

Composição química da folha e do caule de Calamintha baetica. Efeito do solvente na extração de compostos antioxidantes.

Helena Isabel Vieira Azevedo

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar.*

Orientado por

Professora Doutora Clementina Maria Moreira dos Santos

**Bragança
2014**

AGRADECIMENTOS

Na finalização deste trabalho, é com enorme satisfação, que agradeço àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Clementina Santos, orientadora deste trabalho, por toda a ajuda, apoio e incentivo prestados, pela transmissão dos seus conhecimentos, pela sua disponibilidade e prontidão, pela tolerância e principalmente pela compreensão e paciência.

À Doutora Sónia Santos pela disponibilidade e contribuição na recolha da planta *Calamintha baetica* e pela colaboração na pesquisa sobre a classificação botânica da espécie.

Ao Professor Doutor José Alberto pela cedência de vários equipamentos entre os quais evaporador rotativo, espectrofotómetro UV-VIS, liofilizador e equipamento de *Soxhlet*. Aos alunos de doutoramento Nuno Rodrigues e Ricardo Malheiro pela simpatia e auxílio na manipulação dos equipamentos mencionados anteriormente e transmissão de parte dos seus conhecimentos e experiências em laboratório.

À Professora Doutora Elsa Ramalhosa pela cedência de vários equipamentos e pelos conhecimentos transmitidos, os quais muito contribuíram para a realização da parte experimental deste trabalho. Às alunas de doutoramento Luana Fernandes e Teresa Delgado pela prestação de auxílio no laboratório, transmissão de conhecimentos e pelo incentivo e simpatia.

Ao Engenheiro Sá Morais pela disponibilidade e contribuição na realização das análises de cromatografia gasosa e conhecimentos transmitidos.

À Engenheira Ana Pinto pela disponibilidade e pelo seu apoio na obtenção das análises de proteína.

Agradeço também à técnica de laboratório, Céu Fidalgo, pelo seu incentivo, boa disposição e auxílio constante no laboratório de Agro-Indústrias.

E por fim, e não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio, pelo incentivo e compreensão.

RESUMO

As plantas aromáticas e medicinais revelam uma grande importância na atualidade para aplicação nas mais diversas áreas devido, principalmente, às suas propriedades biológicas mas também como fonte de nutrientes. A *Calamintha baetica* é uma planta aromática da família Lamiaceae que em tempos era usada tanto para a cura de algumas doenças como para temperos em certas receitas culinárias.

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar a folha e o caule da espécie *Calamintha baetica* Boiss et Heldr no que respeita à sua composição química e às suas propriedades antioxidantes. Para o efeito, quantificaram-se os seguintes parâmetros: humidade; cinzas; gordura; proteínas; hidratos de carbono e valor energético e também se estudou o perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC/FID).

Foram usados vários solventes para avaliar a extratibilidade de compostos antioxidantes, entre eles, acetato de etilo, acetona e metanol à temperatura ambiente e a água à temperatura de extração de 50 °C. Para avaliar a atividade antioxidante dos diferentes extratos recorreram-se aos ensaios do efeito bloqueador de radicais livres de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), determinação do poder redutor e avaliação da capacidade redutora total através do método *Folin-Ciocalteu*.

Da análise quantitativa em nutrientes, a amostra de folha de *Calamintha baetica* revelou uma maior percentagem em proteína, com 11,81 % e o caule em hidratos de carbono, com 20,54 %. No que respeita a teores em gordura, a amostra de folha evidenciou valores ligeiramente superiores (3,30 %) aos do caule (1,13 %). Energeticamente apresentaram valores semelhantes, aproximadamente 111 kcal/100g de amostra. A análise por cromatografia gasosa permitiu identificar três ácidos gordos maioritários, entre os quais os polinsaturados α -linolénico, com 69,11 % e 44,93 % e o linoleico com 10,03 % e 23,83 % e ainda o saturado palmítico, com 11,55 % e 17,09 % para a amostra de folha e caule, respetivamente.

O rendimento de extração obtido, para as amostras da planta *Calamintha baetica*, foi superior para o solvente mais polar, a água, (21,11 a 34,75 %), seguido do metanol (8,48 a 15,63 %) e com rendimentos mais baixos e próximos entre si, os solventes menos polares, o acetato de etilo e acetona (1,53 a 4,19 % para o acetato de etilo e 1,41 a 5,04 % para

a acetona), apresentando a amostra de folha maiores rendimentos relativamente à amostra de caule.

A atividade antioxidante analisada nos diferentes extratos foi superior para o extrato metanólico obtido para a amostra de folha, traduzindo-se em valores de EC_{50} mais baixos (0,24 mg/mL de efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e 0,52 mg/mL para o poder redutor) e revelaram uma capacidade redutora total também superior, com cerca de 54 mg EAG/g_{extrato}, quando comparada com o extrato obtido para a amostra de caule. Neste, para além dos valores de EC_{50} se revelarem superiores ao extrato de folha, não variaram muito entre os dois métodos.

Os extratos aquosos não apresentaram diferenças entre as amostras de folha e caule para os métodos do efeito bloqueador de radicais DPPH e poder redutor e também entre as respetivas amostras. Os extratos de acetato de etilo e acetona permitiram evidenciar que os respetivos solventes não se revelam bons agentes na extração de compostos antioxidantes na folha e caule de *Calamintha baetica*, revelando baixas concentrações em compostos fenólicos extraídos, ou seja revelaram uma baixa capacidade redutora total.

O estudo permitiu concluir que, caso se pretenda rentabilizar compostos com propriedades antioxidantes dever-se-á ter em conta o tipo de solvente, as condições de extração e por último as características químicas da amostra, que podem influenciar na disponibilidade de compostos para a análise. Assim, no presente estudo, o metanol apresentou-se como o solvente mais indicado para a extratabilidade de compostos antioxidantes na planta *Calamintha baetica*, sendo a folha aquela que evidenciou maiores potencialidades antioxidantes que o caule.

Palavras-chave: *Calamintha baetica*, composição química, ácidos gordos, solventes de extração, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Currently, a wide range of applications in various areas of aromatic and medicinal plants are mainly due to their biological properties and also as an important source of nutrients. *Calamintha baetica* is an aromatic plant of the Lamiaceae family which has been used to cure several diseases and also applied as spices in some dishes.

The aim of this work is to characterize the leaf and stem of *Calamintha baetica* Boiss et Heldr species concerning their chemical composition and antioxidant properties. It was determined moisture; ash; fat and protein and the fatty acids profile was quantified by gas chromatography (GC / FID). Various solvents were used to evaluate the extractability of antioxidant compounds, including ethyl acetate, acetone and methanol at room temperature, and water at 50 °C. The antioxidant activity of the extracts were evaluated by the blocking effect of the free radicals of DPPH, reducing power and total reducing capacity by *Folin-Ciocalteu* method.

Leaf samples showed the highest percentage of protein, with 11.81 % and the stem sample the highest content in carbohydrates, with 20.54 %. Fat content showed to be slightly higher in the leaf samples (3.30 %) than in the stem (1.13 %). Energy content presented similar values in both samples, approximately 111 kcal/100g of sample. The fatty acids profile showed the presence of three main acids, including the polyunsaturated α -linolenic acid, 69.11 % and 44.93 %; followed by the linoleic acid, with 10.03 % and 23.83 % and the saturated palmitic acid, with 11.55 % and 17.09 %, respectively, for the leaf and stem samples of the plant *Calamintha baetica*.

The extraction yield obtained was higher for the more polar solvent, water (21.11 to 34.75 %), followed by methanol (from 8.48 to 15.63 %) and lower yields and closely together were the less polar solvents, ethyl acetate and acetone (1.53 to 4.19 % for ethyl acetate and from 1.41 to 5.04 % in acetone). Higher yields were obtained for the leaf samples.

Analyzing the antioxidant activity of all extracts, the most promising one was the methanol extract of the leaf samples, with the lowest EC₅₀ values (0.24 mg/mL for the blocking effect of DPPH and 0.52 mg/mL for the reducing power), and a high reducing capacity, with about 54 mg GAE/g_{extract}. Stem samples presented similar results for both methods and with highest EC₅₀ values than those presented by the leaf samples.

Aqueous extracts revealed no differences between leaf and stem samples for the blocking effect of DPPH and reducing power. Ethyl acetate and acetone extracts showed that they are not good solvents for the extraction of antioxidant compounds in the leaf and stem of *Calamintha baetica*, revealing low concentrations of phenolic compounds.

Taking into consideration the results of this study, we can conclude that for the search of compounds with antioxidant properties it should be taken into account the type of solvent, the extraction conditions and the chemical characteristics of the sample, which may influence the availability of compounds for analysis. Thus, methanol proved to be the most indicated for the extractability of antioxidant compounds in *Calamintha baetica*, revealing leaf an highest antioxidant potential than stem.

Keywords: *Calamintha baetica*, chemical composition, fatty acids, solvent extraction, antioxidant activity.

ABREVIATURAS

DPPH – 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo

DPPH[•] – Radical de DPPH

EAG – Equivalentes de ácido gálico

EQ – Equivalentes de quercetina

EC₂₀ – Concentração de extrato a que corresponde 20 % de inibição

EC₅₀ – Concentração de extrato a que corresponde 50 % de inibição

FID – Detetor de ionização de chama (*Flame Ionization Detector*)

GC – Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)

GC/FID – Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (*Flame Ionization Detector*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão (*High Performance Liquid Chromatography*)

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*)

min – Minuto

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados (*MonUnsaturated Fatty Acids*)

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados (*PolyUnsaturated Fatty Acids*)

SFA – Ácidos gordos saturados (*Saturated Fatty Acids*)

rpm – Rotações por minuto

TCA – Ácido tricloroacético

UV-VIS – Ultravioleta e visível

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais.....	3
1.2. Descrição da espécie	4
1.3. Compostos bioativos presentes em <i>Calamintha</i>	5
1.4. Propriedades biológicas	7
1.4.1. Antioxidantes	8
1.5. Caracterização física dos solventes.....	10
1.6. Objetivos	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Amostras	15
2.1.1. Preparação das amostras	15
2.2. Caracterização química.....	15
2.2.1. Determinação do teor em humidade e cinzas	16
2.2.2. Determinação do teor em gordura.....	17
2.2.2.1. Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa	19
2.2.3. Determinação do teor em proteína pelo método de <i>Kjeldahl</i>	20
2.2.4. Cálculo do teor em hidratos de carbono e valor energético.....	22
2.3. Atividade antioxidante	22
2.3.1. Preparação dos extratos.....	22
2.3.1.1. Rendimento de extração.....	24

2.3.2.	Determinação da atividade antioxidante	24
2.3.2.1.	Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH.....	24
2.3.2.2.	Determinação do poder redutor.....	26
2.3.2.3.	Avaliação da capacidade redutora total pelo método <i>Folin-Ciocalteu</i>	27
3.	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1.	Composição química.....	31
3.1.1.	Perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa	33
3.2.	Atividade antioxidante	37
3.2.1.	Rendimento de extração.....	37
3.2.2.	Determinação da atividade antioxidante	39
3.2.2.1.	Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH.....	40
3.2.2.2.	Determinação do poder redutor.....	45
3.2.2.3.	Avaliação da capacidade redutora total	52
4.	CONCLUSÃO	59
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O nome do género *Calamintha* deriva do grego *Kalos*, que significa ser superior e excelência, baseado na antiga crença do poder em afastar o terrível rei lendário das serpentes cujo olhar era fatal. O género *Calamintha* pertence à família Lamiaceae, contendo várias espécies, subespécies, variedades, formas e cultivares [1].

A família Lamiaceae é conhecida internacionalmente como a família das mentas ou hortelãs. Esta família pertence a um grupo de plantas com flor onde se incluem 7534 espécies catalogadas (*World check list*) em mais de 200 géneros [2, 3]. Podem ser do tipo herbáceas, arbustos semilenhosos largamente difundidos pelo mundo inteiro, mas com particular incidência na região do Médio Oriente. São sobretudo espécies aromáticas, produtoras de óleos essenciais.

Em Portugal é recorrente o uso de vários géneros dentro da família Lamiaceae, estando intrinsecamente ligados aos nossos hábitos e costumes. São geralmente usados pelas suas propriedades aromáticas, condimentares, ornamentais ou medicinais, tendo como exemplos a *Salvia* (salva), *Ocimum* (manjerição), *Origanum* (orégão), *Thymus* (tomilho), *Mentha* (hortelã), *Lavandula* (alfazema e rosmaninho), *Romarinus* (alecrim), *Melissa* (erva cidreira) e *Calamintha* (erva da azeitona).

A espécie da planta *Calamintha baetica* Boiss et Heldr, também designada *Calamintha nepeta* (L.) Savi; *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball ou *Calamintha glandulosa* (Req.) Bentham, é do tipo gramínea, perene, pertencente à família Lamiaceae. Está largamente distribuída pela região do Mediterrâneo e é considerada uma espécie colonizadora, principalmente de prados secos; de berma dos caminhos rurais, de terrenos selvagens na orla dos pinhais e azinhais. As folhas produzem um aroma muito agradável, entre hortelã e orégãos, sendo muito apreciadas para temperos na cozinha mediterrânea e para fazer infusões [1].

O interesse, por parte de cientistas e da sociedade, no estudo em compostos bioativos em plantas e descoberta de novos compostos para aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentares fez crescer a investigação nesta área e na utilização dos diversos recursos biológicos. Isto é importante na medida em que as plantas são um recurso renovável de compostos com propriedades bioativas, com uma larga biodiversidade de perfis químicos [4]. Para além disso permitem um tratamento mais saudável e em alguns casos mais barato que os compostos de origem sintética [5]. Mais ainda, estudos revelaram que o consu-

mo de plantas contendo compostos bioativos tem sido associado a uma diminuição na ocorrência de doenças nos humanos e uma menor taxa de mortalidade [4].

Um exemplo é o interesse na pesquisa em compostos fenólicos na última década devido às suas capacidades de bloquearem radicais, que estão associados a inúmeros problemas de saúde humana [6]. Muitas plantas aromáticas contêm uma grande variedade de compostos antioxidantes, como os polifenóis, os quais contribuem para captar ou neutralizar radicais, evitar a formação de radicais livres de oxigênio e de azoto ou de peróxidos instáveis, estando associados à prevenção de stress oxidativo, menores riscos de alguns tipos de cancro e doenças coronárias, na modulação da atividade de algumas enzimas específicas, bem como no seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório [7].

1.2. Descrição da espécie

A *Calamintha baetica*, de nome científico, tem vários nomes comuns que foi ganhando ao longo dos tempos. Em alguns lugares é usada para temperar azeitona e talvez por isso seja também conhecida por “erva da azeitona”, mas também é designada por nêveda ou calaminta.

No que respeita a classificação científico-botânica da planta *Calamintha baetica* Boiss et Heldr, esta pertence à subespécie *glandulosa* (Req.) Gams, à família Lamiaceae, ordem Lamiales, classe Magnoliopsida, subclasse Lamiidae e finalmente à divisão Spermatophyta, segundo informação fornecida pela equipa do Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) [8, 9].

A sua fisionomia é bastante característica com o tipo Caméfito. É uma planta anual ou perene, aromática, lenhosa ou herbácea e que se pode reproduzir através de estolhos e se ressemeia com facilidade [10]. O caule de secção quadrangular, geralmente lenhoso com numerosos pêlos crespos pequenos, forma um arbusto baixo e largo, com uma tendência decumbente e bastante ramificado e pode atingir os 20 a 90 cm de comprimento (**figura 1**) [8].

As folhas encontram-se opostas umas em relação às outras, são peludas e glandulosas com contorno oval e com margens levemente dentadas (**figura 2**). Podem apresentar umas manchas esbranquiçadas características desta espécie, sendo mais frequentes nas folhas inferiores [8, 10].

A planta floresce a partir do mês de julho e as suas flores atraem muitos insetos, principalmente abelhas, que aproveitam o néctar. A corola da flor é rosada ou púrpura. Esta é alongada e estreita, caracterizando-se por uma disposição em panícula, nas axilas das folhas. Distribuem-se em cimeiras de 3 a 9 flores e pedúnculo curto (**figura 3**). O cálice tubular é formado por 5 sépalas unidas formando um tubo de 13 nervuras peludas e 2 lábios: lábio superior com 3 dentes que estão virados para cima, e lábio inferior com 2 dentes, mais compridos e ciliados. O limbo da corola é geralmente bilabiado; lábio superior com dois lóbulos e lábio inferior com três lóbulos e tubo anelado e piloso. Cada flor possui órgãos reprodutores femininos e masculinos, ambos funcionais, zigomórficas, raramente suactimórficas, brateoladas ou não. O androceu consta de quatro estames curvados e convergentes. O gineceu é constituído por um ovário dividido em quatro partes, que vão dar origem ao fruto. O fruto é de cor acastanhado e tetraédrico, formado por 4 pequenas nozes, cada uma com sua semente. Servem de alimento a pequenas aves granívoras [1, 8, 10].



Figura 1
Caule de *Calamintha baetica*
www.flora-on.pt



Figura 2
Folha de *Calamintha baetica*
www.flora-on.pt



Figura 3
Flor de *Calamintha baetica*
www.flora-on.pt

1.3. Compostos bioativos presentes em *Calamintha*

Foram feitos inúmeros estudos acerca da espécie *Calamintha baetica* Boiss et Heldr (também designada por *Calamintha nepeta* ssp. *glandulosa*) que permitiram identificar compostos químicos desta espécie.

Baldovinic et al. em 2000 [11] analisaram a composição química de 40 amostras dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de *Calamintha nepeta*, recolhidas em várias localidades da região da Córsega, França, recorrendo as técnicas de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C . O estudo permitiu analisar a variabilidade na composição química ao longo do período de vegetação da planta em diferentes regiões na zona do Mediterrâneo. As análises efetuadas permitiram identificar os seguintes compostos: os monoterpenos oxigenados como maioritários, mentona, pulegona, óxido de piperitona e óxido de piperitenona; uma menor quantidade dos monoterpenos α -pineno, β -pineno, mirceno e limoneno. Foram ainda detetados em baixas quantidades os sesquiterpenos, β -cariofileno e germacreno-D e por último, apenas detetado por RMN, em quantidades muito baixas, o 3-octanol. Verificou-se que existe uma variabilidade na composição química durante o período de floração, a qual a pulegona se apresenta como composto maioritário, e com o seu máximo no mês de julho (início da época de floração) e vai diminuindo até dezembro (final do período de floração). Por seu lado, a mentona apresenta um comportamento contrário, até igualar a sua concentração à da pulegona no fim de vida da planta.

Em 2001, Coudis & Tzakou [12] analisaram os óleos essenciais desta espécie com características de hortelã por GS/MS, o que permitiu a identificação e quantificação dos seguintes compostos voláteis da família dos monoterpenos: pulegona (41,0 %); mentona (32 %); piperitona (7,3 %) e piperitenona (7,0 %), tal como no estudo feito em 2000 por Baldovinic et al. [11].

Posteriormente, Yasar et al. em 2011 [13] estudaram os óleos essenciais das partes aéreas da *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (req.) P. W. Ball, colhida nas margens do Mediterrâneo na Turquia. Os extratos obtidos por hidrodestilação e analisados por GC/MS revelaram como principais componentes, o óxido de piperitona, o óxido de piperitenona e a isomentona, pertencentes aos monoterpenos oxigenados.

Pesquisas realizadas em 2012, por Cávar et al. (2012) [6], ao perfil químico desta espécie de *Calamintha* colhida na Croácia, permitiram identificar para além dos compostos já referidos anteriormente também a presença de β -pineno-3-octanol e limoneno, detetados por GC/MS. Foram também identificados os ácidos fenólicos: ácido gálico; ácido clorogénico e ácido rosmarínico pela técnica de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). Esta pesquisa foi realizada em amostras de óleos essenciais de *Calamintha nepeta glandulosa* obtidas por hidrodestilação e extração por *Soxhlet*.

Araniti et al. em 2013 [14] identificaram em extratos metanólicos mais um composto em quantidades relevantes, a vitamina E (α -tocoferol). Mais, análises feitas por HPLC detetaram a presença de ácidos fenólicos tais como os ácidos: gálico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico e ferúlico. Os autores revelaram que a presença dos terpenóides e dos compostos fenólicos podem potencializar a sua utilização como herbicidas naturais e estarem envolvidos no potencial alelopático sobre a germinação e o comprimento radicular da alface. As amostras foram colhidas no sul da Itália (Calábria) em junho durante o período de floração.

Plantas deste género (*Calamintha*) são conhecidas por apresentarem grande variação na composição de compostos voláteis, mas na generalidade os principais compostos presentes nos óleos essenciais são: os óxidos de piperitona e piperitenona; a pulegona e a mentona, sendo este último o responsável pelo sabor e odor refrescante na hortelã [11, 15].

1.4. Propriedades biológicas

As plantas têm revelado um elevado potencial económico, dadas as várias áreas de aplicação das mesmas, tais como na cosmética, perfumaria, alimentação e indústria farmacêutica.

A espécie de *Calamintha baetica* era usada em tempos, pela medicina popular, para tratamentos de doenças, nomeadamente problemas respiratórios e de estômago. Pesquisas feitas revelaram que durante o período de floração, as folhas secas contêm elevados níveis de flavonoides, compostos com reconhecida importância no tratamento destes distúrbios [16]. O seu uso decaiu nos tempos modernos pela substituição por compostos sintéticos, ainda assim há quem recorra à planta para curar problemas digestivos, gripes e constipações. É de referir que cerca de 80 % da população dos países em desenvolvimento recorrem a remédios naturais, como primeiro tratamento de doenças [4].

Estudos feitos em várias plantas com propriedades medicinais, incluindo a *Calamintha baetica*, têm revelado o grande potencial desta planta como agente antibacteriano e antifúngico [17-19]. É conhecido que os óleos essenciais ricos em terpenóides são os responsáveis pela atividade antimicrobiana desta planta [4].

Em 2002 Kitic et al. [19] estudaram os óleos essenciais, obtidos por hidrodestilação, da espécie de *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball, e detetaram

atividade antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Posteriormente em 2009, Sarac & Ugur [20] pesquisaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação em várias plantas incluindo a espécie de *Calamintha nepeta* (L.) Savi spp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball. As plantas foram colhidas em diferentes localidades da província de Mulga na Turquia. A atividade foi determinada usando o método antidiagrama. A espécie de *Calamintha* demonstrou eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que incluem estirpes resistentes a múltiplos antibióticos, exceto as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Pseudomonas fluorescens* UM 87. Foram também muito eficazes contra o fungo *Candida albicans*.

Estudos feitos em plantas da região do Alentejo, Portugal, provaram que esta espécie de *Calamintha* apresentou importantes propriedades antimicrobianas, nomeadamente dos óleos em época de floração (setembro), a bactérias e leveduras patogénicas e contra fungos filamentosos contaminantes de alimentos e culturas. Os ensaios foram feitos com o método de difusão em meio sólido (método de difusão em agar) [21].

Pesquisas feitas em extratos aquosos de *Calaminta officinalis*, evidenciaram que esta planta também pode ser um potencial agente natural para o controlo de diabetes. Os extratos foram fracionados numa coluna de cromatografia de sílica gel obtendo-se dois ácidos hidroxicinâmicos conhecidos, o ácido rosmarínico e o ácido cafeico que revelaram uma atividade potente no controlo de diabetes, superior ao controlo positivo glibenclamida, que é um medicamento usado no tratamento da diabetes [22].

Tal como referido anteriormente, a *Calamintha baetica* evidencia igualmente um elevado potencial alelopático e pode funcionar como um herbicida natural [14].

1.4.1. Antioxidantes

Em bioquímica e medicina os antioxidantes são substâncias orgânicas capazes de agir contra danos provocados pela oxidação em tecidos animais [23].

As espécies reativas de oxigénio e azoto formam-se no organismo humano durante o metabolismo celular e quando em determinadas concentrações podem levar a um desequilíbrio denominado de stress oxidativo. Nestas condições, o organismo desencadeia mecanismos de defesa que envolvem o retardamento ou inibição da formação de substratos oxidáveis ou limitam as reações em cadeia. Podem ainda atuar como substâncias captado-

ras destas espécies reativas e como agentes quelantes, nomeadamente de iões metálicos [24]. Desta forma, o nosso organismo dispõe de mecanismos próprios de defesa intracelular, nomeadamente por via enzimática (superóxido dismutase, catalase ou glutaciona peroxidase e glutaciona redutase) ou não enzimática (glutaciona, ácido úrico, coenzima Q) para o proteger contra níveis excessivos destas espécies reativas. Ainda assim pode ser feita uma proteção acrescida com a adição exógena de compostos naturais com propriedades protetoras tais como: as vitaminas (A, E, β -caroteno), minerais (selénio, zinco, magnésio) ou proteínas (transferrina, albumina, bilirrubina, ceruloplasmina), ácido lipóico, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides (ex. apigenina e luteolina), entre outros. Esses compostos naturais, os chamados fitoquímicos, estão presentes maioritariamente em vegetais, cereais e especiarias, provenientes das diferentes partes das plantas entre as quais frutos, sementes, folhas, caule e raízes [7].

Deste modo, os antioxidantes têm uma importância acrescida na nossa dieta como possíveis agentes protetores contra mecanismos provocadores de danos oxidativos no organismo.

Como já foi referido, vários são os compostos fenólicos presentes na espécie de *Calamintha baetica*. Os compostos fenólicos podem ter a função de pigmento responsável pela aparência colorida dos alimentos ou podem ser produtos de metabolismo secundário, normalmente derivados de reações de defesa das plantas contra as agressões do meio ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua capacidade em doar hidrogénio ou eletrões, mas também em virtude de formarem radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lípidos [25]. Além disso, em clima mediterrâneo as plantas estão sujeitas a temperaturas elevadas e a demasiada exposição solar. Nestas condições, os compostos fenólicos são essenciais, pois oferecem resistência à foto-oxidação pelas radiações solares, uma vez que estes compostos têm grande capacidade de absorverem na região do ultravioleta e visível (UV-VIS), evitando assim o envelhecimento prematuro da pele [5].

Cávar et al. (2012) [6] para além da composição química da espécie *Calamintha nepeta*, analisaram quantitativamente os compostos fenólicos e avaliaram a atividade antioxidante dos constituintes voláteis obtidos com diferentes técnicas. A metodologia usada para obtenção dos extratos foi a extração por *Soxhlet*, recorrendo a diferentes solventes. Este estudo revelou a presença em fenóis totais entre 30 a 108 mg EAG/g de extrato e flavonoides totais entre 9 a 14 mg EQ/ g de extrato. Mais ainda, os resultados obtidos de EC₅₀ (concentração de amostra que fornece 50 % de atividade antioxidante) variam entre

1 e 23 mg/mL para o método do efeito bloqueador dos radicais de DPPH, e entre 4 e 62 mg/mL para a determinação do poder redutor.

Para avaliar o potencial dos compostos em termos de atividade antioxidante são usadas várias metodologias em laboratório. As mais recorrentes são o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazilo), a atividade sequestrante do radical hidroxilo, o efeito bloqueador do íon positivo do radical ABTS [ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], o efeito na descoloração de β -caroteno, o efeito do poder redutor e ainda capacidade redutora total pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

Neste estudo foram usados somente três métodos. O ensaio do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH que permite avaliar a capacidade para sequestrar radicais livres de DPPH. O ensaio consiste em bloquear o radical de DPPH, tornando-o estável ou não oxidável pela transferência de um átomo de hidrogénio pelo composto antioxidante. O ensaio do poder redutor, em que o mecanismo consiste na transferência de eletrões permitindo reduzir o ferro, pelo antioxidante, (complexo Fe^{3+} /ferricianeto) a uma forma ferrosa (Fe^{2+}). E por último, o método de *Folin-Ciocalteu*, que se baseia na transferência de eletrões e permite quantificar a capacidade redutora total a qual reflete a quantidade de fenóis totais presentes na amostra [26].

No capítulo seguinte (material e métodos) explicar-se-ão com mais pormenor os mecanismos em que assentam estas metodologias.

1.5. Caracterização física dos solventes

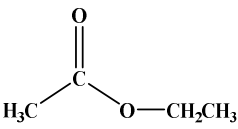
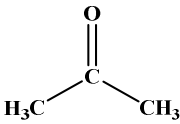
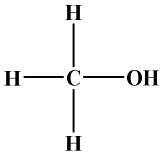
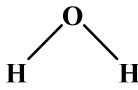
Os solventes dividem-se em polares e não polares, consoante as suas moléculas apresentem ou não momento dipolar diferente de zero, respetivamente. Exemplos de solventes apolares são os hidrocarbonetos alifáticos tal como o tetracloreto de carbono e compostos aromáticos tal como o benzeno. Os solventes polares dividem-se ainda em polares próticos e apróticos. Os polares próticos têm pelo menos um átomo de hidrogénio ligado a um átomo eletronegativo (por exemplo o oxigénio), podendo haver formação de ligações por pontes de hidrogénio. Quando não existe átomo de hidrogénio o solvente é polar aprótico [27].

Muitos solventes são usados nas extrações de diversos produtos de origem vegetal e de subprodutos. O tipo de solvente bem como as condições experimentais afetam o rendimento de extração e a composição dos extratos obtidos.

De entre os solventes usados para este estudo a água e o metanol são solventes polares próticos, sendo mais polares que os solventes acetato de etilo e acetona que são apróticos. Uma forma de medir a intensidade da polaridade dos diferentes solventes é através de uma grandeza física, a constante dielétrica (relacionada com as forças atrativas entre iões de carga oposta), e quanto maior for esta constante, mais polar é o solvente [27].

Na **tabela 1** estão apresentadas algumas propriedades físicas dos solventes usados no estudo da planta *Calamintha baetica* [28], incluindo a constante dielétrica. Esta constante indica a água como solvente mais polar (com 80,10 a 20 °C), e o acetato de etilo o menos polar (com 6,08 a 20 °C). Assim, tendo em conta as constantes dielétricas apresentadas na tabela 1, os solventes assumem a seguinte ordem de polaridade crescente: acetato de etilo; acetona; metanol e água.

Tabela 1: Características físicas dos solventes: acetato de etilo; acetona; metanol e água

Propriedades Físicas	Solventes de extração			
	Acetato de etilo	Acetona	Metanol	Água
Fórmula química	CH ₃ COOC ₂ H ₅	CH ₃ COCH ₃	CH ₃ OH	H ₂ O
Estrutura				
Massa Molar	88,11 g/mol	58,08 g/mol	32,04 g/mol	18,02 g/mol
Densidade	0,902 g/mL a 25 °C	0,791 g/mL a 25°C	0,791 g/mL a25°C	1,00 g/mL a 3,98°C
Ponto de ebulição	76,6 - 77,5 °C	56 °C	64,7 °C	100 °C
Ponto de fusão	-84 °C	-94 °C	- 98 °C	0,0 °C
Ponto de inflamação	-3,3 °C	-17,2 °C	11,1 °C	
Viscosidade	0,423 a 25 °C	0,306 a 25 °C	0,544 a 25 °C	1,000 a 20 °C
Constante dielétrica	6,08 a 20 °C	21,01 a 20 °C	33,00 a 20 °C	80,10 a 20 °C
Momento dipolar	1,780	2,880	1,700	1,82

A técnica usada para extrair os compostos da planta *Calamintha baetica* é a extração por solvente. Esta técnica baseia-se na afinidade (solubilidade) que os compostos têm com o solvente usado. E, à partida, os compostos orgânicos têm geralmente mais afinidade com solventes orgânicos do que com a água, e por sua vez a água tem mais afinidade

para sais inorgânicos mas, devido à possibilidade desta formar pontes de hidrogénio com compostos orgânicos (álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres e amimas), estes são parcialmente solúveis nela [27].

Neste estudo, pretende-se não só extrair compostos como também analisá-los em termos da sua atividade antioxidante. Para o efeito, os diferentes solventes usados nas extrações vão ter maior ou menor afinidade com o conteúdo a extrair [29] e o rendimento obtido depende não só do solvente e da sua polaridade, mas também do tempo e temperatura, como também da composição química e características físicas da amostra [30].

1.6. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal o estudo de uma planta aromática de nome científico *Calamintha baetica* Boiss et Heldr.

Neste estudo pretende-se determinar a composição química nas diferentes partes da planta, folha e caule. Para o efeito, quantificou-se o teor em humidade, cinzas, gordura, proteína e calculou-se o teor em hidratos de carbono e valor energético. Também se procedeu à caracterização da gordura pela determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC/FID).

Pretende-se também avaliar a extratibilidade de compostos antioxidantes na folha e caule da planta *Calamintha baetica*, recorrendo a vários solventes. Para o efeito utilizaram-se os solventes orgânicos acetato de etilo, acetona e metanol à temperatura ambiente, e a água à temperatura de extração de 50 °C.

Para a determinação da atividade antioxidante das diferentes partes da planta, foram usados vários métodos tais como: o efeito bloqueador de radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), o poder redutor e capacidade redutora total pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

A planta *Calamintha baetica* Boiss et Heldr é uma planta aromática selvagem, que cresce e floresce em muitos lugares sem qualquer intervenção humana. A maior parte da planta aromática, obtida para este estudo, foi colhida na região de Bragança num terreno pertencente ao Instituto Politécnico de Bragança. A colheita foi feita, principalmente, entre os meses de outubro e dezembro de 2013, época de temperaturas baixas, de clima frio e agreste, com as características geadas matinais da região de Trás-os-Montes, e uma pequena parte no mês de maio, época de temperaturas moderadas.

2.1.1. Preparação das amostras

A planta *Calamintha baetica* foi colhida e separada nas suas diferentes partes: caule; folha; flor e fruto. As amostras destinadas à determinação do teor em humidade e cinzas foram usadas frescas. Para os restantes ensaios, estas foram conservadas a uma temperatura de -4 °C até se proceder à desidratação das mesmas, por liofilização. Após liofilização, foram guardadas no escuro, para manter as suas características biológicas, até serem posteriormente utilizadas. Na altura de serem utilizadas as amostras de folha e caule foram finamente trituradas, em separado, numa trituradora “Moulinex”.

Inicialmente previa-se fazer o estudo com todas as partes da planta, mas dada a escassez do fruto e da flor, apenas se debruçou sobre a folha e o caule da planta *Calaminta baetica*.

2.2. Caracterização química

Para a determinação da composição química das amostras de folha e caule de *Calaminta baetica* procedeu-se à quantificação dos teores em humidade, cinzas, gordura e proteínas, bem como ao cálculo do teor em hidratos de carbono e do valor energético, utilizando os procedimentos AOAC (1999). Os hidratos de carbono e valor energético foram obtidos a partir do cálculo das análises feitas à restante composição química. A

gordura foi sujeita à análise, por GC/FID, para determinação do perfil de ácidos gordos das amostras.

2.2.1. Determinação do teor em humidade e cinzas

A humidade é o principal fator para que ocorram processos microbiológicos como o desenvolvimento de bactérias, fungos e leveduras. A determinação do teor em humidade de um alimento ou planta está relacionada com a sua qualidade, estabilidade e composição, podendo deste modo afetar as características do produto.

O teor de humidade foi determinado segundo o método AOAC 930.04 (1999) [31]. Para o efeito, pesou-se 1 g de amostra, numa balança de precisão analítica (*Kern ACJ/ACS*), para um cadinho, previamente calcinado e pesado. Seguidamente foi colocado na estufa a 105 °C (*Memmert; UNB 100-500*) até obter um peso constante. Os resultados foram obtidos pela razão entre a massa de água da amostra (diferença da massa inicial e final) e a massa inicial da amostra e são apresentados em termos de percentagem de humidade, segundo a expressão:

$$\text{Teor em humidade (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

onde, m_i é a massa inicial de amostra e m_f é a massa final de amostra após ida à estufa.

A cinza de uma amostra quer seja alimentar ou não, é todo o resíduo inorgânico que resta após a queima da matéria orgânica. Os resíduos inorgânicos da cinza são constituídos por grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg; pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn e Zn e resquícios de Ar, F, I e outros elementos ainda. A análise das cinzas fornece-nos uma informação prévia sobre o valor nutricional de um alimento e é o primeiro passo para a análise deste.

A determinação do teor em cinza foi efetuada segundo o método AOAC 930.05 (1999) [32], o qual define cinza total como o resíduo da incineração da amostra à temperatura de 550 °C, expresso em percentagem de massa total. Assim pesou-se, para um cadinho previamente calcinado e pesado, cerca de 1 g de amostra numa balança de precisão analítica (*Kern ACJ/ACS*). De seguida introduziu-se o cadinho na mufla (*Lenton Thermal designs limited; ECF12/22*), deixando incinerar a amostra durante a noite. Posteriormente retirou-

se o cadinho da mufla, o qual depois de arrefecido em exsiccador, foi pesado (**imagem 1 e 2**).



Imagem 1: Cinzas resultantes da incineração da amostra de folha.



Imagem 2: Cinzas resultantes da incineração da amostra de caule.

Os resultados foram apresentados em percentagem de cinzas total, segundo a expressão:

$$\text{Teor em cinzas (\%)} = \frac{mf}{mi} \times 100$$

onde, mi é a massa inicial de amostra e mf é a massa final de amostra após ida à mufla.

A determinação dos teores em humidade e cinzas foi feita em duplicado para a amostra de folha e caule. Os resultados são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

2.2.2. Determinação do teor em gordura

O método de *Soxhlet* é muito usado para quantificação do teor em gordura em alimentos tanto de origem vegetal como de origem animal. Este método foi inventado em 1879 por *Franz Von Soxhlet*, especialmente concebido para extrair compostos insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como por exemplo o álcool. Este extrai os lípidos, a partir de um material sólido consistindo num processo contínuo. Revela-se bastante útil no caso em que o composto puro é parcialmente solúvel no solvente e as impurezas não.

Para a determinação do teor em gordura nas amostras de folha e caule de *Calaminta baetica* foram pesadas rigorosamente 2,5 g de amostra liofilizada numa balança de precisão analítica (*Kern ACJ/ACS*). Preparou-se o cartucho de papel de filtro com as dimensões ideais (aproximadamente 20 cm x 20 cm) para que possa encaixar no equipamento

de *Soxhlet*. No interior do cartucho foi colocada a amostra coberta com algodão, para não ocorrerem perdas de material por dispersão através do papel de filtro. O cartucho foi colocado no extrator de *Soxhlet* (**imagem 3**) e o balão de fundo redondo foi colocado na sua extremidade (**imagem 4**). Este foi previamente seco, pesado e identificado. O solvente usado foi o éter de petróleo e foi colocado no balão de fundo redondo acoplado a um condensador. A **imagem 5** mostra todo o equipamento de *Soxhlet* (*P Selecta*) montado, segundo AOAC 920.85 (1999) [33].



Imagem 3: Cartuchos de papel de filtro dentro do tubo extrator do equipamento de *Soxhlet*.



Imagem 4: Balões de fundo redondo com éter de petróleo na base de ebulição (40°C) do equipamento de *Soxhlet*.



Imagem 5: Equipamento de *Soxhlet* completo, constituído por: balões de fundo redondo sobre a manta de aquecimento; tubos extratores com os cartuchos acoplados a condensadores.

Deixou-se decorrer um tempo mínimo de extração de 24h. Após esse tempo, o solvente foi evaporado, e o teor em gordura foi determinado após secagem na estufa a aproxi-

madamente 100 °C até peso constante. Os resultados foram apresentados em termos de percentagem de gordura, segundo a expressão:

$$\text{Teor em gordura (\%)} = \frac{mf}{mi} \times 100$$

onde, mi é a massa inicial de amostra e mf é a massa de gordura obtida no balão de fundo redondo.

A análise foi feita em duplicado para as amostras da folha e caule e os resultados são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

2.2.2.1. Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa

A determinação do perfil de ácidos gordos das amostras foi feita após a extração da gordura pelo método de *Soxhlet*.

Recorreu-se à análise por cromatografia gasosa acoplada a um sistema detetor de ionização de chama (GC/FID). Esta técnica, para a sua realização, é necessário que a amostra sofra previamente um processo de transesterificação dos ácidos gordos para se tornarem voláteis. Para o efeito, adicionou-se 2 mL de *n*-heptano ao resíduo de gordura, resultante do método anterior, e 200 µL de hidróxido de potássio 2 M em metanol. Transferiu-se todo o conteúdo de amostra para um tubo de centrífuga. Este foi a centrifugar (*Labofuge 300; Heraeus*) a 3000 rpm durante 2 minutos. Com uma seringa, contendo um filtro de nylon (0,2 µm), retirou-se 1 mL do sobrenadante e injetou-se numa porta amostras com septo.

O procedimento para a identificação dos ácidos gordos (ésteres metílicos) foi desenvolvido por Mariutti et al. (2011) [34], com as alterações necessárias. Deste modo, o perfil de ácidos gordos foi determinado usando um cromatógrafo gasoso (*Dani*; modelo *GC1000*) equipado com um injetor split-splitless (1:40) a 250 °C; uma coluna capilar de sílica fundida (*Macherey–Nagal*, modelo *Optima 225*; 30 m x 0,32 mm, 0,25 µm de espessura da fase estacionária) e detetor de ionização por chama (FID) a 260 °C. O hidrogénio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de 3,7 mL/min a 50 °C. O detetor usou como gases de combustão o azoto a 0,65 bar, ar reconstituídos a 0,90 bar e hidrogénio a 0,65 bar. A fase estacionária tinha na sua constituição 50 % de cianopropilmetilpoli-

siloxano e 50 % de fenilmetilpolisiloxano. Foi programada uma rampa de temperaturas ao longo da “corrida” iniciando com 50 °C durante dois minutos, começando por volatilizar o solvente *n*-heptano; aumentando até 125 °C a 30°/min, neste patamar começam a ser detetados os ácidos gordos; de seguida subiu para os 160 °C a 5°/min; aumentando depois para 180 °C a 20°/min; dos 180 °C passa para os 200 °C a 3°/min e finalmente para os 220 °C a 20°/min, permanecendo a esta temperatura durante 15 minutos, antes de chegar ao detetor, para garantir que todos os compostos sejam detetados. Foi injetada, manualmente, 1 µL de amostra com uma seringa.

A identificação foi feita através da comparação dos tempos de retenção dos picos entre a nossa amostra e uma mistura de padrões de ésteres metílicos (*37-Component FAME Mix on the Omegawax 250*).

Os resultados são expressos em termos de percentagens relativas de ácidos gordos, calculados a partir da área do pico cromatográfico (*Softwer: Data Apex clarity*; versão 4.0.00.681).

Foram efetuadas análises em duplicado para as amostras de folha e caule e os resultados são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

2.2.3. Determinação do teor em proteína pelo método de *Kjeldahl*

O procedimento mais comum para a análise do teor em proteína total é feito a partir da determinação do azoto pertencente à proteína. É quantificado segundo o método AOAC 978.04 (1999) [35], a partir do qual o teor em proteína bruta é o resultado que se obtém multiplicando o teor em azoto da amostra, determinada pelo método de *Kjeldahl*, por um fator convencional. Este método, *Kjeldahl method (230-Hjeltec Analyser, FossTecaton, Höganäs, Sweden)*, é o mais recorrente para a quantificação de proteínas e foi proposto por *Kjeldahl* em 1883 na Dinamarca, permitindo quantificar o “N” orgânico total, ou seja o “N” proteico e não proteico orgânico. A quantificação de proteína total por este método envolve a mineralização da matéria orgânica por ácido sulfúrico na presença de um catalisador, transformando o azoto em sal de amónio e libertando o amoníaco em meio alcalino, destilação, recolha em meio ácido e titulação.

Seguindo o procedimento do método AOAC 978.04 (1999) [35], pesou-se 1 g de amostra previamente liofilizada e moída, e introduziu-se no tubo de digestão com 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (95 % - 97 %) e duas pastilhas de selénio como catalisado-

res da digestão. De seguida, os tubos com as respetivas amostras, foram colocados no digestor (*FossTM Digester*) (**imagem 6**) durante aproximadamente 2h a 410 °C até o conteúdo se apresentar nítido, como mostra a **imagem 7**.

Esta etapa foi responsável pela redução do azoto orgânico a amónio, o qual foi retido em solução, na forma de sulfato de amónio:

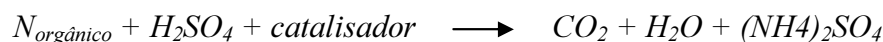


Imagem 6: Digestor do equipamento de *Kjeldahl*.

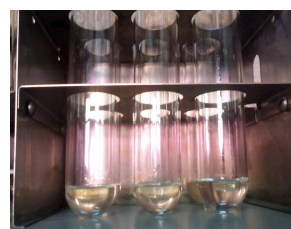
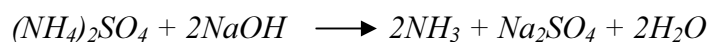


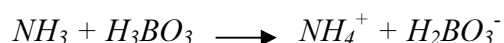
Imagem 7: Conteúdo de amostra, em tubos de digestão, após a digestão.

Posteriormente e após arrefecimento, os tubos de digestão foram colocadas no aparelho de *Kjeldahl* (*UDK 152 Distillation & Titration Unit*), o qual realiza uma série de reações, incluindo uma destilação e por último uma titulação.

De seguida apresentam-se as reações que ocorrem nas diferentes etapas. Primeiro ocorre a diluição da amostra com água e a neutralização do ácido sulfúrico com uma solução de hidróxido de sódio:



Posteriormente segue-se a destilação da solução que contém o amoníaco, que o arrasta por vapor para uma outra solução que o recolhe, que contém ácido bórico e indicador azul de metileno e vermelho de metilo:



E finalmente ocorre a titulação onde o ião borato (quantidade proporcional à de azoto) foi titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl), o que permite calcular a

quantidade molar em azoto na amostra, o qual se mostra igual à quantidade molar amoníaco (NH₃), e por sua vez igual à de HCl.



O teor em azoto é fornecido automaticamente pelo aparelho, e o teor em proteína é calculado multiplicando o valor obtido para o azoto por um fator de conversão específico selecionado previamente no aparelho. Como a maior parte das proteínas em produtos de origem vegetal contém 16 % de azoto, o fator de conversão é de 6,25 (100/16 = 6,25).

Os teores em azoto e em proteína são obtidos em percentagem através da leitura direta no aparelho de *Kjeldahl*.

A análise foi feita em duplicado para a amostra de folha e caule e os resultados apresentados são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

2.2.4. Cálculo do teor em hidratos de carbono e valor energético

O teor em hidratos de carbono foi calculado pela diferença com as restantes componentes: humidade; cinzas; gordura e proteína recorrendo à fórmula seguinte:

$$\text{Teor em hidratos de carbono (\%)} = 100 - (\% \text{ água} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cinzas})$$

O valor energético foi calculado multiplicando o valor exato de cada um dos nutrientes principais pelo equivalente calórico correspondente, e somando os valores obtidos de acordo com o Decreto-Lei n.º 167/2004, de 7 de Julho [36] em que determina os fatores de conversão relativos ao valor energético, sendo para os hidratos de carbono 4 kcal/g, para as proteínas 4 kcal/g e para os lípidos 9 kcal/g.

2.3. Atividade antioxidante

2.3.1. Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos das amostras de folha e caule de *Calaminta baetica* seguiu-se o procedimento descrito por Pereira, 2011 [37], com algumas modificações. Assim, foram pesadas, rigorosamente, numa balança de precisão analítica (*Kern ACJ/ACS*), 2 g de amostra para preparar os extratos como os solventes metanol e água, e

4 g para os extratos com os solventes acetato de etilo e acetona. As respectivas massas foram transferidas para goblés e procedeu-se à adição de 50 mL de metanol, 100 mL de água destilada, 200 mL de acetato de etilo e 200 mL de acetona, como mostra a **tabela 2**. Levaram-se os conteúdos a uma placa de agitação (*IKA RCT basic*) a 150 rpm durante 1h, sendo que no caso da água a placa estava a 50 °C e nos restantes a agitação decorreu à temperatura ambiente. De seguida filtraram-se os extratos com papel de filtro *Whatman* n°4, com a ajuda de um funil de *Büchner*. Procedeu-se a mais uma redissolução dos resíduos com os mesmos volumes por mais 1h. Finalizada a extração, os extratos orgânicos foram evaporados num evaporador rotativo (*Stavrt, RE3022C*) a pressão reduzida e a 40°C em balões de fundo redondo, previamente secos na estufa a 105 °C (*Memmert, UNB100-500*) e pesados. Os resíduos obtidos foram à estufa (*Raypa, Incutermdigit*), a 40°C até atingirem um peso constante. Depois foram redissolvidos com o respetivo solvente de extração para uma concentração de 50 mg/mL. Os extratos aquosos, após arrefecimento, foram congelados, liofilizados e na altura da análise redissolvidos novamente em água destilada para uma concentração de 50 mg/mL.

A extração foi realizada para as amostras de folha e caule, independentemente, com os diferentes solventes e em duplicado.

Posteriormente, para a análise da atividade antioxidante foram preparadas várias concentrações para cada extrato de folha e caule, dependendo do método e do solvente de extração. Para chegar às concentrações desejadas, foram necessários uma série de ensaios prévios.

Tabela 2: Massa de amostra e respetivos volumes de solventes de extração: acetato de etilo; acetona; metanol à temperatura ambiente e água a 50 °C.

Solventes de extração		Massa de amostra		Volume de extração (x 2)
		Folha	Caule	
Temperatura ambiente	Acetato de etilo	4 g	4g	200 mL
	Acetona	4 g	4g	200 mL
	Metanol	2g	2g	50 mL
50 °C	Água	2g	2 g	100 mL

2.3.1.1. Rendimento de extração

O rendimento de extração obtido a partir dos diferentes solventes foi calculado tendo em conta a massa final do extrato, antes de ser redissolvido, e a massa inicial da amostra, segundo a equação:

$$\text{Rendimento de extração (\%)} = \frac{mf}{mi} \times 100$$

onde, *mi* é a massa inicial da amostra e *mf* é a massa final do extrato.

Os resultados apresentam-se em termos de médias e desvios-padrão.

2.3.2. Determinação da atividade antioxidante

As metodologias para determinar a atividade antioxidante são várias e estão sujeitas a interferências, por isso atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra [38, 39].

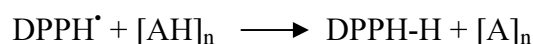
Assim neste estudo, para avaliar o potencial antioxidante nos extratos obtidos da folha e caule da planta *Calamintha baetica* recorreram-se a três métodos. Dois destes métodos (efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e determinação do poder redutor) baseiam-se no valor de EC₅₀, sendo a concentração mínima de amostra necessária para fornecer 50 % de atividade antioxidante e quanto mais baixo é este valor mais ativa é a amostra. O terceiro é o método de *Folin-Ciocalteu*, que permite determinar a capacidade redutora total da amostra.

Far-se-á de seguida uma descrição pormenorizada de cada método.

2.3.2.1. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

O mecanismo que permite bloquear os radicais livres de DPPH foi desenvolvido por Hatano et al. (1988) [40]. O método baseia-se na capacidade dos antioxidantes, neste caso substâncias dadoras de hidrogénio presentes na amostra, incluindo compostos fenólicos

[41], se ligarem ao radical de DPPH (DPPH[•]), um radical orgânico estável, sendo assim reduzido à forma de hidrazina [42].



É um método rápido, específico e não deteta agentes pró-oxidantes [23]. O radical DPPH é solúvel em vários solventes, entre os quais metanol, etanol, dimetilsulfoxido (DMSO), e em qualquer uma das soluções apresenta uma coloração violeta com um máximo de absorvância a 517 nm na região do UV-VIS [43]. Este valor vai decrescendo à medida que a reação entre as moléculas do antioxidante e dos radicais livres de DPPH aumenta, alterando também a coloração da solução. Deste modo, quanto mais rápida for a alteração da coloração de violeta para um amarelo-acastanhado, na qual resulta um decaimento acentuado nos valores de absorvância, maior será a atividade antioxidante da amostra [42].

Seguindo o procedimento proposto por Hatano et al. [40] com algumas modificações, misturaram-se em tubos de ensaio, 0,3 mL das várias concentrações de extrato de cada amostra com 2,7 mL da solução metanólica contendo radicais livres de DPPH (6×10^{-5} mol/L) (*Aldrich Chemistry*). Após agitação no vórtex, a mistura foi colocada no escuro a repousar durante 60 minutos. De seguida foram lidas as absorvâncias a 517nm (Espectrofotómetro *Genesy 10 UV, Thermo Electron Corporation*). As leituras foram feitas em triplicado para as várias concentrações de extrato.

O decréscimo da absorvância dá-nos a redução do radical de DPPH. O efeito bloqueador do radical DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, recorrendo à seguinte equação:

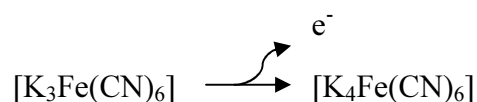
$$\text{Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (\%)} = \left(\frac{A_{\text{DPPH-AA}}}{A_{\text{DPPH}}} \right) \times 100$$

onde, A_{DPPH} corresponde à absorvância da solução do radical livre de DPPH e A_A a absorvância da solução com extrato da amostra. A concentração mínima do extrato, a que corresponde a 50 % ou, nalguns casos, a 20 % de inibição, representado por EC_{50} e EC_{20} respetivamente, foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato em mg/mL.

O ensaio foi feito em duplicado, para os diferentes extratos de folha e caule obtidos com os respetivos solventes: acetato de etilo; acetona; metanol e água. Os valores de EC_{50} e EC_{20} são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

2.3.2.2. Determinação do poder redutor

O método do poder redutor baseia-se num mecanismo de reação de redução do complexo ferro/ferricianeto $[\text{Fe}^{3+}, \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a uma forma ferrosa $[\text{Fe}^{2+}, \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na presença de agentes redutores (antioxidantes) [44]. O produto formado com ferro reduzido reage com a solução de cloreto férrico formando um complexo fortemente colorido e insolúvel em água, o qual pode ser medido espectrofotometricamente no UV-VIS. O complexo de coloração azul “Perl’s Prussian” é usado para monitorizar a concentração de Fe^{2+} [45] e à medida que aumenta a absorvância da amostra indica um maior poder redutor desta. Os compostos fenólicos têm grande capacidade de cedência de electrões logo este mecanismo é adequado para determinar o seu potencial antioxidante e pode ser correlacionado com outras propriedades antioxidantes ou biológicas.



O método do poder redutor utilizado foi descrito por Oyaizu (1986) [45], com algumas modificações. Deste modo, a 1 mL das diferentes concentrações de extrato de cada amostra foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M) a pH 6,6 (*Sigma Chemical Co.*) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1 % (*Sigma Chemical Co.*). A mistura foi agitada vigorosamente no vórtex e posteriormente incubada a 50 °C durante 20 minutos. Decorrido esse período, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (m/v) (*Sigma Chemical Co.*) e levou-se de novo a mistura ao vórtex. Retiraram-se 2,5 mL do sobrenadante que foram misturados com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1 % (*Sigma Chemical Co.*). De seguida leram-se as absorvâncias a 700 nm. As leituras foram feitas em triplicado para as várias concentrações de extrato.

A concentração de extrato correspondente a 0,5 ou 0,2 de absorvância é designada por EC_{50} ou EC_{20} , respetivamente, e foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância em função da concentração, em mg/mL de extrato correspondente.

O ensaio foi feito em duplicado, para os diferentes extratos de folha e caule obtidos com os respetivos solventes: acetato de etilo; acetona; metanol e água. Os valores de EC_{50} e EC_{20} são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

2.3.2.3. Avaliação da capacidade redutora total pelo método *Folin-Ciocalteu*

Um dos métodos usados para avaliar a capacidade redutora total é o do *Folin-Ciocalteu*. Este método é muito recorrente para a determinação do teor em fenóis totais em extratos vegetais. O método baseia-se na reação dum reagente colorimétrico com compostos fenólicos, seguido de uma medição espectrofotométrica na região do visível. O reagente consiste numa mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico com compostos fenólicos, em condições alcalinas, ocorrendo a dissociação de um próton fenólico levando à formação do ião fenolato. Este anião reduz o reagente formando o complexo azul de molibdénio e azul de tungsténio, permitindo medir substâncias redutoras no espectrofotómetro a 725 nm [23, 38]. Contudo, esta metodologia permite a quantificação de substâncias redutoras que podem não ser de natureza fenólica [44].

O método utilizado foi descrito por Oliveira [26], com algumas modificações. Assim, misturaram-se, num tubo de ensaio, 0,5 mL de amostra com 0,5 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (*Panreac*) e por fim, adicionaram-se 3,5 mL de água destilada, levou-se o conteúdo ao vórtex, para agitação vigorosa. O conteúdo foi mantido no escuro durante 90 minutos, para desenvolvimento da cor. Passado o tempo de reação, leram-se as absorvâncias a comprimentos de onda de 725 nm. As leituras foram feitas em triplicado para as várias concentrações de extrato.

Para determinar o teor em fenóis totais nos diferentes extratos de folha e caule, recorreu-se à construção da reta padrão de ácido gálico (*Sigma Aldrich*). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g_{extrato}).

O ensaio foi feito em duplicado, para os diferentes extratos de folha e caule obtidos com os respetivos solventes: acetato de etilo; acetona; metanol e água. Os teores em fenóis totais ou a capacidade redutora total são expressos em termos de médias e desvios-padrão.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição química

As amostras de folha e caule de *Calamintha baetica* foram sujeitas a várias análises com o intuito de determinar os teores em humidade, cinzas, gordura e proteína. Os hidratos de carbono e o valor energético foram obtidos por cálculo com base nos dados obtidos pelas análises dos restantes componentes. Os resultados para as amostras em estudo são apresentados na tabela que se segue.

Tabela 3: Composição química para as amostras de folha e caule de *Calamintha baetica* (média \pm desvio-padrão).

Composição química		
	Folha	Caule
Humidade (%)	72,97 \pm 0,53	70,94 \pm 2,15
Cinzas (%)	3,21 \pm 0,07	2,83 \pm 0,02
*Proteína (%)	11,81 \pm 0,15	4,64 \pm 0,16
*Gordura (%)	3,30 \pm 0,28	1,13 \pm 0,02
Hidratos de Carbono (%)	8,65 \pm 0,07	20,54 \pm 2,19
Valor Energético (kcal/100g)	111,7 \pm 3,25	111,16 \pm 9,65

*Valor expressos em base seca.

Com o intuito de compararmos os nossos resultados com os reportados na literatura, apresenta-se de seguida um estudo feito à composição nutricional de plantas da mesma família da planta *Calamintha baetica* (Lamiaceae), dado não se encontrar estudos relativos à composição química nutricional da *Calamintha*.

Fernandes realizou um estudo em 2010 [46] no Instituto Politécnico de Bragança, a três espécies condimentares usadas na gastronomia transmontana, entre elas a *Mentha pulegium* (hortelã pimenta mansa), *Thymus pulegioides* (tomilho da serra) e *Thymus mastichina* (tomilho vulgar). Estas três espécies pertencem à mesma família de *Calamintha baetica* e os resultados obtidos nesse estudo, relativos à sua composição química, estão apresentados na **tabela 4**.

Tabela 4: Composição química para espécies silvestres condimentares da família Lamiaceae.

Composição química *			
	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus pulegioides</i>	<i>Thymus mastichina</i>
Humidade (%)	54,57	47,66	54,67
Cinzas (%)	4,94	5,92	5,89
Proteína (%)	7,12	5,53	4,89
Gordura (%)	2,22	0,18	8,39
Hidratos de Carbono (%)	84,74	89,35	80,83
Valor Energético (kcal/100g)	387,44	381,14	418,34

*Amostra: flor, folha e caule

Os resultados apresentados na **tabela 3** mostraram que as amostras de folha e caule de *Calaminta baetica* possuem teores em humidade elevados e próximos entre si, na ordem de 72,97 e 70,94 %, respetivamente. Analisando a **tabela 4** verifica-se que os teores de humidade das três espécies condimentares da família Lamiaceae são inferiores aos da planta *Calamintha*.

Os teores em cinzas também não diferem muito entre as amostras, sendo de 3,21 e 2,83 % para a folha e caule, respetivamente. As espécies condimentares evidenciaram valores relativamente próximos aos da planta *Calamintha*.

Em relação aos nutrientes orgânicos, observa-se que a folha apresentou maior percentagem em proteína com 11,81 % e um menor valor para a gordura de 3,30 %. Relativamente ao caule, este pelo contrário, revelou possuir maior teor em hidratos de carbono com 20,54 % e um teor reduzido em gordura de 1,13 %. Comparando o teor em gordura nas duas amostras em estudo constata-se que a folha revelou teores superiores (3,20 %) ao caule (1,13 %).

Os hidratos de carbono revelaram uma diferença acentuada entre as amostras, apresentando para o caule um teor bastante superior (20,54 %) ao da folha (8,65 %).

O valor energético para as amostras de folha e caule praticamente não variou, com um valor a rondar as 111 kcal/100g de amostra.

Tendo em conta os resultados obtidos no estudo das três espécies condimentares (**tabela 4**), verificou-se que em relação ao teor em proteína, estas espécies apresentaram teores inferiores ao da planta *Calamintha*. Relativamente ao teor em gordura, estes apresenta-

ram-se próximos aos de *Mentha pulegium* para a folha e aos de *Thymus pulegioides* para o caule de *Calamintha*. Já os hidratos de carbono evidenciaram teores bastante superiores (variaram entre os 80,83 e 89,35 %) aos de *Calamintha*, os quais refletem valores energéticos também superiores para as três espécies (variaram entre 381,14 e 418,34 kcal/100g de amostra) quando comparados aos da espécie *Calamintha*, para a amostra de folha e caule. É de referir que os teores em proteína, gordura e hidratos de carbono são relativos à base seca das amostras.

Tendo em conta os teores obtidos em proteína para a planta aromática *Calamintha*, especialmente para a amostra de folha, podemos considerar esta espécie como uma planta que fornece maior quantidade deste nutriente, quando comparado com as três espécies do estudo desenvolvido por Fernandes [46]. As proteínas são essenciais na alimentação humana devido às diversas funções estruturais e funcionais que desempenham no nosso organismo.

3.1.1. Perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa

A composição em ácidos gordos das amostras de folha e caule da planta *Calamintha baetica* foi analisada por cromatografia gasosa (GC) obtendo-se os respetivos perfis, em percentagem relativa, apresentados na **tabela 5**. Esta técnica analítica permitiu identificar um total de quinze ácidos gordos para ambas as amostras, apresentando seis dos quais uma percentagem superior a 1.

Analisando a **tabela 5**, podemos verificar que para a amostra de folha os ácidos gordos presentes em maior percentagem relativa foram o ácido α -linolénico (C18:3n3) com 69,11 %, seguido do ácido palmítico (C16:0) com 11,55 %, depois surgiu o ácido linoleico (C18:2n6c) com 10,03 %, o ácido oleico (C18:1n9c+t) com 3,49 % e por último surgiu o ácido mirístico (C14:0) com 1,49 %. Relativamente ao caule, os ácidos gordos presentes em maior percentagem foram o ácido α -linolénico com 44,93 % seguido do ácido linoleico com 23,83 %, (dobro do valor correspondente na amostra de folha), depois surgiu o ácido palmítico com 17,09 %, o ácido oleico com 7,67 % e por último, com percentagem mais baixa, o ácido mirístico com 0,90 %.

Os restantes ácidos gordos identificados apresentaram todos, quer para a amostra de folha quer para a amostra de caule, uma percentagem inferior a 1.

Tabela 5: Composição em ácidos gordos (%) das amostras de folha e caule da planta *Calamintha baetica* (média \pm desvio-padrão).

Ácido gordo (%)	Estrutura	Folha	Caule
Caproico	C6:0	0,32 \pm 0,03	0,018 \pm 0,00
Caprílico	C8:0	0,59 \pm 0,06	0,16 \pm 0,01
Cáprico	C10:0	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00
Láurico	C12:0	0,26 \pm 0,03	0,31 \pm 0,01
Mirístico	C14:0	1,49 \pm 0,05	0,90 \pm 0,00
Pentadecanóico	C15:0	0,15 \pm 0,04	0,27 \pm 0,00
Palmítico	C16:0	11,55 \pm 0,03	17,09 \pm 0,18
Palmitoleico	C16:1	0,12 \pm 0,00	0,40 \pm 0,01
Heptadecanóico	C17:0	0,23 \pm 0,03	0,40 \pm 0,02
Esteárico	C18:0	1,81 \pm 0,02	2,81 \pm 0,10
Oleico	C18:1n9c+t	3,49 \pm 0,00	7,67 \pm 0,05
Linoleico	C18:2n6c	10,03 \pm 0,05	23,83 \pm 0,05
α -Linolénico	C18:3n3	69,11 \pm 0,13	44,93 \pm 0,28
Araquídico	C20:0	0,48 \pm 0,01	0,48 \pm 0,06
Beénico	C22:0	0,35 \pm 0,04	0,65 \pm 0,01
SFA		17,25 \pm 0,35	23,17 \pm 0,41
MUFA		3,60 \pm 0,01	8,07 \pm 0,06
PUFA		79,14 \pm 0,17	68,76 \pm 0,33

SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados.

Os ácidos gordos podem ser classificados em saturados, monoinsaturados e polinsaturados, correspondendo a diferentes frações nutricionais. A fração mais abundante obtida para ambas as amostras foi a fração de ácidos gordos polinsaturados, obtendo-se 79,14 e 68,76 % para as amostras de folha e caule, respetivamente, sendo constituída pelos ácidos linoleico e α -linolénico. De seguida surgiu a fração de ácidos gordos saturados com uma percentagem superior para a amostra de caule (23,17 %) em relação à amostra de folha (17,25 %). Esta fração é constituída pelo maior número dos ácidos gordos detetados em ambas as amostras com percentagens inferiores a 1, e ainda pelos ácidos palmítico e mirístico. Por último, com menor percentagem, surgiram os monoinsaturados, fração constituída pelos ácidos oleico e palmitoleico.

De seguida apresenta-se um gráfico de barras que permite melhor visualizar e comparar as diferenças entre o perfil dos ácidos gordos (com percentagem superior a 1) e a fração de ácidos saturados, monoinsaturados e polinsaturados presentes nas amostras de folha e caule de *Calamintha baetica* (**gráfico 1**).

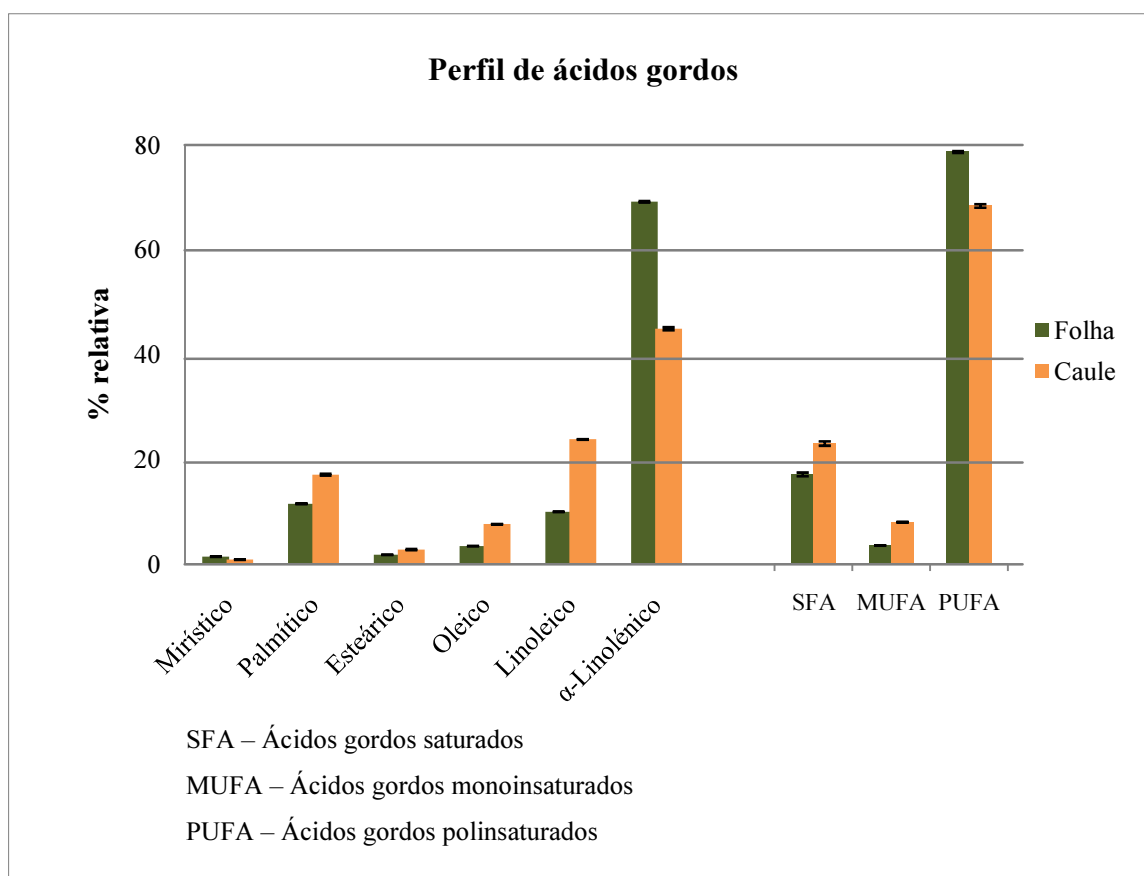


Gráfico 1: Perfil de ácidos gordos, com percentagem superior a 1, e frações dos ácidos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), presentes nas amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*.

Tendo em consideração o **gráfico1**, pode-se constatar que na planta *Calamintha baetica* existem seis ácidos gordos com percentagens superiores a 1 em ambas as amostras, entre eles: os saturados mirístico; esteárico e palmítico, o monoinsaturado oleico; e os polinsaturados linoleico e α -linolénico.

Constata-se que o α -linolénico foi aquele que apresentou maior percentagem relativamente aos outros ácidos gordos e ainda que a folha contém uma maior quantidade em

relação ao caule. Os restantes ácidos gordos apresentam maior quantidade no caule do que na folha, excepto o ácido mirístico, embora com uma diferença pouco acentuada.

Relativamente à fração de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados dos quinze ácidos identificados para as amostras, o **gráfico 1** revela uma maior percentagem dos polinsaturados (PUFA) para ambas as amostras. No entanto, a folha revela níveis superiores, o que seria de prever, pois esta apresentou grande diferença de percentagem no α -linolénico relativamente ao caule. Em menor percentagem encontram-se os monoinsaturados (MUFA), sendo que a amostra de caule apresentou valor superior em relação à amostra de folha. Seria de esperar, pois no caule surgiram valores superiores no ácido oleico e palmitoleico, os únicos monoinsaturados presentes.

Em geral pode dizer-se que as amostras de folha e caule da planta *Calamintha baetica*, através dos resultados obtidos por cromatografia gasosa, revelaram quantidades maiores em ácidos gordos insaturados, principalmente de polinsaturados. A amostra de folha é aquela que apresenta uma maior quantidade de ácidos insaturados (MUFA e PUFA) com um valor de 83 % relativamente à amostra de caule (aproximadamente 77 %).

Sabe-se que os ácidos gordos insaturados são os mais saudáveis para a saúde humana e estão presentes principalmente em produtos de origem vegetal. Os ácidos da série ómega-3 e ómega-6, o α -linolénico e linoleico, respetivamente, são os chamados ácidos gordos essenciais, porque não são produzidos pelo organismo humano, sendo essencial a sua obtenção através da dieta humana. Estes ácidos estão associados a vários efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente na diminuição de risco de doenças inflamatórias, hipertensão, doenças cardíacas, cancro da próstata e mama [47-49]. Por outro lado, os ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 são precursores da biossíntese de eicosanóides envolvidos em diversas funções metabólicas [50].

Nesta perspetiva a planta *Calamintha baetica* pode ser utilizada como uma fonte alimentar de ácidos α -linolénico e linoleico, precursores de ómega-3 e ómega-6 estando também relacionados com a diminuição do colesterol do tipo LDL (o chamado colesterol “mau”) e da oxidação lipídica [47].

O estudo feito por Fernandes em 2010 [46] referido anteriormente, também analisou o perfil de ácidos gordos por GC/FID, nas três espécies condimentares aromáticas (*Mentha pulegium*, *Thymus pulegioides* e *Thymus mastichina*). Os resultados de ácidos gordos presentes em maiores quantidades foram os ácidos gordos palmítico (10,22 a 16,70 %),

esteárico (2,35 a 4,96 %), oleico (5,77 a 11,40 %) e linoleico (11,83 a 16,27 %) para as três espécies da família Lamiaceae, os quais revelaram relativamente próximos aos de *Calamintha baetica*. Relativamente ao α -linolénico as espécies condimentares apresentaram valores inferiores, variando entre 37,00 a 45,65 %, quando comparadas com os obtidas para a amostra de folha (69,11 %) e próximos para a amostra de caule (44,93 %) da planta *Calamintha*. Estes resultados vão refletir numa maior fração em ácidos gordos polinsaturados na folha e uma fração próxima para o caule na planta aromática do presente estudo em relação as espécies condimentares do estudo referido anteriormente.

Em anexo, apresentam-se os cromatogramas obtidos como perfil de ácidos gordos presente nas amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*, analisados pela técnica GC/FID (**anexo 1 e 2**).

3.2. Atividade antioxidante

3.2.1. Rendimento de extração

Foram obtidos os extratos em acetato de etilo, em acetona; metanólico e aquoso, para as amostras de folha e caule da planta *Calamintha baetica*.

Na tabela seguinte (**tabela 6**) apresentam-se os valores de percentagem de extração para cada extrato obtido da amostra de folha e de caule, com os solventes de extração acetato de etilo, acetona e metanol à temperatura ambiente e, por fim, água à temperatura de extração de 50 °C.

Os resultados apresentados na **tabela 6** mostraram que, a água à temperatura de 50 °C foi a que obteve maior rendimento de extração com percentagem de 34,75 % e 21,11 % para a amostra de folha e caule, respetivamente.

Relativamente aos solventes orgânicos à temperatura ambiente, o metanol foi o solvente em que se obteve um rendimento de extração maior, com valores de 15,63 % e 8,48 % para as amostras de folha e caule, respetivamente. Os solventes acetato de etilo e acetona surgiram como rendimentos de extração mais baixos, sendo relativamente próximos, variando entre 4,19 a 5,04 % para a folha e 1,41 a 1,53 % para o caule.

Tabela 6: Rendimento da extração obtidos com os diferentes solventes: acetato de etilo; acetona e metanol à temperatura ambiente e água à temperatura de 50 °C, para a amostra de folha e caule de *Calamintha baetica* (média ± desvio-padrão).

Extrato	Rendimento de extração (%)
Acetato de etilo	
Folha	4,19±1,15
Caule	1,53±0,14
Acetona	
Folha	5,04±0,90
Caule	1,41±0,05
Metanol	
Folha	15,63±0,30
Caule	8,48±0,93
Água a 50 °C	
Folha	34,75±1,89
Caule	21,11±0,25

De seguida apresenta-se um gráfico de barras dos rendimentos de extração obtidos com os solventes orgânicos e com água para as amostras da planta *Calamintha baetica*.

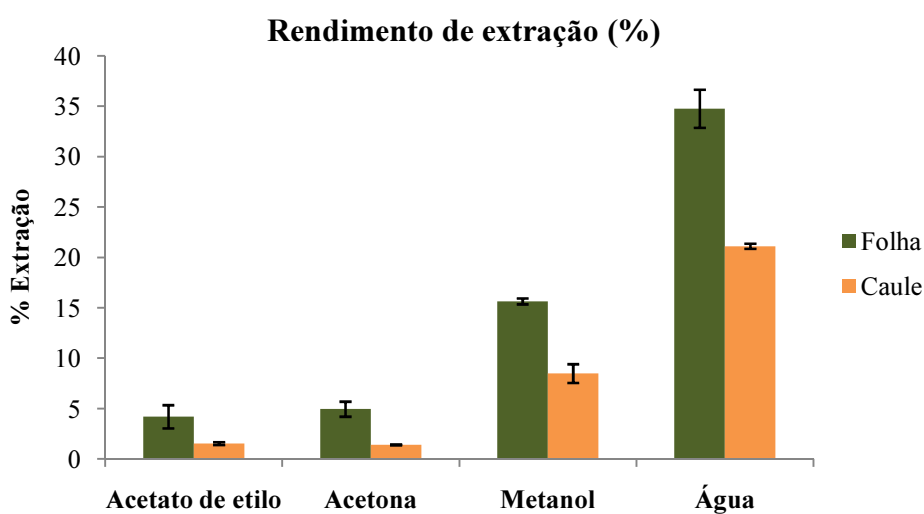


Gráfico 2: Rendimentos de extração obtidos com os solventes acetato de etilo, acetona, metanol e água para as amostras de folha e caule de *Calamintha baetica* (média ± desvio-padrão).

Tendo em conta a polaridade dos solventes, o **gráfico 2** evidencia que à medida que a polaridade dos solventes aumenta a percentagem de extração também aumenta. Assim, os solventes acetato de etilo e acetona, sendo os menos polares, apresentaram um rendimento inferior aos solventes mais polares, metanol e água. Comparando as amostras entre si, a folha apresentou valores de percentagem de extração superiores aos de caule, para todos os solventes. Este facto poderá estar relacionado com a composição química da amostra. Pois, segundo o autor Santos-Buelga, 2003 [30], o rendimento dos compostos extraídos, depende não só do solvente e da sua polaridade, mas também do tempo e temperatura, como também da composição química e características físicas da amostra. Relativamente à composição química, sabe-se que o caule é constituído essencialmente por polímeros como as fibras de celulose e hemicelulose e também lenhina. Estas moléculas apresentam-se na forma de cadeias extensas e bastante insolúveis e, devido a esta característica, tornam-se difíceis de ser extraídas pelos solventes e condições de extração testados neste estudo.

Segundo os resultados obtidos da extração, podemos constatar que, para estas condições de extração, a folha da planta *Calamintha baetica* é aquela que proporciona uma maior quantidade de extrato e, conseqüentemente, uma maior quantidade de compostos para análise, incluindo os compostos essencialmente polares.

3.2.2. Determinação da atividade antioxidante

Os extratos das diferentes partes da planta *Calamintha baetica* foram submetidos a três metodologias, com o intuito de avaliar o potencial antioxidante e o teor em compostos fenólicos, nomeadamente o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, o poder redutor e a capacidade redutora total pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

Os resultados obtidos para as diferentes metodologias estão tabelados a seguir (**tabela 7**) e são expressos em termos de concentração para os diferentes extratos das amostras da folha e caule.

Seguidamente far-se-á uma análise pormenorizada, com representação gráfica, dos resultados para cada método aplicado aos extratos obtidos com os solventes: acetato de

etilo; acetona e metanol à temperatura ambiente, e água à temperatura de 50 °C para as amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*.

Tabela 7: Valores de EC₅₀ e EC₂₀ (mg/mL) para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e poder redutor, e ainda valores da capacidade redutora total expressos em mg EAG/g_{extrato} para os extratos de folha e caule obtidos com os diferentes solventes (média ± desvio-padrão).

Amostra	DPPH		Poder redutor		Capacidade redutora total (mg EAG/g _{extrato})
	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₂₀ (mg/mL)	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₂₀ (mg/mL)	
Acetato de etilo					
Folha	0,94±0,00	0,23±0,02	2,53±0,06	1,05±0,00	22,25±0,61
Caule		0,75±0,03		3,49±0,15	10,52±0,01
Acetona					
Folha		0,24±0,00	0,92±0,16	0,32±0,03	38,83±0,91
Caule		0,66±0,05		0,87±0,03	18,61±1,70
Metanol					
Folha	0,24±0,02		0,51±0,00		54,08±4,50
Caule	0,96±0,10		1,51±0,09		39,55±2,07
Água a 50 °C					
Folha	1,22±0,02		1,22±0,03		42,87±0,62
Caule	0,91±0,07		1,53±0,02		31,86±1,05

3.2.2.1. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

O método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH é considerado um método expedito para avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres por parte dos antioxidantes, visto fornecer resultados reprodutíveis de uma forma rápida e fácil. O potencial antioxidante é avaliado pela concentração de antioxidante necessária para diminuir 50 % da concentração inicial do radical DPPH, denominado por EC₅₀. Assim, quanto mais baixo for este valor mais antioxidante será a amostra.

Os extratos obtidos com os diferentes solventes analisados no presente trabalho, recorrendo ao método do efeito bloqueador de radicais de DPPH, indicaram possuir uma percentagem de inibição do radical DPPH dependente da concentração (**gráficos 3, 4, 5 e 6**).

Relativamente às amostras, a folha revelou valores de percentagem de inibição deste radical superiores aos apresentados pelas amostras de caule, para todos os extratos, exceto para o extrato obtido com água.

O efeito bloqueador de radicais livres de DPPH pelos extratos obtidos com acetato de etilo está representado no **gráfico 3**. No extrato da folha, para concentrações superiores a 1 mg/mL a percentagem de inibição diminuiu ligeiramente e para os extratos de caule houve uma estabilização para concentrações superiores a 1,5 mg/mL.

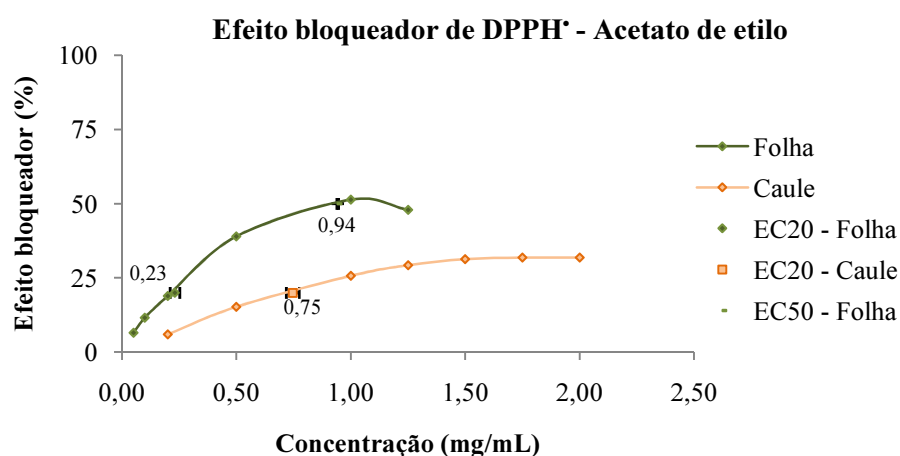


Gráfico 3: Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH dos extratos obtidos com acetato de etilo para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₅₀ e EC₂₀ expressos em média ± desvio-padrão).

Apenas se verificou valores de 50 % de inibição do radical DPPH para o extrato de folha com um EC₅₀ de 0,94 mg/mL, sendo que no caule esse valor não foi atingido. Para este, decidiu-se calcular o valor correspondente a 20 % de inibição (EC₂₀), que foi de 0,75 mg/mL, correspondendo a um fraco efeito bloqueador.

O extrato de folha obtido com acetato de etilo revelou um maior efeito bloqueador em relação ao extrato de caule, que foi praticamente inexistente. Este resultado significa que os compostos extraídos da amostra de caule com acetato de etilo, nas condições realizadas de extração, não apresentam poder bloqueador considerável para provocar inibição de radicais livres de DPPH para metade da sua concentração inicial.

Para o solvente de extração acetona, o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH pelos extratos obtidos aumentou à medida que a concentração de extrato aumentou, até

uma dada concentração (**gráfico 4**). Assim, a curva referente à amostra de folha a partir da concentração de 1 mg/mL começa a diminuir e a do caule estabiliza a partir da concentração de 2 mg/mL.

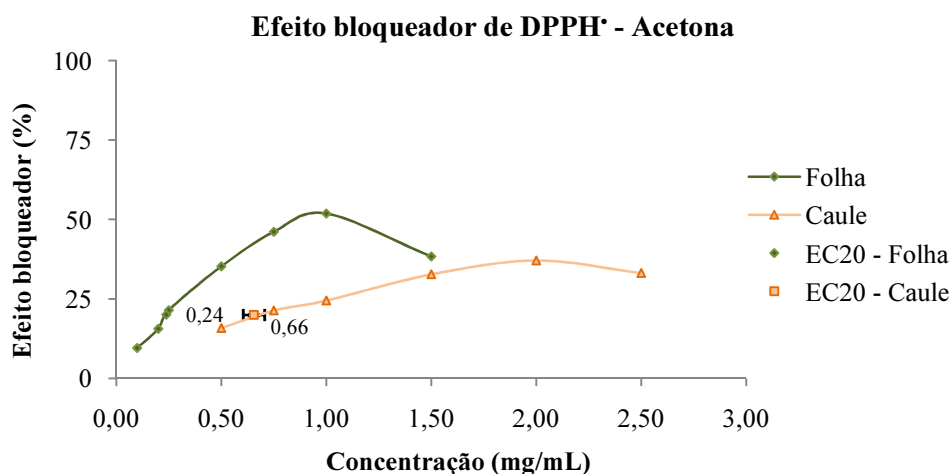


Gráfico 4: Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH dos extratos obtidos com acetona para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₂₀ expresso em média ± desvio-padrão).

Os extratos de ambas as amostras não atingiram os 50 % de inibição. Assim sendo, optou-se pelo cálculo do EC₂₀ com valores de 0,24 mg/mL e 0,66 mg/mL, para as amostras de folha e caule, respetivamente. Podemos então verificar que a amostra de folha é aquela que apresenta um valor inferior de EC₂₀, refletindo-se num maior efeito bloqueador, ainda que fraco.

O solvente acetona, nas condições em que foram realizadas as extrações, não conseguiu extrair compostos suficientemente capazes de bloquear os radicais de DPPH e reduzi-los para metade da sua concentração livre inicial, nas amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*.

O efeito bloqueador de radicais de DPPH do extrato metanólico das amostras de folha e caule de *Calamintha baetica* aumentou à medida que a concentração de extrato aumentou (**gráfico 5**). Este aumento revelou-se bastante acentuado, principalmente para o extrato de folha, chegando a atingir valores de percentagem de inibição deste radical a rondar os 80 %. Para o extrato de caule, embora de uma forma não tão acentuada chegou a atingir os 90 % de inibição, como mostra o **gráfico 5**.

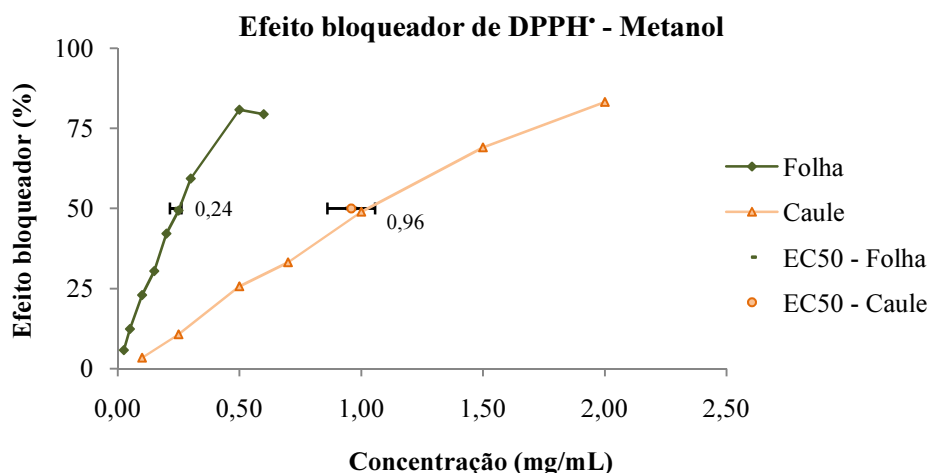


Gráfico 5: Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH dos extratos obtidos com metanol para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₅₀ expresso em média ± desvio-padrão).

Para os extratos metanólicos foi possível obter valores de EC₅₀ para ambas as amostras. O extrato de folha foi aquele que revelou valores inferiores de EC₅₀ de 0,24 mg/mL apresentando assim um maior efeito bloqueador. O caule, pelo contrário, apresentou um menor efeito bloqueador traduzido num valor de EC₅₀ superior (0,95 mg/mL).

Para o solvente de extração água, o **gráfico 6** mostra que as curvas de percentagem de inibição apresentam um perfil semelhante para ambos os extratos de folha e caule. De referir que a curva referente ao extrato de caule diminui para concentrações superiores a 2 mg/mL.

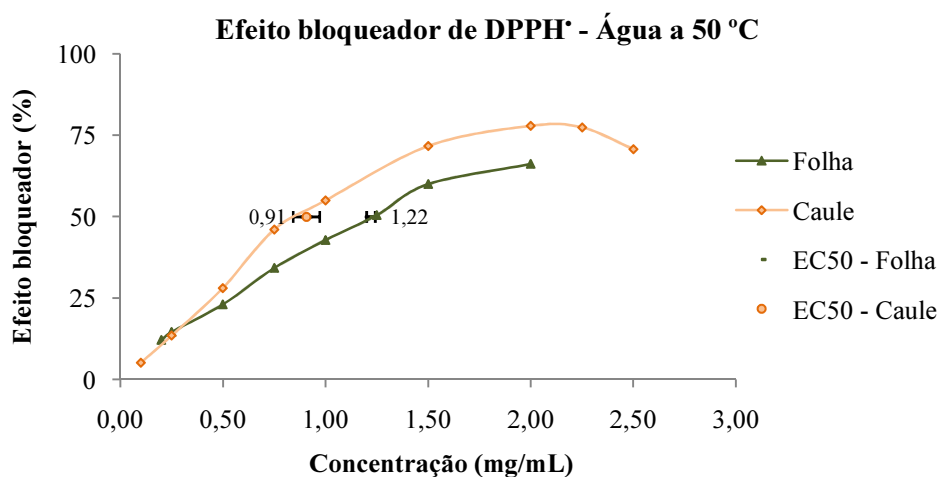
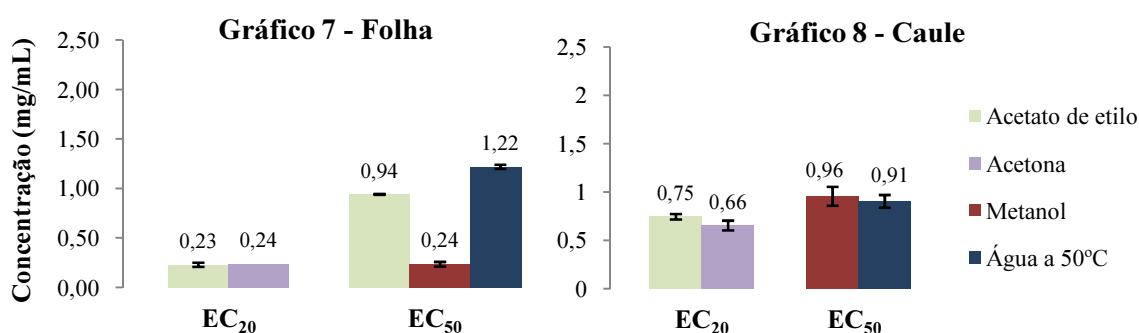


Gráfico 6: Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH dos extratos obtidos com água para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₅₀ expresso em média ± desvio-padrão).

O extrato aquoso revelou resultados contrários aos obtidos para os extratos em solventes orgânicos para o método de efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, apresentando a amostra de folha valores inferiores de percentagem de inibição em relação à amostra de caule, para toda a gama de concentrações, até à concentração máxima de 2 mg/mL.

Os valores obtidos não variaram muito entre si, obtendo-se EC₅₀ de 0,91 e 1,22 mg/mL, respetivamente, para as amostras de folha e caule.

A seguir apresentam-se os resultados obtidos para o método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, em gráficos de barras (**gráficos 7 e 8**), para melhor visualizar e comparar as diferenças entre os extratos obtidos com os diferentes solventes para as amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*.



Gráficos 7 e 8: Valores de EC₅₀ e EC₂₀ para o método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH obtidos para os diferentes extratos de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressos em média ± desvio-padrão).

Em relação à amostra de folha, o **gráfico 7** evidencia que foi possível determinar os valores de EC₅₀ para os extratos em acetato de etilo, metanol e água. Os valores mais baixos foram os do metanol (0,24 mg/mL), seguidos do acetato de etilo (0,94 mg/mL) e por fim a da água (1,22 mg/mL), cerca de seis vezes superior ao EC₅₀ mais baixo. Os valores de EC₂₀ do acetato de etilo e da acetona mostram-se semelhantes. Tendo em conta os resultados obtidos o extrato metanólico foi aquele que revelou maior efeito bloqueador para a amostra de folha de *Calamintha baetica*.

Para a amostra de caule, os valores de EC₅₀ e EC₂₀ obtidos são relativamente próximos entre si nos diferentes solventes de extração (**gráfico 8**). Dado que para os extratos metanólicos e de água foi possível determinar o valor de EC₅₀, estes, comparados com os res-

tantes solventes, são aqueles que obtiveram melhores resultados em termos de efeito bloqueador para a amostra de caule de *Calamintha baetica*.

Foi possível encontrar na literatura um estudo referente à atividade antioxidante de extratos de folha obtidos com acetona, metanol e água da espécie *Calamintha grandiflora*. No referido estudo feito por Dobravalskyt et al. (2012) [4] obtiveram para o extrato de folha obtido com acetona um valor de EC₅₀ de 1,10 mg/mL enquanto para a amostra de folha obtida com mesmo solvente na espécie em estudo, *Calamintha baetica*, não foi possível atingir o valor de EC₅₀. Pelo contrário, o extrato metanólico obtido para a amostra de folha da espécie *Calamintha grandiflora* apresentou um valor de EC₅₀ similar (0,23 mg/mL) ao do presente estudo para a espécie *Calamintha baetica*, revelando capacidades semelhantes em bloquear os radicais livres de DPPH. Os extratos aquosos revelaram valores de EC₅₀ próximos ao extrato metanólico para a espécie *Calamintha grandiflora* e valores inferiores (0,22 mg/mL) ao extrato aquoso da espécie *Calamintha baetica* deste estudo.

Cávar et al. em 2012 [6] estudaram a espécie *Calamintha baetica* proveniente da Croácia. Para o efeito, partes aéreas da planta foram sujeitas a sucessivas extrações por *Soxhlet* usando cinco solventes: éter de petróleo, clorofórmio, acetona, etanol puro e etanol a 96 %. Este estudo revelou capacidade bloqueadora de radicais de DPPH dos extratos em acetona com valores de EC₅₀ de 2,58 mg/mL, enquanto o extrato de acetona do presente estudo não apresentou valores de EC₅₀. Deverá ter-se em conta que o extrato de acetona foi obtido por *Soxhlet* e que sofreu previamente sucessivas extrações com éter de petróleo e clorofórmio, “refinando” deste modo os compostos presentes no extrato da acetona.

3.2.2.2. Determinação do poder redutor

O método do poder redutor consiste em determinar a concentração (mg/mL) mínima de amostra que provoque a conversão do complexo ferro(III)/ferricianeto para a forma ferrosa para valores de absorvância de 0,5. Deste modo a transformação do Fe³⁺ para Fe²⁺ é a medida para determinar a capacidade do poder de redução da amostra. A concentração de extrato correspondente a 0,5 de absorvância e também designada por EC₅₀, foi calcu-

lada a partir da representação gráfica da absorvância registada a 700 nm em função da concentração de extrato. Quanto mais baixa a concentração de amostra necessária para produzir este efeito, mais ativa é.

Nos **gráficos 9, 10, 11 e 12** apresentam-se os resultados obtidos para os extratos de folha e caule com os diferentes solventes de extração, sujeitos ao método do poder redutor. Verificou-se que a absorvância aumenta à medida que a concentração de extrato aumenta, para os diferentes solventes utilizados. Verificou-se ainda que os valores de absorvância para a amostra de folha são superiores aos obtidos para a amostra de caule, para os diferentes solventes de extração.

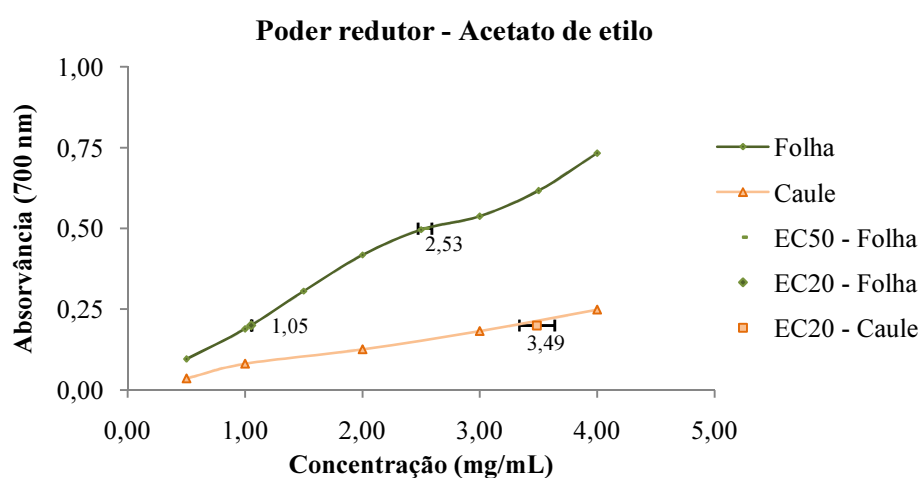


Gráfico 9: Poder redutor dos extratos obtidos com acetato de etilo para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC_{20} e EC_{50} expressos em média \pm desvio-padrão).

Na extração com acetato de etilo para o método do poder redutor, verificou-se que existe um afastamento entre as curvas como mostra o **gráfico 9**. A curva correspondente ao extrato de folha evidencia um declive acentuado e com um valor de EC_{50} de 2,53 mg/mL, apresentando um maior poder redutor relativamente ao extrato de caule. Este revelou um declive menos pronunciado não sendo possível calcular o valor de EC_{50} . Assim, o valor de EC_{20} (decidiu-se por este parâmetro) foi de 3,48 mg/mL, revelando um fraco poder redutor.

Comparando os valores de EC_{20} entre os extratos de folha e caule, o resultado é bem mais inferior para o extrato de folha, com 1,05 mg/mL.

Durante o procedimento experimental ocorreu a formação de uma camada na superfície da mistura reacional (separação de fases entre a fase orgânica e a fase aquosa), o que dificultou a sua realização (**imagens 8 e 9**).



Imagem 8: Conteúdo de amostra, mais o reagente de ferricianeto de potássio, após ida à estufa durante 20 min, usando o solvente acetato de etilo (folha e caule).



Imagem 9: Conteúdo de amostra após a adição do TCA, usando o solvente acetato de etilo (folha e caule).

A fase que se apresenta no topo dos tubos de ensaio corresponde à fase orgânica onde se encontra a fração de gordura do extrato da amostra obtido com acetato de etilo, a outra fase corresponde à fase aquosa onde está contida a fração aquosa do conteúdo (reagentes aquosos).

O **gráfico 10** apresenta para o extrato de caule uma dependência da absorvância com a concentração, até à concentração máxima testada de 2,00 mg/mL, não chegando a atingir os 0,50 de absorvância. No extrato de folha essa dependência chegou a atingir valores próximos de 1,00 de absorvância.

O extrato de folha em acetona evidenciou valores de EC_{50} de 0,92 mg/mL. Como para o extrato de caule não foi possível calcular o valor de EC_{50} optou-se pelo valor de EC_{20} com 0,87 mg/mL, evidenciando um poder redutor muito fraco.

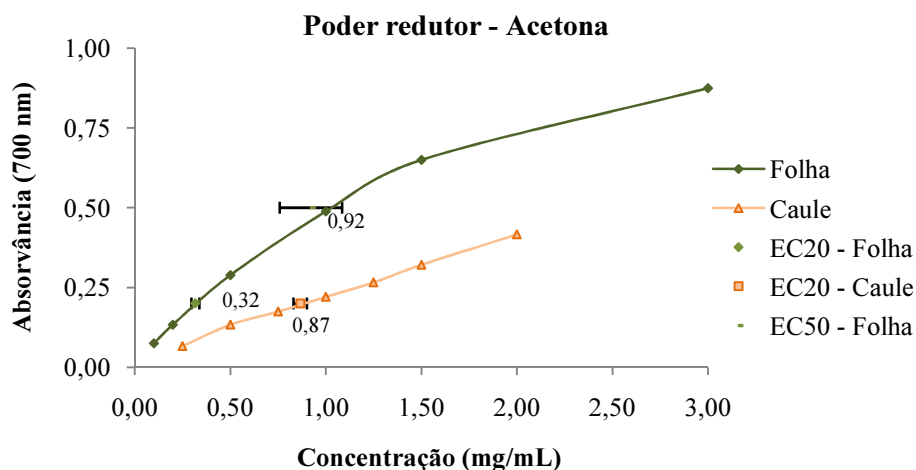


Gráfico 10: Poder redutor dos extratos obtidos com acetona para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₂₀ e EC₅₀ expressos em média ± desvio-padrão).

O valor médio de EC₅₀ para o extrato de folha (0,92 mg/mL) mostrou-se incerto durante o ensaio, pois os resultados entre os duplicados apresentavam uma discrepância, levando a uma percentagem de erro elevada, cerca de 18 %. Esta incerteza pode dever-se à dificuldade experimental encontrada neste ensaio devido à formação de partículas suspensas, encontrando-se em maior abundância na superfície da solução. (**imagens 11 e 12**).



Imagem 11: Conteúdo de amostra, mais o reagente de ferricianeto de potássio, após incubar durante 20 min., usando o solvente acetona (folha).

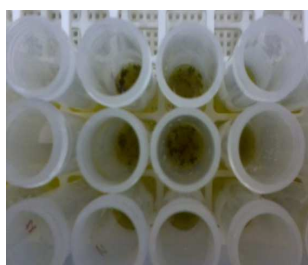


Imagem 12: Mesma solução da imagem 11 vista de cima.



Imagem 13: Resultado final da solução de amostra (mais concentrada), usando o solvente acetona (folha).

Estas partículas surgiram após a adição e agitação vigorosa do reagente ferricianeto de potássio, as quais permaneceram após os tubos terem ido à incubadora. De referir que estes resíduos formaram-se com mais intensidade nas soluções preparadas com os extratos de folha e em soluções mais concentradas (a partir de 1 mg/mL). Com o intuito de

eliminar estas partículas, precedeu-se a uma ligeira alteração no procedimento. Não conseguindo eliminá-las por completo mas, ainda assim, permitiu diminuir a sua concentração. O passo seguinte (retirada de 2,5 mL da solução anterior) foi realizado com todo o cuidado para minimizar a presença de partículas no conteúdo final (**imagem 13**).

No extrato metanólico foi possível calcular os valores de EC₅₀ para ambas as amostras, tal como no método do efeito bloqueador de radicais de DPPH. Podemos verificar no **gráfico 11** que o extrato de folha apresentou um valor inferior de EC₅₀ de 0,51 mg/mL, revelando assim um maior poder redutor. Pelo contrário, o extrato de caule apresentou uma menor capacidade de reduzir o ferro, com um valor de EC₅₀ de 1,51 mg/mL.

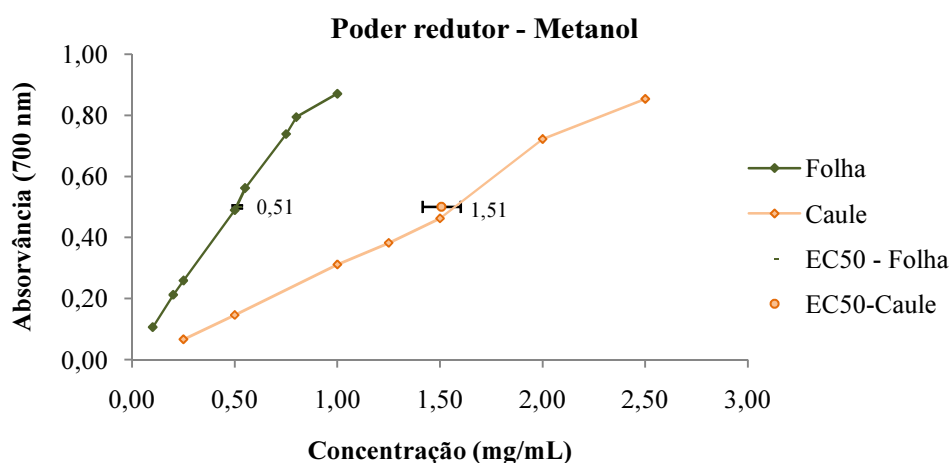


Gráfico 11: Poder redutor dos extratos obtidos com metanol para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₅₀ expresso em média ± desvio padrão).

Relativamente aos extratos de água obtiveram-se curvas semelhantes para as duas amostras, começando a diferenciar-se a partir da concentração de 1,5 mg/mL, como mostra o **gráfico 12**.

Os valores de EC₅₀ obtidos na determinação do poder redutor são inferiores para o extrato de folha (1,22 mg/mL), traduzindo-se numa maior capacidade de reduzir o ferro que o extrato de caule, com um valor de EC₅₀ de 1,53 mg/mL.

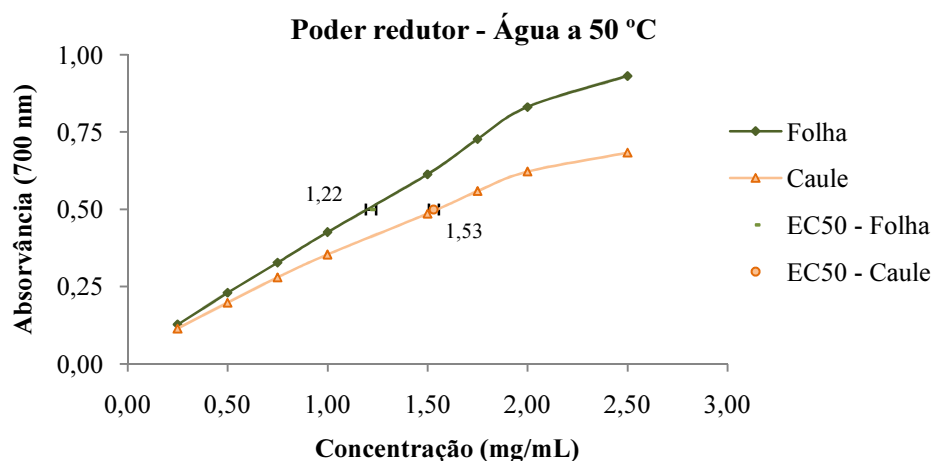
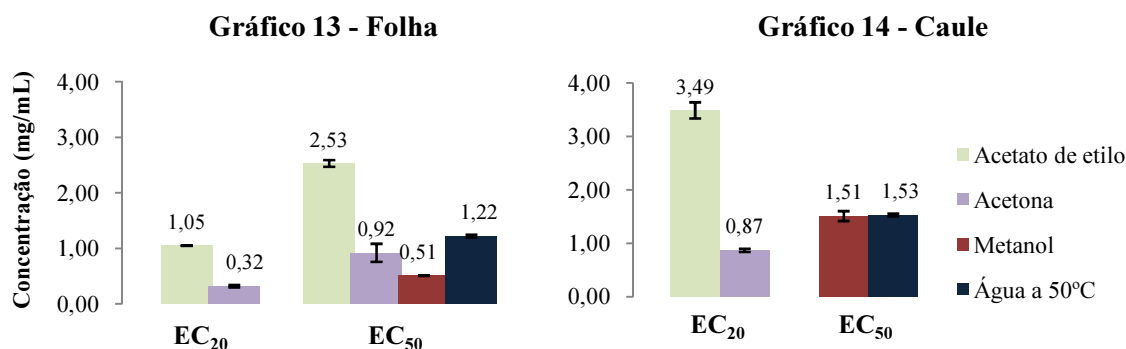


Gráfico 12: Poder redutor dos extratos obtidos com água para a folha e caule de *Calamintha baetica* (EC₅₀ expresso em média ± desvio padrão).

Seguidamente apresentam-se os resultados obtidos para o método do poder redutor, em gráficos de barras (**gráficos 13 e 14**), para melhor visualizar e comparar as diferenças entre os extratos obtidos com os diferentes solventes para as amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*.



Gráficos 13 e 14: Valores de EC₅₀ e EC₂₀ para o método do poder redutor obtidos para os diferentes extratos de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressos em média ± desvio-padrão).

Nos extratos obtidos para a amostra de folha foi possível determinar o valor de EC₅₀ para todos os solventes. O valor mais baixo foi obtido para o metanol (0,51 mg/mL), seguido da acetona (0,92 mg/mL), depois surgiu o da água (1,22 mg/mL) e por último o do acetato de etilo (2,53 mg/ml), com valores cinco vezes superiores ao do resultado mais baixo, como mostra o **gráfico 13**. O extrato metanólico foi aquele que revelou um maior poder redutor, visto ter apresentado valores de EC₅₀ mais baixos; pelo contrário, o extrato

obtido com acetato de etilo foi o que apresentou valores maiores de EC₅₀ revelando deste modo um potencial redutor mais baixo.

Em relação aos EC₂₀ obtidos para o acetato de etilo e acetona, o **gráfico 13** mostrou valores inferiores para o último, cerca de três vezes menos, revelando tal como nos valores de EC₅₀, como seria previsto, o maior poder redutor do extrato de acetona em relação ao acetato de etilo na amostra de folha.

No extrato de caule apenas os solventes metanol e água alcançaram os valores de EC₅₀, revelando valores similares entre si. Relativamente aos valores de EC₂₀ obtidos para os extratos de acetato de etilo e acetona evidenciaram valores bem distintos, revelando-se inferior para a acetona, cerca de quatro vezes menor, como evidencia o **gráfico 14**. Apesar de não se terem alcançado os valores de EC₅₀ para estes dois solventes, comprova-se também na amostra de caule em acetona o maior potencial redutor em relação ao acetato de etilo, ainda que seja pouco relevante.

Tendo em conta os resultados obtidos para os dois métodos: efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e poder redutor constatou-se que o extrato de folha obtido com o solvente metanol foi aquele que se revelou mais ativo, ou seja, evidenciou maior poder antioxidante.

No extrato da amostra do caule não existem grandes diferenças entre os resultados obtidos com os solventes metanol e água.

Os solventes menos indicados para avaliar a atividade antioxidante, nas condições de extração realizadas, são o acetato de etilo e a acetona. Este facto deve-se a que na amostra de folha, o acetato de etilo revelou valores moderados de EC₅₀ no método do efeito bloqueador de radicais de DPPH e no poder redutor, mas com valores superiores aos do metanol; por outro lado a acetona apenas revelou valores de EC₅₀ no método poder redutor, enquanto no caule não se obtiveram os valores de EC₅₀ para os dois solventes.

O estudo reportado por Cávar et al [6] evidenciou, em extratos obtidos com acetona de amostras de partes aéreas da planta *Calamintha nepeta*, um poder redutor inferior (EC₅₀ de 5,62 mg/mL) ao do extrato de acetona obtido para a amostra de folha da planta *Calamintha baetica*. É de referir que os extratos de acetona do estudo de Cávar et al. foram obtidos por *Soxhlet* e a amostra é constituída pelas partes aéreas da planta.

3.2.2.3. Avaliação da capacidade redutora total

A capacidade redutora total dos extratos foi avaliada pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Este método encontrando-se perfeitamente estabelecido e generalizado. No entanto, de uma forma geral, os resultados obtidos para este método em termos de fenóis totais, são superiores aos obtidos por outros métodos mais específicos e sensíveis. Tal facto deve-se sobretudo à sua falta de especificidade, uma vez que outros compostos, como os açúcares e metais, com capacidade redutora podem reagir com o reagente de *Folin-Ciocalteu* sobrevalorizando assim os resultados [5].

Nos últimos anos alguns autores têm proposto que os resultados obtidos por este método sejam interpretados como forma de medir a capacidade redutora total dos extratos avaliados [38, 51].

Nos **gráficos 15, 16, 17 e 18**, encontram-se representados os resultados para os extratos obtidos com os diferentes solventes para a folha e caule, sujeitos ao método de *Folin-Ciocalteu* para a determinação da capacidade redutora total.

Verificou-se para todos os extratos obtidos com os diferentes solventes que o da amostra de folha possui capacidade redutora total superior ao do caule.

Na extração obtida com acetato de etilo os resultados para a amostra de folha e caule são respetivamente, 22,25 mg EAG/g_{extrato} e 10,52 mg EAG/g_{extrato}, apresentando a primeira o dobro da capacidade redutora comparado com a última (**gráfico 15**).

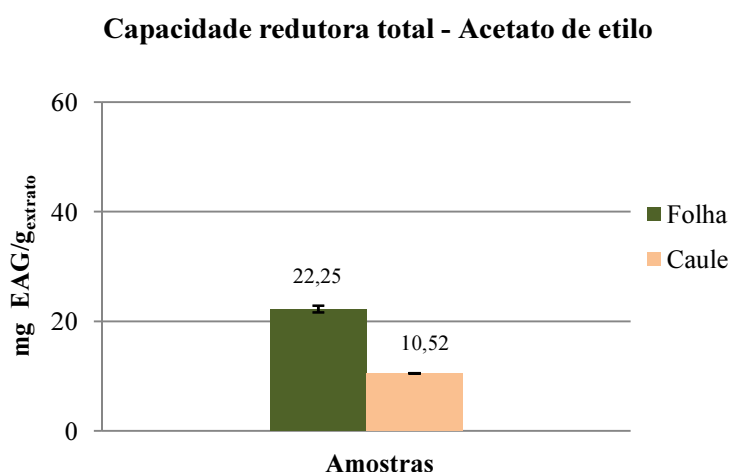


Gráfico15: Capacidade redutora total dos extratos obtidos com acetato de etilo de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressa em média \pm desvio-padrão de mg EAG/g_{extrato}).

Neste método, tal como no método do poder redutor, também se verificou uma separação de fases (fase orgânica na parte superior e fase aquosa na parte inferior do tubo de ensaio), as quais dificultaram a execução experimental (**imagem 14**, lado esquerdo). Esta separação de fases verificou-se até à fase das leituras no espectrofotómetro (**imagem 14**, lado direito) o que levou um certo tempo para a estabilização nas leituras efetuadas.



Imagem 14: Resultado final da solução de amostra (esq. menos concentrada e drt. mais concentrada) para o método da avaliação da capacidade redutora total, usando o solvente acetato de etilo (folha e caule).

Na extração obtida com acetona os resultados, tal como no extrato de acetato de etilo, também variaram da mesma forma. A folha apresentou o dobro da capacidade redutora total (38,83 mg EAG/g_{extrato}) em relação ao caule (18,61 mg EAG/g_{extrato}), no entanto estes resultados são superiores aos obtidos nos respetivos extratos de acetato de etilo (**gráfico 16**).

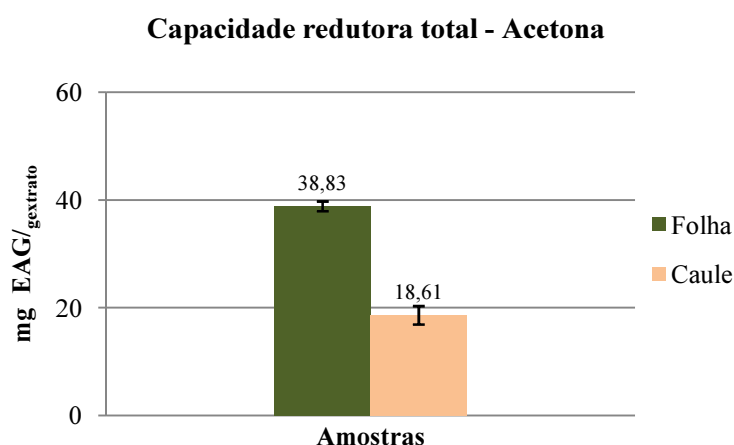


Gráfico 16: Capacidade redutora total dos extratos obtidos com acetona de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressa em média \pm desvio-padrão de mg EAG/g_{extrato}).

Na determinação da capacidade redutora total dos extratos obtidos com acetona ocorreu a formação de um precipitado branco no fundo do tubo de ensaio. Para eliminar essa interferência levaram-se os tubos à centrífuga durante 5 minutos a 3000 rpm. A retirada da solução para a célula foi feita com uma pipeta de *Pasteur* e de seguida fez-se a leitura da absorvância. Deste modo conseguiu-se eliminar por completo, ou minimizar ao máximo, a interferência de partículas na leitura.

O extrato metanólico apresenta, como seria de prever, maior capacidade redutora na amostra de folha com 54,08 mg EAG/g_{extrato} relativamente ao do caule com 39,55 mg EAG/g_{extrato} (**gráfico 17**).

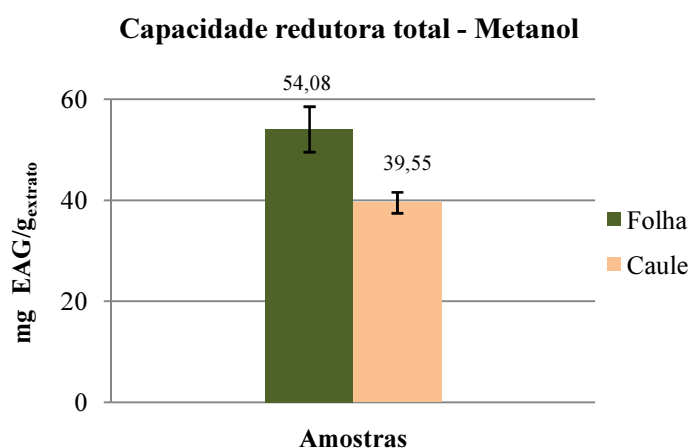


Gráfico 17: Capacidade redutora total dos extratos obtidos com metanol de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressa em média \pm desvio-padrão de mg EAG/g_{extrato}).

Os valores obtidos para o extrato aquoso são superiores na amostra de folha em relação à amostra de caule, tal como nos extratos orgânicos. Para a folha obteve-se um valor de capacidade redutora total de 42,87 mg EAG/g_{extrato} e para o caule de 31,86 mg EAG/g_{extrato} (**gráfico 18**).

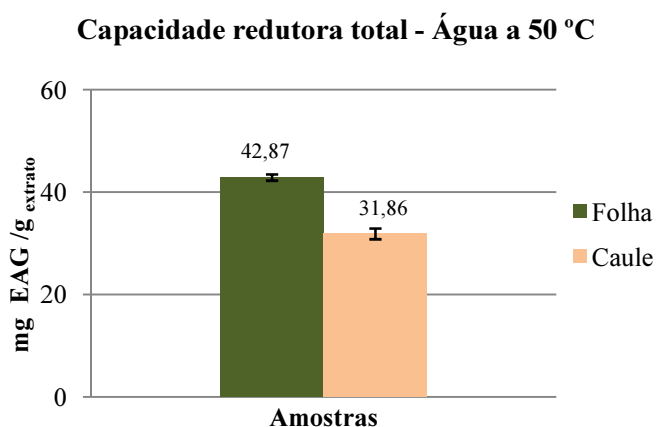


Gráfico 18: Capacidade redutora total dos extratos obtidos com água de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressa em média \pm desvio-padrão de mg EAG/g_{extrato}).

Apresentam-se de seguida os resultados da capacidade redutora total, em gráficos de barras (**gráfico 19**), para melhor visualizar e comparar as diferenças entre os extratos obtidos com os diferentes solventes para as amostras de folha e caule de *Calamintha baetica*.

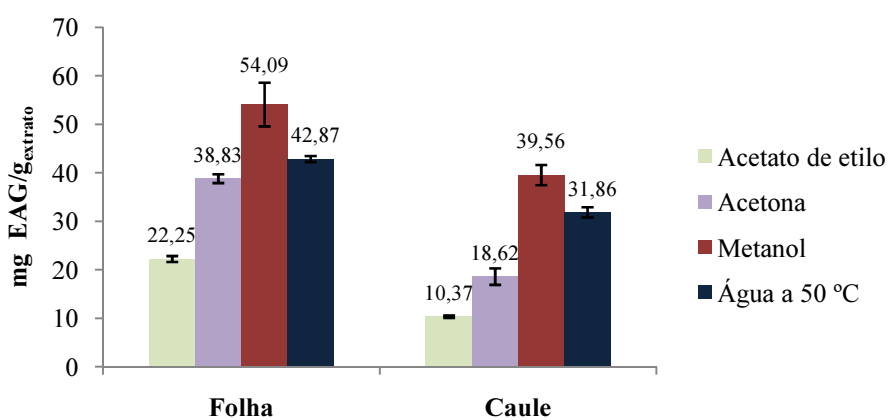


Gráfico 19: Capacidade redutora total obtida para os diferentes extratos de folha e caule de *Calamintha baetica* (expressa em média \pm desvio-padrão de mg EAG/g_{extrato}).

Constatou-se através do **gráfico 19** que a maior capacidade redutora na amostra de folha foi obtida para o extrato metanólico, seguido da água, depois da acetona e por último, com valores mais baixos, a do acetato de etilo. A mesma ordem verifica-se para o caule, mas com os respetivos valores inferiores aos da folha. Esta observação seria de

esperar já que os métodos anteriores revelaram maior atividade antioxidante para a folha comparativamente ao caule.

A pesquisa realizada por Dobravalskyte et al. [4] à amostra de folha da espécie *Calamintha grandiflora* revelou uma capacidade redutora total na mesma ordem de grandeza para os extratos obtidos com acetona, metanol e água, com teores de 28,01, 64,80 e 58,90 mg EAG/g_{extrato}, respetivamente. Relativamente ao extrato de acetona, os dados obtidos por Cávar et al. [6], pela técnica *de Soxhlet*, a amostras das partes aéreas da planta da mesma espécie evidenciaram teores bem mais elevados (117,11 mg EAG/g_{extrato}) do que a planta do presente estudo.

Outro estudo reportado por Conforti et al. em 2011 [52], também revelou uma capacidade redutora total superior para a espécie *Calamintha grandiflora* relativamente à espécie de *Calamintha nepeta* (*Calamintha baetica*) em partes aéreas da planta obtidas a partir de extratos metanólicos, com teor na ordem dos 97 mg EAG/g_{extrato}.

Em suma, a folha da planta *Calamintha baetica* é aquela que possui compostos com maiores propriedades antioxidantes, extraídos com solvente metanol à temperatura ambiente, analisados pelos ensaios do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, do poder redutor e capacidade redutora total.

Por último, faremos uma abordagem às propriedades dos óleos essenciais da espécie *Calamintha baetica*, já que os estudos reportados se baseiam maioritariamente no seu estudo em diversas plantas, quer em composição química quer em atividade antioxidante, e fazer uma comparação entre os resultados referenciados em óleos essenciais e os obtidos para os extratos no presente estudo. Assim, o trabalho realizado por Cávar et al. (2012) [6] baseia-se no estudo da atividade antioxidante de óleos essenciais obtidos por hidrodestilação desta espécie em amostras provenientes da Croácia. Os resultados demonstraram que os óleos essenciais desta planta apresentam capacidade antioxidante inferior aos extratos, com valores de EC₅₀ na ordem dos 34 mg/mL e 406 mg/mL para os métodos do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH e poder redutor, respetivamente.

Existe uma diversidade de espécies de plantas aromáticas da família Lamiaceae, que são recorrentes no uso do dia adia para temperos de muitas receitas alimentares e outras aplicações. Assim, iremos também referir estudos no que respeita à atividade antioxidante dessas espécies que surgem de forma selvagem na região transmontana, e compará-los com a espécie de *Calamintha baetica*.

Fernandes em 2010 [46] analisou a atividade antioxidante das espécies selvagens condimentares *Mentha pulegium*; *Thymus pulegioides* e *Thymus mastichina* a extratos obtidos com metanol a 25 °C. As amostras eram constituídas pelas partes aéreas das plantas (folha, caule e flores). Os resultados da pesquisa revelaram para as três espécies condimentares os seguintes valores: efeito bloqueador de radicais de DPPH (EC_{50} 0,56-0,69 mg/mL), método do poder redutor (EC_{50} 0,12-0,49 mg/mL) e capacidade redutora total variando entre 156,29 a 331,69 mg EAG/g_{extrato}. Analisando os resultados do ensaio do DPPH, os extratos de folha no nosso estudo revelaram maior efeito bloqueador do que os apresentados pelas espécies condimentares. Um efeito contrário foi verificado para o extrato de caule com valores superiores de EC_{50} . O ensaio do poder redutor apresentou valores superiores de EC_{50} tanto para a folha como para o caule relativamente às espécies condimentares, traduzindo-se num menor efeito redutor. No que diz respeito à capacidade redutora total presente na *Calamintha baetica*, esta evidenciou um menor efeito que o apresentado pelas espécies do estudo referido.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho analisou-se a composição química em termos de humidade, cinzas, proteínas, gordura, hidratos de carbono, valor energético e o perfil de ácidos gordos da planta aromática *Calamintha baetica* nas suas diferentes partes, folha e caule.

A análise da composição química relativamente à humidade e às cinzas revelou que, os respetivos teores, não variam muito entre as amostras, e evidenciou altos teores em humidade. A folha obteve maior composição em proteína total; o caule, por sua vez, evidenciou maior abundância em hidratos de carbono. Relativamente ao teor em gordura este foi ligeiramente superior na folha. Em termos de valor energético os valores foram similares para a amostra de folha e de caule.

O perfil em ácidos gordos revelou maiores variações entre as amostras para os compostos presentes em maior percentagem relativa. Os ácidos gordos maioritários foram os ácidos polinsaturados α -linolénico, com maior abundância na amostra da folha, seguido do ácido linoleico, com maior presença na amostra do caule e por último o ácido palmítico também com maior abundância relativa na amostra de caule. A maior fração em gordura presente na *Calamintha* foi a de compostos polinsaturados, com maior relevância na folha, e menor em monoinsaturados, para ambas as amostras.

Relativamente aos rendimentos de extração obtidos pelos diferentes solventes: acetato de etilo, acetona e metanol à temperatura ambiente e água à temperatura de 50 °C de extração, verificou-se que o solvente aquoso foi o que obteve maior rendimento de extração, seguido do metanol e por último os solventes acetato de etilo e acetona com rendimentos mais baixos e similares nas respetivas amostras. A amostra da folha foi a que apresentou maiores rendimentos de extração para todos os solventes testados.

Em termos de atividade antioxidante, o extrato metanólico da folha de *Calamintha baetica* foi o que revelou maior potencial antioxidante, o qual se traduziu em valores de EC₅₀ mais baixos para os métodos do efeito bloqueador de radicai de DPPH e do poder redutor. Também revelou uma maior capacidade redutora total quando comparada com o extrato de caule. Os extratos aquosos, quer da amostra de folha quer da amostra de caule, apresentaram valores de EC₅₀ próximos, não só, entre os métodos do efeito bloqueador de radicais de DPPH e do poder redutor, como também entre amostras, folha e caule. Em

termos da capacidade redutora total a amostra de folha revelou valores superiores relativamente ao caule. O extrato de acetato de etilo apenas revelou valores de EC_{50} para a amostra de folha para os dois métodos, a acetona, por sua vez, apenas revelou valores de EC_{50} para o método do poder redutor. Estes dois extratos, acetato de etilo e acetona, foram aqueles que revelaram uma menor capacidade redutora total, traduzida num menor teor em fenóis totais presentes na amostra de folha e caule. Assim, estes solventes revelam-se como os menos eficazes para analisar a atividade antioxidante da espécie *Calamintha baetica*.

Em suma, o solvente metanol à temperatura ambiente foi o que revelou melhores resultados em termos de atividade antioxidante constatando-se, tal como referenciados por outras pesquisas em diversos produtos de natureza vegetal, como o solvente mais indicado para a extração de compostos com propriedades antioxidantes na planta *Calamintha baetica*. O estudo permitiu concluir também que a parte da planta de *Calamintha baetica* analisada com maior potencial antioxidante foi a folha.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] Silva, S.P.B.; Silveira, A.D., **2011**. “Curva de crescimentos e de biomassa fresca da espécie *Calamintha nepeta* ssp. *glandulosa* em cultivo sob estufa”. Projeto final de estágio. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.
- [2] <http://apps.kew.org/wcsp/incfamilies.do>, acessido a 14 de julho de **2014**.
- [3] Raymond, M.; Harley; Sandy Atkins; Andrey, L.; Budantsev; Philip, D.; Cantino; Barry, J.; Conn; Renée, J.; Grayer; Madeline, M.; Harley; Rogier, P.J. de Kok; Tatyana, V.; Krestovskaja; Ramón Morales; Alan, J.; Paton Olof Ryding, P., **2004**. "*Labiatae*". 167-275. In: Klaus Kubitzki (editor) and Joachim W. Kadereit (volume editor). *The families and genera of vascular plants*, volume VII. Springer-Verlag: Berlin; Heidelberg, Germany. ISBN 978-3-540-40593-1.
- [4] Dobravalskyte, D.; Venskutonis, P. R.; Talou, T., **2012**. “Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora*”. *Food Chemistry*. 135, 1539-1546.
- [5] Pires, A.P.M., **2010**. “Composição química e atividade antioxidante de folhas de diferentes castas de videiras”. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [6] Cavar, S.; Vidic, D.; Maksimovic, M., **2012**. “Volatile constituents, phenolic compounds, and antioxidant activity of *Calamintha glandulosa* (Req.) Bentham”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, 1758-1764.
- [7] Mendes, P.A.F., **2012**. “Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes”. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [8] http://bioliva.utad.pt/plantas/Calamintha_baetica.htm, acessido a 12 de junho de **2014**
- [9] <http://jb.utad.pt/termos>, acessido a 15 de Julho de **2014**.
- [10] <http://floresdoareal.blogspot.pt/2013/01/calamintha-nepeta-l-subsp-nepeta.htm> 1/, acessido a 15 de julho de **2014**.
- [11] Baldovinic, N.; Dominique, R.; Tomi, F.; Casanova, J., **2000**. “Infraspecific variability of the essential oil of the *Calamintha nepeta* from Corsica (France)”. *Flavour and Fragrance Journal*. 15, 50-54.

-
- [12] Couldis, M.; Tzakou, O., **2001**. “Essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* from Greece”. *Journal of Essential Oil Research*. 13, 11-12.
- [13] Yasar, S.; Fakir, H.; Erbas, **2011**. “Volatile constituents of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball. and *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* from mediterranean region in Turkey”. *Asian Journal of Chemistry*. 23, 3765-3766.
- [14] Araniti, F.; Lupini, A.; Mercati, F.; Statti G. A.; Abenovoli M. R., **2013**. “*Calamintha nepeta* (L.) Savi as source of phototoxic compounds: bio-guided fractionation in identifying biological active molecules”. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35, 1979-1988.
- [15] Cook, C.M.; Lanaras, T.; Kokkins, S., **2007**. “Essential oil to two *Calamintha glandulosa* (Req.) Bentham chemotypes in a wild population from Greece”. *Journal of Essential Oil Research*. 19, 534-539.
- [16] Bandini, P.; Pacchiani, M., **1981**. “Constituents, proprieties and uses of *Calamintha nepeta*”. *Essenze e Derivati Agrumari*”. 51, 325-330.
- [17] Panizzi, L.; Flamini, G.; Gioni, P.L.; Morelli, I., **1993**. “Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean lamiaceae”. *Journal of Ethnopharmacology*. 39, 167-170.
- [18] Flamini, G.; Gioni, P.L.; Puleio, R.; Morelli, I.; Panizzi, L., **1999**. “Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi”. *Phytotherapy Research*. 13, 349-351.
- [19] Kitic, D.; Jovanovic, T.; Ristic, M.; Palic, R.; Stojanovic, G., **2002**. “Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro”. *Journal of Essential Oil Research*. 14, 150-152.
- [20] Sarac, N.; Ugur, A., **2009**. “The in vitro antimicrobial activities of essential oils of some lamiaceae species from Turkey”. *Journal of Medicine Food*. 12, 902-907.
- [21] Martins, R.M., **2014**. “Caraterização química e atividade biológica de plantas aromáticas do Alentejo”. Apresentação no dia Aberto da Universidade de Évora.

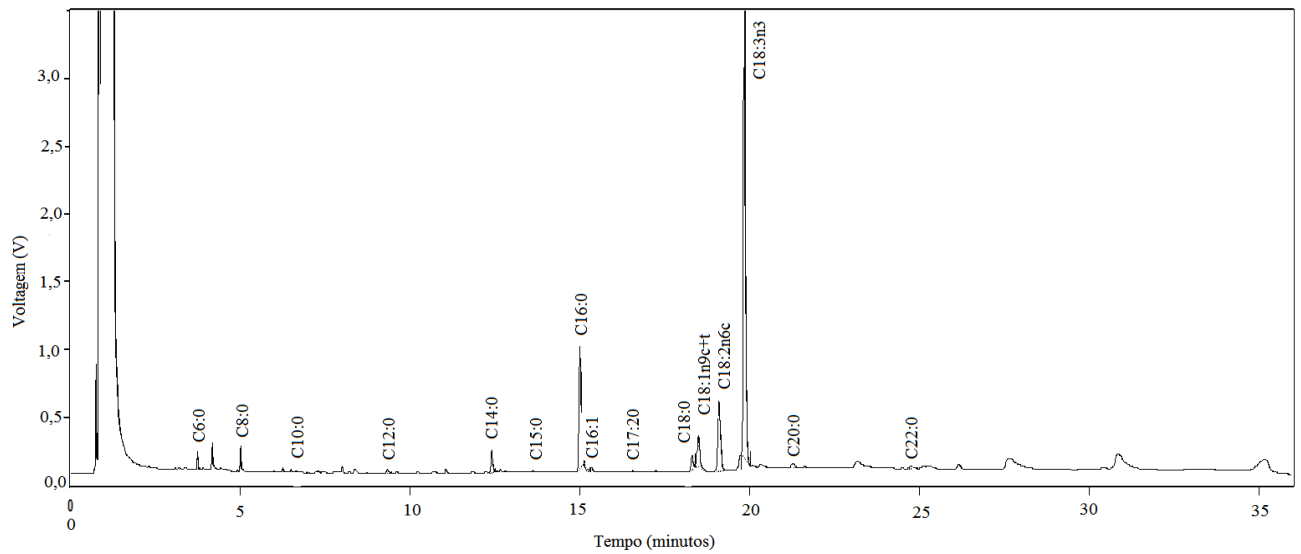
-
- [22] Singh, P.P.; Jha, S.; Irchhaiya, R., **2011**. “Antidiabetic and antioxidant activity of hydroxycinnamic acids from *Calamintha officinalis* Moench”. *Medicinal Chemistry Research*. 21, 1717-1721.
- [23] Gonçalves, A.E. S. S., **2008**. “Avaliação da capacidade antioxidante de frutos e polpas de frutas nativas e determinação de teores de flavonoides e vitamina C”. Tese de mestrado em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo.
- [24] Costa, D.R.L., **2011**. “Efeitos de adubação azotada na composição química e propriedades antioxidantes de sementes de colza da cultivar Hydromel”. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [25] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C., **1995**. “Use of free radical method to evaluate antioxidant”. *Food Science and Technology*. 28, 25-30.
- [26] Oliveira, I.V., **2007**. “Avaliação nutricional, composição química e atividade biológica de folhas e frutos de noqueira e aveleira”. Trabalho de fim de curso da Licenciatura em Engenharia Biotecnológica. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [27] Cavaleiro, A.M.V. **1999**. “Química Inorgânica Básica”. Universidade de Aveiro, 2ª edição, 110-111.
- [28] <http://www.sigmaldrich.com/chemistry/solvents.html>, acessido a 23 de setembro de **2014**.
- [29] Delgado, T.; Oliveira, I.; Pereira, J.A.; Ramalhosa, E., **2009**. “Efeito de diferentes solventes e tempos na extração de compostos antioxidantes presentes em avelãs (*Corylus avellana* L.)”. Actas do 9º Encontro de Química dos Alimentos, Angra do Heroísmo, Açores, Portugal.
- [30] Santos-Buelga, C.; Williamson, G., **2003**. “Methods in polyphenol analysis” *Royal Society of Chemistry*. Cambridge, Reino Unido.
- [31] AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 16ª edição, Virgínia, E.U.A., Vol. I, 3-1

-
- [32] AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 16^a edição, Virgínia, E.U.A., Vol. I, cap. 3, subcap. 3.1.03, p. 1.
- [33] AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 16^a edição, Virgínia, E.U.A., Vol II, cap. 4, subcap. 4.5.01, p. 26.
- [34] Mariutti, B. R.L.; Nogueira, C.G.; Bragagnolo, N., **2011**. “Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic”. *Journal of Food Science*. 6, 909-915.
- [35] AOAC. **1999**. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 16^a edição, Virgínia, E.U.A., Vol. I, cap. 3, subcap. 3.5.09, p. 24.
- [36] Decreto-Lei n.º167/2004, de 7 de Julho.
- [37] Pereira, E., **2011**. “Contribuição para inventariação química e nutricional de cogumelos do nordeste de Portugal”. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [38] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L., **2005**. “The chemistry behind antioxidant capacity assays”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.
- [39] Prior, R.L.; Wu, X.L.; Schaich, K, **2005**. “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290-4320.
- [40] Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T.; Okuda, T., **1988**. “Two new flavonoids”. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36, 2090-2097.
- [41] Roginsky, V.; Lissi, E.A., **2005**. “Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food”. *Food Chemistry*. 92, 235-254.
- [42] Afonso, S.M.E., **2010**. “Caracterização físico-química e atividade antioxidante de novas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*)”. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [43] Santos, C.M.M., **2000**. “Síntese e avaliação da atividade antioxidante de 2-estirilcromonas”. Tese de mestrado em Química dos Produtos Naturais e Alimentos. Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

-
- [44] Abreu, L., **2013**. “Estudo do poder antioxidante em infusões de ervas utilizadas como chás”. Tese de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) do Brasil.
- [45] Oyaizu, M., **1986**. “Studies of products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction propagated from glucosamine”. *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307-315.
- [46] Fernandes, A.S.F., **2010**. “Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano”. Tese de mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [47] Connor, W.E., **2000**. “Oxidative stress in the brain: novel cellular targets govern survival during neurodegenerative disease”. *Progress in Neurobiology*. 75, 207-246.
- [48] Terry, P.D.; Terry, J.B.; Rohan, T.E., **2004**. “Long-chain (n-3) fatty acid intake and risk of cancers of the breast and prostate: recent epidemiological studies, biological mechanisms, and directions for future research”. *Journal of Nutrition*. 134, S3412-3420.
- [49] Djousse, L.; Arnette, D.K.; Panakow, J.S.; Hopkins, P.N.; Province, M.A.; Ellison, R.C., **2005**. “Dietary linolenic acid is associated with a lower prevalence of hypertension in the NHLBI family heart study”. *Hypertension*. 45, 368-373.
- [50] Zubay, G., **2006**. *Biochemistry*. 5ª edição, Wm. C. Brown Publishers.
- [51] Costa, R.M.; Magalhães, A.S.; Pereira, J.A.; Andrade P.B.; Valentão, P.; Carvalho, M.; Silva, B.M., **2009**. “Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*)”. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 860-865.
- [52] Conforti, F.; Marreli, M.; Statti, F.M.; Uzunov, S.; Menichinni, F., **2012**. “Comparative composition and antioxidant activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Nyman and *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae)”. *Nature Product Research*. 26:1, 91-97.

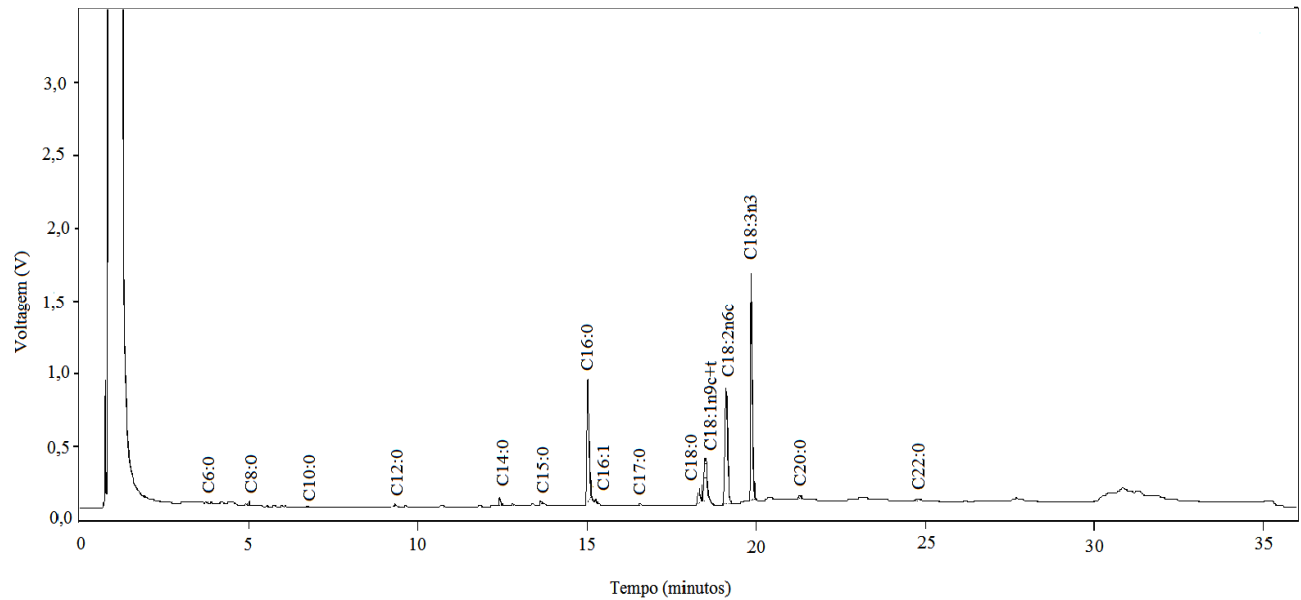
ANEXOS

Cromatograma (GC) - Folha



Anexo 1: Perfil de ácidos gordos, obtido por comatografia gasosa (GC/FID) da amostra da folha da planta *Calamintha baetica*.

Cromatograma (GC) - Caule



Anexo 2: Perfil de ácidos gordos, obtido por comatografia gasosa (GC/FID) da amostra do caule da planta *Calamintha baetica*.