioxidante se manteve estável após o ensaio de estabilidade. No entanto, é de realçar que quando se comparam os valores obtidos nas amostras das condições de estabilidade com a amostra que não foi sujeita a nenhuma condição, esta mostrou uma maior capacidade antioxidante no que diz respeito à inibição da peroxidação lipídica, como é indicado pelo valor de $IC_{50} = 0,88 \pm 0,07$ (%V/V).

Analisando todas as alíquotas individualmente, verificou-se que a alíquota que demonstrou uma maior diminuição da atividade antioxidante foi a alíquota que foi sujeita à exposição de luz, obtendo um $IC_{50} = 1,18 \pm 0,12$ (%V/V) (Tabela 15). A segunda alíquota que apresentou uma ligeira diminuição foi a alíquota que foi colocada a 5°C, tendo um $IC_{50} = 1,12 \pm 0,02$ (%V/V) (Tabela 12). Em relação à alíquota que foi sujeita à temperatura ambiente obteve-se um $IC_{50} = 1,08 \pm 0,04$ (%V/V) sendo a segunda alíquota com um maior poder antioxidante no espectro de teste do óleo essencial de *O. basilicum* (Tabela 14). A alíquota que apresentou uma maior atividade antioxidante na inibição da peroxidação lipídica, foi a alíquota que se manteve a temperatura mais elevada (50°C) resultando num $IC_{50} = 1,02 \pm 0,04$ (%V/V) (Tabela 13). Uma possível justificação para a obtenção deste resultado pode resultar de uma evaporação dos compostos voláteis presentes no óleo e os compostos responsáveis pela atividade antioxidante se terem concentrado transformando quimicamente o óleo essencial de *O. basilicum* obtendo-se uma maior atividade antioxidante.

Em relação à composição química, o composto maioritário é o linalool na amostra de óleo que não sofreu estabilidade acelerada, o segundo composto em maior percentagem é o eucaliptol, o que pode demonstrar a sinergia entre compostos.

Em suma, tanto o óleo que não foi sujeito ao ensaio de estabilidade, como as alíquotas de óleo das condições do teste de estabilidade acelerada, apresentaram uma maior atividade antioxidante, pois todos os valores de IC_{50} são inferiores ao valor obtido para o antioxidante padrão, BHT, demonstrando assim que a concentração de óleo necessária para inibir 50 % da oxidação do β -Caroteno, é inferior à concentração necessária do BHT para obter o mesmo efeito.

3.2.3.4. Óleo essencial de *Origanum vulgare*

Como verificado no óleo essencial de *O. basilicum*, os tubos de ensaio do óleo de *O. vulgare* demonstraram um perfil sequencial de diminuição da coloração, representando uma linearidade no que diz respeito à inibição da peroxidação lipídica, pois quanto maior a concentração de antioxidante, maior será a percentagem de inibição.

A concentração de óleo essencial de *O. vulgare* necessária para inibir 50 % da oxidação do β -Caroteno é de $1,62 \pm 0,04$ (%V/V). Traduzindo-se no óleo com menor capacidade antioxidante na inibição da peroxidação lipídica, em comparação com os três óleos também utilizados nesta dissertação. Todavia, o seu IC_{50} é inferior ao $IC_{50} = 7,70 \pm 0,62$ (%V/V) obtido para o antioxidante sintético., refletindo assim uma menor concentração necessária de óleo em comparação com o BHT, para se obter o resultado pretendido (Tabela 11).

Para avaliar se a atividade antioxidante se mantinha constante no que diz respeito à capacidade de inibir a peroxidação lipídica, procedeu-se novamente à realização do ensaio β -Caroteno/ácido linoleico, para as alíquotas que se mostraram elegíveis para o ensaio, sendo estas, a alíquota sujeita à temperatura ambiente, a 5°C e exposição à luz.

Comparando as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade com a alíquota inicial, isto é, a alíquota que não foi sujeita ao ensaio de estabilidade, verificou-se que esta possuía um valor de IC_{50} superior o que se traduz numa menor atividade antioxidante, em relação aos valores obtidos para o IC_{50} de cada alíquota do óleo essencial de *O. vulgare*.

No que diz respeito à alíquota exposta à luz, constatou-se que a atividade antioxidante era semelhante à alíquota inicial, pois o valor de IC_{50} corresponde a $1,63 \pm 0,25$ (%V/V), valor similar a $1,62 \pm 0,04$ (%V/V), sendo este valor de IC_{50} obtido para a alíquota inicial (Tabela 15). Quando comparado com o antioxidante sintético, verificou-se que em ambas as alíquotas o IC_{50} é inferior ao valor de IC_{50} do BHT, demonstrando assim um comportamento mais eficaz em inibir a peroxidação lipídica, uma vez que se necessita de uma menor concentração para se inibir 50 % da oxidação do β -Caroteno.

Para a alíquota sujeita à temperatura ambiente, o valor de IC_{50} diminuiu ligeiramente, o que significa que, por conseguinte, a atividade antioxidante aumentou, quando comparado com o valor do IC_{50} para a alíquota que não sofreu ensaio de estabilidade acelerada. Contudo, a alíquota que se manteve a 5°C, mostrou um aumento significativo da atividade antioxidante pois foi a alíquota que obteve um valor de $IC_{50} = 0,99 (\pm 0,06) (\%V/V)$, inferior em comparação com todos os valores obtidos para as diferentes condições, o que traduz que a alíquota que se manteve a 5°C, aumentou a sua capacidade de inibição da peroxidação lipídica, sendo considerada a segunda alíquota no que diz respeito a esta condição, com maior atividade antioxidante (Tabela 12). Apesar disso, todas as alíquotas óleo essencial de *O. vulgare* em estudo do demonstraram ter uma capacidade superior em inibir a peroxidação lipídica, quando comparadas com o antioxidante sintético, BHT, pois este último necessita de uma maior concentração para inibir 50 % da oxidação do β -Caroteno, demonstrando assim um comportamento superior do óleo essencial, no que concerne à atividade antioxidante.

3.2.4. Conclusão e Perspetivas futuras

O sistema β -Caroteno/ácido linoleico é largamente utilizado para estudar a atividade antioxidante, uma vez que avalia a capacidade da amostra em estudo em inibir a oxidação do β -Caroteno, induzida pelos radicais resultantes da peroxidação do ácido linoleico, quando sujeito a uma temperatura elevada e à presença de oxigénio. Este método tem sido empregue para estimar a capacidade de compostos antioxidantes presentes em extratos de plantas em sequestrar o radical peróxido ($LOO\cdot$) originado pela oxidação do ácido linoleico.

O estudo da capacidade em inibir a peroxidação lipídica foi realizado com as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada, de forma a comparar se a atividade antioxidante se manteve estável ou sofreu alterações durante o período do ensaio de estabilidade. Para isto, primeiramente foi realizado o ensaio com uma alíquota que não foi sujeita a nenhuma condição de teste, posteriormente foi executado o ensaio de β -Caroteno/ácido linoleico com as alíquotas sujeitas às seguintes condições: temperatura ambiente, 5°C, 50°C e exposição à luz.

Verificou-se que o óleo essencial que possui uma maior atividade antioxidante é o óleo de *S. aromaticum* que não foi sujeito a nenhuma condição de teste. Contudo, após o ensaio de estabilidade acelerada, o óleo que mostrou a maior capacidade antioxidante foi o óleo essencial de *C. sinensis*.

Conclui-se de uma forma geral, que após o período do ensaio de estabilidade, a capacidade de inibir a peroxidação lipídica sofreu alterações em todas as alíquotas selecionadas para a realização do ensaio β -Caroteno/ácido linoleico.

Futuramente, seria interessante averiguar se a atividade antioxidante pode sofrer alterações caso se estudasse uma mistura de óleos essenciais, para potenciar o uso destes como ingredientes antioxidantes em cosmética e assim satisfazer as necessidades do consumidor. Apesar disso também seria interessante estudar, isoladamente, a atividade dos compostos maioritários, para assim avaliar a contribuição destes na atividade referida.

Capítulo 4

Atividade citotóxica

4.1. Considerações gerais

Atualmente, existem diversos métodos com a finalidade de testar a citotoxicidade *in vitro* de uma amostra, dentro destes inclui-se os métodos de XTT, absorção do vermelho neutro (NRU) e de MTT. [38,70]

Neste estudo, o ensaio realizado foi o ensaio *in vitro* de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT – *Microculture Tetrazolium Assay*). Este possibilita estudar e avaliar a toxicidade provocada por compostos em diversas células em cultura. O MTT é um sal de tetrazólio, solúvel em água, que apresenta uma coloração amarela, que é metabolicamente reduzido por enzimas presentes nas mitocôndrias a cristais insolúveis de formazano que possuem uma cor roxa característica. Estes cristais formados são impermeáveis às membranas celulares, resultando assim na sua acumulação no interior das células. Após a solubilização dos cristais de formazano usando um álcool, mais propriamente, o isopropanol, procede-se à leitura das absorvâncias. Podendo-se afirmar que a quantidade de formazano formado é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente viáveis, que se encontram em cultura, sendo assim considerado um método indireto na medição da citotoxicidade de amostras. [38,70]

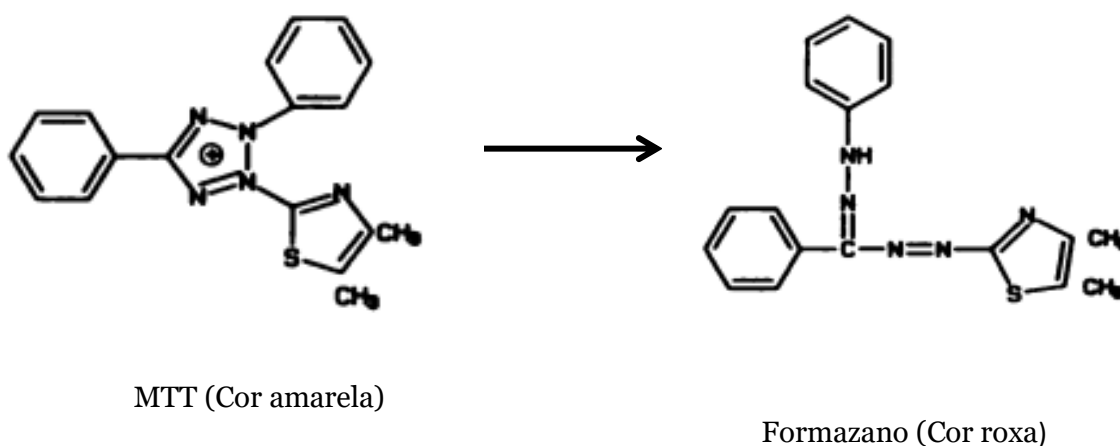


Figura 16: Reação de conversão do MTT em Formazano, adaptado (70)

4.1.1. Objetivo

Este capítulo tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais em estudo provenientes das seguintes espécies, *S. aromaticum*, *O. basilicum*, *O. vulgare* e *C. sinensis*, na linha celular da pele, os queratinócitos humanos (HaCat) representativa da

epiderme humana, recorrendo ao ensaio colorimétricos MTT, adaptado da ISO/EN 10993-5.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Materiais e Métodos

4.2.1.1. Células

A análise da atividade citotóxica dos quatro óleos, foi feita a partir de uma linha celular da pele, os queratinócitos humanos. A linha usada designa-se por HaCat (ATCC- CCS-300493) e representa a epiderme humana. Esta linha celular foi cultivada em meio DMEM (*low glucose*) suplementado com glucose, bicarbonato de sódio, soro fetal bovino (SFB), estreptomicina e penicilina. As culturas celulares foram subcultivadas a cada dois dias, isto é, a cada 48 horas ou sempre que se mostrassem confluentes, e mantidas numa estufa a 37°C com 5% de CO₂, o que permitiu o crescimento continuado desta linha.

A linha celular utilizada para a realização do ensaio encontrava-se entre as passagens 50 e 66.

4.2.1.2. Reagentes

O meio DMEM (Biowest, Missouri, Estados Unidos da América) suplementado com 35,9 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St.Louis, Estados Unidos da América), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Nova Iorque, Estados Unidos da América), 25 mM de glucose (VWR, Portland, Estados Unidos da América) e soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St.Louis, Estados Unidos da América), será mencionado no decorrer desta dissertação como “meio completo” sendo utilizado como meio de cultura para a linha celular usada.

O azul tripano (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado para distinguir células viáveis de células mortas, servindo para contagem na câmara de Neubauer.

O composto brometo de metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT) (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha) foi empregue para medir a viabilidade celular.

O propan-2-ol (Fisher Scientific, Reino Unido), ou trivialmente denominado como isopropanol foi utilizado para solubilizar os cristais de formazano resultantes da reação de MTT.

O dimetilsulfoxido (DMSO) (Fisher Scientific, Reino Unido) foi usado como emulsionante dos óleos essenciais (OE) utilizados durante a parte experimental desta dissertação.

4.2.1.3. Determinação da citotoxicidade *in vitro*

A atividade citotóxica dos óleos essenciais em queratinócitos humanos da pele foi determinada *in vitro* de acordo com o ensaio MTT caracterizado na ISO/EN 10993-5 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity.

1. Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços

Inicialmente, as células foram cultivadas em meio completo em t-flasks (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) de 75 cl, sendo utilizadas para o ensaio quando se mostraram confluentes. Para este fim, o meio completo que se encontrava no frasco de cultura foi descartado e foi adicionado cerca de 1 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,05 % (v/v), que serviu de solução de lavagem. De seguida, foi descartada esta solução e foi adicionada mais uma vez solução de Tripsina-EDTA a 0,05 % (v/v) cerca de 3-4 mL que tem como objetivo soltar as células da parede do frasco. Em seguida, foram adicionados cerca de 6 mL de meio completo para neutralizar a atividade da enzima tripsina, formando assim uma mistura de células, meio completo e tripsina, que prontamente foi transferida para um falcon de 15 mL, sendo levado a centrifugar (Gyrozen, Coreia) a 125 xg, durante 5 minutos. Seguidamente, o sobrenadante foi descartado onde se verifica que o pellet de células se encontrava depositado no fundo do falcon, sendo ressuscitado vigorosamente em 10 mL de meio completo. Desta ressuspensão celular, foram retirados 10 µL para um eppendorf e adicionado ao mesmo 10 µL de azul tripano, tendo como finalidade a marcação de células viáveis para a contagem na câmara de Neubauer. Para calcular a concentração de células viáveis por mL de solução foi necessário recorrer á seguinte equação (1):

$$\text{Concentração de células} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \text{média das células por quadrante} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10000$$

Com o valor de células por mL de solução, resultante da equação anterior, a suspensão celular foi diluída em meio completo para que assim cada poço da placa de 96 poços (VWR, Pensilvânia, Estados Unidos da América) possuisse 10000 células, sendo transferidos 100 µL da solução anterior em 60 poços dos 96, sendo que nos restantes foram colocados 100 µL de uma solução de PBS.

Numa placa estéril de 96 poços, foram reservados 7 poços para as concentrações de óleo essencial em teste, um poço foi destinado a ser controlo positivo, contendo 100 µL de uma

solução de SDS a 10%, representando 100 % de toxicidade, mas também foi necessário ter controlos negativos, neste caso foram usados dois poços diferentes com 100 μ L cada contendo, DMSO (solvente) e Meio completo, respetivamente, representando assim 0% de citotoxicidade.

Deste modo, em cada poço da placa, foram colocados 100 μ L da solução de células preparadas anteriormente, e a placa foi posta a incubar (LEEC Culture Safe CO₂) durante 24 horas, a 37 °C, com 95% de humidade do ar e contendo 5 % de CO₂, permitindo a adesão das células ao fundo de cada poço.

2. Preparação dos estímulos e estimulação das células

O ensaio para os óleos essenciais em meios aquosos implica a estabilização da emulsão do óleo em água, pelo que é necessário adicionar um solvente ou um agente emulsionante que garanta a solubilização dos óleos essenciais no decorrer de todo o ensaio. Um dos solventes mais usados é o DMSO, sendo assim necessário encontrar a concentração máxima tolerada pelas células, mas que ao mesmo tempo fosse eficaz em solubilizar o óleo no meio completo.

Para todos os ensaios, a gama de concentrações de óleo foram: 0,25; 0,125; 0,06; 0,03; 0,016; 0,0078; 0,0039%. Num primeiro eppendorf colocaram-se 7 μ L de uma mistura Óleo:DMSO (50/50 %) com 1393 μ L de meio completo, fazendo vórtex seguidamente, e num segundo eppendorf colocaram-se 700 μ L de meio completo e 700 μ L do primeiro eppendorf, fazendo-se assim diluições 1:2, sucessivamente. Antes dos estímulos serem colocados na placa (100 μ L em cada poço), cada eppendorf foi sujeito ao agitador vórtex, para garantir que o óleo estivesse disperso por toda a solução.

Após o período de preparação e do período de incubação, o meio completo foi removido de cada poço e descartado com cuidado uma vez que tem de se garantir que as células permaneçam aderidas ao fundo do poço. Aos poços reservados para os estímulos foram adicionados 100 μ L a cada poço e aos poços reservados para os controlos foram adicionados 100 μ L de cada solução, no positivo colocou-se solução de SDS a 2%, e num poço negativo, adicionou-se solução de DMSO a 0,25%, e no outro poço positivo apenas se colocou meio completo. Após isto, a placa foi colocada a incubar (LEEC Culture Safe CO₂) durante 24 horas a 37°C com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂.

3. Execução do ensaio MTT

Após a incubação das células com os estímulos, as soluções foram removidas e foram adicionados 150 µL de uma solução de PBS que tem como finalidade lavar o que possa ter ficado no poço e em seguida, no escuro, foram acrescentados 100 µL de uma solução de MTT -Meio completo a cada poço de ensaio e controlo. A placa foi revestida com papel de alumínio e em seguida posta a incubar durante 4 horas a 37°C com 95 % de humidade do ar contendo 5 % de CO₂.

Logo após o período de incubação, a solução de cada poço foi retirada e descartada com cuidado para que os cristais de formazano permanecessem no fundo do poço. Para dissolver os cristais formados foram adicionados 100 µL de isopropanol, sendo ressuspenso, para promover uma mais rápida e fácil dissolução. Por último, as absorvâncias foram lidas a 570 nm e a 650 nm, num leitor de microplacas (Biorad, Tóquio, Japão).

4.2.2. Esquema representativo da metodologia aplicada

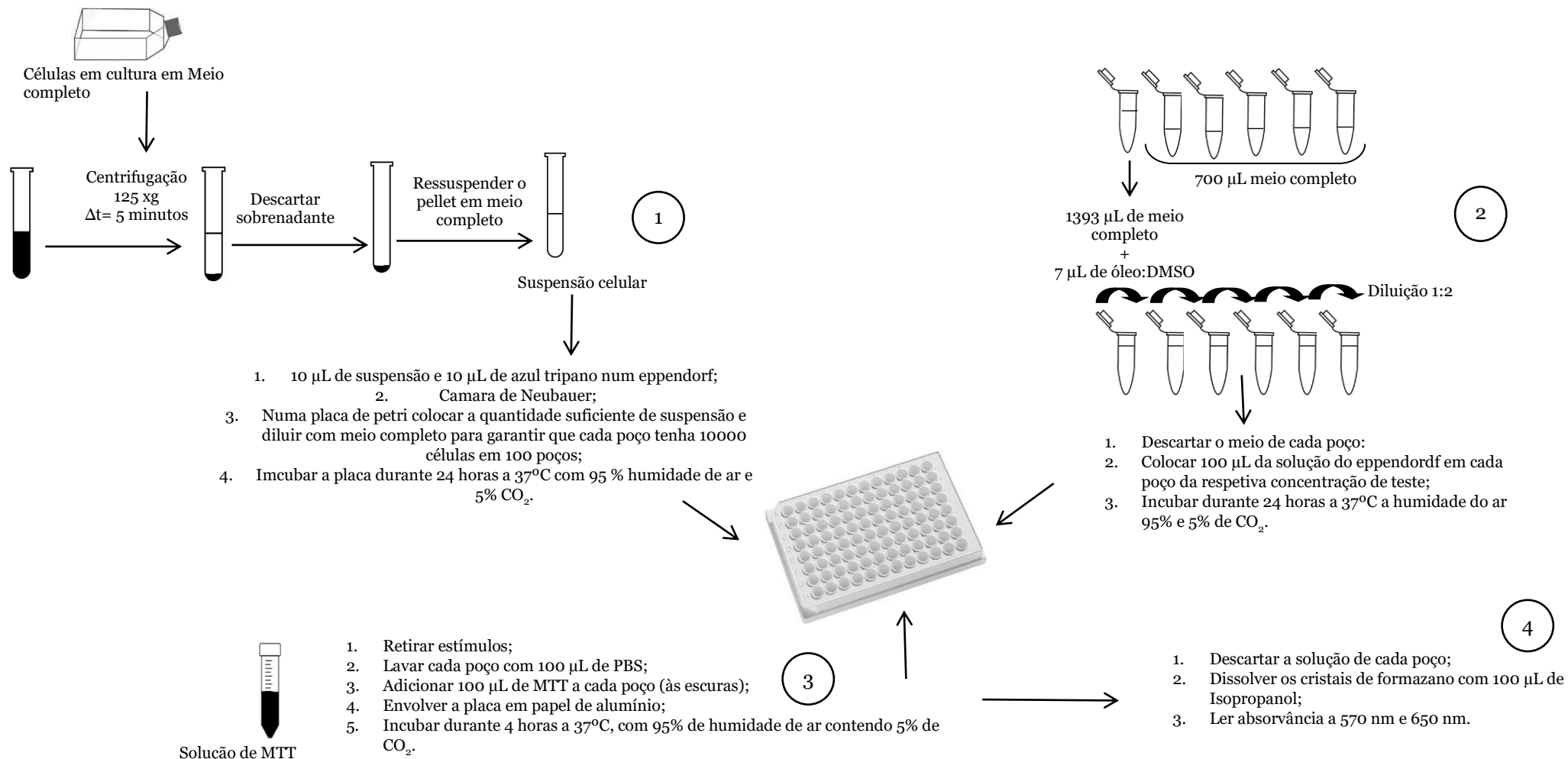


Figura 17: Esquema representativo da metodologia desempenhada no estudo da atividade citotóxica dos óleos em estudo pelo ensaio MTT. Os números correspondem à ordem pela qual se elaborou o ensaio

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha	Concentração (V/V)											
	PBS	CRL + (SDS)	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	0,0078	0,0039	CRL - (DSMO)	CRL - (Meio completo)	PBS
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 18: Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada na execução do ensaio de MTT para os óleos essenciais em estudo.

Legenda:

- Contorno negrito corresponde à placa de 96 poços;
- Poços com coloração cinzento-escuro representam os poços (n = 6) que estiveram em contacto com os estímulos da solução de óleo na respetiva concentração;
- Os poços (n = 6) branco acinzentado simbolizam os poços do controlo positivo, contendo solução de SDS;
- A cinzento retrata os poços (n = 6) com as células que ficaram em contacto com o estímulo da solução de DMSO (controlo negativo);
- Os poços que apenas estiveram em contacto com o meio completo estão coloridos de cinzento-claro.

4.2.3. Tratamento de resultados

Uma placa representa um ensaio e este consistiu no estudo e análise do comportamento da linha celular HaCat na presença de um óleo essencial. A placa possuía 5 repetições de cada concentração em estudo (n= 5 poços), 5 repetições para cada controlo negativo (meio completo e solvente, respetivamente) e cada controlo positivo. Para cada óleo foram realizados entre 2-3 ensaios independentes.

O tratamento e subsequente análise foi conseguido através de folhas de cálculo de Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016) e por meio do programa Graphpad Prism (versão 8.0.2 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA) e compreendeu os seguintes passos:

1. Leitura da absorvância: Com recurso a um leitor de microplacas, mediu-se a absorvância a 570 e 650 nm, para posteriormente subtrair os valores de absorvância a 570 nm para cada concentração e para cada controlo aos valores obtidos a 650 nm.

2. Porcentagem de viabilidade celular: Primeiramente calculou-se a média dos valores obtidos no ponto 1 referente ao meio completo, controlo negativo. Para cada valor de absorvância anteriormente calculado (ponto 1), este foi multiplicado por 100 e dividido pela média obtida das absorvâncias do controlo negativo, meio completo. Posteriormente foi calculada a média e o desvio padrão para cada concentração e cada controlo.
3. Construção do gráfico de barras: Com os valores de porcentagem de viabilidade celular calculados no ponto anterior, e com as concentrações teste do óleo essencial, foi construído um gráfico de barras, tanto no Excel como no Graphpad .

4.3. Discussão de resultados

A atividade citotóxica dos óleos essenciais de *C. sinensis*, *S. aromaticum*, *O. basilicum* e *O. vulgare*, é analisada e discutida neste capítulo a partir dos perfis obtidos para a linha celular HaCat, representando a epiderme humana. Posteriormente, esta atividade é relacionada com a composição química dos respetivos óleos.

A atividade citotóxica é determinada a partir da porcentagem da viabilidade celular, da linha celular HaCat, para a gama de concentração dos óleos em estudo de 0,250-0,004 % v/v, sendo que estas porcentagens são normalizadas ao controlo negativo designado “Meio” (células sem estimulação de óleo essencial), onde se obteve o valor máximo de viabilidade celular, 100 %.

Para garantir que os óleos essenciais são emulsionados no meio completo, recorreu-se ao uso de um solvente, o DMSO. Contudo, teve de se averiguar se à concentração máxima de teste dos óleos essenciais o DMSO era biocompatível não tendo então influência na citotoxicidade induzida pelos óleos essenciais. Posto isto, é de salientar que se a porcentagem de viabilidade celular for superior a 70 % considera-se que essa concentração é não tóxica, sendo assim biocompatível para esta linha celular. Nesta ótica pode-se afirmar que o solvente usado apenas é citotóxico na concentração mais elevada, isto é, na concentração a 2% (v/v). Analisando a figura 19 pode-se concluir que à concentração de 0,250% o DMSO é biocompatível para esta linha celular, podendo-se inferir que a esta concentração a citotoxicidade verificada tanto nos óleos essenciais apenas resulta da ação destes e não da mistura entre o óleo e o DMSO.

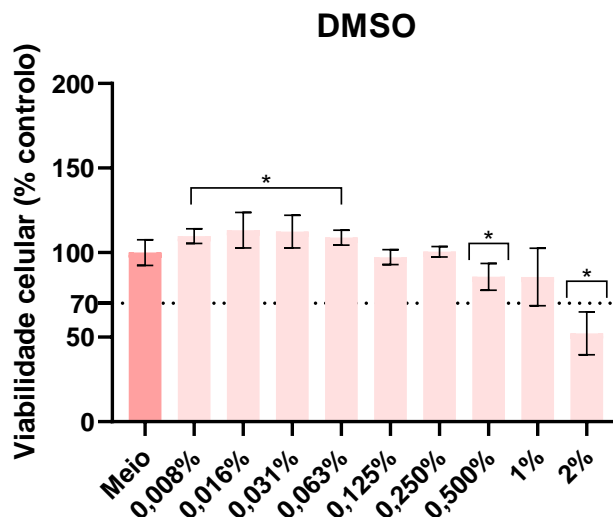


Figura 19: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas expostas a diferentes concentrações do solvente DMSO. “Meio” corresponde a células sujeitas ao meio de cultura completo. “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística t-Test.

O óleo essencial de *S. aromaticum* foi testada na gama de concentração de 0,250% a 0,004% (v/v). A partir da concentração de 0,008% até a concentração de 0,004% (v/v) verifica-se que a viabilidade celular é superior a 70 % quando comparado com o controlo, assim pode-se concluir que o óleo essencial de *S. aromaticum* apenas é biocompatível nestas duas concentrações. Contudo, entre estas duas concentrações constata-se que a concentração inferior, isto é, a 0,004, é aquela que apresenta uma maior percentagem de viabilidade celular na linha celular utilizada. (Figura 20)

O óleo essencial de *O. Basilicum* foi testado a gama de concentração de 0,250% a 0,004%. Com a viabilidade superior a 70 % considera-se que essa concentração é biocompatível assim nas concentrações de 0,008 a 0,004% (v/v), contrariamente nas concentrações de 0,250 a 0,030% não são biocompatíveis para a linha celular HaCat. A concentração de 0,016% pode gerar dúvidas em relação à sua biocompatibilidade uma vez que esta concentração interceta a percentagem mínima de viabilidade celular, podendo considerar-se que não é uma concentração ideal para se trabalhar neste tipo de células. (Figura 21) Em relação ao óleo essencial de *C. sinensis*, este apenas é citotóxico nas concentrações de 0,250 a 0,125% (v/v), uma vez que a viabilidade celular é inferior a 70% quando comparado com o controlo negativo. Contudo, as restantes concentrações, isto é, da concentração 0,060 a 0,004% são biocompatíveis para esta linha celular, e é de salientar que a biocompatível ultrapassa a linha mínima de viabilidade celular, podendo-se constatar que estas concentrações são seguras para este tipo de células. (Figura 22)

O óleo essencial de *O. vulgare* é considerado um dos óleos em estudo menos citotóxico, uma vez que apenas é biocompatível na gama de concentração de 0,016 a 0,004% (v/v), pois nestas concentrações a viabilidade celular é superior a 70% quando comparado com o controlo. Assim, as concentrações menos biocompatíveis, de 0,250% a 0,030% (v/v), não são recomendadas para trabalhar com a linha celular utilizada. (Figura 23)

Em suma, pode-se concluir que o óleo essencial de *C. sinensis* é o óleo mais biocompatível para a linha celular HaCat, pois apenas apresenta atividade citotóxica nas duas primeiras concentrações em teste, enquanto os óleos essenciais em estudo não apresentam citotoxicidade até à concentração de 0,030% (v/v). As concentrações biocompatíveis com esta linha celular são 0,008 e a de 0,004% (v/v) em todos os óleos em estudo podendo ser usadas em ensaios futuros. A concentração que difere entre os óleos é a concentração de 0,016%, podendo ser considerada como aquela que definiu entre os três óleos menos biocompatíveis qual era o mais e o menos tóxico para esta linha celular. Assim, comparando o óleo essencial de *S. aromaticum*, de *O. basilicum* e o de *O. vulgare* conclui-se que o menos biocompatível é o óleo essencial de *S. aromaticum*, pois nesta concentração a viabilidade celular é inferior a 70%. Como é verificado na figura 16 o óleo essencial de *O. vulgare* na concentração de 0,016% é considerado não tóxico pois a sua viabilidade celular ultrapassa os 70%.

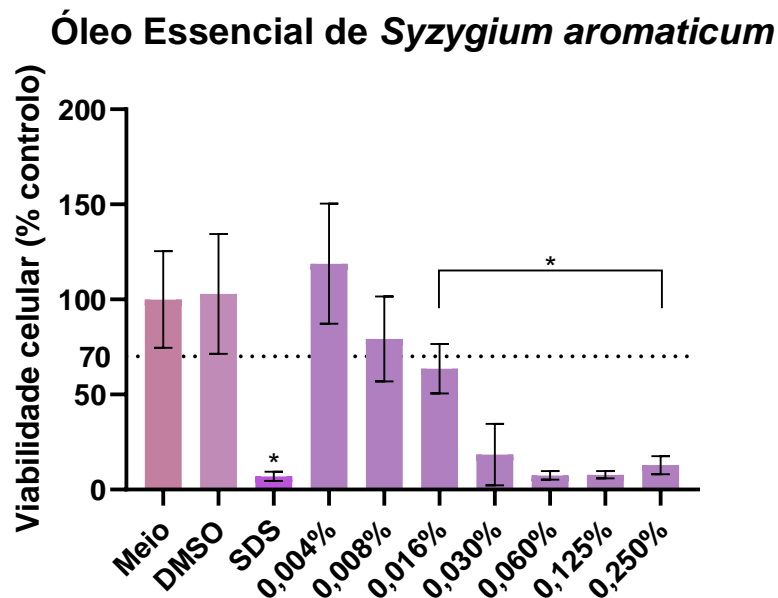


Figura 20: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *S. aromaticum*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

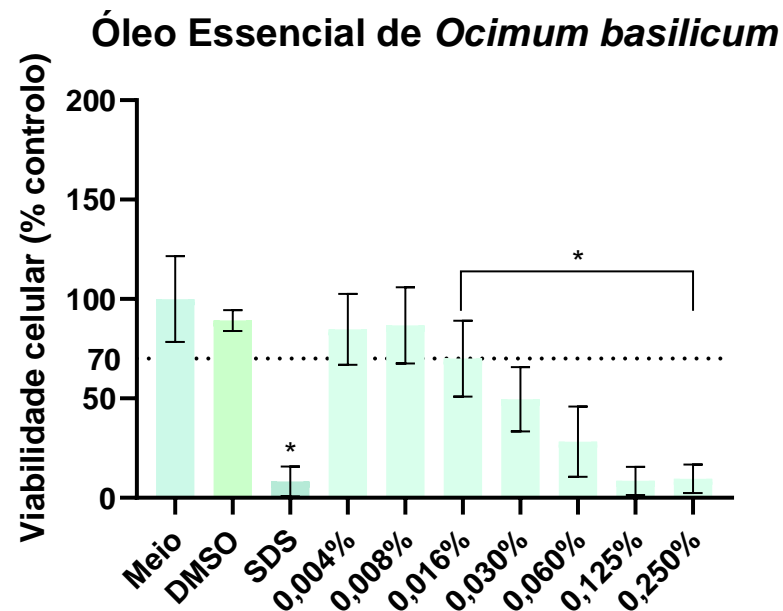


Figura 21: Viabilidade celular (% controlo) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. basilicum*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

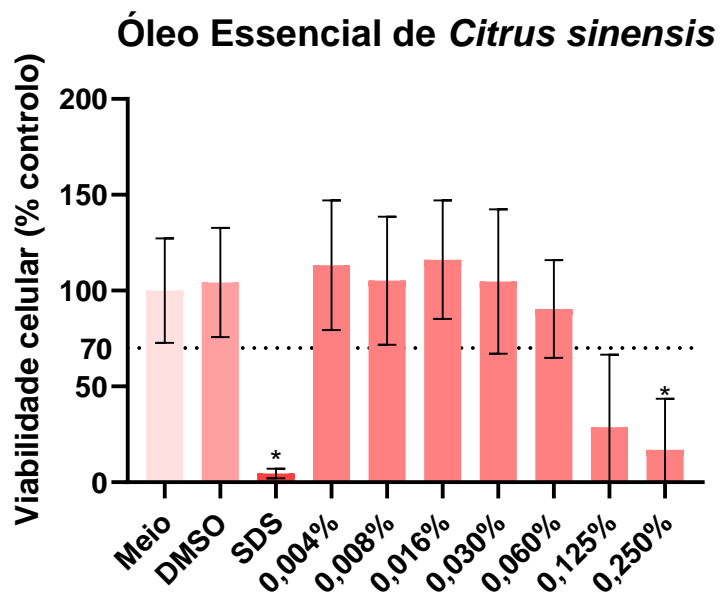


Figura 22: Viabilidade celular (% controle) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *C. sinensis*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

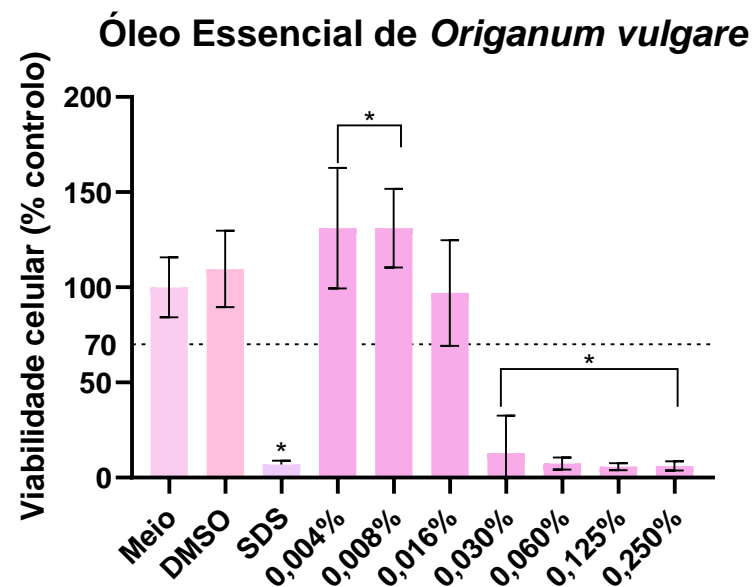


Figura 23: Viabilidade celular (% controle) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare*. “Meio” corresponde as células expostas ao meio de cultura completo. “DMSO” a células expostas ao solvente DMSO a 0,250% (v/v). “*” – Diferenças significativas relativamente ao “Meio” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

Tabela 16: Concentrações biocompatíveis do óleo essencial de *S. aromaticum*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *C. sinensis* e do solvente DMSO para a linha celular HaCat.

Composto	Concentração biocompatível (% v/v)
Óleo essencial de <i>S. aromaticum</i>	≤0,008
Óleo essencial de <i>O. basilicum</i>	≤0,016
Óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	≤0,016
Óleo essencial de <i>C. sinensis</i>	≤0,060
DMSO	≤1,000

4.4. Conclusão e Perspetivas Futuras

O ensaio MTT é amplamente empregue na quantificação da viabilidade celular, já que a conversão em cristais de formazano, ocorre intracelularmente através de um mecanismo celular. Todavia, existem compostos naturais que são capazes de reduzir o MTT através de um mecanismo não celular, refletindo-se em falsos positivos, deste modo este método pode não ser o mais eficaz nestas condições.

Os óleos essenciais de *C. sinensis*, *S. aromaticum*, *O. basilicum* e de *O. vulgare* possuem atividade citotóxica sobre a linha celular HaCat, comprovando assim que os seus compostos não dispõem da capacidade de converter o MTT por mecanismos não celulares.

Para a linha celular HaCat, verificou-se que os óleos essenciais podem ter um efeito citotóxico ou estimulado, dependendo da concentração do óleo em estudo. O efeito estimulador da viabilidade celular da linha celular utilizada ocorre para as concentrações menores de óleo essencial, enquanto o efeito citotóxico é visível nas duas primeiras concentrações.

Futuramente, para análise de óleos essenciais, poderá ser interessante estudar os compostos maioritários no processo de conversão do MTT. Contudo também seria

Estudo da estabilidade da atividade antioxidante de óleos essenciais com interesse para a indústria cosmética

interessante estudar uma mistura de óleos tanto na linha celular estudada, mas também em diferentes linhas celulares.

Capítulo 5

Estabilidade acelerada

5.1. Considerações gerais

A estabilidade de qualquer produto farmacêutico depende de diversos fatores, entre eles, fatores ambientais, temperatura, humidade e luz. Existem outros fatores relacionados com o produto em si, como as propriedades físico-químicas das substâncias, como por exemplo, do princípio ativo ou os excipientes farmacêuticos, a sua composição, entre outros. Desta forma, foi necessário conceber estudos para aumentar a taxa de degradação química e mudança física de um produto cosmético, recorrendo à utilização de condições de armazenamento exageradas, realizando assim testes de estabilidade. Assim, pode-se afirmar que estes testes irão “acelerar e prever” os efeitos das condições normais de utilização como também de armazenamento. Dentro do espectro de testes de estabilidade encontram-se os testes de estabilidade acelerada, e estes foram desenvolvidos pois fornecem informações desejadas num período mais curto. Para se obter o efeito pretendido, as amostras são sujeitas a condições que acelerem quaisquer alterações que possam ocorrer em condições ditas normais durante um certo período de tempo. Quando realizados os testes em condições aceleradas deve-se garantir a estabilidade química, estabilidade física dos produtos cosméticos sob condições apropriadas de armazenamento e utilização. [71-74]

Em suma, o objetivo dos testes de estabilidade de produtos cosméticos é assegurar que o produto cumpre as normas pretendidas no que diz respeito à qualidade química e física quando armazenado em condições adequadas. É de realçar que a informação resultante também pode ser útil para melhorar o produto que se está a testar ou então para aperfeiçoar a metodologia utilizada no ensaio acelerado de estabilidade. [71-74]

Com o propósito de induzir a aceleração desejada, as amostras, em geral, são submetidas as seguintes condições de ensaio: 1) a 4°C, sendo que esta temperatura funciona como controlo, uma vez que a esta temperatura as alterações que possam ocorrer são consideradas mínimas;; 2) Temperatura ambiente; 3) Temperaturas elevadas de 50°C-80°C, é de salientar que se o produto apresentar uma boa estabilidade a estas temperaturas é certamente estável a condições normais; 4) Exposição à luz, apesar de esta ser difícil de mimetizar no laboratório uma vez que é preferível sujeitar o produto à luz solar, porém, pode-se recorrer a um armário que possua lâmpadas e as amostras sejam mantidas nesse ambiente. É importante que as amostras sejam sujeitas no mínimo a três temperaturas diferentes. [71-74]

É de salientar que as condições de temperaturas elevadas irão acelerar quaisquer alterações que possam ocorrer em condições normais, como anteriormente referido, a um nível molecular sendo que um aumento de 10°C de temperatura irá resultar numa duplicação da taxa de reação. [71-74]

Devido à diversidade de produtos cosméticos e à sua complexidade inerente, os testes de estabilidade não podem ser prescritos, no entanto existe uma série de diretrizes recomendadas por associações cosméticas globais como a International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) e a Cosmetic Europe. Em 2018 a British Standards Institution publicou a ISO/TR 18811:2018 Cosmetics-Guidelines on the stability testing of cosmetics, todavia o documento não pretende especificar como deve ser realizado um teste de estabilidade, apenas analisa a informação recolhida através de documentos anteriormente publicados sobre este assunto, tais como os documentos publicados pela IFSCC e pela Cosmetic Europe. Porém a ISSO é um recurso inicial que ajuda os fabricantes a selecionar protocolos corretos para a realização de um teste de estabilidade. [71-74]

5.1.1. Objetivo

Este capítulo tem o objetivo de avaliar a estabilidade de alíquotas dos óleos essenciais em estudo, provenientes das espécies *S. aromaticum*, *O. basilicum*, *O. vulgare* e *C. sinensis*, através de um ensaio de estabilidade acelerada em diferentes condições, bem como analisar as propriedades organolépticas dos mesmos.

5.2. Parte Experimental

5.2.1. Materiais e Métodos

5.2.1.1. Reagentes

Alíquotas dos quatro óleos foram preparados em eppendorfs de 1,5 mL e tubos de falcon de 15 mL novos.

5.2.1.2. Características organolépticas

As propriedades organolépticas foram analisadas antes e após estabilidade, entre elas, estudou-se a coloração, o aroma e a textura das alíquotas de óleo essencial. Com a finalidade de comparar os resultados e analisar se durante o ensaio de estabilidade acelerada estas propriedades se mantiveram constantes ou se de alguma forma sofreram alterações.

5.2.1.3. Ensaio de estabilidade acelerada

Os testes de estabilidade acelerada estão desenhados para que ocorra um aumento da taxa de degradação química e para tal recorre-se a condições de armazenamento exageradas tal como por exemplo temperaturas elevadas. Pode-se afirmar que os resultados permitem prever a estabilidade de um cosmético o que se vai refletir no efeito do mesmo a longo prazo. Com duração de 8 semanas, este ensaio, teve como objetivo sujeitar alíquotas dos quatro óleos em estudo a condições diferentes que mimetizassem determinadas condições a que os óleos podem estar sujeitos. Para isto colocaram-se alíquotas à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), a uma temperatura de 5°C , sendo esta uma temperatura de controlo uma vez que se pressupõe que a temperaturas mais baixas as mudanças que possam ocorrer sejam mais lentas de acontecer, numa estufa a 50°C e por fim com exposição direta de luz sobre as alíquotas à temperatura ambiente. As propriedades organolépticas, entre elas, a coloração, odor e textura foram avaliadas antes e depois do termino do ensaio permitindo assim uma comparação entre as alíquotas antes e depois da estabilidade, mas também entre alíquotas de condições diferentes.

5.2.2. Esquema representativo da metodologia executada

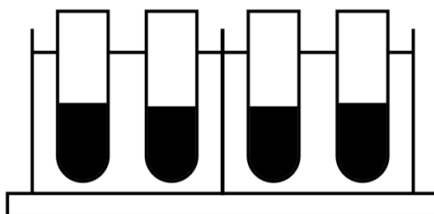


Figura 24: Esquema representativo da metodologia adotada para o ensaio de estabilidade acelerada à temperatura ambiente.

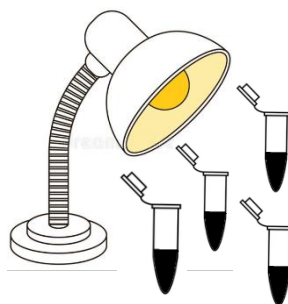


Figura 25: Esquema representativo da metodologia executada para o ensaio de estabilidade acelerada dos óleos em estudo com exposição direta à luz dos mesmos.

5.3. Discussão de Resultados

Com o objetivo de acelerar a taxa de reação sujeitaram-se alíquotas às seguintes condições, temperatura de 5°C, temperatura de 50°C, temperatura ambiente e à exposição de luz, com a finalidade de se averiguar se a capacidade antioxidante se manteve constante ou sofreu alterações.

De forma a comparar visualmente as alterações sofridas, caracterizaram-se as propriedades organoléticas, entre elas, o aroma, a coloração e a textura. Estas foram avaliadas antes de se sujeitarem as alíquotas a qualquer condição e por fim quando se deu por terminado o ensaio de estabilidade acelerada.

5.3.1. Óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

Tabela 17: Descrição das características organoléticas das alíquotas do óleo essencial de *S. aromaticum* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

	Condição	Cor	Aroma	Textura
S. aromaticum	Inicial	Amarelo intenso	Doce Intenso À flor seca	Oleoso
	5 °C	Amarelo intenso	Doce Intenso	Oleoso
	50 °C	Amarelo-escuro (muito forte)	Doce Intenso	Oleoso
	T _{ambiente}	Amarelo	Doce Intenso	Oleoso
	Luz	Amarelo-escuro	Doce	Oleoso

Quando comparadas as alíquotas que foram mantidas nas condições de teste, verificou-se que em relação à coloração, as variações mais significativas ocorreram na condição da temperatura mais elevada em estudo, 50°C, e na exposição à luz. Porém, a alíquota que se manteve mais estável foi a alíquota sujeita a 5°C, o que seria de prever uma vez que a temperaturas mais baixas a taxa de reação é mais lenta (Figura 26).

Em relação à atividade antioxidante, a estabilidade das alíquotas resultou num aumento da capacidade de sequestrar radicais livres como é demonstrado pelo ensaio do DPPH,

contudo, a capacidade de inibição da peroxidação lipídica reduziu ligeiramente, como se verificou no ensaio β -Caroteno/ácido linoleico, em todas as condições de teste.

Cada alíquota do óleo essencial de *S. aromaticum* correspondia a 675 μ L, todavia o volume entre cada alíquota sofreu modificações, apesar disso, em comparação com o conjunto de óleos em estudo, este foi aquele que se mostrou mais estável no que corresponde ao volume final, pois a diminuição de volume foi notória apenas na temperatura de 50°C, que equivale a uma diminuição de aproximadamente de 125 μ L, resultando num volume final de 550 μ L. Enquanto que nas condições de temperatura ambiente, 5°C e exposição à luz, o volume final apenas variou 75 μ L, originando um volume final de 600 μ L. Contudo no eppendorf das condições de exposição à luz e à temperatura de 50°C, era visível gotas de condensação, principalmente no eppendorf que continha a alíquota sujeita à temperatura de teste mais elevada, 50°C.

Em suma, em relação as propriedades organolépticas do óleo de *S. aromaticum*, estas mantiveram-se estáveis, apenas a coloração demonstrou sofrer significativas alterações.

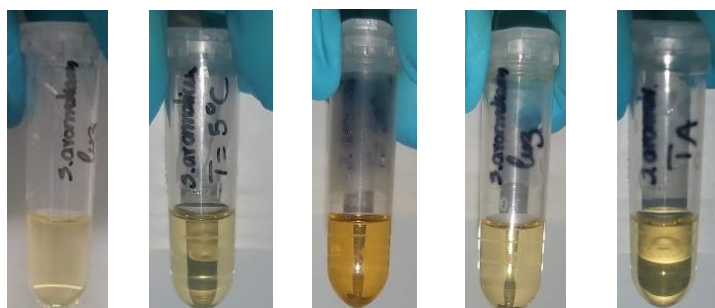


Figura 26: Fotografias da alíquota do óleo essencial de *S. aromaticum* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições.

5.3.2. Óleo essencial de *Ocimum basilicum*

Tabela 18: Descrição das características organoléticas das alíquotas do óleo essencial de *O. basilicum* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

	Condição	Cor	Aroma	Textura
<i>O. basilicum</i>	Inicial	Amarelo-claro	Fresco À planta Ativo	Oleoso
	5 °C	Amarelo-claro	À planta Fresco Ativo	Oleoso
	50 °C	Amarelo- escuro	À planta Intenso Ativo	Oleoso
	T _{ambiente}	Amarelo-claro	À planta Fresco Ativo	Oleoso
	Luz	Amarelo-claro	À planta Fresco Intenso Robusto	Oleoso

Foram caracterizadas as propriedades organoléticas antes e depois da realização do ensaio de estabilidade. Após o seu término, verificou-se que em termos de coloração, apenas ocorreu uma alteração significativa na alíquota que se manteve a 50°C, por isso pode-se concluir que a coloração durante 8 semanas em 3 condições nomeadamente, temperatura ambiente, 5°C e exposição à luz, se manteve praticamente constante, sendo considerada estável (Figura 27). A capacidade antioxidante foi estudada após o fim do período do ensaio de estabilidade acelerada e verificou-se que em todas as condições a capacidade de inibir a peroxidação lipídica diminuiu, apesar disso, a capacidade de sequestrar radicais livres aumentou, que se traduz num maior índice de atividade antioxidante. As alíquotas sujeitas às condições definidas no ensaio de estabilidade acelerada, constituíram num volume final de 1 mL de óleo essencial de *O. basilicum*. No entanto, na condição de temperatura a 50°C, após o término do ensaio, o volume da alíquota submetida a esta temperatura, diminuiu, resultando assim num volume final de 500 µL. Contudo, as alíquotas das seguintes condições, temperatura igual a 5°C, temperatura ambiente e exposição à luz, mantiveram constante o seu volume durante o período no qual decorreu o ensaio de estabilidade acelerada. Por fim, pode-se afirmar que o aroma se manteve estável em todas as condições, não sofrendo alterações significativas, assim, consequentemente pode-se concluir que o óleo essencial de *O. basilicum* se mantém estável em relação ao seu aroma em todas as condições, apenas demonstrou uma taxa de degradação mais elevada,

na temperatura de 50°C, o que seria expectável, no que diz respeito à sua volatilidade, podendo justificar a diminuição do volume final.

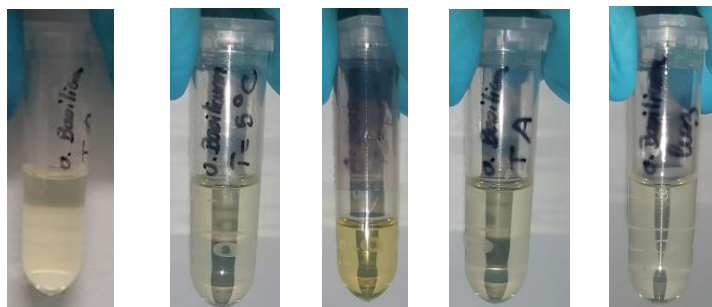


Figura 27: Fotografias da alíquota do óleo essencial *O. basilicum* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições.

5.3.3. Óleo essencial de *Origanum vulgare*

Tabela 19: Descrição das características organoléticas das alíquotas do óleo essencial de *O. vulgare* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

	Condição	Cor	Aroma	Textura
<i>O. vulgare</i>	Inicial	Amarelo/Esbranquiçado	Fresco Intenso à planta Amargo	Oleoso Gorduroso
	5 °C	Amarelo/Esbranquiçado	À planta Fresco	Oleoso Gorduroso
	50 °C	Amarelo-escuro	À planta Menos intenso	Oleoso Gorduroso
	T _{ambiente}	Amarelo/Esbranquiçado	À planta Mais robusto	Oleoso Gorduroso
	Luz	Amarelo/Esbranquiçado	Doce Intenso Robusto	Oleoso Gorduroso

As propriedades organoléticas do óleo essencial de *O. vulgare* foram avaliadas antes e depois do ensaio de estabilidade acelerada. Relativamente às suas características organoléticas e comparando com todos os óleos essenciais em estudo, constatou-se que o óleo de *O. vulgare* demonstrou alterações significativas no que diz respeito à sua

coloração e ao seu volume final após a conclusão do ensaio de estabilidade acelerada (Figura 28).

Em comparação com a alíquota inicial, isto é, antes de ser sujeita a qualquer tipo de condição, verificou-se a coloração e o aroma do óleo essencial de *O. vulgare*, e constatou-se que a coloração sofreu alterações na condição de temperatura a 50°C, tornando-se relativamente mais escura.

A alíquota de óleo essencial de *O. vulgare* consistiu num 1 mL em quatro eppendorfs distintos, cada um destinado a uma condição de teste diferente. Após o término do ensaio, avaliou-se o volume final, e verificou-se que a única condição que manteve estável o seu volume, resultando num volume constante, isto é, igual ao inicial, foi a alíquota sujeita à temperatura de 5°C, o que seria de prever, pois a esta temperatura as reações que possam ocorrer são mais lentas. Em contraste, a temperatura de 50°C, foi aquela que demonstrou uma diminuição significativa do volume final, perfazendo um volume final de aproximadamente 300 µL. Contudo, também se verificou um decréscimo de volume nas condições de temperatura ambiente e de exposição à luz, resultando em 800 µL e 600 µL, respetivamente, de volume final.

Em relação ao aroma, o óleo essencial de *O. vulgare*, sofreu alterações consideráveis, principalmente na alíquota de 50°C, pois obteve-se um decréscimo de aroma, o que pode significar a volatilidade de vários compostos responsáveis pelo aroma do óleo essencial de *O. vulgare*. Porém, o seu aroma na alíquota exposta à luz também variou resultando num aroma mais adocicado, contrastando com a alíquota inicial.

Comparando os ensaios que traduzem a atividade antioxidante constatou-se que no que concerne à capacidade da peroxidação lipídica, esta manteve-se praticamente constante, apesar disso, o índice de atividade antioxidante obtido no ensaio de redução de DPPH, aumentou, o que se traduz numa maior atividade antioxidante após o ensaio de estabilidade acelerada.

Resumidamente, o óleo essencial de *O. vulgare* demonstrou um comportamento estável, no que diz respeito à capacidade de inibição da peroxidação lipídica, às características organoléticas, nomeadamente à coloração das alíquotas. Todavia, em relação à volatilidade dos compostos que constituem o óleo, estes não se mostraram estáveis, como é verificado na alíquota sujeita à temperatura mais elevada de teste.

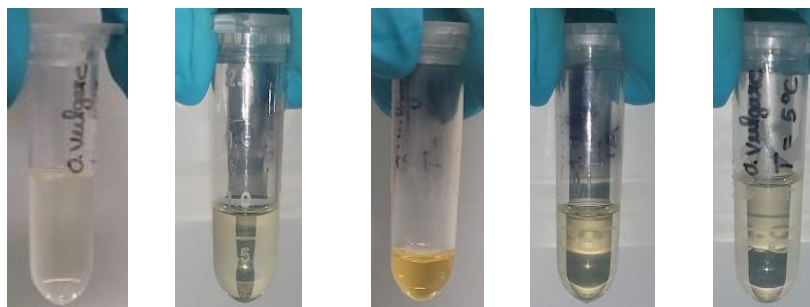


Figura 28: Fotografias da alíquota do óleo essencial de *O. vulgare* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições.

5.3.4. Óleo essencial de *Citrus sinensis*

Tabela 20: Descrição das características organolépticas das alíquotas do óleo essencial de *C. sinensis* antes e depois de serem sujeitas as condições do ensaio de estabilidade acelerada

	Condição	Cor	Aroma	Textura
<i>C. sinensis</i>	Inicial	Transparente	À casca do fruto	Aguada
	5 °C	Transparente/Esbranquiçado	À casca do fruto	Oleoso Gorduroso
	50 °C	Amarelo muito escuro	Artificial Forte	Oleoso Gorduroso
	T _{ambiente}	Transparente	À casca do fruto	Oleoso Gorduroso
	Luz	Transparente/Esbranquiçado	À casca do fruto Intenso	Oleoso Gorduroso

O óleo essencial de *C. sinensis* foi colocado em alíquotas contendo 3 mL em tubos de ensaio, para posteriormente ser sujeito às quatro condições de teste. Visualmente, as propriedades organolépticas analisadas foram a coloração, aroma e textura.

No que concerne à coloração, a alíquota antes do ensaio de estabilidade acelerada possuía uma coloração transparente, todavia esta coloração apenas se manteve constante em três condições, temperatura ambiente, temperatura a 5°C e à exposição à luz. Pelo contrário, a coloração na alíquota a 50°C alterou-se significativamente, pois apresenta uma coloração amarela-escuro (Figura 29).

O aroma característico do óleo essencial de *C. sinensis* é o odor a casca de laranja. Com o fim do ensaio de estabilidade acelerada, verificou-se que conforme as condições a que as

alíquotas estiveram sujeitas, o aroma sofreu ligeiras alterações, tornando-se mais intenso na alíquota que se encontrou exposta à luz, mas também se tornou mais forte perdendo parcialmente o odor característico na alíquota sujeita a 50°C, considerando este aroma o mais artificial em comparação com as restantes alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada.

Como referido anteriormente, as alíquotas consistiam em 3 mL de óleo essencial de *C. sinensis*, no entanto, o volume final apenas se manteve constante na alíquota colocada a 5°C. As variações de volume foram significativas na alíquota exposta à luz e na alíquota sujeita à temperatura ambiente, contudo o decréscimo foi mais acentuado na alíquota exposta à luz. No que corresponde à alíquota mantida a 50°C, esta apresentou uma consistência de gel, não permitindo determinar qual o seu volume final.

Numa análise visual, constatou-se que no tubo de falcon que foi destinado à temperatura ambiente, este apresentava nas paredes do tubo gotas de condensação, o mesmo se verificou no tubo de falcon exposto à luz. No que diz respeito ao tubo de falcon sujeito à temperatura de 50°C, o volume não pode ser contabilizado uma vez que o líquido devido a diversos processos, resultou num gel.

De forma a comparar se a atividade antioxidante se manteve constante realizou-se o ensaio de redução do DPPH e o sistema β -Caroteno/ácido linoleico. Os resultados obtidos demonstraram que apesar de o óleo essencial de *C. sinensis* ser considerado o menos estável, mostrou um comportamento elevado na inibição da peroxidação lipídica, em comparação com os restantes óleos essenciais em estudo. Em relação à capacidade de sequestrar radicais livres, o seu poder antioxidante teve um ligeiro aumento, no entanto, foi o óleo com um menor índice de atividade antioxidante. É de realçar que para os ensaios realizados para avaliar a atividade antioxidante apenas se recorreu às alíquotas sujeitas às seguintes condições: temperatura ambiente e temperatura a 5°C, visto que o óleo essencial de *C. sinensis* não se manteve estável na alíquota exposta à luz e na alíquota sujeita a temperatura mais elevada (50°C), sendo consideradas não elegíveis para a repetição dos ensaios anteriormente referidos.

Por fim, o óleo essencial de *C. sinensis*, foi considerado entre os óleos em estudo, aquele que demonstrou um comportamento menos estável nas características organoléticas, como o odor e no volume final. Contudo, a sua capacidade de inibição da oxidação do β -Caroteno manteve-se constante, enquanto a capacidade de sequestrar radicais livres aumentou ligeiramente.



Figura 29: Fotografias da alíquota do óleo essencial de *C. sinensis* previamente a ser sujeita as diferentes condições de estabilidade acelerada, e após o término do ensaio de estabilidade nas diversas condições.

5.4. Conclusão e Perspetivas futuras

O propósito de estudar a estabilidade dos produtos cosméticos é para assegurar se ocorrem modificações a nível químico, físico e garantir a funcionalidade do produto quando armazenado em condições adequadas.

Avaliaram-se as propriedades organoléticas de cada óleo após o período de 8 semanas e constatou-se visualmente que o óleo menos estável foi o óleo de *C. sinensis* uma vez que a nível do volume final este sofreu significativas alterações. Pelo contrário, o óleo que se considerou como sendo o que apresentou maior estabilidade foi o óleo de *O. basilicum*, pois o volume manteve-se constante em 3 condições entre as 4 condições em estudo.

As alíquotas que se sofreram modificações significativas foram aquelas que estiveram sujeitas às seguintes condições de teste, temperatura igual a 50°C e exposição à luz, demonstrando variações a nível do volume e da coloração.

Futuramente seria interessante avaliar a estabilidade em diferentes condições, como é descrito pela IFSCC, realizando os seguintes ensaios: Teste congelamento/descongelamento, amostra sujeita à temperatura de 37°C e Temperatura a 37°C com 80% de humidade relativa. Contudo seria importante avaliar o comportamento dos óleos essenciais em estudo em tempo real.

Capítulo 6

Composição química

6.1. Considerações gerais

O objetivo deste capítulo é determinar a composição química dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Syzygium aromaticum* e de *Citrus sinensis* com a finalidade de compreender as suas aplicações e atividades biológicas.

A caracterização fitoquímica de todos os óleos essenciais em estudo foi realizada recorrendo ao método GC-MS. Este método é apontado para a análise de distintos compostos de amostras que possuem um baixo peso molecular e voláteis. É considerado um método quantitativo, eficiente, reproduzível e sensível.

6.2. Parte Experimental

6.2.1. Materiais e Métodos

O perfil volátil do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e de *Citrus sinensis*, foi conseguido por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC-MS SCIION 456, Bruker). Os óleos essenciais foram previamente diluídos no solvente orgânico, n-pentano, e seguidamente 1 µL da diluição resultante foi injetada no GC-MS, recorrendo-se a um split de 1:80. A temperatura inicial foi programada para os 45°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 175°C e finalmente aumenta a temperatura até aos 300°C com uma taxa de aquecimento de 15°C/min, permanecendo nesta temperatura durante 10 minutos. O injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e a 250°C, respetivamente. A identificação dos compostos foi baseada na comparação de espectros de massa com espectros de massa da biblioteca NIST que se encontra 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. Esta análise foi efetuada pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

6.3. Discussão de Resultados

6.3.1. Óleo essencial de *Ocimum basilicum*

Tabela 21: Composição dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Nome do composto	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>
	%Área	(temperatura ambiente) %Área
α -Pinene	0,22	0,19
Thujene	0,10	0,09
β -Pinene	0,41	0,42
β -Myrcene	0,35	0,20
D-Limonene	0,08	0,08
Eucalyptol	9,33	10,11
β -Ocimene	0,61	0,28
Terpinolene	0,14	----
Linalool	67,57	71,10
Camphor	0,80	0,79
Borneol	0,09	----
α -Terpineol	0,58	0,43
Bornyl acetate	1,06	1,08
Eugenol	6,09	3,16
β -Elemene	0,61	0,54
Caryophyllene	0,15	----
α -Bergamotene	6,61	6,74
α -Guaiene	0,08	0,06
Humulene	0,25	0,18
cis-Muuro-la-4(15),5-diene	0,12	----
Germacrene D	1,18	1,03
Bicyclogermacrene	0,19	----
δ -Guaiene	0,40	0,33
γ -Cadinene	1,27	1,21
t-Cadinol	1,27	1,04

No óleo essencial de *Ocimum basilicum* foram identificados 99,55% dos compostos químicos, sendo o composto maioritário o linanool (67,57%) e o eucaliptol (9,33%). Após o ensaio de estabilidade verificou-se que os dois compostos em maior percentagem são igualmente o linalool (71,70%) e o eucaliptol (10,11%), representando numa percentagem de aumento de 0,78% e 3,53%, respetivamente. Contudo, pode-se constatar que a sua percentagem é ligeiramente superior na alíquota sujeita à temperatura ambiente, o que mostra que o óleo essencial de *Ocimum basilicum* manteve a sua composição estável, não sofrendo diferenças relevantes em todos os compostos, nomeadamente nos compostos que se encontram em maior percentagem.

6.3.2. Óleo essencial de *Origanum vulgare*

Tabela 22: Composição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Nome do composto	<i>Origanum vulgare</i> %Área	<i>Origanum vulgare</i> (temperatura ambiente) %Área
α -Pinene	0,28	0,25
Camphene	0,04	0,04
β -Pinene	0,10	0,10
β -Myrcene	0,21	0,13
p-Cymene	3,06	2,23
D-Limonene	40,64	27,13
Eucalyptol	0,26	0,35
Linalool	0,91	1,20
<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0,10	0,15
Camphor	0,39	0,46
Borneol	0,49	0,61
Terpinen-4-ol	0,29	0,36
α -Terpineol	0,27	0,37
Thymol	0,88	1,19
Carvacrol	50,99	64,08
Caryophyllene	0,60	0,68
Humulene	0,05	0,07
Caryophyllene oxide	0,15	0,20

No óleo essencial de *Origanum vulgare* foram identificados 99,70% dos compostos químicos, sendo o maioritário o carvacrol (50,99%) seguido do D-limoneno (40,64%).

Após o ensaio de estabilidade acelerada, a alíquota sujeita à temperatura ambiente foi analisada e verificou-se que as percentagens são superiores às obtidas anteriormente, todavia o composto maioritário é o carvacrol (64,08%) com uma percentagem de aumento de 13,09% e o *D*-limoneno (27,18%) em seguida representando uma redução de 13,51%. Com isto constata-se que o óleo essencial de *Origanum vulgare* não demonstrou um comportamento muito estável no que diz respeito às percentagens dos compostos que o constituem. Este resultado pode provir de reações a que os compostos estão sujeitos como isomerização, oxidação, desidrogenação, entre outras, o que traduz numa degradação dos compostos iniciais e às diferenças entre as percentagens obtidas.

6.3.3. Óleo Essencial de *Syzygium aromaticum*

Tabela 23: Composição dos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Nome do composto	<i>Syzygium aromaticum</i> %Área	<i>Syzygium aromaticum</i> (temperatura ambiente) %Área
Eugenol	66,12	85,30
Caryophyllene	8,34	2,77
Humulene	----	0,24
Eugenyl acetate	24,66	11,34
Caryophyllene oxide	----	0,34

Para o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foram identificados 100% dos compostos químicos, sendo o composto maioritário o eugenol (66,12%) e em seguida o acetato de eugenilo (24,66%). Com o término do ensaio de estabilidade acelerada, estudou-se a composição química da alíquota sujeita à temperatura ambiente, e constatou-se que o eugenol (85,30%) com aumento de 19,18%, é aquele que se encontra com uma percentagem mais elevada, sendo assim o composto maioritário, seguido acetato de eugenilo (11,34%) que sofreu um decréscimo de 13,32 % face à alíquota inicial. Com a análise da alíquota sujeita à temperatura ambiente, constatou-se que o composto maioritário se apresenta em maior percentagem, enquanto o acetato de eugenilo sofreu um decréscimo, demonstrando assim que o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* a nível fitoquímico não teve um comportamento estável. Este resultado pode advir das reações a que os compostos estão sujeitos como isomerização, oxidação, desidrogenação,

entre outras, o que traduz em aparecimento de novos compostos, a degradação dos compostos iniciais e às diferenças entre as percentagens obtidas.

6.3.4. Óleo essencial o de *Citrus sinensis*

Tabela 24: Composição dos óleos essenciais de *Citrus sinensis* antes e após o ensaio de estabilidade à temperatura ambiente. A % Área representa a quantidade relativa de cada composto, obtida através da relação entre a área relativa do composto e a área total dos picos identificados na amostra.

Nome do composto	<i>Citrus sinensis</i> %Área	<i>Citrus sinensis</i> (temperatura ambiente) %Área
α -Pinene	0,39	0,56
Thujene	0,42	0,50
β -Pinene	0,13	0,22
β -Myrcene	0,84	----
p-Cymene	0,10	----
D-Limonene	97,27	92,59
Linalool	0,62	3,18
Terpinen-4-ol	----	0,49
α -Terpineol	----	0,61
Eremophilene	----	0,68
Octanal	----	0,27
o-Cymene	----	0,11

No óleo essencial de *Citrus sinensis* foram identificados 99,78% dos compostos químicos, sendo o composto maioritário o *D*-limoneno (97,27%). Após o ensaio de estabilidade acelerada, analisou-se a composição química da alíquota sujeita à temperatura ambiente e verificou-se que o composto que se encontra em maior percentagem é o *D*-limoneno (92,59%), apesar de se encontrar numa percentagem mais baixa, constatando-se uma redução de 4,63%. O composto que sofreu um aumento foi o composto linalool com uma acréscimo de 2,56% quando comparado com a alíquota inicial. Com este resultado constata-se que o óleo essencial de *Citrus sinensis* não tem um comportamento estável relativamente à percentagem de compostos na sua constituição.

6.4. Conclusão

A caracterização química antes e após o ensaio de estabilidade acelerada dos óleos essenciais em estudo permitiu verificar os compostos maioritários, mas também a ocorrência de modificações a nível da composição dos mesmos. Contudo, comparando as

composições químicas constata-se que o composto maioritário em todos os óleos se mantém o mesmo, apesar de se encontrar em percentagens semelhantes no que diz respeito ao óleo essencial de *Ocimum basilicum* e em percentagens distintas no óleo essencial de *Citrus sinensis* e nos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Origanum vulgare*.

Os resultados obtidos permitem concluir que a composição química dos óleos essenciais sofreram alterações, todavia o óleo essencial que demonstrou um comportamento mais estável foi o óleo de *Ocimum basilicum* enquanto o menos estável foi o óleo essencial de *Citrus sinensis*.

Capítulo 7

Discussão Geral

Os antioxidantes são adicionados aos produtos cosméticos com o objetivo de evitar a oxidação dos restantes ingredientes da formulação, mas também de manter a quantidade de antioxidantes na pele que têm a principal função de a proteger dos danos causados pelas reações de oxidação que possam ocorrer. Porém, os compostos habitualmente utilizados como antioxidantes em produtos cosméticos, têm sido associados a problemas de saúde, nomeadamente problemas de toxicidade e de carcinogénese. É de realçar que os antioxidantes quando presentes no produto devem permanecer estáveis não reagindo com as outras substâncias.

Este estudo procurou analisar quatro óleos essenciais provenientes de *C. sinensis*, *S. aromaticum*, *O. basilicum* e de *O. vulgare*, e estudá-los no que diz respeito à atividade antioxidante e citotóxica, com o objetivo de serem utilizados como ingredientes ativos em formulações cosméticas antienvhecimento.

A atividade biológica de um óleo depende da atividade dos compostos que o constituem. Deste modo foi realizado um estudo da sua caracterização química, pelo meio da técnica de GC-MS.

Os óleos essenciais são constituídos maioritariamente por compostos pertencentes à família dos terpenos como o linalool, *D*-limoneno e carvacrol mas também da família dos fenilpropanos como o eugenol.

Avaliou-se também atividade citotóxica, que permite estabelecer os limites de concentração seguros para a utilização dos óleos sem estes apresentarem toxicidade celular como possíveis ingredientes de uma formulação tópica.

De acordo com a norma **ISO/EN 10993-5** - *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* o limite mínimo de percentagem de viabilidade celular é de 70%. Nesta perspetiva compararam-se os resultados obtidos entre os quatro óleos essenciais. É de salientar que se verificou que conforme a diminuição da concentração, o aumento da viabilidade celular foi observado. Nesta ótica, o óleo menos biocompatível com a linha celular HaCat foi o óleo de *S. aromaticum*, uma vez que apenas apresenta biocompatibilidade nas duas concentrações mais baixas, isto é, nas concentrações de 0,008 e 0,004%. Contudo, pode-se afirmar que a melhor concentração de trabalho entre estas duas concentrações é a concentração de 0,004% (v/v), uma vez que

a viabilidade celular ultrapassa com segurança o limite de viabilidade celular. É de referir que as duas concentrações mais altas (0,250 e 0,125% v/v) exercem um efeito citotóxico na linha celular usada para todos os óleos essenciais. Em relação ao DMSO, este mostrou ser citotóxico na concentração mais alta de teste (2% v/v). Contudo, podemos constatar que o potencial citotóxico dos óleos essenciais é superior ao do DMSO nas concentrações de teste em comum (de 0,250 a 0,008% v/v), confirmando assim que a citotoxicidade verificada apenas deriva dos óleos em estudo e não do solvente usado para a sua solubilização.

Na literatura, estudos já realizados com óleos essenciais demonstram um largo espectro de atividades biológicas, entre elas, a atividade antioxidante. Associado ao envelhecimento da pele está a incapacidade de o organismo não conseguir reagir contra as espécies reativas de oxigénio, desta forma é necessário um agente externo para realizar esse efeito. Deste modo, procedeu-se à análise da atividade antioxidante do óleo essencial de *S. aromaticum*, *O. Basilicum*, *O. vulgare* e de *C. sinensis*, de forma a ter uma possível aplicação em formulações cosméticas de antienvelhecimento.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de redução do radical DPPH e pelo Sistema β -Caroteno/ácido linoleico.

Em relação ao método de redução do radical DPPH verificou-se que todos os óleos essenciais possuem atividade antioxidante nas condições em que o estudo se realizou, demonstrando assim que são ingredientes interessantes para a utilização como substâncias de combate ao envelhecimento da pele.

A concentração para qual o óleo essencial de *S. aromaticum* tem a capacidade de reduzir 50% da concentração inicial de DPPH é de 0,0007 $\mu\text{g/mL}$, traduzindo-se num IAA de 3,18, demonstrando ser assim um potente óleo essencial com atividade antioxidante, uma vez que o seu IAA é superior a 2. Com as alíquotas de óleo essencial sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada verificou-se que ocorreu um aumento do IAA na alíquota sujeita à temperatura de 50°C, uma vez que o EC_{50} diminuiu quando comparado com as restantes alíquotas. Contudo, o IAA das alíquotas sujeitas à temperatura ambiente e de 5°C foi semelhante podendo inferir-se que o óleo nestas condições possivelmente possui uma caracterização química semelhante, neste caso, o composto maioritário é o eugenol. Apesar disso, pode-se verificar que quando comparado o IAA inicial com o IAA das alíquotas de teste, este se encontra dentro da mesma ordem de grandeza, demonstrando assim que o óleo essencial de *S. aromaticum* é estável no que diz respeito à transferência de um eletrão para um radical livre, inativando-o. A estabilidade da atividade antioxidante

pode ser corroborada pelas propriedades organolépticas, uma vez que estas se mantêm semelhantes entre si. Porém, quando analisada a atividade antioxidante do óleo essencial de *S. aromaticum* contra a peroxidação lipídica, a concentração que inibe 50 % da oxidação do β -Caroteno devida aos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, é de 0,55% (v/v), realçando assim o potencial antioxidante do óleo essencial de *S. aromaticum*. Porém, quando comparado o IC₅₀ inicial com os IC₅₀ obtidos para as alíquotas do ensaio de estabilidade acelerada verificou-se que o IC₅₀ sofreu alterações em todas as alíquotas em teste, aumentando, demonstrando assim que a atividade antioxidante diminui após o teste de estabilidade acelerada. Contudo, o IC₅₀ da alíquota de 50°C, luz e temperatura ambiente é semelhante realçando que o óleo essencial nestas condições possui os mesmos compostos em percentagens relativas semelhantes. Apesar disso, a alíquota que mostrou um comportamento antioxidante inferior contra a peroxidação lipídica foi a alíquota sujeita à temperatura de 5°C.

Com os resultados obtidos para ambos os métodos, pode-se concluir que o óleo essencial de *S. aromaticum* se demonstrou estável nas alíquotas sujeita à temperatura ambiente e exposta à luz, traduzindo-se assim numa composição química semelhante. Todavia, é de salientar que apesar de o óleo de *S. aromaticum* mostrar uma atividade antioxidante estável no método de redução do radical de DPPH, o mesmo não se verificou no sistema β -Caroteno/ácido linoleico.

Apesar da atividade antioxidante não se mostrar concordante para ambos os métodos, os resultados obtidos evidenciam o interesse deste óleo como possível ingrediente cosmético numa formulação antienvhecimento.

Com um EC₅₀ inicial de 0,00160 μ g/mL, o óleo essencial de *O. basilicum* possui um IAA de 1,57, sendo considerado um antioxidante forte, uma vez que o valor obtido é superior a 1 mas inferior a 2. Verificou-se que em todas as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada o EC₅₀ aumentou traduzindo-se numa diminuição do IAA, representando assim uma diminuição da atividade antioxidante. Contudo, esta diminuição foi mais acentuada na alíquota exposta à luz, uma vez que o EC₅₀ foi de 0,0069 μ g/mL. Os resultados obtidos para as alíquotas do ensaio de estabilidade acelerada evidenciam que a composição química do óleo essencial deve ser semelhante (linalool e eucaliptol, este último numa percentagem relativa inferior, sendo o linalool o composto maioritário) nas alíquotas sujeitas a 5°C, 50°C e à temperatura ambiente, uma vez que o IAA de cada uma das alíquotas é semelhante. Em relação à atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica, inicialmente o IC₅₀ foi de 0,88 % (v/v), e comparando com as alíquotas do ensaio de estabilidade acelerada o IC₅₀ destas foi superior o que expressa uma diminuição da

atividade antioxidante do óleo essencial de *O. basilicum* contra a ação dos radicais provenientes da oxidação de lípidos. É de salientar que os resultados obtidos para o IC₅₀ para as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada se encontram todos na mesma ordem de grandeza, reforçando assim a ideia de que este óleo essencial manteve os seus compostos em percentagens semelhantes uma vez que os resultados são muito similares entre si. É de realçar que o óleo essencial de *O. basilicum* foi aquele que mostrou ser o mais estável quando analisadas as características organoléticas após o término do ensaio de estabilidade acelerada o que corrobora com os resultados obtidos para ambos os métodos.

Para reduzir 50 % da concentração inicial de DPPH o óleo essencial de *O. vulgare* necessita inicialmente de 0,3078 µg/mL, refletindo-se num IAA de 0,01, sendo considerado um antioxidante fraco uma vez que possui um IAA inferior a 0,5. Quando analisados os resultados obtidos para as alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada, verificou-se um aumento do IAA como se pode observar pela diminuição do EC₅₀ para cada alíquota de teste. No entanto, é de reforçar que na alíquota exposta à luz, o aumento do IAA foi mais evidente, uma vez que o EC₅₀ foi de 0,0203 µg/mL. Inicialmente o óleo essencial de *O. vulgare* obteve um IC₅₀ de 1,62 % (v/v), o que demonstrou que de entre os óleos essenciais presentes neste estudo, este foi aquele que mostrou uma eficiência mais baixa na inibição da peroxidação lipídica. Porém, as características organoléticas deste óleo não se mantiveram estáveis, o que se reflete na sua capacidade antioxidante contra a oxidação de lípidos, pois de entre as alíquotas elegíveis para a determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-Caroteno/ácido linoleico, os resultados variaram entre alíquotas. Todavia, observou-se que o IC₅₀ para a alíquota exposta à luz é similar ao IC₅₀ obtido inicialmente, podendo traduzir-se na composição química semelhante entre a alíquota inicial e a alíquota do ensaio de estabilidade acelerada. Contudo, a alíquota sujeita a 5°C e à temperatura ambiente obtiveram valores de IC₅₀ distintos entre si, apesar disso ambas as alíquotas possuíram um comportamento mais antioxidante quando comparadas com a alíquota inicial, uma vez que para ambas, o IC₅₀ foi inferior ao obtido inicialmente. O aumento de atividade antioxidante na alíquota sujeita à temperatura ambiente deve-se à presença do carvacrol (composto maioritário) mas também na sua composição química o *D*-limoneno aparece com uma percentagem relativa superior quando comparada com a composição química da alíquota inicial. Esta análise da composição química pode sugerir a sinergia entre os dois compostos anteriormente referidos, aumentando assim a atividade antioxidante deste óleo essencial. O carvacrol é um álcool monoterpénico conhecido pela sua atividade antioxidante, uma vez que pode interferir com a membrana fosfolipídica celular e minimizar a de

peroxidação lipídica. Outros estudos documentaram também a potente eficácia antioxidante do *D*-limoneno (Bacanli et al., 2015; Toscano-Garibay et al., 2017). O possível mecanismo pelo qual o *D*-limoneno exerce o seu efeito antioxidante poderá ser pela contenção do stresse oxidativo mediado por radicais livres e pelo reforço do sistema celular de defesa antioxidante. Em geral, os componentes principais traduzem determinadas características biológicas dos óleos essenciais, sendo dependente da concentração do composto. Contudo, Hoet et al. (2006) e Santana-Rios et a. (2001) demonstraram que o óleo essencial tem de ser analisado como um todo, constatando assim uma sinergia entre os compostos, pois a atividade dos componentes principais pode ser modulada pela presença de outros compostos minoritários. [23,75-77]

Sendo considerado o óleo mais biocompatível, uma vez que apenas apresenta toxicidade nas duas concentrações mais altas, o óleo de essencial de *C. sinensis* foi aquele que demonstrou o IAA inferior quando comparado com os restantes óleos em estudo. Obtendo um valor elevado de EC₅₀ (24,8894 µg/mL) o IAA por sua vez foi de 0,0001, valor consideravelmente inferior aos obtidos pelos restantes óleos em estudo. Após a análise das características organolépticas constatou-se que este óleo foi aquele que apresentou uma estabilidade inferior. Quando analisadas as alíquotas do ensaio de estabilidade acelerada, apenas as alíquotas sujeitas à temperatura ambiente e a 5°C foram elegíveis para a realização do ensaio nas condições a que este foi executado. Observou-se m aumento de IAA na alíquota sujeita à temperatura ambiente, apesar disso também se verificou um ligeiro aumento na alíquota sujeita a 5°C, contudo os resultados obtidos indicam que o óleo essencial de *C. sinensis* foi o menos eficaz em sequestrar radicais livres entre todos os óleos em estudo, sendo considerado aquele que possui a menor atividade antioxidante. Todavia, para o sistema β-Caroteno/ácido linoleico, o mesmo não se verificou, uma vez que inicialmente o IC₅₀ foi de 0,60% (v/v) e quando comparado com os valores obtidos para as alíquotas sujeitas à temperatura ambiente e a 5°C constatou-se que estes eram semelhantes, traduzindo assim uma atividade antioxidante constante entre a alíquota inicial e as alíquotas de estabilidade acelerada, o que não se comprovou com o método anterior. Este resultado de inibição da peroxidação lipídica pode ser associado ao composto maioritário do óleo essencial de *C. sinensis* ser o *D*-limoneno, sendo descrito na literatura como um potente composto contra a oxidação de lípidos. O aumento do IAA na alíquota exposta à temperatura ambiente pode possivelmente provir da sinergia entre o *D*-limoneno e o linalool presentes na sua constituição química, reforçando a ideia de que as bioatividades dos óleos não dependem apenas do composto maioritário, mas sim da mistura de compostos que é característica de cada óleo essencial.

De um modo geral com os resultados obtidos compreende-se o crescente interesse da indústria cosmética na utilização de compostos naturais como substitutos dos antioxidantes sintéticos, uma vez que a toxicidade destes têm vindo a ser discutida na indústria. Com os resultados anteriormente apresentados conclui-se que os óleos essenciais não possuem toxicidade celular em concentrações inferiores ou iguais a 0,004% (v/v), porém será interessante averiguar em futuros estudos a atividade citotóxica em diferentes linhas celulares. Os resultados de Alexa VT et al. (2022) demonstraram que o óleo essencial de *S. aromaticum* estão de acordo com os resultados obtidos neste estudo pois, ambos os resultados evidenciam que este óleo essencial não é biocompatível na concentração de 0,250% v/v. Contudo, no estudo de Alexa VT et al. (2022), o óleo essencial de *Citrus sinensis* na concentração de 0,250 % v/v não foi tóxico para as células, contrariamente aos resultados obtidos neste estudo, pois na concentração de 0,250% o óleo essencial de *Citrus sinensis* foi não biocompatível para esta linha celular, diferença que pode ser justificada pela diferença na composição química, dado que apesar de o composto maioritário em ambos ser o *D*-limoneno, o composto seguinte é diferente entre o óleo analisado neste estudo com o óleo do estudo de Alexa VT et al. (2022). É de referir ainda que no estudo de Alexa VT et al. (2022) o óleo essencial de *Citrus sinensis* demonstrou inibir proliferação do cancro do fígado (HepG2), cancro do cólon (HCT116) [17], cancro do pulmão (A549). [34]

Em relação à sua atividade antioxidante apesar dos resultados obtidos serem muito promissores, é necessário prosseguir com futuras investigações de forma a potenciar a sua utilização como ingrediente ativo numa formulação antienvhecimento.

Capítulo 8

Conclusões e Perspetivas futuras

A crescente consciencialização económica e ambiental por parte do consumidor atual direcionou a indústria cosmética a procurar alternativas aos ingredientes sintéticos, como antioxidantes usualmente utilizados em formulações cosméticas.

Neste âmbito, o presente estudo procurou avaliar e caracterizar o potencial antioxidante de óleos essenciais, assim como a sua compatibilidade biológica, de forma a potenciar o seu valor como ingrediente ativo em formulações antienvhecimento.

O óleo essencial de *C.sinensis* apresenta uma baixa capacidade em sequestrar radicais livres, pois foi aquele que apresentou um EC_{50} superior. Todavia devido à sua composição química este óleo essencial exibe uma atividade antioxidante elevada em inibir a peroxidação lipídica pois o composto maioritário D-Limoneno é descrito como um antioxidante eficiente contra a oxidação de lípidos, o mesmo é verificado pelo Sistema β -Caroteno/Ácido linoleico, pois este óleo essencial foi aquele que nas alíquotas sujeitas ao teste de estabilidade acelerada a sua atividade antioxidante tenha sofrido um ligeiro aumento, resultado que pode ser justificado pelo aumento do composto linalool, que atua sinergicamente com o D-Limoneno, originando assim um óleo essencial com uma maior atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica.

O óleo essencial de *O.vulgare* foi aquele que demonstrou resultados menos promissores, pois este óleo possui um índice de atividade antioxidante fraco no que diz respeito à sua capacidade em sequestrar radicais livres, apesar desta atividade ser superior nas alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada, o índice de atividade antioxidante mantém o óleo como um antioxidante fraco. Embora o composto que compõem maioritariamente este óleo essencial ser um álcool monoterpénico conhecido pela sua atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica, os resultados obtidos não corroboram com esta afirmação pois comparando este óleo essencial com os restantes, este foi aquele que apresentou uma menor atividade antioxidante contra a oxidação de lípidos.

O óleo essencial de *O.basilicum* aparece como um antioxidante forte pois apresenta um índice de atividade entre o 1 e o 2, porém este índice sofre uma ligeira diminuição nas alíquotas sujeitas ao ensaio de estabilidade acelerada. Porém no que concerne à capacidade em inibir a peroxidação lipídica constatou-se uma ligeira diminuição nas alíquotas sujeitas as condições de teste de estabilidade acelerada quando comparadas com a atividade antioxidante apresentada pela alíquota inicial.

O óleo essencial de *S. aromaticum* surge como o óleo com maior atividade antioxidante, demonstrando a sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica, assim como em transferir um eletrão de forma a reduzir um radical livre. Contudo, após o ensaio de estabilidade acelerada concluiu-se que a sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica sofreu modificações, apesar disso continuou a ser um dos óleos mais antioxidantes após o término do ensaio de estabilidade acelerada. Desta forma, parece ser aquele que mais facilmente poderá ter utilidade como ingrediente ativo em formulações antienvhecimento, uma vez que quando comparado com os restantes óleos em estudo verificou-se que estes obtiveram reduções ou aumento acentuados da atividade antioxidante, o que não é o pretendido quando se adiciona um composto antioxidante a uma formulação, pois este deve manter-se estável em relação à sua atividade antioxidante.

Apesar de demonstrar uma elevada atividade citotóxica na linha celular utilizada, é de reforçar que os óleos possuem na sua constituição química uma mistura complexa de compostos a que este tipo de células é sensível aquando da sua manipulação. Contudo é de realçar que o óleo essencial de *C.sinensis* foi aquele que demonstrou uma maior biocompatibilidade para a linha celular HaCat pois apenas apresenta toxicidade celular nas concentrações 0,250 e 0,125%, apesar disso o óleo essencial de *O.vulgare* surge a seguir ao óleo essencial de *C.sinensis*, como um dos menos citotóxicos. No que se refere ao óleo essencial de *O.basilicum* aparece como o segundo com uma menor biocompatibilidade para esta linha celular, pois a concentração de 0,016% interceta a percentagem mínima de viabilidade celular sendo esta assim considerada dúbia para se trabalhar com este tipo de células. Assim, será interessante dar continuidade ao estudo relativamente à atividade citotóxica e perceber se os óleos presentes neste estudo apresentam a mesma toxicidade em diferentes linhas celulares, do mesmo modo executar métodos que mimetizem a estrutura tridimensional da pele humana e não apenas uma monocamada.

Uma vez que se executou um ensaio de estabilidade acelerada, seria interessante prosseguir com o ensaio, contudo com condições diferentes e durante um período de tempo superior, como recomendado pela IFCSS, de forma a comprovar assim a ideia que se pressupõe neste estudo da sinergia entre os compostos que constituem os óleos essenciais em estudo aquando da análise da composição química pelo método GC-MS entre as alíquotas sujeitas a temperatura ambiente e as alíquotas iniciais.

É necessário considerar a importância de diversos fatores que possam contribuir para a variabilidade da composição dos óleos essenciais, que por consequência traduzem em diferenças nas bioatividades.

Posto isto, é fundamental realizar mais estudos a fim de perceber o potencial de cada óleo essencial em estudo, como a atividade antimicrobiana, o perfil de segurança, mas também dar continuidade aos estudos da atividade antioxidante para ser considerado um seguro substituto de compostos antioxidantes sintéticos, de forma a tornar a cosmética mais natural, mas sem comprometer a sua eficácia.

Capítulo 9

Referencias bibliográficas

1. Mitsui T. *New Cosmetic Science*. Elsevier. 1998. 3-15 p.
2. Ali S, Halim F, Ahmad NB. Beauty Premium and Halal Cosmetics Industry. *J Mark Manag Consum Behav*. 2016;1(4):52–63.
3. Farman Hussain, Saman Pathan, Kailash Sahu, & Bhaskar Kumar Gupta. (2022). Herbs as cosmetics for natural care: A review. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 19(2), 316–322.
4. González-Minero FJ, Bravo-Díaz L. The Use of Plants in Skin-Care Products, Cosmetics and Fragrances: Past and Present. *Cosmetics*. 2018; 5(3):50
5. Halla N, Fernandes IP, Heleno SA, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*. 2018;23(7):1–41.
6. Europeu P. EMAS, Regulamento no1221/2009 de 25 de Novembro do Parlamento Europeu e do Conselho [Internet]. 2009. p. 1–45. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0001:0045:PT:PDF>
7. Kusumawati, I., & Indrayanto, G. (2013). Natural Antioxidants in Cosmetics. *Studies in Natural Products Chemistry*, 485–505.
8. Hoang, H. T., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Natural antioxidants from plant extracts in skincare cosmetics: Recent applications, challenges and perspectives. *Cosmetics*, 8(4), 1–24.
9. Kitchin DMP and JS. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. *J drugs dermatology*. 2010;9(1):11–5.
10. Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
11. Edris AE. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Wiley Interisci*. 2007;21:308–23.
12. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013 Jan;51:15-25.
13. Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 14–16.
14. Srinivasan, D., Parkin, K., & Fennema, O. (2008). *Fennema's Food Chemistry-CRC Press (2008) - 4th Edition.pdf* (p. 1123).

15. Araújo, J. Características dos Antioxidantes Primários. In: ARAÚJO, Júlio. Química de Alimentos. Viçosa-MG: UFV, 2015.
16. Hoang, H.T.; Moon, J.-Y.; Lee, Y.-C. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics* 2021, 8, 106.
17. Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, X., Martínez, M., Anadón, A., & Martínez, M. A. (2021). Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chemistry*, 353(March).
18. Guzmán, E., & Lucia, A. (2021). Essential oils and their individual components in cosmetic products. *Cosmetics*, 8(4), 1–28.
19. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J Dermatol Sci.* 2010;58(2):85–90.
20. Carvalho IT, Estevinho BN, Santos L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review. *Int J Cosmet Sci.* 2016;38(2):109–19.
21. Hoffmann, K. H. (2020). Essential oils. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 75(78), 177.
22. Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules.* 2010;15(12):9252–87.
23. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-- a review. *Food Chem Toxicol.* 2008 Feb;46(2):446-75.
24. Sharma A., Bajpai V.K., Shukla S. (2013) Sesquiterpenes and Cytotoxicity. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg.
25. Ríos, J.-L. Essential Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier; 2016: 3–10.
26. ISO 9235: Aromatic natural raw materials- vocabulary (2021)
27. Aburjai T, Natsheh FM. Plants Used in Cosmetics. *Phyther Res.* 2003;17(9):987–1000
28. Chemat, F., AbertVian, M., & Dangles, O. (2007). Essential oils as antioxidants. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1(1), 4–15.
29. Milica. (2021). Essential Oils: Inhalation Aromatherapy. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management Review*, 4(2), 547–557.
30. Dreger M, Wielgus K. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Pol.* 2013;59(4).
31. Lamprecht P, Schmitt WH, Gross WL. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(1):213–21.

32. Vigan M. Essential oils: Renewal of interest and toxicity. *Eur J Dermatology*. 2010;20(6):685–92.
33. Kammoun AK, Ahmed A, Haidy G. Comparative metabolic study of *Citrus sinensis* leaves cultivars based on GC-MS and their cytotoxic activity. *J Pharma Biomed Anal*. 2021;198:113991
34. Alexa VT, Galuscan A, Soica CM, Cozma A, Coricovac D, Borcan F, Popescu I, MIOC A, Szuhaneck C, Dehelean CA, Jumanca D. In Vitro Assessment of the Cytotoxic and Antiproliferative Profile of Natural Preparations Containing Bergamot, Orange and Clove Essential Oils. *Molecules*. 2022 Feb 1;27(3):990
35. Dolghi A, Buzatu R, Dobrescu A, et al. Phytochemical Analysis and In Vitro Cytotoxic Activity against Colorectal Adenocarcinoma Cells of *Hippophae rhamnoides* L., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils. *Plants (Basel)*. 2021;10(12):2752
36. Lombrea A, Antal D, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ, Vlaia L, Mut A-M, Diaconeasa Z, Dehelean CA, Soica C, Danciu C. A recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(24):9653
37. Elshafie HS, Armentano MF, Carmosino M, Bufo SA, De Feo V, Camele I. Cytotoxic Activity of *Origanum Vulgare* L. on Hepatocellular Carcinoma cell Line HepG2 and Evaluation of its Biological Activity. *Molecules*. 2017;22(9):1435
38. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009
39. Fierascu, R. C., Fierascu, I., Baroi, A. M., & Ortan, A. (2021). Selected aspects related to medicinal and aromatic plants as alternative sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–20.
40. 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(3).
41. Singh, J., Baghotia, A., & Goel, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4), 1469–1475.
42. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res*. 2007 Jun;21(6):501-6.
43. Cortés-Rojas DF, de Souza CR, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014 Feb;4(2):90-6.

44. Namiki M. 1994. Antimutagen and anticarcinogen research in Japan. In Food Phytochemicals for Cancer Prevention III, Huang M-T, Osawa T, Ho C-T, Rosen RT (eds). Maple Press: York, Vol. 546, 64–81
45. Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmidt JM, Setzer WN. 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *Int J Aromather* 15: 147–152.
46. Yoo CB, Han KT, Cho KS et al. 2005. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 225: 41–52.
47. Pandey, A. K., Singh, P., & Tripathi, N. N. (2014). Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 682–694.
48. 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.
49. Purushothaman, B., Prasannasrinivasan, R., Suganthi, P., Ranganathan, B., Gimbin, J., & Shanmugam, K. (2018). A comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *Journal of Natural Remedies*, 18(3), 71–85.
50. Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. T., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986–995
51. Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J Microbiol Biotechnol*. 2017 Mar 28;27(3):429-438.
52. A.Proença da Cunha. (2004). Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
53. Pezzani, R., Vitalini, S., & Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1253–1268.
54. Bussmann, R. W., Batsatsashvili, K., Kikvidze, Z., Paniagua-zambrana, N. Y., Khutsishvili, M., Maisaia, I., Sikharulidze, S., & Tchelidze, D. (n.d.). *Origanum vulgare* L. L.
55. Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717–1727.
56. Lucia, G. (2021). Biological and Antibiofilm Activity of *Origanum Vulgare* Essential. *Researchgate*, June, 21–39.

57. Long, X., Zeng, X., Yan, H., Xu, M., Zeng, Q., Xu, C., Xu, Q., Liang, Y., & Zhang, J. (2021). Flavonoids composition and antioxidant potential assessment of extracts from Gannanzao Navel Orange (*Citrus sinensis* Osbeck Cv. Gannanzao) peel. *Natural Product Research*, 35(4), 702–706.
58. Toscano-Garibay, J. D., Arriaga-Alba, M., Sánchez-Navarrete, J., Mendoza-García, M., Flores-Estrada, J. J., Moreno-Eutimio, M. A., Espinosa-Aguirre, J. J., González-Ávila, M., & Ruiz-Pérez, N. J. (2017). Antimutagenic and antioxidant activity of the essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.
59. Aydeniz-Guneser, B. (2020). Cold pressed orange (*Citrus sinensis*) oil. In *Cold Pressed Oils*. Elsevier Inc.
60. Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M. D. R. (2016). Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2).
61. Anandakumar, P., Kamaraj, S., & Vanitha, M. K. (2021). D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1), 1–10.
62. Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M. D. R. (2016). Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2).
63. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011 Aug;48(4):412-22.
64. Molyneux P. (2004). The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Anti-Oxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(May), 211–219.
65. Inovep. Procedimento Operativo – Determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH
66. Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2015). Depletion/protection of β -carotene in estimating antioxidant activity by β -carotene bleaching assay. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7321–7328.
67. Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J. A., & Murado, M. A. (2012). β -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8983–8993.
68. Olszowy, M., & Dawidowicz, A. L. (2016). Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. *Monatshefte Fur Chemie*, 147(12), 2083–2091.

69. Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2010). Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -carotene bleaching assay: Experiments with BHT used as standard antioxidant. *European Food Research and Technology*, 231(6), 835–840.
70. Scudiero D a, Shoemaker RH, Paull KD, Scudiere D a, Paul KD, Monks A, et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human an. 1988;4827–33.
71. Testing, S. (n.d.). Number 2 orphanages (Issue 2).
72. WHO. (1996). Annex 5: Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well Established Drug Substances in Conventional Dosage Forms. World Health Organization Technical Report Series, 863, 65–80.
73. Kirkbride, L., Humphries, L., Kozielska, P., & Curtis, H. (2021). Changing Retail Landscape. *Samudra Report*, 55, 0–3.
74. The European Cosmetic, T. and P. A. (Colipa). (2004). Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. Cosmetic Toiletry and Fragrance Association and The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association, March, 1–8.
75. Bacanlı, M., Basaran, A., & Basaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 160–170.
76. Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M.F., Quetin-Leclercq, J., 2006. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72, 480–482.
77. Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.Y., Dashwood, R.H., 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutat. Res.* 495, 61–74.

Anexos

Para a realização do ensaio de redução do radical DPPH foi necessário primeiramente validar a reta de calibração do radical DPPH para seguidamente se efetuar o gráfico correspondente tanto aos óleos essenciais em estudo.

Anexo 1- Validação da reta de calibração do ensaio 1 de redução do radical DPPH

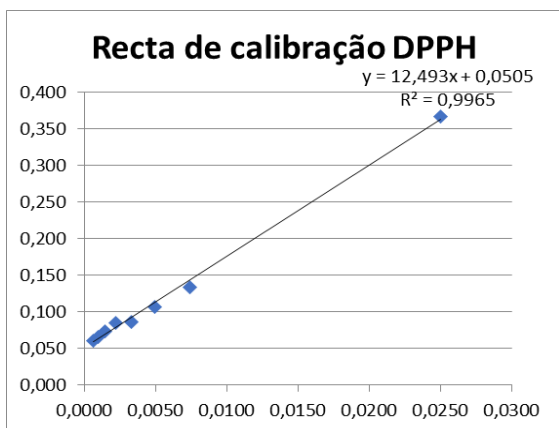


Figura 1: Reta de calibração referente ao radical DPPH no ensaio 1

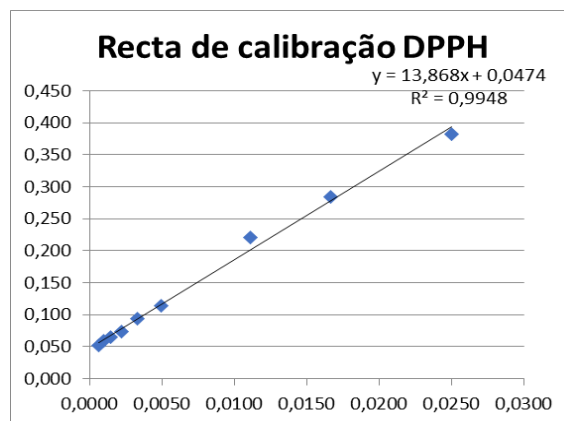


Figura 2: Reta de calibração referente ao radical DPPH no ensaio 2

Anexo 2- Validação da reta de calibração do ensaio de redução do radical DPPH após o ensaio de estabilidade acelerada

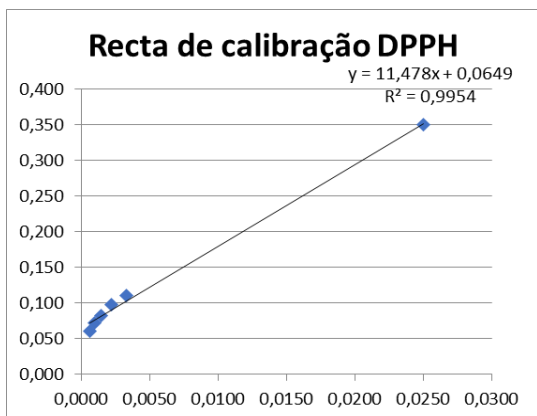


Figura 3: Reta de calibração referente ao radical DPPH no ensaio 1 após o ensaio de estabilidade acelerada

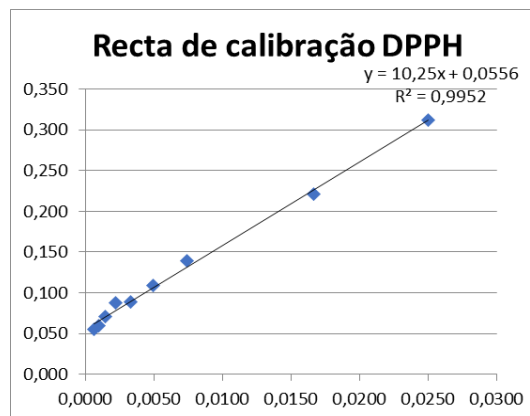


Figura 4: Reta de calibração referente ao radical DPPH no ensaio 2 após o ensaio de estabilidade acelerada

De modo a comparar os resultados obtidos para os óleos essenciais verificou-se o comportamento do antioxidante padrão BHT pelo sistema β - Caroteno/ácido linoleico

Anexo 3- Validação do antioxidante BHT no sistema β - Caroteno/ácido linoleico

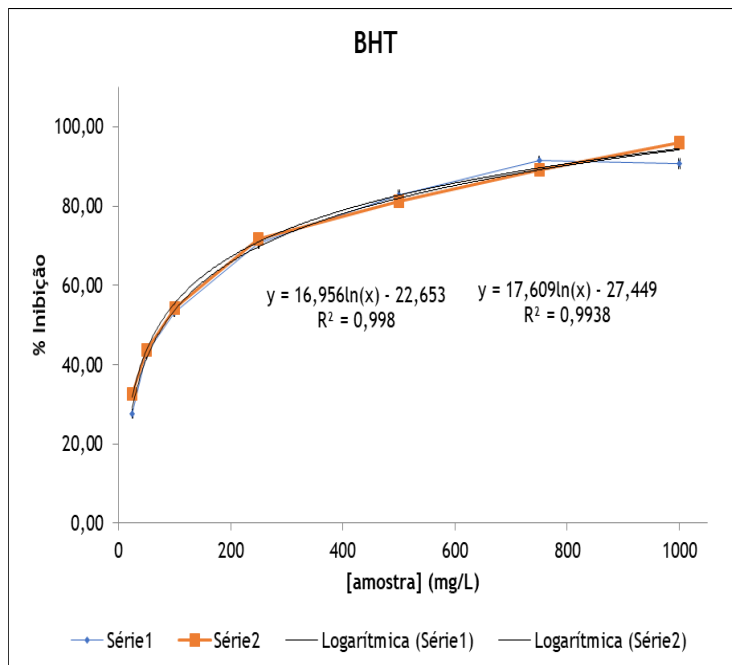
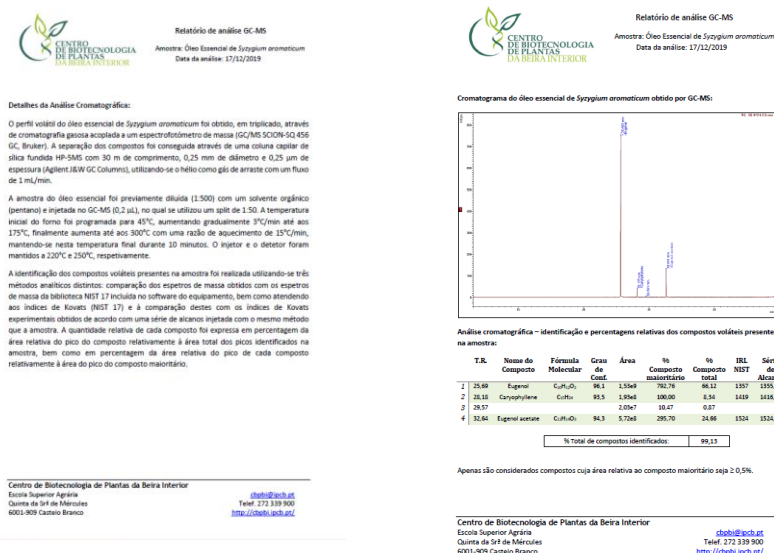


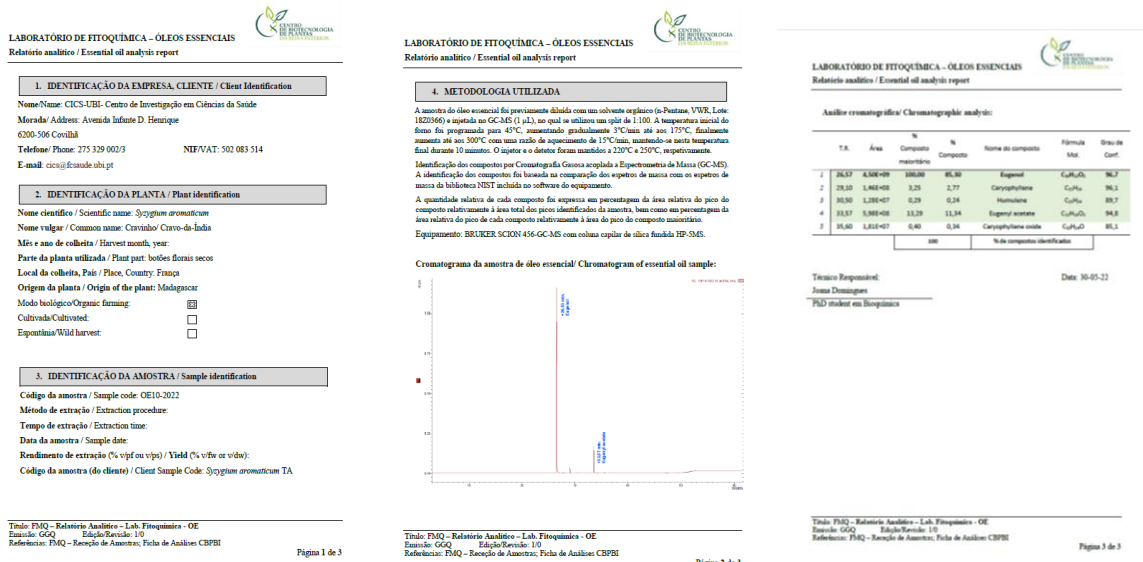
Figura 5: Comportamento do antioxidante sintético BHT na inibição da oxidação do β -Caroteno

Os relatórios analíticos relativos à identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais foram realizados por GC-MS pelo Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior Interior

Anexo 4- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *S. aromaticum* da alíquota inicial



Anexo 5- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *S. aromaticum* da alíquota sujeita à temperatura ambiente



Anexo 6- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *O. basilicum* da alíquota inicial

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

1. IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA, CLIENTE / Client Identification

Nome/Name: CICS-LIBI, Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Morada/Address: Avenida Infante D. Henrique
6355-506 Casilhol
Telefone/Phone: 275 329 0023 NIF/VAT: 502 083 514
E-mail: cics@libi.pt

2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant Identification

Nome científico / Scientific name: *Ocimum basilicum*
Nome vulgar / Common name: Manjericao
Mês e ano de colheita / Harvest month, year: Agosto, 2018
Parte da planta utilizada / Plant part:
Local de colheita, País / Place, Country:
Origem da planta / Origin of the plant:
Método biológico/Organic farming:
Cultivado/Cultivated:
Espécimen/Wild harvest:

3. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA / Sample Identification

Código da amostra / Sample code: OE-2022
Método de extração / Extraction procedure:
Tempo de extração / Extraction time:
Data da amostra / Sample date:
Rendimento de extração (% v/v) ou v/v₀ / Yield (% v/v) or v/v₀:
Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: *Ocimum basilicum*

Título: FRQJ - Relatório Analítico - Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GQJ - Edição/Versão: 10
Referência: FRQJ - Reação de Amostra, Ficha de Análise: CPBE

Página 1 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA

A amostra de óleo essencial foi previamente diluída com um solvente apolar (n-Pentano, VPR, Lote 1623360) e injetado no GC-MS (1 µL) no qual se utilizou um split de 1:10. A temperatura inicial do forno foi programada para 40°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 170°C. Em seguida, manteve-se até aos 300°C com uma taxa de aquecimento de 17°C/min, mantendo-se após 10 segundos final durante 10 minutos. O injetor e o detector foram aquecidos a 230°C e 250°C, respetivamente.
Identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa com os espectros de massa de bibliotecas NIST incluído no software de equipamento.
A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico de 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 correspondente.
Equipamento: BRUKER SCION 436-GC-MS com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS.
Cromatograma da amostra de óleo essencial/Chromatogram of essential oil sample:

Título: FRQJ - Relatório Analítico - Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GQJ - Edição/Versão: 10
Referência: FRQJ - Reação de Amostra, Ficha de Análise: CPBE

Página 2 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica/Chromatographic analysis:

TR	Área	% Composto	% Composto	Nome do composto	Fórmula Mol	Óleo de Conf.	
1	7.26	5.02E-07	0.22	o-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	91.5	
2	9.41	4.83E-06	0.25	Thujene	C ₁₀ H ₁₆	91.6	
3	9.51	2.91E-07	0.61	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	94.1	
4	10.33	2.48E-07	0.52	β-Myrcene	C ₁₁ H ₁₈	93.4	
5	11.75	5.49E-06	0.21	δ-Limonene	C ₁₄ H ₂₂	94.0	
6	11.85	6.55E-06	1.81	Eucaliptol	C ₁₅ H ₂₂ O	94.4	
7	12.67	4.23E-07	0.90	β-Cymene	C ₁₀ H ₁₆	94.8	
8	14.42	8.94E-06	0.21	Terpinolene	C ₁₄ H ₂₂	91.7	
9	15.62	4.79E-09	100.00	Linalool	C ₁₁ H ₁₈ O	94.4	
10	16.42	1.63E-07	1.19	Camphor	C ₁₅ H ₂₄ O	91.8	
11	16.50	6.04E-06	0.13	Bornolol	C ₁₅ H ₂₄ O	90.7	
12	16.50	8.76E-06	0.18	0.12			
13	19.32	4.07E-07	0.26	o-Terpinolene	C ₁₄ H ₂₂ O	91.6	
14	21.61	7.66E-07	1.87	Bornyl acetate	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	94.3	
15	24.54	4.28E-08	0.51	Eugenol	C ₁₅ H ₁₄ O	90.7	
16	26.01	4.31E-07	0.91	β-Elemene	C ₁₄ H ₂₂	92.3	
17	29.09	1.04E-07	0.22	Carophyllene	C ₁₈ H ₂₆	89.6	
18	29.80	4.83E-08	0.78	α-Bergamotene	C ₁₈ H ₂₆	90.5	
19	29.80	4.13E-08	0.11	α-Bisabolene	C ₁₈ H ₂₆	92.8	
20	30.49	1.76E-07	0.37	Humulene	C ₁₈ H ₂₆	91.4	
21	30.89	6.32E-06	0.17	cis-Maurerol-(E)-1,5-diene	C ₁₈ H ₂₆ O	90.7	
22	31.63	6.31E-07	1.75	Gamma-D	C ₁₅ H ₂₂ O	94.2	
23	31.63	1.20E-07	0.48	0.33			
24	32.26	1.39E-07	0.28	Bicyclogermacrene	C ₁₈ H ₂₆	90.3	
25	32.65	2.83E-07	0.40	β-Guaiolene	C ₁₈ H ₂₆	91.8	
26	32.87	8.87E-07	1.89	γ-Cadinene	C ₁₈ H ₂₆	90.3	
27	37.82	8.50E-07	1.88	γ-Cadinol	C ₁₈ H ₂₆ O	91.4	
			92.20				
						No de compostos identificados	

Título: FRQJ - Relatório Analítico - Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GQJ - Edição/Versão: 10
Referência: FRQJ - Reação de Amostra, Ficha de Análise: CPBE

Página 3 de 4

Anexo 7- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *O. basilicum* da alíquota sujeita à temperatura ambiente

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

1. IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA, CLIENTE / Client Identification

Nome/Name: CICS-LIBI, Centro de Investigação em Ciências da Saúde
Morada/Address: Avenida Infante D. Henrique
6355-506 Casilhol
Telefone/Phone: 275 329 0023 NIF/VAT: 502 083 514
E-mail: cics@libi.pt

2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant Identification

Nome científico / Scientific name: *Ocimum basilicum_TA*
Nome vulgar / Common name: Manjericao
Mês e ano de colheita / Harvest month, year: Agosto, 2018
Parte da planta utilizada / Plant part:
Local de colheita, País / Place, Country:
Origem da planta / Origin of the plant:
Método biológico/Organic farming:
Cultivado/Cultivated:
Espécimen/Wild harvest:

3. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA / Sample Identification

Código da amostra / Sample code: OE7-2022
Método de extração / Extraction procedure:
Tempo de extração / Extraction time:
Data da amostra / Sample date:
Rendimento de extração (% v/v) ou v/v₀ / Yield (% v/v) or v/v₀:
Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: *Ocimum basilicum_TA*

Título: FRQJ - Relatório Analítico - Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GQJ - Edição/Versão: 10
Referência: FRQJ - Reação de Amostra, Ficha de Análise: CPBE

Página 1 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA

A amostra de óleo essencial foi previamente diluída com um solvente apolar (n-Pentano, VPR, Lote 1623360) e injetado no GC-MS (1 µL) no qual se utilizou um split de 1:10. A temperatura inicial do forno foi programada para 40°C, aumentando gradualmente 3°C/min até aos 170°C. Em seguida, manteve-se até aos 300°C com uma taxa de aquecimento de 17°C/min, mantendo-se após 10 segundos final durante 10 minutos. O injetor e o detector foram aquecidos a 230°C e 250°C, respetivamente.
Identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massa com os espectros de massa de bibliotecas NIST incluído no software de equipamento.
A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico de 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 correspondente.
Equipamento: BRUKER SCION 436-GC-MS com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS.
Cromatograma da amostra de óleo essencial/Chromatogram of essential oil sample:

Título: FRQJ - Relatório Analítico - Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GQJ - Edição/Versão: 10
Referência: FRQJ - Reação de Amostra, Ficha de Análise: CPBE

Página 2 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica/Chromatographic analysis:

TR	Área	% Composto	% Composto	Nome do composto	Fórmula Mol	Óleo de Conf.	
1	7.26	6.40E-06	0.26	o-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	89.7	
2	9.41	1.05E-06	0.12	Thujene	C ₁₀ H ₁₆	88.1	
3	9.50	1.44E-07	0.58	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	90.4	
4	10.19	4.93E-06	0.26	β-Myrcene	C ₁₁ H ₁₈	91.4	
5	11.72	2.74E-06	0.11	δ-Limonene	C ₁₄ H ₂₂	89.0	
6	11.80	3.48E-08	14.11	Eucaliptol	C ₁₅ H ₂₂ O	95.9	
7	12.67	1.49E-06	0.36	β-Cymene	C ₁₀ H ₁₆	90.9	
8	14.42	1.14E-06	0.13	0.08			
9	14.90	2.47E-09	100.00	Linalool	C ₁₁ H ₁₈ O	94.4	
10	14.93	3.76E-07	1.30	Camphor	C ₁₅ H ₂₄ O	91.6	
11	15.13	1.46E-07	0.60	α-Terpinolene	C ₁₄ H ₂₂ O	91.0	
12	21.43	3.71E-07	1.30	Bornyl acetate	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	91.3	
13	24.53	1.09E-08	4.41	Eugenol	C ₁₅ H ₁₄ O	91.8	
14	26.01	1.87E-07	0.76	β-Elemene	C ₁₄ H ₂₂	89.7	
15	29.80	2.33E-08	1.40	α-Bergamotene	C ₁₈ H ₂₆	90.3	
16	29.83	2.22E-08	0.20	α-Bisabolene	C ₁₈ H ₂₆	89.6	
17	30.49	6.26E-08	0.25	0.18	Humulene	C ₁₈ H ₂₆	86.0
18	31.64	3.55E-07	1.94	Gamma-D	C ₁₅ H ₂₂ O	93.7	
19	31.62	4.61E-08	0.19	0.26			
20	32.46	1.94E-07	0.46	β-Guaiolene	C ₁₈ H ₂₆	86.2	
21	32.87	4.14E-07	1.88	γ-Cadinene	C ₁₈ H ₂₆	91.3	
22	37.81	3.57E-07	1.46	γ-Cadinol	C ₁₈ H ₂₆ O	90.4	
						No de compostos identificados	

Título: FRQJ - Relatório Analítico - Lab. Fitoquímica - OE
Emissão: GQJ - Edição/Versão: 10
Referência: FRQJ - Reação de Amostra, Ficha de Análise: CPBE

Página 3 de 3

Técnico Responsável: Inês Domingos
Data: 10-05-22

Anexo 8- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *O. vulgare* da alíquota inicial

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
 6205-506 Covilhã
 Telefone/Phone: 273 329 003 NIF/VAT: 502 083 514
 E-mail: cics@fct.ucp.pt

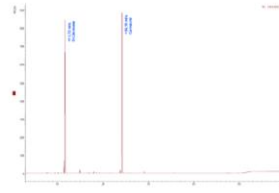
2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant identification
 Nome científico / Scientific name: *Origanum vulgare*
 Nome vulgar / Common name: Orégão
 Mês e ano de colheita / Harvest month, year:
 Parte da planta utilizada / Plant part:
 Local de colheita, País / Place, Country: Portugal
 Origem da planta / Origin of the plant:
 Modo biológico/Organic farming:
 Cultuada/Cultivated:
 Espontânea/Wild harvest:

3. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA / Sample identification
 Código da amostra / Sample code: OES-2022
 Método de extração / Extraction procedure:
 Tempo de extração / Extraction time:
 Data da amostra / Sample date:
 Rendimento de extração (% v/v) ou (v/v) / Yield (% v/v or v/v):
 Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: *Origanum vulgare*

Título: F1Q2 - Relatório Analítico - Lab. Fitotecnologia - OE
 Baseado: GGG - Edição/Ferrolha, 1/0
 Referência: F1AQ - Exatidão de Amostras; Ficha de Análise: CBPSE

Página 1 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA
 A amostra de óleo essencial foi previamente diluída com um solvente orgânico (n-Pentano, VWR, Lot: 1829566) e injetada no GC-MS (1 µL), no qual se utilizou um split de 1:50. A temperatura inicial do forno foi programada para 40°C, mantendo-se posteriormente 1°C/min até aos 170°C, finalmente mantendo-se em 200°C com uma velocidade de aquecimento de 1°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detector foram mantidos a 230°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 espetros de massa com os espetros de massa de bibliotecas NIST incluído no software do equipamento.
 A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico de 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 de composto mais abundante.
 Equipamento: BRUKER SCIEX 456-GC-MS com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS.
 Cromatograma da amostra de óleo essencial: Chromatogram of essential oil sample:


Título: F1Q2 - Relatório Analítico - Lab. Fitotecnologia - OE
 Baseado: GGG - Edição/Ferrolha, 1/0
 Referência: F1AQ - Exatidão de Amostras; Ficha de Análise: CBPSE

Página 2 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica / Chromatographic analysis:

T.R.	Área	% Composto relativo	% Composto	Nome do composto	Fórmula Mol.	Óleo de Cont.
2	7.61	4.93E-06	0.25	0.07		
7	7.85	1.89E-07	0.56	0.28	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆ 91.4
9	14.1	2.64E-06	0.08	0.04	Camphorene	C ₁₅ H ₂₂ 98.2
4	9.50	6.79E-06	0.20	0.10	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆ 91.3
5	10.18	1.38E-07	0.40	0.21	β-Myrcene	C ₁₁ H ₁₆ 91.7
6	11.94	2.04E-08	6.00	3.06	p-Cimene	C ₁₀ H ₁₆ 94.8
7	11.72	2.22E-09	70.70	40.68	Dilimone	C ₁₀ H ₁₆ 94.0
8	11.61	1.74E-07	0.51	0.26	Eucalyptol	C ₁₅ H ₂₂ 91.2
9	14.99	6.08E-07	1.78	0.91	Limonene	C ₁₅ H ₂₄ 89.9
10	15.08	8.91E-06	0.26	0.13		
11	16.94	4.91E-06	0.19	0.10	α-Pineno-Limonil-Lol	C ₂₅ H ₄₀ 91.1
12	16.92	2.63E-07	0.77	0.39	Camphor	C ₁₅ H ₂₂ 91.7
13	17.91	3.26E-07	0.96	0.49	Borneol	C ₁₅ H ₂₄ 91.0
14	18.49	1.91E-07	0.56	0.29	Terpinen-4-ol	C ₁₅ H ₂₂ 89.0
15	19.12	1.81E-07	0.54	0.27	α-Terpinolol	C ₁₅ H ₂₄ 91.4
16	21.60	9.42E-06	0.17	0.09		
17	23.77	5.66E-07	1.72	0.88	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ 91.5
18	24.19	8.42E-09	100.00	50.99	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ 91.4
19	29.19	3.90E-07	1.17	0.60	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₂ 91.3
20	30.49	3.47E-06	0.11	0.05	Humulene	C ₁₅ H ₂₂ 87.3
21	35.60	1.61E-07	0.30	0.15	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₂ 87.2
			96.71		% de compostos identificados	

Técnicos Responsáveis:
 Joana Domingues
 F1Q2 - Síntese em Biociências

Título: F1Q2 - Relatório Analítico - Lab. Fitotecnologia - OE
 Baseado: GGG - Edição/Ferrolha, 1/0
 Referência: F1AQ - Exatidão de Amostras; Ficha de Análise: CBPSE

Data: 30-01-2022

Página 3 de 3

Anexo 9- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *O. vulgare* da alíquota sujeita à temperatura ambiente

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
 6205-506 Covilhã
 Telefone/Phone: 273 329 003 NIF/VAT: 502 083 514
 E-mail: cics@fct.ucp.pt

2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant identification
 Nome científico / Scientific name: *Origanum vulgare* TA
 Nome vulgar / Common name: Orégãos
 Mês e ano de colheita / Harvest month, year:
 Parte da planta utilizada / Plant part:
 Local de colheita, País / Place, Country: Portugal
 Origem da planta / Origin of the plant:
 Modo biológico/Organic farming:
 Cultuada/Cultivated:
 Espontânea/Wild harvest:

3. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA / Sample identification
 Código da amostra / Sample code: OES-2022
 Método de extração / Extraction procedure:
 Tempo de extração / Extraction time:
 Data da amostra / Sample date:
 Rendimento de extração (% v/v) ou (v/v) / Yield (% v/v or v/v):
 Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: *Origanum vulgare* TA

Título: F1Q2 - Relatório Analítico - Lab. Fitotecnologia - OE
 Baseado: GGG - Edição/Ferrolha, 1/0
 Referência: F1AQ - Exatidão de Amostras; Ficha de Análise: CBPSE

Página 1 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA
 A amostra de óleo essencial foi previamente diluída com um solvente orgânico (n-Pentano, VWR, Lot: 1829566) e injetada no GC-MS (1 µL), no qual se utilizou um split de 1:50. A temperatura inicial do forno foi programada para 40°C, mantendo-se posteriormente 1°C/min até aos 170°C, finalmente mantendo-se em 200°C com uma velocidade de aquecimento de 1°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detector foram mantidos a 230°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 espetros de massa com os espetros de massa de bibliotecas NIST incluído no software do equipamento.
 A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico de 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 de composto mais abundante.
 Equipamento: BRUKER SCIEX 456-GC-MS com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS.
 Cromatograma da amostra de óleo essencial: Chromatogram of essential oil sample:


Título: F1Q2 - Relatório Analítico - Lab. Fitotecnologia - OE
 Baseado: GGG - Edição/Ferrolha, 1/0
 Referência: F1AQ - Exatidão de Amostras; Ficha de Análise: CBPSE

Página 2 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA - ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica / Chromatographic analysis:

T.R.	Área	Composto relativo	% Composto	Nome do composto	Fórmula Mol.	Óleo de Cont.
2	7.62	4.98E-06	0.08	0.05		
7	7.84	1.98E-07	0.59	0.29	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆ 91.3
4	9.50	1.11E-06	0.06	0.04	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆ 91.7
5	10.18	1.02E-07	0.20	0.13	β-Myrcene	C ₁₁ H ₁₆ 91.2
6	11.93	1.79E-08	3.47	2.23	p-Cimene	C ₁₀ H ₁₆ 90.2
7	11.70	1.12E-09	41.34	21.13	Dilimone	C ₁₀ H ₁₆ 91.1
8	11.80	1.76E-07	0.55	0.35	Eucalyptol	C ₁₅ H ₂₂ 91.3
9	14.98	9.51E-07	1.88	1.20	Limonene	C ₁₅ H ₂₄ 90.3
10	15.07	1.40E-07	0.28	0.18		
11	16.94	1.19E-07	0.33	0.19	α-Pineno-Limonil-Lol	C ₂₅ H ₄₀ 91.1
12	16.90	1.64E-07	0.72	0.46	Camphor	C ₁₅ H ₂₂ 91.5
13	17.90	4.86E-07	0.96	0.61	Borneol	C ₁₅ H ₂₄ 91.9
14	18.48	2.88E-07	0.57	0.36	Terpinen-4-ol	C ₁₅ H ₂₂ 89.6
15	19.11	2.92E-07	0.58	0.37	α-Terpinolol	C ₁₅ H ₂₄ 91.8
16	21.59	1.28E-07	0.25	0.16		
17	23.77	9.36E-07	1.85	1.19	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ 91.8
18	24.19	8.07E-09	100.00	64.08	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ 91.5
19	29.19	4.40E-07	1.05	0.68	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₂ 94.9
20	30.50	3.49E-06	0.11	0.07	Humulene	C ₁₅ H ₂₂ 89.8
21	35.61	1.61E-07	0.32	0.20	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₂ 88.4
			96.61		% de compostos identificados	

Técnicos Responsáveis:
 Joana Domingues
 F1Q2 - Síntese em Biociências

Título: F1Q2 - Relatório Analítico - Lab. Fitotecnologia - OE
 Baseado: GGG - Edição/Ferrolha, 1/0
 Referência: F1AQ - Exatidão de Amostras; Ficha de Análise: CBPSE

Data: 30-01-2022

Página 3 de 3

Anexo 10- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *C. sinensis* da alíquota inicial

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

1. IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA, CLIENTE / Client Identification
 Nome/Name: CICS-UBS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde
 Morada/Address: Avenida Infante D. Henrique
 6200-506 Covilhã
 Telefone/Phone: 275 229 002/3 NIF/VAT: 502 083 514
 E-mail: cics@fundao.ubs.pt

2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant Identification
 Nome científico / Scientific name: Citrus sinensis
 Nome vulgar / Common name: Laranja
 Mês e ano de colheita / Harvest month, year:
 Parte da planta utilizada / Plant part: Casca de laranja
 Local da colheita, País / Place, Country: Portugal
 Origem da planta / Origin of the plant: Portugal
 Modo biológico/Organic farming:
 Cultivada/Cultivated:
 Espontânea/Wild harvest:

3. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA / Sample Identification
 Código da amostra / Sample code: OE5-2022
 Método de extração / Extraction procedure:
 Tempo de extração / Extraction time:
 Data da amostra / Sample date:
 Resultado de extração (% v/v em v/v) / Yield (% v/v in v/v):
 Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: Citrus sinensis

Título: F102 - Relatório Analítico - Lab. Fitotermico - OE
 Escala: G02 - Edição/Revisão: 1/0
 Referências: F102 - Base de Insumos, Ficha de Análise CBPH

Página 1 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA
 A amostra de óleo essencial foi previamente diluída com um solvente orgânico (o Pentano, VWR, Lot# 1022096) e agitada ao GC-MS (1 µL), no qual se utilizou um split de 1:100. A temperatura inicial do forno foi programada para 40°C, aumentando gradualmente 1°C/min até aos 170°C. Realizámos o mesmo até aos 300°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detector 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 de bibliotecas NIST incluído no software de equipamento.
 A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa da picos de composto relativamente à área total dos picos identificados da amostra, bem como em percentagem da área relativa da picos de cada composto relativamente à área de picos de composto não-identificados.
 Equipamento: BRUKER SCIEX 456 GC-MS com colunas capilares de sílica fundida HP-5MS.

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

Título: F102 - Relatório Analítico - Lab. Fitotermico - OE
 Escala: G02 - Edição/Revisão: 1/0
 Referências: F102 - Base de Insumos, Ficha de Análise CBPH

Página 2 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica/ Chromatographic analysis:

T.R.	Área Composta	% Composta	% Composta	Nome do composto	Fórmula Mol.	Óleo de Ess.
1	7,27	2,83E-07	0,00	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	94,8
2	9,42	2,31E-07	0,00	Thujeno	C ₁₀ H ₁₆	94,9
3	9,51	7,94E-06	0,34	β-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	91,0
4	10,18	4,80E-07	0,00	β-Myrceno	C ₁₁ H ₁₈	96,3
5	11,08	4,03E-06	0,20	α-Cimeno	C ₁₀ H ₁₆	91,2
6	11,79	5,76E-09	0,00	β-Cimeno	C ₁₀ H ₁₆	97,4
7	13,10	4,78E-06	0,20	0,00		
8	15,10	1,64E-07	0,00	0,00		
9	16,52	3,60E-06	0,00	0,00		98,1
10	32,14	5,95E-06	0,20	0,00		
		94,76	% de compostos identificados			

Técnico Responsável: Jozsa Domingues
 PFD: analise em Biologia

Data: 30-05-2022

Título: F102 - Relatório Analítico - Lab. Fitotermico - OE
 Escala: G02 - Edição/Revisão: 1/0
 Referências: F102 - Base de Insumos, Ficha de Análise CBPH

Página 3 de 3

Anexo 11- Identificação e quantificação dos compostos que constituem o óleo essencial de *C. sinensis* da alíquota sujeita à temperatura ambiente

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

1. IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA, CLIENTE / Client Identification
 Nome/Name: CICS-UBS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde
 Morada/Address: Avenida Infante D. Henrique
 6200-506 Covilhã
 Telefone/Phone: 275 229 002/3 NIF/VAT: 502 083 514
 E-mail: cics@fundao.ubs.pt

2. IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA / Plant Identification
 Nome científico / Scientific name: Citrus sinensis TA
 Nome vulgar / Common name: Laranja
 Mês e ano de colheita / Harvest month, year:
 Parte da planta utilizada / Plant part: Casca de laranja
 Local da colheita, País / Place, Country: Portugal
 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: OE5-2022
 Método de extração / Extraction procedure:
 Tempo de extração / Extraction time:
 Data da amostra / Sample date:
 Resultado de extração (% v/v em v/v) / Yield (% v/v in v/v):
 Código da amostra (do cliente) / Client Sample Code: Citrus sinensis TA

Título: F102 - Relatório Analítico - Lab. Fitotermico - OE
 Escala: G02 - Edição/Revisão: 1/0
 Referências: F102 - Base de Insumos, Ficha de Análise CBPH

Página 1 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

4. METODOLOGIA UTILIZADA
 A amostra de óleo essencial foi previamente diluída com um solvente orgânico (o Pentano, VWR, Lot# 1022096) e agitada ao GC-MS (1 µL), no qual se utilizou um split de 1:100. A temperatura inicial do forno foi programada para 40°C, aumentando gradualmente 1°C/min até aos 170°C. Realizámos o mesmo até aos 300°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos. O injetor e o detector 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 de bibliotecas NIST incluído no software de equipamento.
 A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa da picos de composto relativamente à área total dos picos identificados da amostra, bem como em percentagem da área relativa da picos de cada composto relativamente à área de picos de composto não-identificados.
 Equipamento: BRUKER SCIEX 456 GC-MS com colunas capilares de sílica fundida HP-5MS.

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

Título: F102 - Relatório Analítico - Lab. Fitotermico - OE
 Escala: G02 - Edição/Revisão: 1/0
 Referências: F102 - Base de Insumos, Ficha de Análise CBPH

Página 2 de 3

LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA – ÓLEOS ESSENCIAIS
Relatório analítico / Essential oil analysis report

Análise cromatográfica/ Chromatographic analysis:

T.R.	Área Composta	% Composta	% Composta	Nome do composto	Fórmula Mol.	Óleo de Ess.
1	7,36	2,83E-07	0,00	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	91,0
2	9,40	2,31E-07	0,00	Thujeno	C ₁₀ H ₁₆	91,5
3	9,50	1,03E-07	0,24	β-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	91,0
4	10,17	3,18E-07	0,72	β-Myrceno	C ₁₁ H ₁₈	94,9
5	10,89	1,27E-07	0,29	0,27		
6	11,35	4,85E-06	0,11	0,11		91,6
7	11,72	4,96E-09	0,00	0,00		97,4
8	14,99	1,50E-08	3,44	3,18		90,1
9	16,49	2,20E-07	0,51	0,49		95,2
10	32,12	2,83E-07	0,00	0,00		95,5
11	19,92	4,36E-06	0,10	0,14		
12	32,13	3,22E-07	0,74	0,68		91,5
		90,26	% de compostos identificados			

Técnico Responsável: Jozsa Domingues
 PFD: analise em Biologia

Data: 30-05-22

Título: F102 - Relatório Analítico - Lab. Fitotermico - OE
 Escala: G02 - Edição/Revisão: 1/0
 Referências: F102 - Base de Insumos, Ficha de Análise CBPH

Página 3 de 3