

# POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES DAS Plantas Aromáticas e Medicinais

Curso Teórico-Prático

18 a 22 de Junho 2007





FACULDADE • DE • CIÊNCIAS | UNIVERSIDADE • DE • LISBOA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL



**Editores:**

Ana Cristina da Silva Figueiredo  
José Manuel Gonçalves Barroso  
Luis Manuel Gaspar Pedro

---

**Design gráfico da Capa:** TVMdesigners



## FICHA TÉCNICA

**Título:**

Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático

**Local de Realização:**

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal

**Data:**

18 a 22 de Junho 2007

**3ª Edição**, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, Lisboa, 2007. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal.

---

**Editores:**

Ana Cristina da Silva Figueiredo

José Manuel Gonçalves Barroso

Luis Manuel Gaspar Pedro

---

**Edição:**

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal

---

**Design gráfico da Capa:**

TVMdesigners

---

**Composição, Impressão e Acabamentos:**

Repro2000

---

**Tiragem:**

1ª Edição, Lisboa, Fevereiro de 2006 - 50 exemplares

2ª Edição, Lisboa, Setembro de 2006 - 50 exemplares

3ª Edição, Lisboa, Junho de 2007 - 70 exemplares

---

**ISBN:** 978-972-9348-16-7

**Depósito Legal nº:** 259080/07

Cópias adicionais podem ser obtidas dos Editores: Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Vegetal, C2, Piso 1, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

O conteúdo de cada artigo é da responsabilidade dos respectivos autores



## ÍNDICE

<b>NOTA PRÉVIA</b> .....	<b>VII</b>
<b>INSTITUIÇÃO FORMADORA</b> .....	<b>VIII</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>CALENDARIZAÇÃO</b> .....	<b>IX</b>
SEGUNDA-FEIRA, 18 DE JUNHO .....	IX
TERÇA-FEIRA, 19 DE JUNHO .....	IX
QUARTA-FEIRA, 20 DE JUNHO .....	X
QUINTA-FEIRA, 21 DE JUNHO .....	X
SEXTA-FEIRA, 22 DE JUNHO .....	XI
<b>CONTRIBUIÇÕES</b> .....	<b>XIII</b>
<b>PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS. FACTORES QUE AFECTAM A PRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
FACTORES QUE AFECTAM A PRODUÇÃO .....	2
VARIACÕES FISIOLÓGICAS .....	3
CONDIÇÕES AMBIENTAIS .....	10
VARIACÕES GEOGRÁFICAS .....	12
FACTORES GENÉTICOS E EVOLUÇÃO .....	13
CONDIÇÕES POLÍTICO/SOCIAIS .....	14
QUANTIDADE DE MATERIAL/NECESSIDADE DE ESPAÇO E MÃO-DE-OBRA .....	15
REFERÊNCIAS .....	16
<b>ESTRUTURAS SECRETORAS EM PLANTAS. UMA ABORDAGEM MORFO-ANATÓMICA</b> .....	<b>19</b>
INTRODUÇÃO .....	19
TRICOMAS E EMERGÊNCIAS .....	19
IDIOBLASTOS, CAVIDADES E CANAIS SECRETORES .....	22
LATICÍFEROS .....	26
REFERÊNCIAS .....	26
<b>ASPECTOS LEGAIS DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS</b> .....	<b>29</b>
INTRODUÇÃO .....	29
SITUAÇÃO ACTUAL .....	29
LEGISLAÇÃO COMUNITÁRIA RELATIVA AOS MEDICAMENTOS DE USO HUMANO .....	30
Medicamentos tradicionais à base de plantas .....	31
Definições .....	32
Registo de utilização tradicional .....	32
Causas de recusa de autorização .....	33
Rotulagem e folheto informativo .....	34
Publicidade .....	34
Comité dos Medicamentos à Base de Plantas .....	34
Transposição nacional .....	35
REFERÊNCIAS .....	35
ANEXO I .....	35
<b>O GÉNERO <i>HYPERICUM</i> L. EM PORTUGAL</b> .....	<b>36</b>
RESUMO .....	36
INTRODUÇÃO .....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
Material estudado .....	37
Análises químicas e tratamento dos dados .....	37
Extracção .....	37
Análise química .....	37
Análise multivariada .....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
REFERÊNCIAS .....	45



<b>ÓLEOS ESSENCIAIS: A NORMALIZAÇÃO E A SUA IMPORTÂNCIA NO ÂMBITO DO REGULAMENTO REACH .....</b>	<b>72</b>
INTRODUÇÃO .....	72
NORMALIZAÇÃO .....	72
O REGULAMENTO REACH E OS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	74
A IDENTIFICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO ÂMBITO DO REACH .....	76
CONCLUSÕES .....	78
REFERÊNCIAS .....	79
<b>DESTILAÇÃO INDUSTRIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS .....</b>	<b>80</b>
FUNDAMENTOS NA DESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS .....	80
Introdução .....	80
A destilação com vapor de água .....	81
A pressão de vapor de um líquido puro .....	81
Misturas de compostos solúveis e insolúveis .....	82
O papel da energia na destilação .....	83
Modelo para a destilação de óleos localizados superficialmente .....	84
Estabelecimento de uma base de comparação de ensaios de destilação .....	86
Instante inicial .....	87
O instante final .....	87
Altura da carga .....	87
Estimativa do conteúdo total de óleo na carga .....	87
EXEMPLO DE APLICAÇÃO .....	88
EQUIPAMENTOS E PROCESSAMENTO EM INSTALAÇÕES INDUSTRIAIS .....	90
Cultivo da planta .....	90
Colheita .....	90
Transporte da planta .....	91
Armazenagem do material antes da destilação .....	91
Destilação .....	91
Condensação e separação do sistema água-óleo .....	94
Embalagem e armazenamento dos óleos .....	94
REFERÊNCIAS .....	95
<b>PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS E BIOLOGIA MOLECULAR .....</b>	<b>96</b>
CONCEITO DE MARCADOR: MORFOLÓGICO VS MOLECULAR .....	96
APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES .....	96
Construção de mapas genéticos de <i>linkage</i> .....	96
Análise de mapeamento comparativo .....	97
Conhecimento da variação natural .....	97
Identificação de genes economicamente importantes .....	97
Seleção assistida por marcadores .....	97
CLASSIFICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES .....	97
Isoenzimas .....	98
Polimorfismos baseados em hibridização .....	98
Polimorfismos baseados no PCR .....	98
CARACTERÍSTICAS DE UM MARCADOR MOLECULAR .....	101
IMPORTÂNCIA RELATIVA DOS MARCADORES .....	101
PAM E BIOLOGIA MOLECULAR .....	101
BIBLIOGRAFIA .....	102
ANEXO I .....	104
Protocolo de extracção e isolamento de DNA .....	104
Quantificação do DNA .....	104
Reacção de RAPDs .....	104
Preparação de um gel de agarose .....	104
Carregamento do gel de agarose com produtos RAPDs .....	105
Análise de dados .....	105

<b>PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS: MÉTODOS DE ANÁLISE.....</b>	<b>106</b>
OXIDAÇÃO E ANTIOXIDANTES: CONCEITOS GERAIS .....	106
ESPÉCIES REACTIVAS OXIGENADAS.....	108
OUTROS RADICAIS LIVRES.....	110
ORIGEM E EFEITOS BIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES.....	111
DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	113
Métodos que se baseiam na transferência de um hidrogénio .....	114
“Oxygen radical absorbance capacity” (ORAC) .....	114
“Total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP) .....	115
Métodos que se baseiam na transferência de um electrão .....	116
Quantificação dos fenóis totais pelo reagente Folin-Ciocalteu .....	116
“Trolox equivalent antioxidant capacity” (TEAC) ou método ABTS.....	117
Método DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine) .....	117
“Ferric ion reducing antioxidant power” (FRAP) .....	118
Método da capacidade de redução do Cu(II).....	118
Método do DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	118
Ensaio para a detecção da captação de radicais livres .....	119
Captação de espécies reactivas oxigenadas e nitrogenadas .....	119
Captação do radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ).....	119
Captação do radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) .....	120
Captação de peróxido de hidrogénio.....	121
Captação de oxigénio singleto .....	122
Captação do óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ).....	122
Captação de peroxinitrito .....	122
Avaliação da capacidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica .....	123
ANÁLISE DOS SUBSTRATOS DE OXIDAÇÃO .....	125
Medição do consumo de oxigénio .....	125
Doseamento dos ácidos gordos não oxidados residuais .....	125
Análise de peróxidos .....	125
Medição do índice de peróxidos (IP) .....	125
Método iodométrico.....	125
Método colorimétrico.....	126
Outros métodos .....	126
Análise dos produtos secundários da oxidação .....	127
Análise dos compostos aldeídicos.....	127
Teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) .....	127
Índice de p-anisidina (IpA) .....	127
Dosagem dos compostos voláteis .....	128
Outros métodos (Teste do $\beta$ -caroteno-ácido linoleico).....	128
Influência do meio no comportamento dos antioxidantes.....	128
ANTIOXIDANTES NATURAIS .....	129
Plantas aromáticas.....	129
REFERÊNCIAS .....	131
<b>ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA .....</b>	<b>137</b>
AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	137
Efeito microbiostático ou microbicida .....	137
Cinética da acção antimicrobiana.....	137
Factores que influenciam a avaliação da actividade antimicrobiana .....	138
A técnica de ensaio .....	139
O microrganismo teste.....	140
O meio de cultura e o valor do pH .....	141
Interações entre os componentes dos óleos essenciais.....	141
Alvos celulares .....	142
Avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais em sistemas alimentares .....	142
REFERÊNCIAS .....	143

<b>WINE AROMATISATION.....</b>	<b>147</b>
SOME OFFICIAL DEFINITIONS AND LEGISLATIVE NOTES ABOUT WINE AROMATISATION .....	147
VERMOUTHS .....	147
History .....	148
Vermouth definitions .....	148
Ingredients .....	148
Wine .....	148
Alcohol .....	149
Sugars .....	149
Caramel .....	149
Botanicals .....	149
The quality control of botanicals .....	149
The botanicals mixtures (recipes) .....	151
The botanical extracts .....	151
Techniques applied for extracts/distillates production .....	151
VERMOUTH PRODUCTION PROCESS .....	153
Base-wine blend .....	153
Blending the ingredients .....	153
Stabilisation .....	153
Analysis .....	153
REFERENCES .....	153
<b>PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS (PAM'S). PRODUÇÃO, TRANSFORMAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO.....</b>	<b>155</b>
INTRODUÇÃO HISTÓRICA .....	155
PRODUÇÃO DE PAM'S .....	155
TRANSFORMAÇÃO DE PAM'S .....	156
COMERCIALIZAÇÃO DE PAM'S .....	156
AROMATERAPIA .....	157
Definição de Aromaterapia .....	157
Óleos Essenciais .....	157
Principais Aplicações dos Óleos Essenciais .....	157
<b>O ECOTURISMO E AS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS .....</b>	<b>158</b>
REFERÊNCIAS .....	161
<b>ECOTURISMO (OU) OS NOVOS ECOS DO TURISMO .....</b>	<b>163</b>
PRESSUPOSTOS PARA O ENTENDIMENTO DO PARADIGMA DOMINANTE DO DESENVOLVIMENTO TURÍSTICO .....	163
O (DES)ENVOLVIMENTO TURÍSTICO: A EMERGÊNCIA DO MODELO TURÍSTICO ALTERNATIVO. (PRESSUPOSTOS PARA O ENTENDIMENTO DO PARADIGMA EMERGENTE) .....	164
ECOTURISMO: DEFINIÇÕES E CONCEITOS .....	164
O ECOTURISMO, O AMBIENTE E AS COMUNIDADES LOCAIS .....	166
O ECOTURISMO, AS COMUNIDADES LOCAIS E AS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS (PAM).....	166
REFERÊNCIAS .....	167
<b>ESTUDO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS.....</b>	<b>168</b>
METODOLOGIA EM ETNOBOTÂNICA .....	170
CONTRIBUTO PARA O ESTUDO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS NO PARQUE NATURAL DA SERRA DE S. MAMEDE .....	173
CONTRIBUTO PARA O ESTUDO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS NA ÁREA PROTEGIDA DA SERRA DO AÇOR .....	173
RECOLHA DOS "SABER-FAZER" TRADICIONAIS DAS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS: CONCELHOS DE ALJEZUR, LAGOS E VILA DO BISPO .....	173
REFERÊNCIAS .....	173

---

<b>PLANTAS MEDICINAIS DA PENÍNSULA DE SETÚBAL. CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA SUA RELEVÂNCIA ETNOBOTÂNICA.....</b>	<b>175</b>
RESUMO .....	175
INTRODUÇÃO .....	175
ENQUADRAMENTO GEOGRÁFICO .....	176
METODOLOGIA .....	176
Recolha de dados (entrevistas).....	176
Construção de uma base de dados.....	177
Atribuição de correspondências entre as designações populares locais das plantas e a nomenclatura botânica.....	177
Colheita, identificação e herborização das plantas indicadas por informantes seleccionados .....	177
Tratamento dos dados recolhidos .....	177
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	178
Análises descritivas e quantitativas .....	178
Perfil dos Informantes.....	178
Plantas.....	178
Análise das correspondências e classificação automática .....	179
Informantes.....	179
Plantas.....	179
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	180
REFERÊNCIAS .....	181
<b>FORMADORES .....</b>	<b>183</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO.....</b>	<b>187</b>
<b>COM O APOIO DE.....</b>	<b>195</b>

---

## NOTA PRÉVIA

As plantas aromáticas e medicinais fazem parte do nosso dia-a-dia, como alimento, mézinha, sob a forma de cosmético e/ou pelo seu aroma. Constituindo um recurso natural de valor ímpar, urge conhecê-las, saber valorizá-las e utilizá-las de uma forma sustentada.

Em Portugal, como no resto do Mundo, tem-se assistido, nos últimos anos, a um ressurgir da vontade de consumir o que é natural. Contudo, muito daquele que era um inestimável saber e saber-fazer popular sobre plantas e produtos naturais foi-se, simultaneamente, perdendo, num período de tempo em que pouco se valorizou este conhecimento e em que a forma de vida ao tornar-se mais citadina, perdeu muito destes valores.

Ainda assim, ao longo de vários anos, muitas Instituições Nacionais foram desenvolvendo inúmeros trabalhos sobre plantas aromáticas e medicinais, acumulando uma mais-valia preciosa de conhecimento em várias vertentes deste domínio. Este Curso nasceu da vontade de divulgar à comunidade em geral, o muito do que tem sido feito em muitas destas Instituições sobre esta temática. Conscientes de que os assuntos a abordar não se esgotam aqui e que muito fica ainda por abranger, esperamos que este Curso seja oportuno e útil e constitua um valioso acervo de informação para todos quantos se interessam, ou convivem diariamente, directa ou indirectamente, com plantas aromáticas e medicinais.

A Comissão Organizadora

(Nota Prévia da 1ª e 2ª Edição)

---

## **INSTITUIÇÃO FORMADORA**

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)

### **Com a colaboração de:**

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve (FERN)

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC)

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas (INETI)

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED)

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril (ESHTE)

Segredo da Planta – Produtos Naturais e Biológicos, Lda. Em conjunto com Green Planet – Produtos Biológicos, Lda

Socidestilda – Sociedade Portuguesa de Destilação de Óleos Essenciais, Lda.

Bacardi-Martini Portugal

## **AGRADECIMENTOS**

Os Editores desejam expressar o seu sincero agradecimento às seguintes entidades, pelo apoio e interesse manifestado durante o desenvolvimento deste Curso, pelas generosas ofertas aos participantes e igualmente pelas condições materiais postas à disposição, sem as quais este trabalho não teria sido possível:

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)

Bacardi-Martini Portugal

Segredo da Planta – Produtos Naturais e Biológicos, Lda. em conjunto com Green Planet – Produtos Biológicos, Lda

Chocolates Avianense

AchBrito

Gorreana

Estética Viva

Izasa

Repro 2000

Uma palavra particular de agradecimento pela disponibilidade e colaboração na formação ao:

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas (INETI)

e às firmas:

Bacardi-Martini Portugal

Socidestilda – Sociedade Portuguesa de Destilação de Óleos Essenciais, Lda.

Segredo da Planta – Produtos Naturais e Biológicos, Lda. em conjunto com Green Planet – Produtos Biológicos, Lda

Os autores agradecem ao Instituto de Financiamento e Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura e Pescas (IFADAP), o apoio simbólico concedido no âmbito do 3º ano do Projecto de Investigação AGRO 800.

À Divisão de Informação da FCUL o nosso agradecimento pela sempre pronta colaboração na divulgação do Curso. À TVMDesigners um sincero obrigada pela sua disponibilidade e apoio constante e, bem assim, pelo design gráfico do Curso.

Finalmente, o nosso obrigado aos colegas que conosco colaboraram neste Curso e a todos quantos de algum modo contribuíram para a sua realização.

---

## CALENDARIZAÇÃO

### SEGUNDA-FEIRA, 18 DE JUNHO

8.30 - 9.00	<i>Recepção e entrega de documentação</i>	
9.00 - 10.00	<b>Plantas Aromáticas e Medicinais (PAM). Factores que afectam a produção</b> <i>Prof. Dr Ana Cristina Figueiredo, FCUL</i>	Sala 2.2.12
10.00 - 10.30	<i>Pausa para café</i>	
10.30 - 11.30	<b>Estruturas secretoras em PAM</b> <i>Prof. Dra Lia Ascensão, FCUL</i>	Sala 2.2.12
11.30 - 12.30	<b>Legislação e PAM</b> <i>Dra Paula Martins, INFARMED</i>	Sala 2.2.12
12.30 - 14.00	<i>Almoço</i>	
14.00 - 16.30	<b>Observação de estruturas secretoras em PAM</b> <i>Prof. Dra Lia Ascensão, FCUL</i>	CME, Politécnica
16.30 - 17.00	<i>Pausa para café</i>	
17.00 - 19.00	<b>Observação de estruturas secretoras em PAM</b> <i>Prof. Dra Lia Ascensão, FCUL</i> <i>Em simultâneo com (os participantes serão divididos em 2 grupos)</i>	CME, Politécnica
14.00 - 16.30	<b>Extracção, análise e quantificação de óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Ana Cristina Figueiredo, Prof. Dr Luis Pedro, FCUL</i>	C2, sala 2.1.18A
16.30 - 17.00	<i>Pausa para café</i>	
17.00 - 19.00	<b>Extracção, análise e quantificação de óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Ana Cristina Figueiredo, Prof. Dr Luis Pedro, FCUL</i>	C2, sala 2.1.18A

### TERÇA-FEIRA, 19 DE JUNHO

9.00 - 10.00	<b>O género <i>Hypericum</i> em Portugal</b> <i>Dra Teresa Nogueira, INETI</i>	Sala 2.2.12
10.00 - 10.30	<i>Pausa para café</i>	
10.30 - 11.30	<b>O género <i>Thymus</i> em Portugal</b> <i>Prof. Dra Lígia Salgueiro, FFUC</i>	Sala 2.2.12
11.30 - 12.30	<b>PAM em farmácia e medicina</b> <i>Prof. Dr Carlos Cavaleiro, FFUC</i>	Sala 2.2.12
12.30 - 14.00	<i>Almoço</i>	
14.00 - 16.30	<b>Observação de estruturas secretoras em PAM</b> <i>Prof. Dra Lia Ascensão, FCUL</i>	CME, Politécnica
16.30 - 17.00	<i>Pausa para café</i>	
17.00 - 19.00	<b>Observação de estruturas secretoras em PAM</b> <i>Prof. Dra Lia Ascensão, FCUL</i> <i>Em simultâneo com (os participantes serão divididos em 2 grupos)</i>	CME, Politécnica

14.00 – 16.30	<b>Extracção, análise e quantificação de óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Ana Cristina Figueiredo, Prof. Dr Luis Pedro, FCUL</i>	C2, sala 2.1.18A
16.30 – 17.00	<i>Pausa para café</i>	
17.00 – 19.00	<b>Extracção, análise e quantificação de óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Ana Cristina Figueiredo, Prof. Dr Luis Pedro, FCUL</i>	C2, sala 2.1.18A

**QUARTA-FEIRA, 20 DE JUNHO**

9.00 – 10.00	<b>Boas práticas de cultura, colheita e conservação após colheita</b> <i>Dra Teresa Nogueira, INETI</i>	INETI
10.00 – 10.30	<i>Pausa para café</i>	
10.30 – 12.30	<b>Extracção industrial de óleos essenciais</b> <i>Eng. João Lourenço, INETI</i>	INETI
12.30 – 14.30	<i>Almoço</i>	
14.30 – 15.30	<b>PAM e biologia molecular</b> <i>Prof. Dra Helena Trindade, FCUL</i>	Sala 2.2.12
15.30 – 16.00	<i>Pausa para café</i>	
16.00 – 19.00	<b>Análise molecular de PAM</b> <i>Prof. Dra Helena Trindade, FCUL</i>	C2, sala 2.1.17

**QUINTA-FEIRA, 21 DE JUNHO**

9.00 – 10.00	<b>Actividade antioxidante de PAM</b> <i>Prof. Dra Graça Miguel, FERN</i>	Sala 2.2.12
10.00 – 10.30	<i>Pausa para café</i>	
10.30 – 11.30	<b>Actividade antimicrobiana de PAM</b> <i>Prof. Dra Leonor Faleiro, FERN</i>	Sala 2.2.12
11.30 – 12.30	<b>A aromatização de vinhos</b> <i>Eng. Ivano Tonutti, Bacardi-Martini</i>	Sala 2.2.12
12.30 – 14.00	<i>Almoço</i>	
14.00 – 16.30	<b>Determinação de actividade antioxidante dos óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Graça Miguel, FERN</i>	C2, sala 2.1.18
16.30 – 17.00	<i>Pausa para café</i>	
17.00 – 19.00	<b>Determinação de actividade antimicrobiana dos óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Leonor Faleiro, FERN</i>	C2, sala 2.1.19
	<i>Em simultâneo com (os participantes serão divididos em 2 grupos)</i>	
14.00 – 16.30	<b>Determinação de actividade antimicrobiana dos óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Leonor Faleiro, FERN</i>	C2, sala 2.1.18
16.30 – 17.00	<i>Pausa para café</i>	
17.00 – 19.00	<b>Determinação de actividade antioxidante dos óleos essenciais</b> <i>Prof. Dra Graça Miguel, FERN</i>	C2, sala 2.1.19

**SEXTA-FEIRA, 22 DE JUNHO**

8.30 - 9.00	<i>Deslocação</i>	
9.00 – 12.30	<b>Visita a unidade de destilação industrial de óleos essenciais biológicos e a unidade industrial de transformação de PAM's</b> <i>Socidestilda, Segredo da Planta</i>	
12.30 – 14.30	<i>Almoço</i>	
14.30 – 15.30	<b>Ecoturismo e PAM</b> <i>Dra Catarina Meireles e Dr Fernando Completo</i>	Sala 2.2.12
15.30 – 16.00	<b>Observação de Resultados</b> <i>Prof. Dra Graça Miguel, FERN / Prof. Dra Leonor Faleiro, FERN</i>	C2, sala 2.1.18
16.00 – 16.30	<i>Pausa para café / Mostra de produtos da Herdade de Vale Côvo e de programas da Nature &amp; Nature</i>	
16.30 – 17.30	<b>Estudo etnobotânico das PAM</b> <i>Mestre Joana Camejo</i>	Sala 2.2.12
17.30 – 18.30	<b>Etnobotânica da plantas medicinais da Península de Setúbal</b> <i>Lic. Sara Santos</i>	Sala 2.2.12
18.30 – 19.00	<b>Conclusões e Encerramento</b>	Sala 2.2.12



CONTRIBUIÇÕES





## PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS. Factores que afectam a produção\*

A. C. Figueiredo, J. G. Barroso e L. G. Pedro

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

Além de nos fornecerem oxigénio, alimento, roupa, perfumes e materiais de base para inúmeros processos químicos, as plantas são uma fonte de grande diversidade de compostos de aplicação medicinal e farmacêutica. Nas últimas décadas tem havido um ressurgimento do interesse na medicina popular e de como esta prática se pode conjugar com a medicina tradicional. A mesma busca do que é natural é igualmente observada nas indústrias alimentares e de aromas.

A procura de substâncias naturais, biologicamente activas, tem encorajado a utilização, entre outros, dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos e antioxidantes em alimentos. Para tal, contribuiu o facto de os óleos essenciais aliarem o seu papel aromatizante a: 1) serem produtos naturais e biodegradáveis, 2) apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos, 3) poderem desempenhar, simultaneamente, as funções de mais do que um dos seus equivalentes sintéticos. Além destas propriedades, os óleos essenciais podem ainda ser utilizados na protecção de culturas agrícolas, contra doenças e pragas, com a vantagem de não se acumularem no ambiente e terem um largo espectro de acção, o que diminui o risco de desenvolvimento de estirpes patogénicas resistentes.

Muitos destas substâncias naturais são extraídas das plantas sob a forma de extractos mais ou menos complexos. Mais raramente as substâncias isoladas são utilizadas na síntese ou semi-síntese de outros compostos. Muitas vezes um mesmo principio activo pode ser extraído de diferentes plantas. A escolha é feita, tendo em mente, entre outros, o ciclo de vida da planta, o rendimento de extracção, a natureza dos compostos, o custo da planta, o custo de manutenção e a ausência de compostos tóxicos.

Os óleos essenciais, aroma ou essência, são os princípios odoríferos voláteis, produzidos pelas plantas, e utilizados desde a antiguidade, não só pelas suas propriedades medicinais mas também pela sua importância na indústria de perfumes e sabores. Os óleos essenciais, que podem ser isolados por destilação, pressão ou extracção por solventes, mantêm-se, normalmente, líquidos à temperatura ambiente, não são miscíveis com a água, mas miscíveis com solventes orgânicos. Os óleos essenciais são, regra geral, uma mistura de compostos com características físico-químicas próprias que, combinados, conferem ao óleo um odor particular. O diferente aroma dos óleos deve-se, fundamentalmente, às variações de volatilidade e da concentração relativa dos seus constituintes. Os óleos essenciais, maioritariamente constituídos por substâncias de natureza terpénica (mono-, sequi- e diterpenos), estão entre os compostos mais valiosos produzidos pelas plantas, Tabela 1, a par dos alcalóides e das substâncias fenólicas, algumas das quais fazem igualmente parte dos óleos essenciais (fenilpropanóides), Fig. 1.

A Flora Portuguesa é, neste contexto, particularmente importante pela sua riqueza em espécies aromáticas e medicinais. Na realidade, das cerca de 3800 espécies que compõem a cobertura vegetal do Continente, Açores e Madeira, cerca de 500 são aromáticas e/ou medicinais, podendo, parte delas, constituir uma alternativa para sistemas agrícolas sustentáveis ou para a rentabilização de terrenos marginais para a agricultura. Estas espécies distribuem-se maioritariamente pelas famílias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Mirtaceae, Oleaceae, Liliaceae, Rosaceae, Leguminosae, Rutaceae, Hipericaeae, Pinaceae, Cupressaceae, Lauraceae e Malvaceae. Acresce que algumas destas espécies constituem endemismos, por vezes com nichos ecológicos muito vulneráveis. A conservação desta diversidade biológica, actualmente indissociável da sua utilização sustentada, contribuiria para a fixação das populações no seu

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 1-18, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

"habitat" tradicional, única forma de sustentar a tendência actual de agravamento de um dos fenómenos mais preocupantes que afectam o território nacional continental, a desertificação.

O reconhecimento de espécies potencialmente utilizáveis pelos produtores pode contribuir para uma gestão mais equilibrada do espaço rural, incentivando a conservação do património florestal e potenciando a sua influência ambiental, em particular no que respeita à protecção de recursos hídricos, à limitação de fenómenos de erosão e à salvaguarda da biodiversidade.

Tabela 1. Exemplos de substâncias, derivadas das plantas, com interesse comercial.

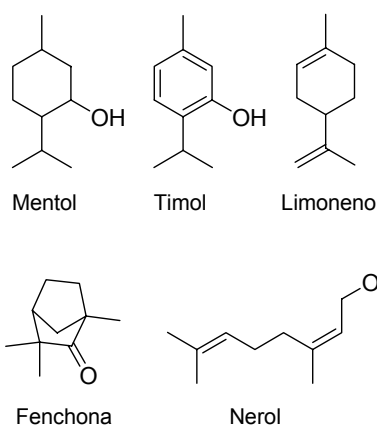
Grupo Químico	Composto	Espécie	Utilização Industrial
<b>Alcalóides</b>	Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
	Lobelina	<i>Lobelia inflata</i>	Estimulante respiratório
	Quinino	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antimalária, agentes amargos
	Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Dilatação da pupila e outros usos oftálmicos
	Hiosciamina	<i>Datura stramonium</i>	Anticolinérgico
	Escopolamina	<i>Datura stramonium</i> <i>Duboisia myoporoides</i>	Antihipertensor, tratamento de doenças motoras
	Vincristina, Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antileucémico
<b>Terpenos</b>	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Contraceptivos
	Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
	Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	Tónico
	Isoprenóides	<i>Hevea brasiliensis</i>	Borracha
	Jasmonatos	<i>Jasminum sp.</i>	Perfume
	Piretrinas	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Insecticida
	Valepotriatos	<i>Valeriana officinalis</i>	Carminativo, anti-espasmódico
<b>Fenóis</b>	Betacianina, Betaxantina	<i>Beta vulgaris</i>	Pigmentos
	Antocianinas	<i>Hibiscus sp.</i>	Pigmentos
	Xiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Pigmento anti-inflamatório
	Taumatina	<i>Thaumatococcus danielli</i>	Edulcorante
<b>Polissacáridos</b>	Goma e mucilagens	<i>Acacia sp., Astragalus sp., Sterculia sp.</i>	Gomas
	Amidos	<i>Zea mays, Oryza sativa, Triticum aestivum, Solanum tuberosum</i>	Uso farmacêutico
	Fibras	<i>Gossypium sp., Corchorus sp., Linum usitatissimum, Cannabis sativa</i>	Fibras para vestuário e uso medicinal
	Fructanas	<i>Inula helenium, Helianthus tuberosus, Cichorium intibus</i>	Inulina
<b>Lípidos</b>	Óleos e gorduras	<i>Prunus amygdalus, Arachis hypogaea</i>	Uso farmacêutico, óleos alimentares
<b>Proteínas</b>	Papaína	<i>Carica papaya</i>	Proteases

## FACTORES QUE AFECTAM A PRODUÇÃO

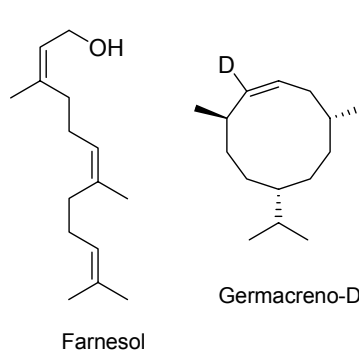
Os aromatizantes sempre tiveram um papel diversificado e sofisticado: a maceração de absinto na aromatização dos vinhos Hebreus; ou a utilização de figos e rosas nos vinhos Persas e Assírios; o desenvolvimento do comércio das especiarias pelos Gregos e Romanos. Para lá das virtudes odoríferas está o seu valor litúrgico: as carnes grelhadas fumadas eram consideradas a cozinha dos Deuses. Conhecido desde o Neolítico, o mel é um dos aromatizantes que mantém

ainda hoje toda a sua importância, em particular nas civilizações orientais. De igual modo o lúpulo tem acompanhado o fabrico da cerveja, até aos nossos dias. Várias espécies de milefólio têm sido igualmente utilizadas no fabrico de licores. Desde há muito que se reconhece às especiarias, para além das suas propriedades organolépticas, a actividade preservante dos alimentos. O cravo-da-índia, a canela, o alho, o tomilho, os orégãos, o aníz e a segurelha estão entre algumas das especiarias que retardam, reduzem ou inibem o crescimento de diversos fungos e impedem a produção de aflatoxinas ou outras micotoxinas.

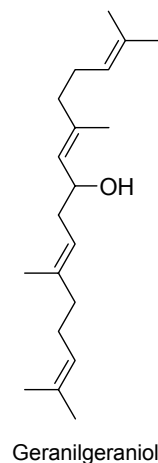
#### ❖ Monoterpenos



#### ❖ Sesquiterpenos



#### ❖ Diterpenos



#### ❖ Fenilpropanóides



#### ❖ Poliacetilenos

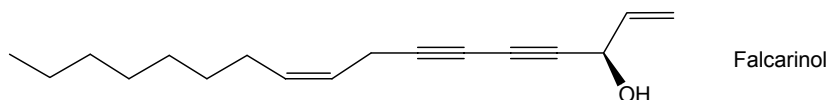


Fig. 1. Exemplos de constituintes dos óleos essenciais.

Na natureza existem, contudo, vários factores que limitam uma produção homogénea e continuada de metabolitos de origem vegetal, Tabela 2, e que fazem com que a indústria procure vias alternativas de obter os mesmos compostos.

### VARIAÇÕES FISIOLÓGICAS

O estágio de desenvolvimento do órgão (ontogenia foliar, floral e do fruto) é, muitas vezes, determinante no rendimento e na composição do óleo essencial (para exemplos vários *vide* Figueiredo *et al.* 1997, Badalamenti 2004). Em muitos casos ocorre um aumento do rendimento em óleo da fase de botão floral para a flor madura, em simultâneo com uma alteração da composição química do óleo, sendo que alguns componentes podem variar de vestigiais a 10% nas fases iniciais, a 50-70% quando o órgão está completamente desenvolvido. Noutros casos, o óleo acumula-se muito antes da completa expansão foliar ou do completo desenvolvimento do órgão. Em *Ocimum* verificou-se que a concentração relativa de eugenol e metileugenol diminuiu com o desenvolvimento das folhas, o que, segundo os autores, podia ser explicado pela utilização destes compostos na síntese de lenhina (Dey e Choudhuri 1983). Segundo Máñez *et al.* (1991) a alteração da composição do óleo essencial com a maturação do órgão está intimamente

relacionada com as vias biossintéticas conducentes a uma maior ciclização e desidratação dos componentes do óleo.

As variações diurnas da composição e/ou rendimento em óleo essencial, bem como a alteração da sua composição com o desenvolvimento do órgão, ou da planta, têm sido consideradas por vários autores como um processo normal do catabolismo terpénico. Enquanto no caso das variações diurnas o catabolismo terpénico depende da fotossíntese e da utilização dos seus produtos, nas variações associadas ao desenvolvimento, o conteúdo de monoterpenos diminui, como resultado da utilização de substâncias acumuladas. A análise de dois sistemas modelo (*Mentha piperita* e *Salvia officinalis*) revelou que o catabolismo dos terpenos passa pela formação de derivados glicosilados que são transportados para as raízes onde são utilizados na biossíntese de lípidos (Croteau 1987).

Tabela 2: Factores que afectam a produção e a composição de metabolitos de origem vegetal (adaptado de Figueiredo *et al.* 1997).

❖ Variações fisiológicas
Desenvolvimento do órgão
Ciclo de actividade do polinizador
Tipo de material (folhas, flores, etc.)
Tipo de estrutura secretora
Variação sazonal
Estímulo mecânico ou químico
❖ Condições ambientais
Clima
Pestes
Armazenamento
Factores edáficos
Stress hídrico e método de irrigação
❖ Variações geográficas
❖ Factores genéticos e evolução
❖ Condições político / sociais
❖ Quantidade de material / Necessidade de espaço e mão-de-obra

Os óleos essenciais isolados, durante as diferentes fases do seu desenvolvimento, das flores de *Achillea millefolium*, colhidas no Jardim Canecão de Almada, Fig. 2, possuíam uma coloração diferente consoante a fase de desenvolvimento das mesmas: azul nas flores fechadas (FF), azul-esverdeado nas flores jovens (FJ), castanho-amarelado nas flores abertas (FA) e amarelo-claro-acastanhado nas flores secas (FS). Esta variação de coloração reflecte um decréscimo da percentagem relativa de camazuleno no óleo essencial, com a maturação da flor, Fig. 3. No que diz respeito aos componentes dominantes dos óleos, as concentrações relativas de cânfora e de 1,8-cineole aumentaram com a maturação das flores, observando-se o comportamento inverso para o  $\beta$ -pineno, Fig. 3, (Figueiredo *et al.* 1992a).

À excepção das flores ornitófilas, a maioria das flores apresenta algum tipo de odor. Além do estímulo visual, os odores são a forma mais importante de atracção e orientação de polinizadores, em particular dos insectos nocturnos. O tipo de odor permite discriminar as flores e desencadear o processo polinizador, sendo que a emissão de voláteis atinge, muitas vezes, o seu máximo aquando da maturação do pólen, isto é, quando a flor está pronta para a polinização. Neste aspecto, as orquídeas constituem um dos exemplos de sistemas altamente especializados em que há produção de feromonas. Elas crescem predominantemente na zona mediterrânica, e os seus polinizadores são sobretudo abelhas. O 1,8-cineole, constituinte de 60 % dos odores de algumas orquídeas, revelou ser o composto que mais espécies de abelhas polinizadoras atraía (70 %) (Dodson *et al.* 1969). Comparativamente, compostos como o eugenol, salicilato de metilo e cinamato de metilo atraíam menor número de espécies. Combinações destes compostos nas proporções encontradas na fragrância das orquídeas atraíam o mesmo tipo de abelhas que o odor natural. Outros exemplos em que as feromonas e os voláteis das flores afectam o comportamento dos insectos, são os de *Cassia fistulosa* (Leguminosae) e de *Zieria smithii* (Rutaceae). Tem sido

proposta a utilização destas plantas como armadilhas em programas de luta biológica, pois elas produzem grandes quantidades de metileugenol, composto que atrai a mosca da fruta (*Daucus dorsalis*), praga muito frequente em pomares (referências in Figueiredo *et al.* 1997).

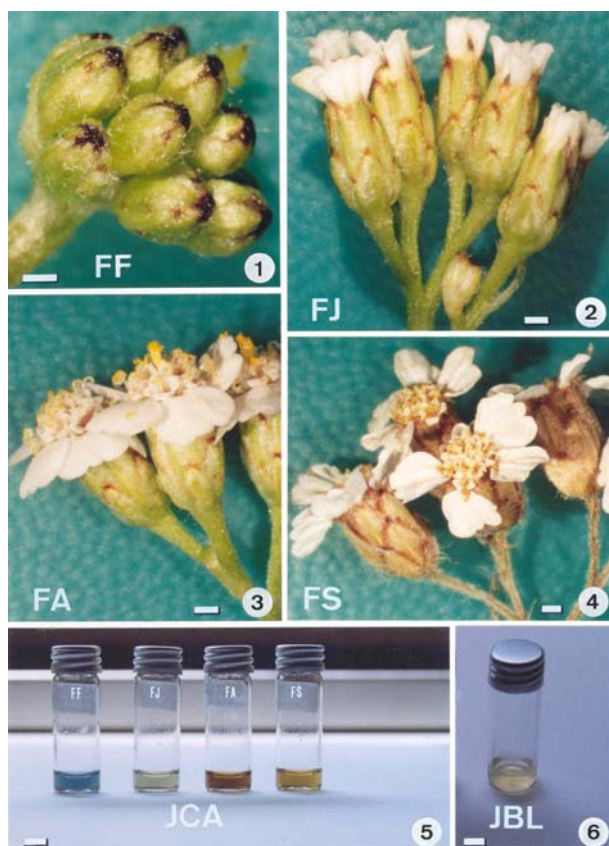


Fig. 2. (1-4): Aspecto dos diferentes estádios de desenvolvimento das inflorescências de *A. millefolium* utilizados no isolamento dos óleos essenciais. 1: Flores fechadas (FF); 2: Flores jovens (FJ); 3: Flores abertas (FA); 4: Flores secas (FS). (5-6): Coloração dos óleos essenciais isolados das inflorescências colhidas no Jardim Canecão de Almada (JCA) (5) e no Jardim Botânico de Lisboa (JBL) (6), em diferentes estádios de desenvolvimento (Figueiredo 1992).

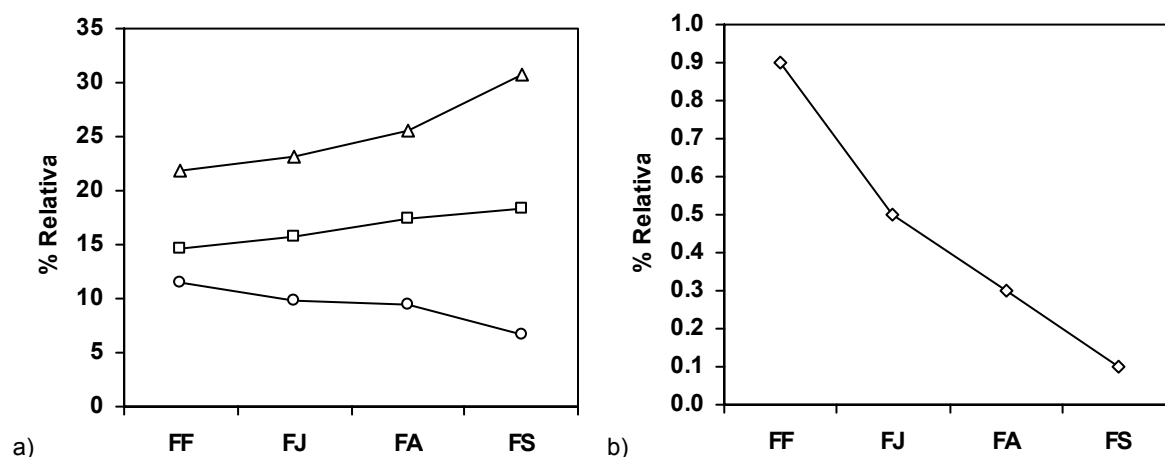


Fig. 3. a) Variação da concentração do  $\beta$ -pineno (—○—), do 1,8-cineole (—□—) e da cânfora (—△—) e b) camazuleno (—◇—) durante o desenvolvimento das flores de *A. millefolium*, colhidas no Jardim Canecão de Almada (adaptado de Figueiredo *et al.* 1992).

As flores de algumas espécies de Orquídeas mimetizam as fêmeas receptoras de, normalmente, apenas uma espécie de polinizador (mimetismo de Pouyanne), Fig. 4. Os machos são atraídos pela forma e pelo odor da flor e transferem as polinídias durante a chamada pseudo-cópula com a flor. A título de exemplo, refira-se que a *Ophrys sphegodes* produz os mesmos

compostos, e na mesma proporção relativa, que se encontram nas feromonas sexuais do seu polinizador, a abelha *Andrena nigroaenea*, Tabela 3. Estas flores emitem quantidades mínimas de voláteis. Esta orquídea é conhecida como orquídea aranha e distribui-se no Mediterrâneo e Europa Central. A inflorescência possui 2 a 6 flores e é polinizada especificamente por machos de *Andrena nigroaenea*. Interessante é também o facto de o odor mudar após a polinização, com uma diminuição do rendimento e da composição dos voláteis emitidos. Mais ainda, aumenta a produção de um composto, vestigial até então, (farnesil hexanoato) que se sabe inibir a cópula quando presente em grande quantidade na cutícula da fêmea. Como outras alterações morfológicas que ocorrem na pós-polinização, a cessação da emissão de voláteis serve duas funções básicas. Primeiro, poupam-se recursos, já que a síntese de voláteis é um processo em que se consome muita energia. Segundo, se a planta possui mais de uma flor, reduzir a atracção para as flores já polinizadas direcciona os polinizadores para as flores não polinizadas, o que aumenta o sucesso da polinização (Schiestl *et al.* 1999, 2000).



Fig. 4. *Ophrys sphegodes*.

Tabela 3. Comparação da composição dos voláteis emitidos pela orquídea *Ophrys sphegodes* e as feromonas sexuais do seu polinizador, a abelha *Andrena nigroaenea* (adaptado de Schiestl *et al.* 1999 e Schiestl *et al.* 2000).

Composto (%)	<i>Ophrys</i>	<i>Andrena</i> ♀
Tricosano	31	29
Pentacosano	20	35
11 + 12-Heptacoseno	6	1
9-Heptacoseno	8	5
Heptacosano	12	11
12 + 11-Nonacoseno	7	4
9-Nonacoseno	9	7

Um outro exemplo da adaptação da emissão de voláteis com o ciclo de vida do polinizador é o observado com a madressilva (*Lonicera japonica*), Fig. 5, conhecida pelo seu aroma semelhante a jasmim e a flores de laranjeira, mais intenso ao fim do dia. Ikeda *et al.* (1994) demonstraram a variação da composição de voláteis da madressilva, durante o dia, sendo o odor mais acentuado emitido entre as 19.30h e as 7.30h, com o máximo entre as 23.30h e as 3.30h da manhã, Fig. 6.



Fig. 5. a) *Lonicera japonica* e b) polinizador ao fim-do-dia (20h).

Ainda que muitas espécies mostrem uma componente volátil semelhante nos seus diferentes órgãos, a composição do óleo essencial pode ser igualmente dependente do tipo de material colhido: flores, partes verdes (folhas e caules), frutos, sementes ou raízes (para referências *vide*

Figueiredo *et al.* 1997, Olawore *et al.* 2005, Novak *et al.* 2005). A existência desta variação pode ser particularmente evidente em flores entomófilas, em que os voláteis emitidos pelas flores funcionam como pista atractiva para o insecto. Nesse caso, o aroma emitido pelas flores, ou pelas partes aéreas florais, pode ser muito diferente do dos outros órgãos da planta. Kuroпка *et al.* (1991) verificaram que em *Achillea ptarmica* os monoterpenos eram praticamente inexistentes nos óleos obtidos das partes verdes e das raízes, ao contrário do que acontecia com as flores. Resultados idênticos são referidos por Máñez *et al.* (1991) na análise da componente volátil de *Sideritis mugronensis*. Segundo estes autores a presença de maiores quantidades de monoterpenos, em particular  $\alpha$ -felandreno, limoneno e fenchona, nos óleos florais está intimamente relacionada com a atracção de polinizadores. De igual modo, a análise da componente floral volátil de *Lavandula pinnata* (Figueiredo *et al.* 1995) mostrou diferenças relativamente à extraída das folhas e caules, quer em fase floral quer em fase vegetativa, Tabela 4.

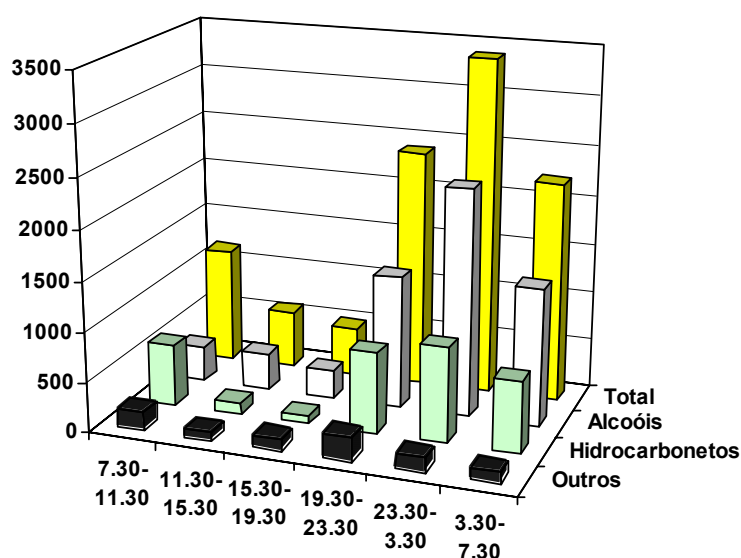


Fig. 6. Variação da composição de voláteis da madressilva, durante o dia (adaptado de Ikeda *et al.* 1994).

Tabela 4. Variação da composição percentual relativa dos componentes dominantes do óleo essencial de *Lavandula pinnata* colhida em diferentes fases de desenvolvimento (adaptado de Figueiredo *et al.* 1995).

Componentes	<i>Lavandula pinnata</i>		
	Fase Floral		Fase Vegetativa
	Flores	Folhas e caules	Folhas e caules
$\alpha$ -Pineno	6.5	3.5	3.7
Sabineno	5.7	4.0	3.1
Octen-3-ol	0.7	6.0	3.9
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	<b>15.9</b>	<b>6.3</b>	<b>10.8</b>
Fenilacetaldéido	1.3	5.9	9.2
<b><math>\beta</math>-Felandreno</b>	<b>31.7</b>	<b>12.2</b>	<b>19.5</b>
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	8.9	4.2	6.5
Terpineno-4-ol	1.2	0.8	
$\beta$ -Cariofileno	10.5	11.4	11.0
<b>Monoterpenos</b>	<b>82.0</b>	<b>39.2</b>	<b>57.8</b>
<b>Sesquiterpenos</b>	<b>13.0</b>	<b>21.8</b>	<b>13.6</b>
<b>Outros</b>	<b>3.0</b>	<b>17.5</b>	<b>16.1</b>

As diferenças encontradas na composição do óleo essencial entre diferentes órgãos pode ser parcialmente explicada pela existência de diferentes estruturas secretoras distribuídas de forma heterogénea pela planta. Com efeito, ainda que os óleos essenciais sejam produzidos em

estruturas secretoras especializadas, e apesar do tipo e a localização destas estruturas ser, regra geral, característico da família, Tabela 5, há vários exemplos de plantas com mais de um tipo diferente de estrutura secretora (tricomas e canais, por exemplo). Além disso, as estruturas secretoras nem sempre se desenvolvem de maneira síncrona, nem sempre secretam o mesmo tipo de substâncias e podem apresentar diferentes formas de secreção.

Em *Leonotis leonurus* (Ascensão *et al.* 1995) os tricomas capitados e peltados diferem no processo secretor. Enquanto nos tricomas peltados a secreção permanece acumulada no espaço subcuticular, a não ser que um factor externo rompa a cutícula, nos tricomas capitados a secreção é, provavelmente, libertada por microporos. Nesta espécie verifica-se ainda que os tricomas peltados são abundantes tanto nas folhas como nas flores, enquanto os capitados são numerosos nas folhas, mas raros, ou ausentes, nas flores.

Tabela 5. Diferentes tipos de estruturas secretoras que ocorrem em algumas famílias de plantas (adaptado de Figueiredo *et al.* 1997).

Estruturas secretoras	Famílias
<b>Estruturas secretoras externas</b>	
Tricomas	Asteraceae, Lamiaceae, Rutaceae, Geraniaceae, Solanaceae e Cannabinaceae
Osmóforos	Piperaceae, Orchidaceae e Araceae
<b>Estruturas secretoras internas</b>	
Idioblastos	Lauraceae, Magnoliaceae, Piperaceae, Araceae, Aristolochiaceae, Calycanthaceae e Saururaceae
Bolsas	Rutaceae, Myrtaceae, Myoporaceae, Hypericaceae e Leguminosae
Canais	Apiaceae, Asteraceae, Pinaceae, Myrtaceae, Hypericaceae, Leguminosae e Anacardiaceae

Histoquímica- e/ou ultrastructuralmente é igualmente possível demonstrar a diferenciação secretora dos diversos tipos de tricomas presentes numa mesma planta. Pedro *et al.* (1990) demonstraram histoquimicamente que os tricomas glandulares uniseriados dos Tipos I, II e III produzem substâncias de natureza química distinta. Também em *Plectranthus ornatus* (Ascensão *et al.* 1999) e *P. madagascariensis* (Ascensão *et al.* 1998) há uma distribuição heterogénea dos tricomas peltados e capitados nos órgãos vegetativos e reprodutores. Ao contrário dos restantes tricomas incolores, nesta última espécie existe apenas um tipo de tricomas peltados, particularmente abundantes entre as nervuras das folhas, com uma coloração laranja vivo, observável a olho nu, Fig. 7. O componente dominante dos óleos de *P. madagascariensis* é a 6,7-dehidroroileanona, um diterpeno isolado sob a forma de cristais vermelho-alaranjados.

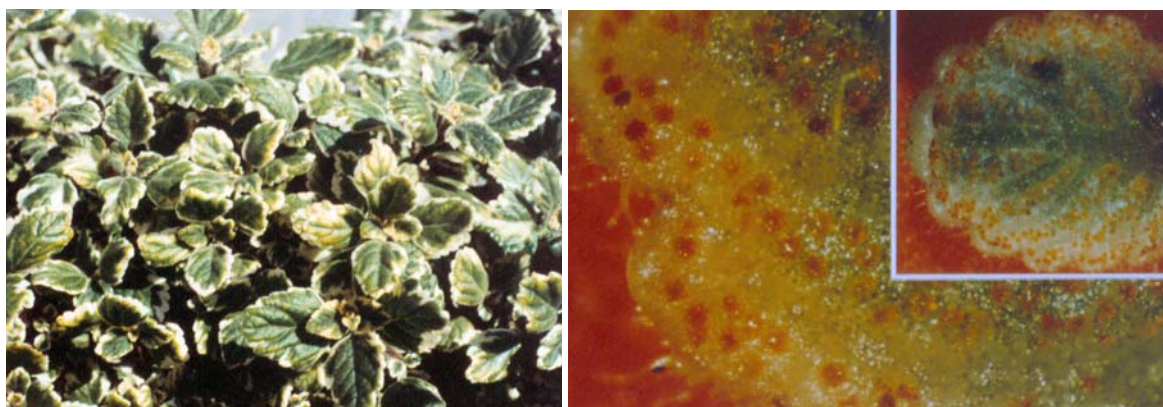


Fig. 7. Aspecto de *Plectranthus madagascariensis* e detalhe da página inferior da folha com os tricomas peltados de cor laranja vivo.

A composição dos óleos essenciais varia também com a época do ano e a decisão do

momento adequado de colheita é importante do ponto de vista agronómico e económico. Em *Crithmum maritimum*, Barroso *et al.* (1992), verificaram que o sabineno era o componente dominante durante a fase de floração, enquanto o  $\gamma$ -terpineno era o componente maioritário durante o resto do ano, Fig. 8. Em *Achillea millefolium* verificou-se que, durante a fase vegetativa, os hidrocarbonetos sesquiterpénicos constituíam a componente dominante do óleo das folhas, enquanto na fase floral este óleo era dominado pelos hidrocarbonetos monoterpénicos (Figueiredo *et al.* 1992b). No caso de *Mentha piperita* o óleo de qualidade contém uma percentagem relativa de álcoois e mentol >50%, mentofurano <4% e pulegona <2%. Dependendo da temperatura, velocidade do vento, humidade do solo, entre outros, a irrigação é cortada um a cinco dias antes da colheita, para que o vigor da colheita e a qualidade do óleo não sejam afectados. Em plantações de um ano, ainda que o rendimento tenda a aumentar quando a floração atinge valores  $\geq 50\%$  (meio a fim de Agosto) a percentagem relativa de mentofurano também aumenta. Com a sobre-maturação (Setembro a Outubro) os níveis de mentol aproximam-se dos 60%, o mentofurano diminui, mas o rendimento do óleo decai drasticamente, o que torna a sua produção demasiado dispendiosa (Morris 2005).

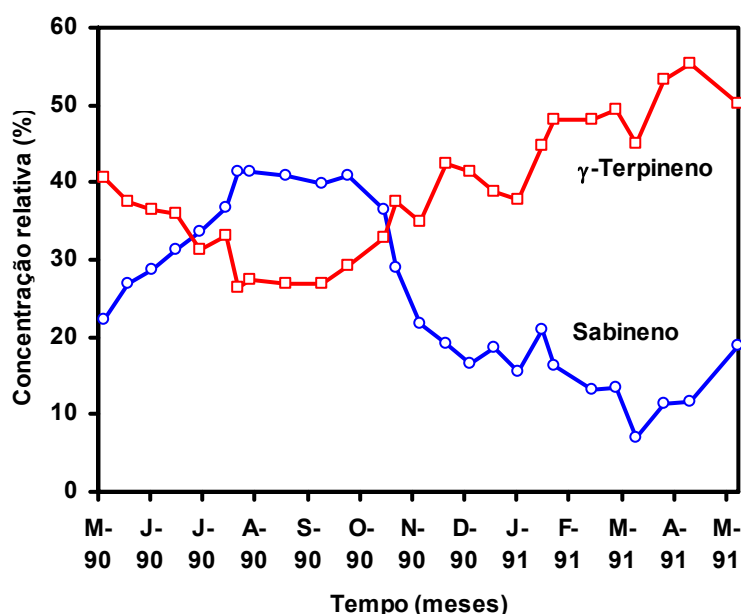


Fig. 8. Variação sazonal da concentração relativa de  $\gamma$ -terpineno (—○—) e de sabineno (—□—) no óleo essencial de *Crithmum maritimum* (adaptado de Barroso *et al.* 1992).

Para além das variações mensais e anuais, ou consoante se trata da fase floral ou vegetativa da planta, há ainda a considerar as flutuações ao longo do dia, que parecem estar directamente ligadas ao ciclo de actividade do polinizador, como referido anteriormente. Com efeito, verifica-se que em plantas com polinização diurna a emissão de voláteis é máxima durante o dia, observando-se o inverso para as plantas que têm polinizadores nocturnos. Noutros casos as variações da composição do óleo, ou a alteração do seu rendimento, foram correlacionadas com herbivoria, com parâmetros climáticos (temperatura, humidade, duração do dia) ou com ataques fúngicos, em particular nos meses mais chuvosos (para referências *vide* Figueiredo *et al.* 1997). Em qualquer um dos casos é sempre necessário determinar, para cada espécie, qual a melhor altura para a colheita do material, de acordo com aquele que é o componente comercialmente mais importante e o rendimento mais favorável.

A emissão de voláteis não tem apenas um papel estimulante e/ou atractivo, mas funciona igualmente como forma defensiva directa ou indirecta. O efeito dos estímulos traumáticos mecânicos ou químicos (perfuração, infestação por predadores, utilização de herbicidas, entre outros) sobre a composição e o rendimento dos óleos essenciais tem sido pouco estudado. As plantas produzem, em condições normais, ditas saudáveis, um conjunto de metabolitos secundários, considerados, no seu todo, produção constitutiva. Quando sujeitas a um qualquer estímulo traumático, pode haver uma produção *de novo*, isto é, serem sintetizados compostos que

não estavam presentes na planta até então, considerada uma produção induzida. A diferença entre produção constitutiva e induzida é ambígua, já que, por exemplo, a maioria dos voláteis normalmente libertados por plantas saudáveis se tornam induzidos após um qualquer tipo de dano. Na maioria dos casos os compostos são, então, produzidos em maior quantidade e/ou numa proporção diferente. Para alguns autores a resposta induzida é não só dependente da espécie mas também função do desenvolvimento da mesma, da disponibilidade de água e da quantidade de luz (para referências *vide* Figueiredo *et al.* 1997).

O efeito da perfuração, ou da infestação por predadores, é particularmente importante em plantas produtoras de resina, que acumulam o secretado em estruturas secretoras internas, como canais e bolsas. Em *Pinus pinaster* verificou-se que a perfuração induzia um aumento de duas vezes e meia do rendimento em óleo, enquanto a infecção com micélio de *Verticicladiella* sp. aumentava sessenta vezes o rendimento do mesmo óleo. Por outro lado, o efeito do estímulo era mais duradouro na infecção com o micélio do que no caso da perfuração. A concentração relativa dos componentes do óleo não foi no entanto muito afectada em qualquer dos casos. A aplicação foliar de diferentes tipos de herbicidas e fitoreguladores em *Salvia officinalis* mostrou alterações significativas na composição e rendimento em óleo essencial obtido, sem, no entanto, ter sido possível estabelecer qualquer relação entre os resultados encontrados (para referências *vide* Figueiredo *et al.* 1997). Do mesmo modo, Stahl e Wollensah (1986) estudaram o efeito de onze herbicidas sobre o desenvolvimento dos tricomas e produção de proazuleno em *A. millefolium*. Muitos destes herbicidas causavam não só um atraso no desenvolvimento glandular, mas também gigantismo dos tricomas que passavam a apresentar entre o dobro e triplo do número de células. A produção de proazuleno foi também negativamente afectada, em particular nos casos de aplicação de 2,4-D, Dicamba, Triazin, Chlorpropham e Brompyrazon.

As coníferas produzem resinas de interesse industrial e importância ecológica. Na composição das resinas entram, em quantidades aproximadamente iguais, mono- e diterpenos, e menor quantidade de sesquiterpenos. Estes terpenos acumulam-se em estruturas secretoras especializadas que podem ir de simples dilatações (bolhas) como as de espécies de *Abies* (abeto branco) ou estruturas mais complexas como canais em *Picea* e *Pinus*, que se interligam num sistema tridimensional reticulado. Em *Picea* a resina acumula-se constitutivamente em canais distribuídos no córtex e em canais traumáticos que aparecem a nível do xilema, após dano mecânico, por insecto ou por fungo. Utilizando um método não invasivo (Martin *et al.* 2002), observaram alterações morfológicas significativas 6 a 9 dias após adição de metiljasmonato (MeJA) em spray. Células do xilema, adjacentes ao câmbio, apresentavam citoplasma mais denso e paredes finas, dando origem às células epidérmicas dos novos canais. Ao fim de 15 dias, o lúmen destes canais era perfeitamente visível, formando um anel na porção mais jovem do xilema. A partir deste momento o lúmen do canais começou a encher-se com resina. Para além das alterações morfológicas, o tratamento com MeJA induziu um aumento da quantidade de mono- e diterpenos, mas a quantidade de sesquiterpenos permaneceu inalterável. Já a quantidade constitutiva destes compostos não revelou alterações significativas.

## CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Como refere Reeve (2005), apesar dos avanços tecnológicos, existe um elemento que continua para além do controlo do Homem – o clima. A produção de óleos essenciais, e de metabolitos secundários no geral, parece extremamente dependente de factores climáticos. Furacões, ciclones, inundações e/ou a seca são algumas das condicionantes ambientais que tiveram, ou podem ter, consequências mais ou menos severas na indústria de aromas. Segundo Reeve (2005) os furacões que, em 2004, assolaram a Flórida causaram uma quebra de 25% na colheita de laranjas e de 63% na de toranjas. O mesmo autor refere ainda outros exemplos, como o efeito dos ciclones anuais de Madagáscar sobre a produção de baunilha e a sua consequente repercussão nos preços praticados no mercado, ou ainda o efeito negativo das inundações na China e na Argentina, sobre a produção de gerânio e de limão, respectivamente. A Europa também não escapa aos efeitos climáticos, sendo que, quer as inundações, quer as temperaturas

anormalmente elevadas de Verão tiveram um efeito dramático na plantação de coentro da Europa de Leste. Em anos considerados normais, a produção Tunisina de óleo de *Rosmarinus officinalis* oscila entre 60 a 70 toneladas, enquanto, devido à seca, a produção baixou para valores <20 toneladas em 2002 e 2003 (Ouahada 2004).

Outros exemplos mostram que igualmente em décadas anteriores as condições ambientais afectaram negativamente a produção de plantas aromáticas e medicinais. Cite-se a título de exemplo que na Indonésia ocorreu uma quebra de 2/3 da produção de pimenta em consequência da seca, factor que, de igual modo, afectou negativamente a produção mundial, Fig. 9.

Durante os meses mais frios e com menor número de horas de luz, há, muitas vezes, um nítido decréscimo na produção de óleo essencial. Em *Pinus elliotii*, o aumento de temperatura, entre 20 °C e 46 °C, induziu um aumento exponencial na emissão de  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno e  $\beta$ -felandreno (Tingey *et al.* 1980). Os mesmos autores não observaram, no entanto, influência da luz no rendimento de emissão destes compostos. Segundo Badoc e Lamarti (1991), os climas tropicais favorecem a formação de compostos oxidados nos óleos. Em condições induzidas de seca, Turtola *et al.* (2003) mostraram que a concentração de monoterpenos aumentou consideravelmente, ao mesmo tempo que o crescimento de *Pinus sylvestris* e *Picea abies* diminuiu. A análise do óleo essencial de 14 populações de *Rosmarinus officinalis* da Tunisia, pertencentes a 3 áreas ecológicas distintas (sub-húmida, semi-árida e árida-superior) mostrou diferenças na proporção e natureza dos constituintes de acordo com a área ecológica a que pertenciam. Segundo os autores (Zaouali *et al.* 2005) as variações encontradas podem resultar de factores ambientais como pluviosidade, temperatura, tamanho da população e tipo de solo, a par com a diversidade genética destas populações.

Também diversos tipos de pestes podem causar danos importantes na estabilidade de uma produção. Trinta a 40% de uma plantação de pimenta pode ser perdida em consequência do ataque do insecto *Longitarsus nigripennis* e cerca de 50% com o ataque de *Laspeyresia hemidoxa* (Weiss 1997). Nos Estados Unidos o fungo do solo *Verticillum dahliae* é considerado um dos principais factores limitantes da produção de *Mentha piperita*, por causar o emurchecimento das plantas, embora na Argentina exista maior susceptibilidade desta planta ao afídeo das raízes. Na Índia esta cultura é anual, pelo que o problema destas pestes é menor (Morris 2005).

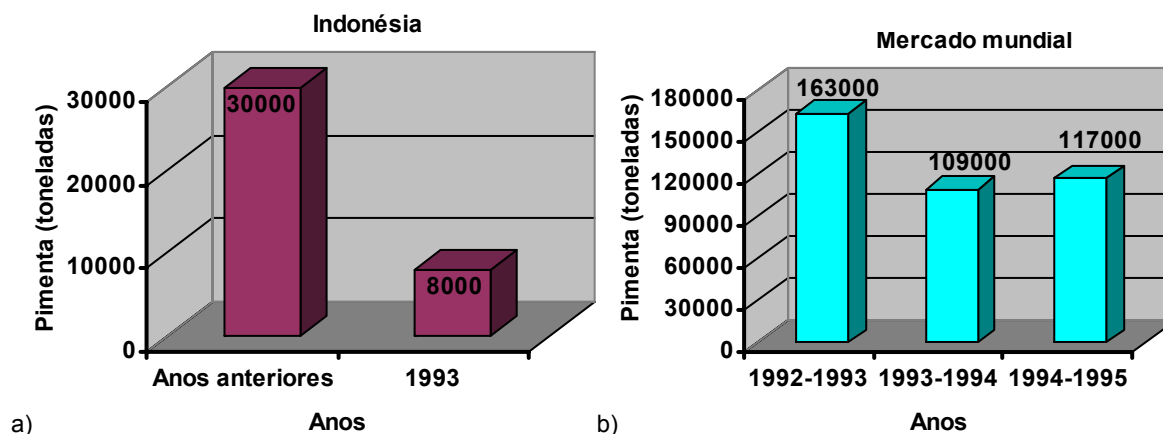


Fig. 9. Consequência da seca na produção de pimenta (adaptado de Weiss 1997).

A percentagem de metabolitos secundários é igualmente afectada pelo método de armazenamento utilizado. Factores como a luz, humidade, evaporação, temperatura, idade do material, tipo de estrutura secretora, ocorrência de contaminação, oxidação, resinificação, entre outros, condicionam maiores ou menores alterações na concentração de metabolitos secundários, em geral, e da componente volátil, em particular. A *Cananga odorata*, *Ocimum basilicum*, *Sassafras albidum*, *Carum carvi*, *Zingiber officinale*, *Narcissus poeticus*, *Jasminum grandiflorum*, *Anethum graveolens* e *Chamomila recutita* são algumas das espécies em que o rendimento ou a

produção de metabolitos secundários é reduzida sob armazenamento ou secagem. Para outras espécies, contudo, o processo de secagem é indispensável para aquisição do aroma, como o exemplo das vagens de *Vanilla planifolia*. Neste caso, as glicosil hidrolases (entre as quais a  $\beta$ -glucosidase) e os substratos (como a glucovanilina e outros precursores) estão espacialmente separados, sendo as primeiras abundantes na zona clorofilina externa e os segundos dominantes a nível da zona não clorofilina do endosperma que rodeia as sementes. O processo de cura permite o contacto entre os precursores e as enzimas que catalizam a hidrólise destes compostos a produtos aromáticos como a baunilha, entre outros (Havkin-Frenkel *et al.* 2005).

A natureza e composição do solo tem sido apontada, por alguns autores, como um dos factores condicionantes da produção de metabolitos secundários, Tabela 6, e da composição do óleo essencial, em particular, podendo explicar algumas das diferenças encontradas em óleos da mesma espécie. De um modo geral, solos alagados são inadequados quer em termos de desenvolvimento de biomassa, quer em termos do rendimento e composição do óleo. Segundo Hornok (1988) a suplementação do solo, com os três elementos nutritivos mais importantes (N, P e K), mostrou, dum modo geral, um aumento do rendimento em óleos, ainda que a adição de cada um destes elementos às plantas estudadas tivesse um efeito diferente no rendimento e composição do óleo essencial das mesmas. Vários autores verificaram, no entanto, que, ao contrário do que se registava com o rendimento, a composição do óleo não era influenciada pela concentração de azoto no solo (para referências *vide* Figueiredo *et al.* 1997). Baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  conduzem à formação de solos ácidos que reduzem o crescimento e o reduzido espaçamento entre plantas pode diminuir o crescimento por efeito alelopático ou mútuo ensombramento. Dada a elevada variabilidade química apresentada pelos óleos isolados de quatro populações de *Thymus caespitius* colhidas numa distância de cerca de 200m na mesma vertente do Pico Verde (Açores), e a ausência de diferenças morfológicas, Pereira *et al.* (2000) referem factores genéticos e edáficos como prováveis determinantes destas diferenças.

O "stress" hídrico parece estar associado ao aumento da produção do óleo essencial em algumas espécies. Nos climas mediterrâneos, em que as plantas estão normalmente sujeitas a "stress" hídrico, cerca de 38% das plantas são produtoras de óleos essenciais, enquanto nos climas temperados esse número decresce para 11%. O efeito do "stress" hídrico é variável consoante a espécie. Enquanto que para *Ocimum basilicum*, *Anethum graveolens* e *Artemisia dracunculus* o aumento do "stress" hídrico é acompanhado do correspondente aumento do rendimento e alteração da composição do óleo, noutras espécies aromáticas, como o caso de *Coriandrum sativum*, o rendimento em óleo é aumentado pela maior irrigação. O método de irrigação, bem como a fase do desenvolvimento da planta em que esta é mais abundante, parece ser igualmente importante no rendimento em óleo obtido (para referências *vide* Figueiredo *et al.* 1997).

Tabela 6. Exemplo da influência de factores edáficos na produção de metabolitos secundários. + aumento; - diminuição; x sem alteração aparente (adaptado de Larcher 2003).

Tipo de metabolito secundário	Azoto		Deficiência			Défice de água
	Adubado	Deficiente	P	K	S	
Terpenóides: Ervas		X	+	X		+
Árvores		-				-
Derivados fenólicos		+	+	+	+	X
Alcalóides	+	-	X	+		+
Glucosinolatos		+			-	+
Glicósidos cianogénicos		-				+

## VARIAÇÕES GEOGRÁFICAS

São inúmeros os exemplos do efeito das variações geográficas na composição e rendimento dos óleos essenciais, definindo, para muitas espécies, a existência de quimiotipos distintos. A título de exemplo refira-se a variação da composição de *Zingiber officinale* de diferentes origens,

Tabela 7. Outros exemplos incluem os óleos essenciais de *Crithmum maritimum* (Pateira *et al.* 1999, Santos *et al.* 2002), *Thymus carnosus* (Miguel *et al.* 2005) e *T. caespititius* (Santos *et al.* 2005 e referências aí citadas).

O estudo de várias populações de *C. maritimum* colhido em Portugal continental (Pateira *et al.* 1999) definiu dois quimiotipos: quimiotipo 1 (15-47% dilapiole; 17-35%  $\gamma$ -terpineno; 10-18% metiltimol; 7-22% sabineno e quimiotipo 2 (25-44%  $\gamma$ -terpineno; 17-34% sabineno; 10-18% metiltimol; não detectado-6% dilapiole). A ocorrência de percentagens relativas mais elevadas de  $\gamma$ -terpineno, conjuntamente com percentagens inferiores de sabineno, dilapiole e metiltimol, sugerem um quimiotipo distinto para as plantas colhidas nas ilhas dos Açores (Santos *et al.* 2002).

No caso de *T. caespititius*, enquanto os óleos essenciais obtidos de populações colhidas em Portugal Continental e na Madeira são caracterizadas pela dominância de  $\alpha$ -terpineol, os obtidos de populações colhidas nas nove ilhas dos Açores mostram uma marcada variabilidade química, com carvacrol, timol ou  $\alpha$ -terpineol como compostos dominantes (Santos *et al.* 2005 e referências aí citadas).

Tabela 7. Variação da composição do óleo essencial de *Zingiber officinale* de diferentes origens (adaptado de Pellerin 1994 e Weiss 1997).

Componentes	Concentração (%)		
	Austrália	Índia	Sri Lanka
Canfeno	t-14	t	1-14
<b><math>\beta</math>-Bisaboleno + <math>\beta</math>-farneseno</b>	<b>2-9</b>	<b>0.2-12</b>	<b>21-61</b>
<i>ar</i> -Curcumeno	6-10	19	6-27
$\beta$ -Sesquifelandreno	3-11	12	t-0.3
<b>Zingiberenos</b>	<b>4-28</b>	<b>7-36</b>	<b>0.4-2</b>
Linalol	2	1	1-5
Nerolidol	1	2	1
$\beta$ -Sesquifelandrol	2	2	0.2-1
<b>Geranial</b>	<b>3-20</b>	<b>1</b>	<b>1-15</b>
Neral	4	1	3-10
1,8-Cineole	8	0.3	2-12

Importa referir que, na maioria dos casos, as variações geográficas observadas na composição dos óleos essenciais são um reflexo directo das variações ambientais referidas anteriormente, a que não é alheia, igualmente, a diversidade genética inerente a cada espécie.

## FACTORES GENÉTICOS E EVOLUÇÃO

Estudos genéticos e de hibridação têm mostrado que a composição do óleo essencial é regulada geneticamente. O estudo dos óleos essenciais de várias espécies de *Mentha* mostrou que os genótipos CC ou Cc promoviam a conversão de  $\alpha$ -terpineol em limoneno, e a oxidação deste para formar carvona. Por outro lado, o genótipo cc formava um mentadieno que era convertido em pulegona e mentol. Também em espécies de *Pinus*, *Abies*, *Salvia* e *Juniperus* se verificou que a composição do óleo essencial era determinada geneticamente. Nas espécies de *Achillea* parece existir uma relação entre o grau de ploidia e a presença de proazulenos (para referências *vide* Figueiredo *et al.* 1997 e Nemeth 2005).

A própria selecção natural tem vindo a determinar alterações na produção e na composição dos óleos essenciais. A título de exemplo refira-se o da *Pinus ponderosa* que é uma árvore da América do Norte, rica em terpenos voláteis, nomeadamente em  $\alpha$ -pineno, mirceno e limoneno. A oleoresina produzida por esta planta atrai o *Dendroctonus brevicomis*, que aí se instala durante o seu ciclo reprodutor. Este insecto utiliza o  $\alpha$ -pineno e o mirceno da oleoresina para sintetizar as suas próprias feromonas, que vão actuar ao longo do ciclo reprodutor do insecto quer como atraentes, quer como repelentes. Estudos da composição do óleo essencial de várias populações mostram que tem vindo a ocorrer uma selecção natural no sentido de prevalecerem as árvores em

que o componente dominante da resina é o limoneno, que é tóxico para o insecto em concentrações elevadas (Harborne 1994).

Os mecanismos que levam à evolução da produção de voláteis nas plantas incluem fenómenos de a) duplicação e divergência de genes, retendo, pelo primeiro processo, a função enzimática original, enquanto uma nova função decorre da enzima codificada pelo gene duplicado, b) evolução convergente, em que novas funções aparecem múltiplas vezes independentemente, c) alteração evolutiva da expressão génica, que conduz a uma nova função enzimática com a concomitante perda da actividade original e d) desaparecimento da actividade enzimática causada por diversos factores, tais como hibridação acompanhada de rearranjos cromossómicos ou mutações (Gang 2005). Em qualquer um dos casos estes processos são seguidos de alteração da especificidade enzimática. Se a produção de novos metabolitos confere uma vantagem adaptativa para a planta, então a sua produção é mantida e/ou aumentada. As alterações da expressão de uma proteína não conduzem necessariamente ao desaparecimento da actividade enzimática, mas podem, por exemplo, determinar a sua produção numa célula, tecido ou órgão diferente.

### CONDIÇÕES POLÍTICO/SOCIAIS

Cerca de 30000t de óleos essenciais, isto é, cerca de 65% da produção mundial, derivam de plantas lenhosas perenes (árvores e arbustos), facto por si só determinante da reduzida elasticidade do mercado abastecedor. Os restantes 35% da produção mundial vêm de plantas herbáceas, na sua maioria cultivadas. Nos casos em que a matéria prima, para a extracção dos óleos essenciais, é obtida de árvores espontâneas, o abastecimento depende, essencialmente, da abundância da espécie e dos custos da colheita. Por outro lado, a produção a partir de espécies cultivadas acarreta investimentos consideráveis nas plantações e uma baixa capacidade de resposta às flutuações de mercado. Acresce que, tanto o rendimento, como os custos, variam com a área geográfica (dependendo de factores locais: clima e grau de mecanização), com o clima económico e com o nível de produtividade. O cultivo de algumas espécies aromáticas, como a lavandula e a hortelã-pimenta, restringe-se por razões edáfo-climáticas, a determinadas zonas do globo. Outras espécies há, mais cosmopolitas e, como tal, de distribuição mais vasta. Os países do Terceiro Mundo detêm 55% da produção mundial de óleos essenciais, Fig. 10.

A riqueza da sua Flora natural, aliada ao baixo custo de mão-de-obra, tem permitido, a muitos destes países, constituírem-se como fornecedores importantes de matéria prima para a extracção de óleos essenciais. Contudo, a instabilidade política e a reduzida capacidade de investimento, quer na produção, quer na qualidade, são factores limitantes do abastecimento estável requerido pelas empresas dos países consumidores, Tabela 8. Entre outras, uma das consequências destas variações é a diferença de preço da matéria prima originária de diferentes locais: enquanto o preço das flores de jasmim adquiridas no Egipto, Índia ou em Marrocos rondavam, em 1994, 1€/kg, o mesmo material originário de Grasse ascendia a 27€/kg (Basset 1994).

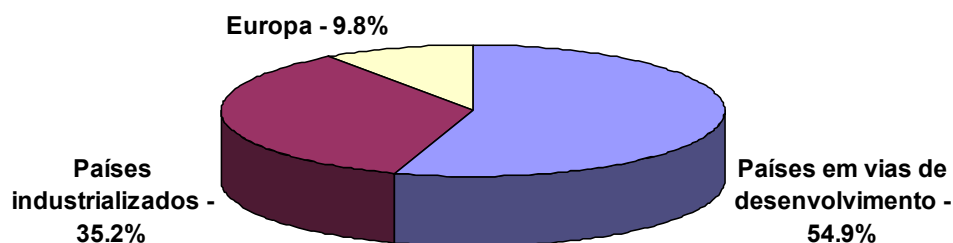


Fig. 10. Distribuição da produção de óleos essenciais (adaptado de Verlet 1993).

Outra das consequências da limitação a um único país como fonte de material é a ocorrência de condicionantes ambientais e/ou políticas que restrinjam o acesso a esses materiais. Durante as primeiras quatro décadas do século XX, a produção de safrole assentava na extracção de

*Cinnamomum camphora* de origem Chinesa. Com a Segunda Guerra Mundial a indústria Europeia de perfumes viu-se confrontada com a impossibilidade de importar produtos Asiáticos, e a solução foi recorrer a materiais alternativos, nomeadamente a *Ocotea cymbarum* de origem Brasileira. Depois de 35 anos de exploração a produção decaiu drasticamente em consequência da extracção desregrada e ausência de políticas de reflorestação. Este processo culminou com um Decreto do Governo Brasileiro em 1991, que proibiu o abate de árvores, a sua comercialização e produção de derivados químicos. Em resposta, as empresas Brasileiras começaram a importar óleo essencial de *Cinnamomum camphora* da China e Vietname, mas também estes países se tornaram vítimas da exploração desordenada desta espécie. Por conseguinte, nos últimos anos têm-se elaborado vários estudos para encontrar fontes alternativas que produzam um óleo essencial com  $\geq 80\%$  de safrole, em particular *Piper hispidinervium* (Santos *et al.* 2005).

Tabela 8. Factores que afectam a produção em países em vias de desenvolvimento.

Vantagens	Desvantagens
Condições climáticas favoráveis ao cultivo	Instabilidade política
Baixa interferência por parte de espécies competidoras	Reduzida capacidade de investimento na produção e qualidade
Baixo custo de mão-de-obra	Controlo de qualidade inadequado ou inexistente
	Extracção desregrada sem políticas de reflorestação
	Embargo às exportações

As estratégias de mercado são também importantes em termos dos dois principais objectivos industriais: disponibilidade e estabilidade (de qualidade e preço). A indústria da baunilha natural perdeu 25-40% do mercado nos últimos três a quatro anos, em consequência dos preços excessivos das vagens de baunilha o que levou a uma substituição do aroma natural dispendioso, por substitutos sintéticos mais baratos. Actualmente, o mercado da baunilha enfrenta o problema da necessidade de estimular o consumo de baunilha natural (Havkin-Frenkel *et al.* 2005, Brownell *et al.* 2005).

#### QUANTIDADE DE MATERIAL/NECESSIDADE DE ESPAÇO E MÃO-DE-OBRA

Ainda que não afectando directamente a produção do óleo essencial, mas com implicações directas na sua comercialização estão a quantidade de material necessário à obtenção do óleo e, bem assim, a enorme necessidade de espaço para o seu cultivo e a mão-de-obra a ela associada, Tabela 9. Por exemplo, 1kg de flores de jasmim correspondem a 10000 flores que implicam 2h de trabalho de um bom colectador (Basset 1994). De igual modo, antes da mecanização praticada actualmente, isto é, até aos finais de 1960, a colheita de *Narcissus poeticus* em França era feita manualmente num período de 10 dias a duas semanas, durante a floração, em Maio. Embora os dados possam variar muito consoante a fonte, um bom dia de colheita poderia render até um máximo de 30Kg/pessoa/dia. Hoje em dia, a colheita é semi-mecanizada, sendo menos laboriosa e mais rentável, rondando os 300kg/dia. No entanto, a colheita é menos “limpa” do que a manual, já que são igualmente colhidas folhas e caules em maior quantidade do que com a colheita manual. Neste caso, 450Kg de flores fornecem 1Kg de concreto<sup>1</sup> e 350g de absoluto<sup>2</sup> (Harris

<sup>1</sup> *Concreto*: Goma ou exsudado natural, mais cristalino que as oleoresinas, que é, à semelhança destas últimas, extraído com solventes. Ao contrário das tinturas, o solvente é removido no caso dos concretos e oleoresinas. Exemplos de concretos e oleoresinas: benjoim (*Styrax benzoin*), mirra (*Commiphora myrrha*), olíbano (*Boswellia carteri* ou *B. thurifera*) e bálsamo de copaiba (*Copaifera officinalis* ou *C. reticulata*).

*Oleoresinas*: Ocorrem naturalmente como gomas ou exsudados. São extraídos com solventes, embora só sejam parcialmente solúveis.

*Tintura*: Extracto alcoólico (álcool, etanol, propan-2-ol), em que o álcool fica a fazer parte do produto final.

<sup>2</sup> *Absoluto*: Extracto solúvel em álcool que constitui o “coração” do aroma. Pode ser preparado por 1) extracção do material com álcool e sua ulterior evaporação, 2) extracção da oleoresina com um solvente apropriado, evaporação do solvente e nova extracção com álcool ou 3) extraído com CO<sub>2</sub>.

2005).

Tabela 9. Quantidade de material vegetal necessário para produzir 1kg de essência e/ou absoluto (adaptado de Flora Perpétua).

Planta	País	Tipo de Extracção	Material	Quantidade (Kg)
<i>Citrus aurantium</i> (bergamota)	Itália	Pressão	Casca	200
<i>Citrus limon</i> (limão)	Brasil	Pressão	Casca	60-70
<i>Citrus mandurensis</i> (tangerina)	Espanha	Pressão	Casca	50
<i>Citrus decumana</i> , <i>Citrus paradisi</i> (lima)	USA	Pressão	Casca	100
<i>Citrus aurantium dulcis</i> (laranja)	USA	Pressão	Casca	50
<i>Citrus aurantium amara</i> (petigrain)	Paraguai	Hidrodestilação	Folhas/Pecíolos	100
<i>Cinnamomum ceylanicum</i>	SriLanka	Hidrodestilação	Ritidoma	80
<i>Mentha piperita</i>	China	Hidrodestilação	Folhas	50
<i>Eucalyptus globulus</i>	China	Hidrodestilação	Folhas	50
<i>Salvia sclarea</i>	GUS	Hidrodestilação	Flores/Folhas	1000
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Tunisia	Hidrodestilação	Parte aérea	50
<i>Lavandula angustifolia</i>	França	Hidrodestilação	Flores	100
<i>Pelargonium odorantissimum</i>	China	Hidrodestilação	Folhas	500
<i>Cymbopogon citratus</i>	China	Hidrodestilação	Folhas	30
<i>Pogostemon patchouli</i>	Indonésia	Hidrodestilação	Folhas	35
<i>Cananga odorata</i> (ylang-ylang)	Indonésia	Hidrodestilação	Flores	50
<i>Aniba rosae odora</i>	Brasil	Hidrodestilação	Madeira	100
<i>Vetiveria zizanoides</i>	Indonésia	Hidrodestilação	Raíz	50
<i>Juniperus virginiana</i>	USA	Hidrodestilação	Madeira	30
<i>Santalum album</i>	Índia	Hidrodestilação	Madeira	20
<i>Jasminum officinalis</i>	Marrocos	Extracção c. álcool	Flores	1000
<i>Rosa canina</i> (rosa Turca)	Turquia	Hidrodestilação	Flores	5000
<i>Citrus Bigaradia aurantium</i> (Neroli)	Guiné	Hidrodestilação	Flores	1000
<i>Boswellia thurifera</i>	Somália	Hidrodestilação	Resina	15
<i>Ocimum basilicum</i>	Uganda	Hidrodestilação	Parte aérea	500-800
<i>Pinus mugo - Turra</i> var. <i>pumilio</i>	Canadá	Hidrodestilação	Acículas	200
<i>Vanilla planifolia</i>	Java / Madagáscar	Extracção c. álcool	Vagens	35

O futuro das plantas aromáticas e medicinais está intimamente ligado à elevada competição global e às pressões daí decorrentes. As plantas aromáticas e medicinais são produtos naturais e, como tal, os derivados delas obtidos são de composição variável. De um lado as condições fisiológicas, ambientais, climáticas e geopolíticas tornam o fornecimento e o preço instáveis. Esta instabilidade leva à procura de formulações alternativas que recorrem a produtos sintéticos cuja implicação secundária é, em muitos casos, desconhecida. Por outro lado, os consumidores continuam a preferir os compostos naturais, o que, aliado à diversificação das aplicações, pode constituir uma razão acrescida para o seu uso. Contudo, a procura do que é natural não deve recorrer à extracção desregulada da Flora local e obriga igualmente à aposta na qualidade, à inovação agrícola e ao trabalho conjunto de agricultores, indústria e ciência na selecção dos melhores locais de cultivo, de variedades melhoradas, da altura adequada para colheita, no controlo de pestes e na gestão adequada de stocks.

## REFERÊNCIAS

- Ascensão L, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, J Schripsema, SG Deans, JJC Scheffer (1998) *Plectranthus madagascariensis*: Morphology of the glandular trichomes, essential oil composition and its biological activity. *Int. J. Plant Sci.* 159: 31-38.
- Ascensão L, L Mota, MdeM Castro (1999) Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, distribution and histochemistry. *Ann. of Bot.* 84: 437-447.
- Badalamenti F (2004) Changes in lemon oil composition during fruit ripening. In: *Proceedings of the IFEAT*

- International Conference 2004 – The essential oils of the Mediterranean region*. Green C (Ed.). pp. 77-97. IFEAT, UK.
- Badoc A, A Lamarti (1991) A chemotaxonomic evaluation of *Anethum graveolens* L. (Dill) of various origins. *J. Essent. Oil Res.* 3: 269-278.
- Barroso JG, LG Pedro, AC Figueiredo, MSS Pais, JJC Scheffer (1992) Seasonal variation in the composition of the essential oil of *Crithmum maritimum* L. *Flavour Fragr. J.* 7: 147-150.
- Basset F (1994) Journées de Digne: Le jasmim, la "fleur", le "roi". *Parfums Cosmétiques Arômes* 119: 58-64.
- Brownell R, D Havkin-Frenkel, O Nembach, S Poppelsdorf, A RAnadive, K Tsurumaki (2005) Crucial raw materials. The state of vanilla. *Perfumer & Flavorist* 30 (8): 36-39.
- Croteau R (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.* 87: 929-954.
- Dey BB, MA Choudhuri (1983) Effect of leaf development stage on changes in the essential oil of *Ocimum sanctum* L. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 13: 331-335.
- Dodson CH, RL Dressler, HG Hills, RM Adams, NH Williams (1969) Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Figueiredo AC (1992) *Achillea millefolium* L. *millefolium*: Produção de metabolitos secundários *in vivo* e *in vitro*, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro, I Sevinat-Pinto, T Antunes, SS Fontinha, A Looman, JJC Scheffer (1995) Composition of the essential oil of *Lavandula pinnata* L. fil. var. *pinnata* grown on Madeira. *Flavour Fragr. J.* 10: 93-96.
- Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro, JJC Scheffer (1997) Physiological aspects of essential oil production. In: *Essential Oils: Basic and Applied Research*, Ch Franz, Á Máthé, G Buchbauer (Eds), pp. 95-107, *Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*, Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL.
- Figueiredo AC, JG Barroso, MS Pais, JJC Scheffer (1992a) Composition of the essential oils from two populations of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *J. Chromatogr. Sci.* 30: 392-395.
- Figueiredo AC, JG Barroso, MS Pais, JJC Scheffer (1992b) Composition of the essential oils from leaves and flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Flavour Fragr. J.* 7: 219-222.
- Flora Perpétua (-) Ätherische Öle. Flora Perpetua Produktions. Germany.
- Gang DR (2005) Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 301-325.
- Harborne JB (1994) *Introduction to ecological biochemistry*, Academic Press.
- Harris R (2005) Narcissus poeticus. The heart note. *Perfumer & Flavorist* 30 (2): 46-53.
- Havkin-Frenkel D, J French, F Pak, C Frenkel (2005) Inside vanilla. *Perfumer & Flavorist* 30 (3): 36-55.
- Hornok L (1988) Effect of environmental factors on the production of some essential oil plants. In: Lawrence BM, BD Mookherjee, BJ Willis (eds.) *Flavors and Fragrances: A World Perspective*, Elsevier, Amsterdam.
- Ikeda N, M Ishihara, T Tsuneya, M Kawakita, M Yoshihara, Y Suzuki, R Komaki, M Inui (1994) Volatile components of honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) flowers. *Flavour Fragr. J.* 9: 325-331.
- Kuroпка G, M Neugebauer, K-W Glombitza (1991) Essential oils of *Achillea ptarmica*. *Planta Med.* 57: 492-494.
- Máñez S, A Jiménez, A Villar (1991) Volatiles of *Sideritis mugronensis* flower and leaf. *J. Essent. Oil Res.* 3: 395-397.
- Martin D, D Tholl, J Gershenzon, J Bohlmann (2002) Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.* 129: 1003-1018.
- Miguel MG, J Duarte, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2005) *Thymus carnosus* Boiss.: effect of harvesting period, collection site and type of plant material on essential oil composition. *J. Essent. Oil Res.* 17: 422-426.
- Morris M (2005) Mint landscape. From field to flavor. *Perfumer & Flavorist* 30 (4): 46-51.
- Nemeth E (2005) Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. *J. Essent. Oil Res.* 17: 501-512.
- Novak J, L Draxler, I Göhler, CM Franz (2005) Essential oil composition of *Vitex agnus-castus* – comparison of accessions and different plant organs. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 186-192.
- Olawore NO, IA Ogunwande, O Ekundayo, K Adeleke (2005) Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn). *Flavour and Fragrance Journal* 20: 54-56.
- Ouahada A (2004) The essential oils industry in Tunisia. In: *Proceedings of the IFEAT International Conference 2004 – The essential oils of the Mediterranean region*. Green C (Ed.). pp. 53-57. IFEAT, UK.
- Pateira L, T Nogueira, A Antunes, F Venâncio, R Tavares, J Capelo (1999) Two chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 333-343.
- Pedro LG, P Campos, MSS Pais (1990) Morphology, ontogeny and histochemistry of secretory trichomes of *Geranium robertianum* (Geraniaceae). *Nord. J. Bot.* 10: 501-509.

- Pellerin P (1994) Le gingembre: production et analyse. *Parfums Cosmétiques Arômes* 117: 70-73.
- Pereira SI, PAG Santos, JG Barroso, AC Figueiredo, LG Pedro, LR Salgueiro, SG Deans, JJC Scheffer (2000) Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry* 55: 241-246.
- Reeve D (2005) Global outlook. Controlling the uncontrollable. *Perfumer & Flavorist* 30 (1): 32-34.
- Santos A, AMS Antunes, LA d'Avila (2005) Global sustainability. Safrole. *Perfumer & Flavorist* 30 (2): 62-64.
- Santos PAG, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, SG Deans, JJC Scheffer (2002) Composition of the essential oils from populations of *Crithmum maritimum* L. grown on four Azorean islands. In: Rauter AP, FB Palma, J Justino, ME Araújo, SP Santos (Eds), *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, Vol. 47, pp. 135-141. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Santos PAG, JG Barroso, AC Figueiredo, LG Pedro, LR Salgueiro, SS Fontinha, SG Deans, JJC Scheffer (2005) Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira assessed by analysis of their essential oils. *Plant Science* 169: 1112-1117.
- Schiestl FP, M Ayasse, HF Paulus, C Löfstedt, B Hansson, F Ibarra, W Francke (1999) Orchid pollination by sexual swindle. *Nature* 399: 421-422.
- Schiestl FP, M Ayasse, HF Paulus, C Löfstedt, BS Hansson, F Ibarra, W Francke (2000) Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. A* 186: 567-574.
- Stahl E, A Wollensah (1986) Observations on the function of the glandular hairs of yarrow, 3. report: effects of selective herbicides on the glandular hairs and tissue of the florets. *J. Plant Physiol.* 122: 93-96.
- Tingey DT, M Manning, LC Grothaus, WF Burns (1980) Influence of light and temperature on monoterpene emission rates from slash pine. *Plant Physiol.* 65: 797-801.
- Turtola S, A-M Manninen, R Rikala, P Kainulainen (2003) Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and Norway spruce seedlings. *J. Chem. Ecol.* 29: 1981-1995.
- Verlet N (1993) Commercial aspects. In: Hay KM, G Waterman (Eds) *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*, pp. 137-174. Longman Scientific & Technical, UK.
- Weiss EA (1997) Essential oil crops. CAB International. UK.
- Zaouali Y, C Messaoud, A Ben Salah, M Boussaïd (2005) Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L.. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 512-520.
-

## ESTRUTURAS SECRETORAS EM PLANTAS. Uma abordagem Morfo-Anatômica\*

L. Ascensão

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

### INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma grande variedade de secreções. Algumas são soluções aquosas ricas em sais, aminoácidos e açúcares, outras são misturas mais menos complexas, constituídas essencialmente por metabolitos primários (proteínas, polissacáridos e pectinas) ou por metabolitos primários e secundários (terpenóides, fenilpropanóides e alcalóides). Em alguns secretados estão presentes centenas de compostos, alguns dos quais biologicamente activos, que contribuíram e contribuem para o sucesso evolutivo das espécies que os produzem.

As secreções vegetais são sintetizadas ou simplesmente acumuladas e eliminadas em células especializadas, que ocorrem isoladas (idioblastos secretores) ou que constituem estruturas glandulares altamente diferenciadas (tricomatas, emergências, bolsas, canais e laticíferos). É extremamente vasta a diversidade morfológica de qualquer destas estruturas, não existindo geralmente nenhum tipo de relação entre a morfologia e a secreção produzida. (Fahn 1979, 1990, Metcalfe e Chalk 1983, Dickison 2000).

As estruturas secretoras têm vindo a despertar nos botânicos um grande interesse desde o advento da microscopia óptica no século XVII. A sua presença ou ausência e a sua morfologia particular são caracteres com valor taxonómico para alguns taxa. Na segunda metade do século passado, as estruturas secretoras, fascinantes na sua diversidade estrutural, conduziram a numerosos estudos anatómicos, ultraestruturais e químicos, que contribuíram para o conhecimento da sua diferenciação e desenvolvimento, para a elucidação da compartimentação das principais vias de síntese dos metabolitos produzidos e para o esclarecimento das suas funções fisiológicas e ecológicas (Fahn 1988). Começam-se agora a dar os primeiros passos no que refere à análise genética e molecular dessas estruturas (Warker e Marks 2000, Hulskamp e Kirik 2000, Wang e Wagner 2003) e ao desenvolvimento de estratégias que aumentem a síntese dos metabolitos produzidos, em particular, nos tricomas glandulares (Duke *et al.* 2000, Wagner, Wang e Shepherd 2004).

O crescente emprego dos produtos naturais, em especial de metabolitos secundários, como matéria-prima indispensável a uma indústria cada vez mais diversificada, e a procura de compostos anti-cancerígenos, anti-maláricos, antidiarreicos e de pesticidas naturais biodegradáveis levou, nas últimas décadas, ao estudo pluridisciplinar de numerosas plantas aromáticas (Singh e Upadhyay 1993, Tyle 1999, Briskin 2000).

Apresenta-se neste artigo uma abordagem morfo-anatómica das estruturas glandulares envolvidas na biossíntese de mucilagem, óleos essenciais, resinas e látex, secreções que ocorrem frequentemente nas plantas aromáticas e medicinais (PAM).

### TRICOMAS E EMERGÊNCIAS

Tricomatas e emergências são estruturas glandulares externas com ampla distribuição nas Angiospérmicas. Por definição, os tricomas têm origem em células da protoderme, enquanto que na ontogenia das emergências participam, para além de células epidérmicas, células de tecidos subjacentes, parênquima ou mesmo tecidos condutores. Sem estudos ontogénicos é difícil distinguir entre estes dois tipos de estruturas, sendo muitas vezes as emergências designadas

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 19-28, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

genericamente por tricomas. Para além destes apêndices com origem epidérmica, algumas epidermes em paliçada ou papiliformes são de natureza glandular (Figs. A1, A2, C1 – C4).

Os tricomas glandulares têm origem numa célula da protoderme, que se distingue das células vizinhas por ser mais volumosa e apresentar citoplasma mais denso e núcleo hipertrofiado. Esta célula inicial dos tricomas aumenta gradualmente de volume segundo o eixo longitudinal, sofrendo ulteriormente uma divisão periclinal ou anticlinal. Após esta primeira divisão que estabelece de imediato a natureza unisseriada ou bisseriada dos tricomas, processa-se uma nova divisão periclinal, da qual resultam células diferentes: as proximais, correspondem às células basais dos tricomas e são caracterizadas pela presença de grandes vacúolos, enquanto que as distais, com citoplasma denso, originam após uma ou mais divisões periclinais, o pedículo (uni ou pluricelular) e a cabeça glandular (unicelular) ou a inicial da cabeça glandular. Esta, ao sofrer divisões periclinais e/ou anticlinais ou radiais dá origem a cabeças glandulares pluricelulares com morfologia diversa e com um número variável de células (Ascensão e Pais 1987, Ascensão *et al.* 1995).

A fase final da diferenciação dos tricomas glandulares é concomitante com o início do processo secretor. Assim, nos tricomas completamente diferenciados a fase de secreção é caracterizada pela presença de secretado nas células glandulares e pela a sua sequestração no vacúolo ou no espaço sub-cuticular, que se forma por distensão e separação da cutícula do resto da parede celular. O refluxo da secreção acumulada nesse espaço extracelular é, de um modo geral, impedido pela cutinização das paredes externas do pedículo, que ao bloquear o transporte no apoplasto protege os parênquimas da toxicidade dos metabolitos que constituem o secretado (Ascensão e Pais 1987, Ascensão *et al.* 1995, 1997, Ascensão e Pais 1998, Ascensão *et al.* 1999).

A eliminação da secreção do espaço sub-cuticular ocorre quer por poros cuticulares (moléculas hidrofílicas de pequena massa molecular ou hidrofóbicas de pequena massa molecular e grande volatilidade) ou por ruptura da cutícula. Para alguns autores a ruptura da cutícula é um processo espontâneo, que se deve essencialmente à pressão do secretado (Fahn 1988), enquanto que para outros é um processo provocado por factores abióticos, diferenças drásticas de temperatura e humidade e factores bióticos, como por exemplo, presença de predadores (Ascensão *et al.* 1999).

Terminada a fase de secreção, as células glandulares sofrem, de um modo geral, degenerescência celular, o que leva ao colapso da cabeça glandular do tricoma e à sua perda de funcionalidade.

Os tricomas glandulares ocorrem na maioria das Angiospérmicas, quer em órgãos vegetativos quer em órgãos florais, predominando em órgãos jovens em pleno crescimento (Figs. A3 – A7). Em algumas espécies a frequência de tricomas (número por unidade de superfície) parece ser constante, o que implica uma produção contínua, mas na maioria das espécies a frequência decresce com a idade do órgão, sendo o número final de tricomas estabelecido numa fase precoce do seu desenvolvimento (Ascensão e Pais 198, Ascensão *et al.* 1998, 2001). Embora a diferenciação dos tricomas (glandulares e cobertura) seja geneticamente controlada, a sua frequência é afectada por condições ambientais (temperatura, radiação, fotoperíodo, disponibilidade de água e nutrientes) e por factores bióticos (predadores, parasitas e agentes patogénicos) (Werker 2000).

---

Fig. A. Fotografias em microscopia de varrimento mostrando diversos tipos de estruturas secretoras. **1** Epiderme glandular em paliçada na flor de *Leonotis leonurus*. **2**, Epiderme papiliforme da superfície abaxial do bordo lateral do labelo de *Ophrys lutea*. **3 – 7**, Tricomas glandulares em órgãos vegetativos e florais. **3**, Superfície adaxial de uma folha jovem de *Plectranthus laxiflorus*. **4 – 6**, Botões florais e antera de *P. ecklonii*. **7**, Ovário quadrilobular e nectário de *Leonotis leonurus*. **8,9**, Secções transversais de canais secretores do caule de *Tapirira guianensis*. Barras = 200µm (1, 2, 6); Barras = 50µm (3 - 7); Barra = 100µm (8,9).

---

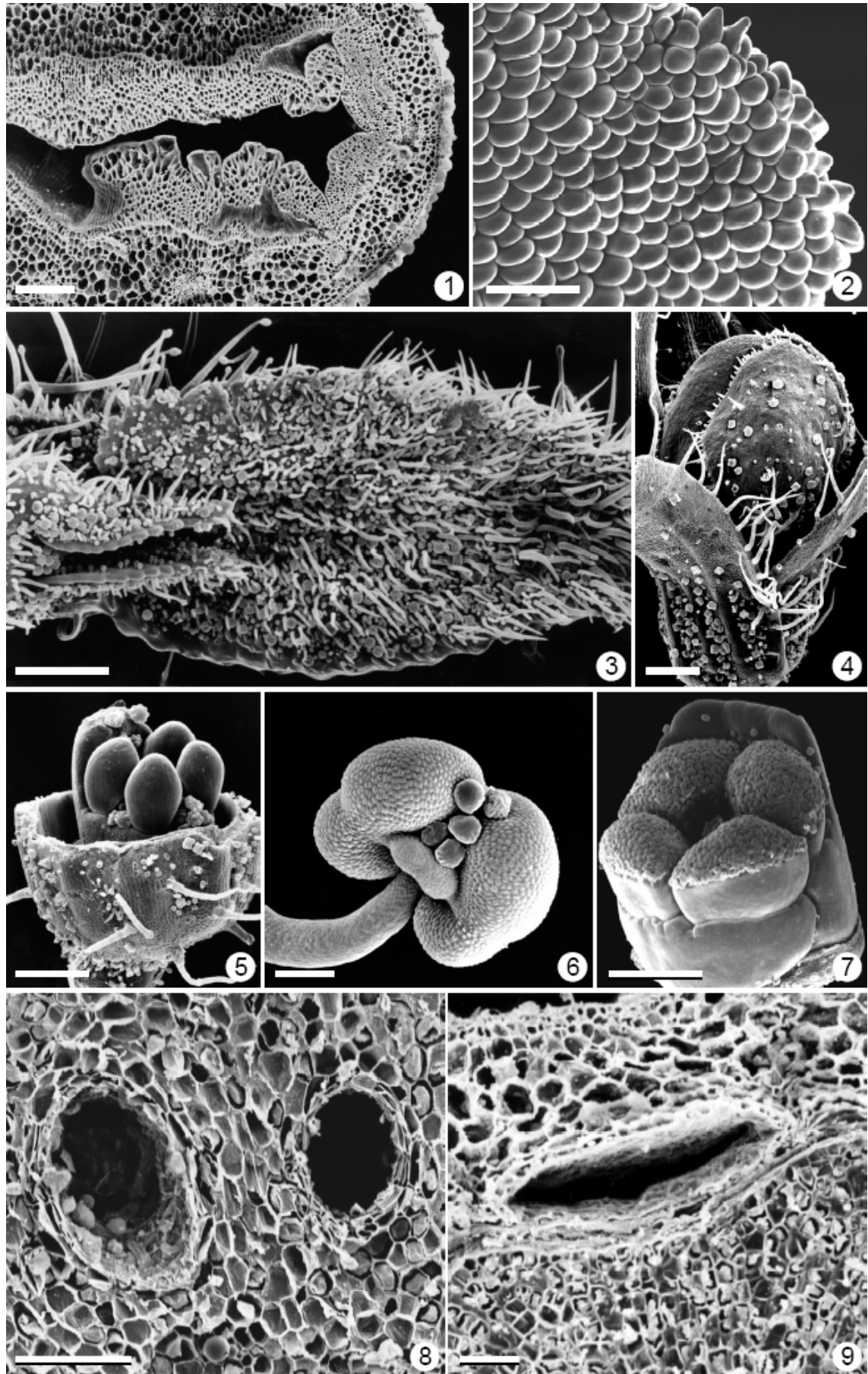


Fig. A

A enorme diversidade de tricomas glandulares, no que refere à forma, dimensão, número de células, processo secretor, período de secreção e função (Figs. B1 – B15), faz com que a sua classificação não seja fácil. A característica principal, frequentemente utilizada para distinguir tricomas glandulares, é o tipo de produtos secretados ou absorvidos, que podem ser identificados *in situ* por meio de testes histoquímicos, com controlos apropriados (Figs. C5 – C23). A morfologia e a função dos tricomas glandulares são caracteres a que ulteriormente se recorre dentro dos grupos anteriormente referidos. Embora nenhuma das classificações de tricomas proposta até hoje seja completamente satisfatória, deve-se tanto quanto possível adoptar a terminologia já existente e definir claramente critérios que permitam comparar entre si tricomas de diferentes taxa (Theobald *et al.* 1980). O uso de parâmetros quantitativos simples permite, por exemplo, a distinção segura entre tricomas capitados e peltados. De acordo com Abu-Asab e Cantino (1987) deve considerar-se capitado todo o tricoma em que o comprimento do pedículo é maior que metade da altura da cabeça.

A micromorfologia dos tricomas glandulares e algumas classes de metabolitos por eles produzidos têm valor taxonómico, sendo usados na delimitação de diferentes taxa. A ocorrência de tricomas bisseriados e de tricomas peltados, e a presença de marcadores químicos, como as lactonas sesquiterpénicas e as lactonas monoterpénicas (iridóides), são enfatizadas por vários autores como caracteres de diagnóstico taxonómico para as Asteraceae e Lamiaceae (Spring 1989, 2000, Richardson 1992).

A produção de óleos essenciais e resinas por tricomas glandulares é característica de diversas famílias, em particular, das Asteraceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Rubiaceae, Geraniaceae, Solanaceae e Plumbaginaceae (Metcalf e Chalk 1983).

#### IDIOLASTOS, CAVIDADES E CANAIS SECRETORES

Os idioblastos, as cavidades e os canais secretores são estruturas de secreção internas. Os idioblastos são, na maioria dos casos, células hipertrofiadas, maiores que as células vizinhas, que ocorrem isoladas e contêm mucilagens, óleos essenciais e resinas ou misturas destes três tipos de secretados. São frequentemente designadas, apenas por células de mucilagens e por células de óleos, e apesar de serem morfológicamente idênticas, são de fácil separação por testes histoquímicos (Figs. C29, C30). As primeiras apresentam uma secreção lamelada constituída por polissacáridos ou por misturas de polissacáridos, proteínas e poli-fenóis (taninos), enquanto que nas segundas a secreção é homogénia, brilhante e contém óleos essenciais ou misturas de terpenóides, ácidos gordos e agliconas flavonóidicas, podendo ter ainda uma fracção polissacarídica diminuta (Metcalf e Chalk 1983, Fahn 1988, Gregory e Baas 1989).

As paredes celulares destes dois tipos de idioblastos são geralmente também diferentes, celulósicas nos idioblastos de mucilagem e suberificadas nos de óleos. Contudo, em grupos de plantas primitivas, como as Magnoliales e Laurales, onde não ocorrem outras estruturas secretoras além dos idioblastos de mucilagem e óleos, as paredes destas células são em ambos os casos suberificadas. A camada de suberina, que tem como função compartimentar a secreção, protegendo as células adjacentes de compostos tóxicos, pode ser interpretada como uma relíquia

---

Fig. B. Fotografias em microscopia de varrimento mostrando diversos tipos morfológicos de tricomas glandulares em Lamiaceae (1 – 13) e Asteraceae (14, 15). **1, 2**, Tricomas peltados, respectivamente, na superfície abaxial da folha de *Lavandula viridis* e na superfície externa da corola de *Plectranthus madagascariensis*. **3 – 7**, Tricomas glandulares das folhas e flores de *P. ornatus*. 3,4, Tricomas capitados de pedículo longo, respectivamente em fase secretora e pós-secretora. 5, Tricoma conoidal. 6, Tricoma digitiforme. 7, Tricomas capitados de pedículo curto. **8, 9**, Tricomas conoidais da flor de *P. madagascariensis*, respectivamente em fase secretora e pós-secretora. **10, 12**, Tricomas elipsoidais de *P. laxiflorus*. **11**, Tricomas com características mistas de tricomas glandulares e de cobertura em *L. viridis*. **13**, Tricoma peltado do nectário de *Leonotis leonurus*. **14, 15**, Tricomas bisseriados das folhas de *Osteospermum ecklonis*. Barras = 25µm.

---

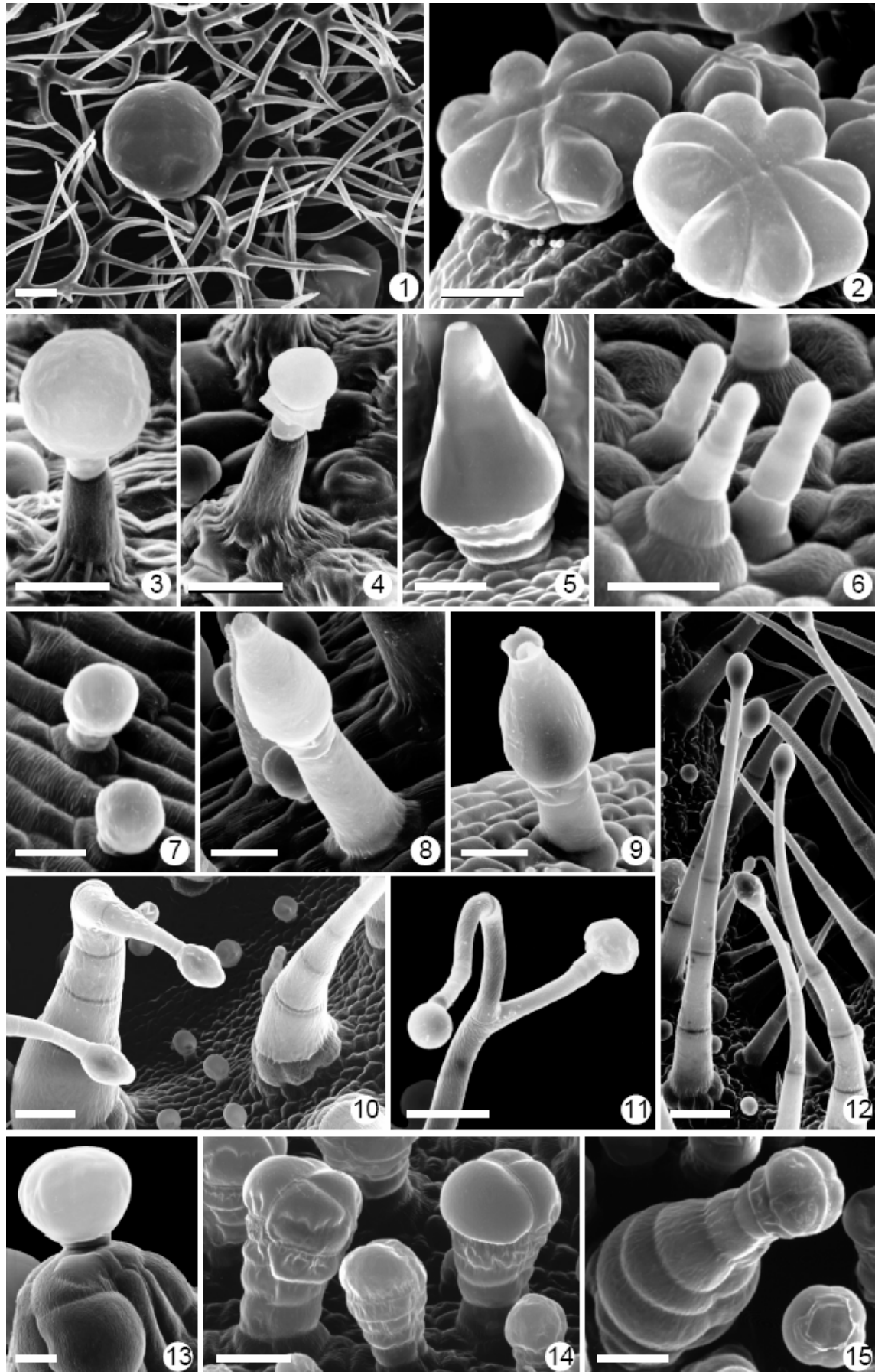


Fig. B

ancestral, nas células de mucilagem desses taxa, se admitirmos que estas evoluíram a partir de idioblastos de óleos, substituindo-os em certas famílias primitivas (Baas e Gregory 1985). As dicotiledóneas mais avançadas, como as Malvaceae, poderiam ter perdido, durante a evolução, a capacidade de depositar a camada de suberina. A partir dos idioblastos de mucilagem sem paredes suberificadas poder-se-iam ter desenvolvido as bolsas e os canais de mucilagem, ou em alternativa, estes poderiam ter surgido “*de novo*” várias vezes durante a evolução das dicotiledóneas (Bakker e Baas 1993).

Apesar da ocorrência de células, cavidades e canais de mucilagem ser ubíqua nas Bombacaceae, Malvaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae, a sua presença só tem valor taxonómico a nível da espécie ou de categorias inferiores.

Alguns tecidos glandulares eliminam os secretados para espaços intercelulares com forma e dimensões variáveis. – cavidades ou bolsas, estruturas mais ou menos isodiamétricas, e canais secretores com formas alongadas (Figs. A8, A9).

As cavidades e os canais secretores diferenciam-se a partir de maciços de células meristemáticas. Divisões sucessivas, na sua maioria radiais e tangenciais, formam rapidamente um conjunto de células, que constituem mais tarde as células epiteliais que delimitam o lúmen, e as células da bainha. O espaço intercelular, que será no futuro, o lúmen da cavidade ou do canal, forma-se entre as células mais internas deste maciço por um processo de esquizogenia, que envolve a degradação das pectinas da lamela média, ou por um processo de lisigenia em que ocorre autólise de uma ou mais células secretoras. Em algumas espécies parece ocorrer um processo misto de esquizolisigenia, iniciando-se a estrutura por esquizogenia e crescendo ulteriormente por autólise de células glandulares.

Apesar da biogénese das cavidades e dos canais secretores por lisigenia ser discutida em todos os livros de anatomia e de ter sido referida em alguns estudos recentes (Monteiro *et al.* 1995, Brubaker *et al.* 1996), o conceito de lisigenia continua a ser, tal como no passado, altamente polémico. Em espécies relativamente próximas, a formação de cavidades e de canais secretores tem sido descrita como ocorrendo quer por esquizogenia quer por lisigenia. Na interpretação destas observações contraditórias diferentes explicações têm sido propostas; enquanto alguns autores alertam para problemas de má preservação dos tecidos vegetais (Carr e Carr 1970, Turner 1986), outros admitem que diferentes processos ontogénicos poderão ter lugar nos vários órgãos de uma mesma espécie (Langenheim *et al.* 1978). Recentemente Turner (1998, 1999) ao reavaliar o conceito de lisigenia, estudando as cavidades de *Citrus limon* em material criopreservado e quimicamente fixado, sugere que a lisigenia não é mais de que um artefacto.

A formação do lúmen das cavidades e dos canais é concomitante com o início do processo secretor. Neste contexto é crível que o aumento do lúmen do destas cavidades secretoras dependa da pressão exercida pelo secretado sobre as células epiteliais, que se achatam, sofrendo deformação plástica (Figs. A8, A9).

Tal como nos tricomas glandulares as classes maioritárias de compostos que constituem os secretados podem ser localizados *in situ* (Figs. C24-C28), permitindo a classificação destas estruturas glandulares. Cavidades e canais secretores de compostos lipofílicos são frequentes, respectivamente, nas Myoporaceae, Rutaceae e Mirtaceae e nas Asteraceae, Apiaceae e

---

Fig. C. Caracterização histoquímica das principais classes de metabolitos presentes no secretado em epidermes secretoras de Lamiaceae (1 – 3) e Orchidaceae (4); em tricomas glandulares de Lamiaceae (5 – 15, 21 - 23) e Asteraceae (16 - 20); em idioblastos secretores de Leguminosae (29, 30); em canais secretores de Asteraceae (24 – 27) e Bombacaceae (28); em laticíferos de Apocynaceae (31,32) e Moraceae (33 - 35). Material fresco (1, 2, 5 – 27, 29 – 35) e material fixado (3, 4, 28). **1, 14, 17**, Sudão IV, para lípidos totais. **2, 7, 15, 18, 25**, Azul do Nilo, para lípidos ácidos e neutros. **3, 22, 29, 33, 34**, Negro Sudão B, para lípidos totais. **4, 11, 28**, PAS, para polissacáridos. **6, 24**, Tetróxido de ósmio, para lípidos insaturados. **8 - 10, 21, 26, 32**, Reagente de Nadi, para terpenóides. **19, 20**, Tricloreto de antimónio, para esteróides, respectivamente em luz visível e em UV. **22, 23**, Cloreto de ferro, para compostos fenólicos. **27**, Autofluorescência em UV. **30**, Sulfato de cobre/ácido rubeânico, para ácidos gordos. **5, 12, 13, 31**, Tricomas glandulares e laticífero sem qualquer coloração. Barras = 50µm (1, 2, 4, 26 – 30, 33, 35); Barras = 25µm (3, 5 – 7, 11, 16 – 21, 24 – 26, 31, 32, 35); Barras = 15µm (8 – 10, 12 – 15)

---

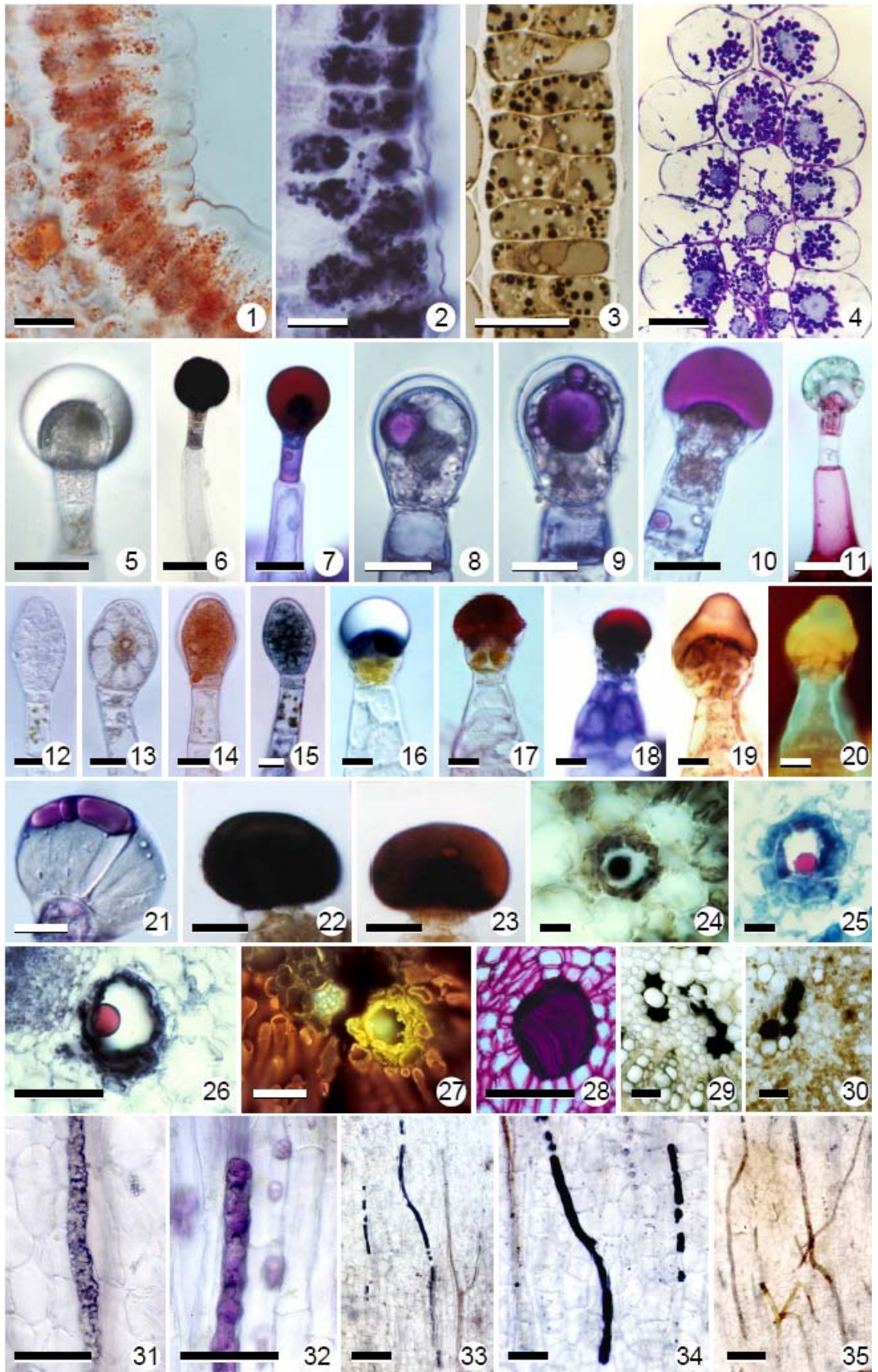


Fig. C

Pinaceae. Nas Anacardiaceae, Hypericaceae e Leguminosae ocorrem quer bolsas quer canais. A presença destas estruturas secretoras deve ser aceite, mais como uma característica de diagnóstico do que como um carácter com valor taxonómico (Metcalf e Chalk 1983).

## LATICÍFEROS

As estruturas secretoras envolvidas na produção de látex denominam-se laticíferos. O látex é uma suspensão ou emulsão de pequenas partículas dispersas num meio com índice de refacção muito variável. Embora a composição do látex difira nas diversas espécies onde ocorre, as partículas dispersas são maioritariamente moléculas terpénicas, ácidos orgânicos, iões e sais minerais. Alguns látex são ricos em alcalóides (Papaveraceae), açúcares (Asteraceae), amido e vitamina B<sub>1</sub> (Euphorbia), enzimas proteolíticas (*Carica*), taninos (*Musa*) e partículas de borracha (*Hevea*). Apesar de muitos látex conterem borracha, são escassas as plantas que a produzem em quantidade e com qualidade que justifique a sua exploração (Fahn 1979, Metcalfe e Chalk 1983).

Os laticíferos são células muito alongadas ou séries de células que se fundem entre si e contêm látex. Em termos estruturais agrupam-se em duas classes: não-articulados e articulados. Os laticíferos não-articulados são formados por células isoladas que têm crescimento indefinido, diferenciando-se em estruturas tubulares gigantes que apresentam crescimento intrusivo. Têm origem em iniciais, que ocorrem no embrião, e que sofrem divisões nucleares não acompanhadas das respectivas citocineses, dando origem a estruturas cenocíticas, que podem ou não ramificar. A penetração das extremidades do laticífero entre as células vizinhas parece ser possível por pectinólise da lamela média, e a sua capacidade de crescer é grandemente determinada quer pela composição específica das suas paredes, quer pela actividade de moléculas que as tornam mais laxas.

Os laticíferos articulados são formados por fileiras de células, que se dispõem em série, podendo as suas paredes terminais permanecer integras – laticíferos articulados não-anastomosados (Figs. C31, C32), ou serem parcialmente ou totalmente degradadas – laticíferos articulados anastomosados (Figs. C33 - C35). A extensão da destruição dessas paredes é variável nas diversas espécies, e quando completa origina uma estrutura cenocítica, que é difícil de distinguir daquela que constitui os laticíferos não-articulados, excepto se seguirmos o seu desenvolvimento desde o embrião (Mahlberg 1993). À medida que a planta se desenvolve a partir do embrião, estes laticíferos alongam-se por diferenciação de novas células meristemáticas.

Em Cactaceae, Mauseth (1978) refere a presença de laticíferos articulados de um tipo raro, em que o lúmen resulta da lise de diversas células e não da degradação das paredes terminais de fiadas de células, como é habitual. Para além disso, estes laticíferos são delimitados por um epitélio estratificado, bastante espesso, aumentando de diâmetro por desorganização de algumas dessas células. Estudos detalhados são absolutamente necessários em outras espécies para sustentar de uma forma inequívoca este tipo invulgar de laticíferos.

Nos diferentes órgãos, os laticíferos acompanham frequentemente o tecido vascular ocorrendo particularmente associados aos tubos floémicos ou aos raios xilémicos. Embora a distribuição dos laticíferos varia de uma espécie para outra, o seu tipo anatómico é geralmente constante nos diferentes membros de uma família. Nas Apocynaceae, Asclepiadaceae, Urticaceae e Moraceae são não-articulados e nas Asteraceae, Convolvulaceae, Caricaceae, Musaceae e Papaveraceae são articulados. Embora em Euphorbiaceae ocorram, na maioria das espécies, laticíferos não-articulados, em algumas espécies produtoras de borracha, como *Hevea brasiliensis* e *Manihot glaziovii* estão presentes laticíferos articulados (Metcalf e Chalk 1983).

## REFERÊNCIAS

- Abu-Asab, MS, PD Cantino 1987. Phylogenetic implications of leaf anatomy in subtribe Melittidinae (Labiatae) and related taxa. *Journal of the Arnold Arboretum* 68: 1 – 34.
- Ascensão L, MS Pais 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of secretory products. *Botanical Gazette* 148: 221 – 227.

- Ascensão L, N Marques, MS Pais 1995. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75: 619- 626.
- Ascensão L, N Marques, MS Pais 1997. Peltate trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Science* 158: 247 – 256.
- Ascensão L, MS Pais 1998. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* 81: 263 – 271.
- Ascensão L, A Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, J Schriepsema, SG Deans, JJ Scheffer 1998. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition and its biological activity. *International Journal of Plant Science* 159: 31 – 38.
- Ascensão L, L Mota, MM Castro 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* 84: 437- 447.
- Ascensão L, JAT da Silva, JG Barroso, AC Figueiredo, LG Pedro 2001. Glandular trichomes and essential oils of *Helichrysum stoechas*. *Israel Journal of Plant Science* 49: 115 – 122.
- Baas P e M Gregory 1985. A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. *Israel Journal of Botany* 34: 167 – 186.
- Bakker ME, P Baas 1993. Cells walls and mucilage cells. *Acta Botanica Neerlandesa* 42:133 -139.
- Briskin DP 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology* 124: 507- 514.
- Brubaker BM, CG Benson, C Miller, DN Leach 1996. Occurrence of terpenoid aldehydes and lysigenous cavities in the “glandless” seeds of Australian *Gossypium* species. *Australian Journal of Botany* 44: 601 – 612.
- Carr DJ e GM Carr 1970. Oil glands and ducts I Eucalyptus L' Herit. II. Development and structure of oil glands in the embryo. *Australian Journal of Botany* 18: 191 – 212.
- Dickson WC 2000. Integrative Plant Anatomy. Academic Press, New York, London, Tokyo.
- Duke SO, C Canel, AM Rimando, MR Tellez, MV Duke, RN Paul 2000. Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Advances in Botanical Research* 31: 121-151.
- Fahn A 1979. Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Fahn A 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108: 229 – 257.
- Fahn A.1990. Plant Anatomy. 4<sup>th</sup>Edition. Pergamon Press, Oxford.
- Gregory M e P Baas 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38: 125 – 174.
- Hulskamp M, V Kirik 2000. Trichome differentiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Advances in Botanical Research* 31: 237 – 260.
- Langenheim JH, WH Stubblebine, DE Lincoln, CE Foster 1987. Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. *Biochemical Systematic Ecology* 6: 299 – 313.
- Mahlberg PG 1993. Laticifers: an historical perspective. *The Botanical Review* 59: 1 – 23.
- Metcalf CR, L Chalk 1983. Anatomy of the Dicotyledons. II. Wood Structure and Conclusion of General Introduction. 2<sup>nd</sup>. Edn. Clarendon Press, Oxford.
- Monteiro WR, MMCastro, A Fahn, W Cadeira 1995. Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Podophyllum lanceolatum* (Asteraceae). *Nordic Journal of Botany* 15: 69 – 76.
- Richardson PM 1992. The chemistry of the Labiatae: an introduction and overview. In: Harley RM, T Reynolds (Eds.). *Advances in Labiatae Science*, pp.291 -297. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sing G, RK Upadhyay 1993. Essential oils: a potent source of natural pesticides. *Journal Science of Indian Research* 52: 676 – 683.
- Spring O 1989. Microsampling: an alternative approach using sesquiterpene lactones for systematics. *Biochemical Systematic and Ecology* 17: 509- 517.
- Spring O 2000. Chemotaxonomy based on glandular trichome metabolites. *Advances in Botanical Research* 31: 153 -174.
- Theobald WL, JL Krahulik, RC Rollins 1980. Trichome description and classification. In: Metcalf CR, L Chalk (Eds.), *Anatomy of Dicotyledons*, 2<sup>nd</sup> ed., I, pp. 40 – 53. Clarendon Press, Oxford.
- Tyle VE 1999. Phytomedicines: back to the future. *Journal of Natural Products* 62: 1589 -1592.
- Turner GW 1986. Comparative development of secretory cavities in the tribes Amorpeae and Psoraleeae (Leguminosae: Papilionoideae). *American Journal Botany* 73: 1178 – 1192.
- Turner GW, AM Berry, EM Gifford 1998. Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. F. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Science* 159: 75 – 88.
- Turner GW 1999. A brief history of the lysigenous concept. *The Botanical Review* 65: 76 – 88.
- Wagner GJ, E Wang, RW Shepherd 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11.

- Wang E, GJ Wagner 2003. Isolation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using post-transcriptional gene silencing. *Planta* 216: 686-691.
- Warker AR, MD Marks 2000. Trichome initiation in Arabidopsis. *Advances in Botanical Research* 31: 219-236.
- Werker E 2000. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research* 31: 1-35.
-

## ASPECTOS LEGAIS DA UTILIZAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS\*

A. P. Martins

INFARMED – Parque de Saúde de Lisboa, Av. Do Brasil nº 53, 1749-004 Lisboa

### INTRODUÇÃO

Até há poucos anos, se se tiver em conta o lento desenvolvimento da terapêutica, as plantas foram a maior fonte de medicamentos para o tratamento das doenças humanas. Desde sempre as plantas medicinais estiveram ligadas ao progresso da medicina e ao exercício da profissão farmacêutica. No entanto, no início do séc. XX tem lugar o início do desenvolvimento da química de síntese, com uma desvalorização simultânea da fitoterapia.

Esta decadência de utilização de plantas medicinais pode atribuir-se, por um lado, aos numerosos medicamentos de síntese que conseguiram tratar e erradicar doenças para as quais as plantas medicinais não se mostraram eficazes. Assim, por exemplo, as sulfamidas, primeiro, e seguidamente os antibióticos (muitos dos quais são, também, de origem vegetal) fizeram crer que se tinha conseguido vencer a doença. No entanto, surgiram novas doenças, quadros degenerativos e problemas de saúde relacionados com o sedentarismo e com o aumento da esperança de vida. Além disso, surgiram vários problemas ligados à utilização de medicamentos de síntese, tais como os vários efeitos secundários que podem provocar, o que condicionou uma nova etapa na aprovação de medicamentos, sendo decisivos, além da eficácia, a segurança e qualidade. Esta necessidade de comprovação da eficácia levou a que se questionasse a utilização de muitos dos medicamentos até então utilizados, baseada em muitos casos em observações de autoridades não discutidas, em conclusões obtidas *in vitro*, ou em ensaios clínicos não sistematizados nem controlados com metodologia adequada.

Para além dos aspectos científicos e técnicos, também a nova organização económica foi um grande obstáculo ao desenvolvimento da fitoterapia. Na verdade, o desenvolvimento de patentes e marcas, por exemplo, foi uma das grandes causas de decadência dos medicamentos de origem natural, que são mais difíceis de patentear, e, por isso, da fitoterapia, que foi relegada, em muitos casos para os países em vias de desenvolvimento e de baixos recursos económicos.

### SITUAÇÃO ACTUAL

Após a constatação dos efeitos secundários dos medicamentos de síntese e do abuso na toma de certos medicamentos, com o conseqüente aparecimento de resistências, procurou-se a utilização de tratamentos menos agressivos. Também o desenvolvimento científico e técnico que permitiu demonstrar a eficácia e segurança terapêutica de muitas plantas medicinais, assim como a possibilidade de preparação de formas galénicas com teores padronizados de princípios activos, fizeram com que a fitoterapia seja de novo um ramo da terapêutica a ter em atenção.

De facto, assiste-se actualmente a um retorno à fitoterapia. Países como a Alemanha, França e Inglaterra incluíram várias plantas medicinais nas respectivas farmacopeias e elaboraram monografias tão importantes como as da Comissão E (Comité de peritos em plantas medicinais, criado pela Agência Federal de Saúde Alemã para avaliar a segurança das fitomedicinas), que nos últimos 15 anos publicou 410 monografias sobre 324 plantas, incluindo as descrições das plantas e respectivos constituintes, propriedades farmacológicas, indicações terapêuticas aceites, contra-indicações, efeitos secundários, interacções, doses recomendadas, requisitos de controlo da qualidade e condições recomendadas de armazenamento.

Em França, foi publicado em 1990, um “Aviso para produtores sobre a autorização comercial

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 29-35, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

de produtos baseados em plantas medicinais”, incluindo uma lista de 174 plantas e partes de plantas com indicações terapêuticas aprovadas e uma lista de 35 plantas aceites com indicações terapêuticas para infecções menores.

Em Inglaterra existe uma lista de plantas que só podem ser comercializadas em Farmácias registadas e duas listas de plantas que podem ser comercializadas por médicos na sua consulta privada ou por farmácias registadas.

Também a OMS elaborou diversos documentos técnicos acerca de plantas medicinais (ver Anexo I), incluindo normas e guias de conservação, investigação e avaliação de segurança e eficácia, controlo da qualidade, selecção de plantas medicinais essenciais, normas de recomendação e 28 monografias publicadas em 1999 e 32 de publicação mais recente.

## **LEGISLAÇÃO COMUNITÁRIA RELATIVA AOS MEDICAMENTOS DE USO HUMANO**

A legislação europeia sobre medicamentos de uso humano teve, desde sempre, dois objectivos fundamentais: a protecção da saúde e a livre circulação de medicamentos entre todos os Estados-Membros da União Europeia.

Assim, desde 1965 que se aprovam directivas harmonizadoras dos procedimentos a nível europeu. A primeira foi a Directiva 65/65/CEE do Conselho, de 22 de Janeiro. Esta directiva suprimiu as divergências que existiam em matéria de regulamentação de medicamentos nos diferentes estados membros. Mais tarde, a Directiva 75/319/CEE do Conselho, de 20 de Maio, estabeleceu o procedimento de registo multi-estado, para reconhecimento de uma autorização concedida por um estado membro, e criou um Comité de Especialidades Farmacêuticas, que tinha como missão unificar os critérios e resolver as disparidades produzidas durante a aplicação deste procedimento europeu. Na mesma data foi aprovada a Directiva 75/318/CEE do Conselho, com o objectivo principal de eliminar as diferenças que ainda subsistiam relativamente à informação e documentação necessária para o registo de um medicamento novo.

As disposições destas primeiras directivas harmonizadoras não foram suficientes no caso de alguns medicamentos especiais (vacinas, soros, toxinas, especialidades à base de sangue humano, isótopos radioactivos, medicamentos homeopáticos). Estes grupos de produtos foram tendo, posteriormente, regulamentação específica, através da aprovação de várias directivas específicas.

O decorrer dos anos e os avanços tecnológicos e científicos fizeram com que as Directivas 65/65/CEE, 75/318/CEE e 75/319/CEE fossem sucessivamente actualizadas e modificadas.

A existência de tantas directivas e das suas numerosas actualizações, aplicáveis aos medicamentos de uso humano fazia com que a sua consulta e correcta aplicação fosse difícil, pelo que em 2001 se compilou numa única directiva a legislação comunitária referente aos medicamentos de uso humano. Assim, em 6 de Novembro de 2001, foi publicada a Directiva 2001/83/CE do Parlamento e do Conselho, estabelecendo um código comunitário relativamente aos medicamentos para uso humano.

Com a publicação deste código, o panorama legislativo comunitário em matéria de registo de medicamentos de uso humano passou a ser regulamentado por esta directiva e pelo Regulamento 2309/93 do Conselho, de 22 de Julho. Este último estabeleceu procedimentos comunitários para a autorização de medicamentos de uso humano e veterinário e criou a Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA).

Este Regulamento exigia que num prazo de 6 anos após a sua entrada em vigor a Comissão fizesse uma avaliação da experiência adquirida como resultado da aplicação dos procedimentos comunitários. Em cumprimento do estabelecido, a Comissão publicou, em Novembro de 2001, um relatório, expondo as conclusões da avaliação do funcionamento dos procedimentos de registo e respectivas propostas de revisão. Desde essa altura teve lugar um intenso processo de discussão através da Comissão, do Parlamento e do Conselho Europeu, até à adopção dos documentos que configuram a revisão legislativa do direito farmacêutico comunitário:

- A Directiva 2004/24/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março de 2004, que altera, em relação aos medicamentos tradicionais à base de plantas, a Directiva

2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano.

- A Directiva 2004/27/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março de 2004, que modifica a Directiva 2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano.
- O Regulamento 726/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março de 2004, que estabelece procedimentos comunitários de autorização e de fiscalização de medicamentos para uso humano e veterinário e que institui uma Agência Europeia de Medicamentos.

A Directiva 2004/27/CE responde a quatro objectivos básicos:

- Melhorar a saúde do doente europeu mediante uma maior vigilância do mercado europeu de medicamentos.
- Assegurar que o sistema legislativo europeu é viável mesmo prevendo o alargamento da União Europeia.
- Racionalizar e simplificar o sistema, de modo a torná-lo mais coerente e transparente.
- Favorecer a competitividade da indústria farmacêutica.

Além disso, tendo em conta o número crescente de produtos ditos "de fronteira" entre o sector dos medicamentos e os outros sectores, a Directiva 2004/27/CE alterou a definição de medicamento de modo a evitar que subsistam quaisquer dúvidas relativamente à legislação aplicável quando um produto corresponda integralmente à definição de medicamento mas possa também ser abrangido pela definição de outros produtos regulamentados, estabelecendo igualmente que, em caso de dúvida, se, tendo em conta a globalidade das suas características, um produto corresponder simultaneamente à definição do medicamento e à definição de um produto regido por outras disposições legislativas comunitárias, se aplicam as outras disposições da presente directiva.

### **Medicamentos tradicionais à base de plantas**

A recente modificação do direito farmacêutico comunitário foi feita pela Directiva 2004/27/CE, pelo Regulamento 726/2004 e pela Directiva 2004/24/CE, esta última relativa aos medicamentos tradicionais à base de plantas medicinais.

A Directiva 2004/24/CE responde ao objectivo de harmonizar as regras distintas dos vários Estados-Membros em matéria de medicamentos com uma grande tradição de utilização para, desta forma, facilitar o seu comércio e a competitividade entre os fabricantes dentro da Comunidade.

Sem as normas específicas estabelecidas por esta Directiva, a maioria destes produtos não conseguiria cumprir os requisitos de eficácia e segurança que devem demonstrar os medicamentos para obterem uma autorização de introdução no mercado (AIM). Como a maioria destes medicamentos, com uma vasta tradição de utilização, são substâncias de origem vegetal, o Parlamento Europeu e o Conselho começaram por criar uma directiva específica para os medicamentos tradicionais à base de plantas, podendo futuramente alargar o seu âmbito de forma a possibilitar este registo simplificado a outras categorias de medicamentos.

Antes de se detalhar o conteúdo desta directiva convém lembrar que, apesar de se tratar de uma directiva sobre medicamentos tradicionais à base de plantas, faz alterações a uma outra directiva, já existente, a Directiva 2001/83/CE, que aprova o código comunitário sobre medicamentos de uso humano (JO L-136, de 30.04.2004).

A Directiva 2004/24/CE incorpora especificamente no artigo 1º do código novas definições e insere um novo capítulo no título III, o Capítulo 2 A "Disposições particulares aplicáveis aos medicamentos tradicionais à base de plantas", que compreende uma série de artigos, desde o 16 A até ao 16 I.

Os pontos mais importantes da directiva sobre medicamentos tradicionais à base de plantas são os seguintes:

- Definições
- Disposições específicas aplicáveis aos medicamentos tradicionais à base de plantas (Registo de utilização tradicional)
- Indeferimento (Causas de recusa de autorização)
- Rotulagem e folheto informativo
- Publicidade
- Comité dos medicamentos à base de plantas
- Transposição nacional

### **Definições**

No artigo 1º da Directiva 2001/83/CE são introduzidas quatro novas definições, correspondentes a medicamento tradicional à base de plantas, medicamento à base de plantas, substâncias vegetais e preparações vegetais.

- Medicamento tradicional à base de plantas: Qualquer medicamento à base de plantas que observe as condições do nº 1 do artigo 16.ºA.
- Medicamento à base de plantas: Qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias activas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas.
- Substâncias derivadas de plantas: Quaisquer plantas inteiras, fragmentadas ou cortadas, partes de plantas, algas, fungos e líquenes não transformados, geralmente secos, mas por vezes frescos. São igualmente considerados substâncias derivadas de plantas alguns exsudados não sujeitos a um tratamento específico. As substâncias derivadas de plantas são definidas de forma exacta através da parte da planta utilizada e da taxonomia botânica, de acordo com o sistema binomial (género, espécie, variedade e autor).
- Preparações à base de plantas: Preparações obtidas submetendo as substâncias derivadas de plantas a tratamentos como a extracção, a destilação, a expressão, o fraccionamento, a purificação, a concentração ou a fermentação. São disso exemplo as substâncias derivadas de plantas pulverizadas ou em pó, as tinturas, os extractos, os óleos essenciais, os sucos espremidos e os exsudados transformados.

### **Registo de utilização tradicional**

Como principal novidade, introduz-se um procedimento simplificado para o “registo de utilização tradicional” para os medicamentos à base de plantas que reúnam as seguintes condições:

- Que seja suficiente a informação sobre a utilização tradicional do medicamento; em particular, o medicamento seja comprovadamente não nocivo nas condições de utilização especificadas e os efeitos farmacológicos ou a eficácia do medicamento sejam plausíveis, tendo em conta a utilização e a experiência de longa data;
- Que se destinem exclusivamente a ser administrados de acordo com a dosagem e posologia especificadas;
- Que sejam preparações administráveis por via oral, externa e/ou inalatória;
- Que já tenha decorrido o período de utilização tradicional previsto na alínea c) do n.º 1 do artigo 16ºC (o medicamento em questão, ou um medicamento correspondente, teve uma utilização terapêutica pelo menos durante os 30 anos anteriores à data do pedido, incluindo pelo menos 15 anos no território da Comunidade);
- Que tenham indicações adequadas exclusivamente aos medicamentos tradicionais à base de plantas que, dadas a sua composição e finalidade, se destinem e sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização do tratamento;

A presença no medicamento à base de plantas de vitaminas ou minerais cuja segurança esteja

bem documentada não impedirá que o produto seja sujeito ao registo simplificado criado pela Directiva 2004/24/CE (registo de utilização tradicional), desde que a acção das vitaminas ou minerais seja complementar da acção das substâncias activas à base de plantas em relação à ou às indicações específicas invocadas.

No entanto, e independentemente do exposto, o registo de utilização tradicional só será aplicável se as autoridades competentes considerarem que o medicamento não reúne os critérios necessários para outro tipo de registo, nomeadamente uma autorização, nos termos do artigo 6º (da Directiva 2001/83/CE), ou um registo, nos termos do artigo 14º (da Directiva 2001/83/CE – procedimento de registo simplificado especial para os medicamentos homeopáticos).

O requerente e o titular do registo devem estar estabelecidos na União Europeia.

Considera-se, em geral, que a longa tradição do medicamento permite reduzir a necessidade de recorrer a ensaios clínicos, na medida em que a sua eficácia é plausível, tendo em conta a utilização e a experiência de longa data. O mesmo acontece relativamente aos ensaios pré-clínicos se, com base na informação sobre a sua utilização tradicional, se comprovar que o medicamento não é nocivo nas condições específicas da respectiva utilização. No entanto, até mesmo uma longa tradição não exclui possíveis receios em relação à segurança do medicamento, motivo pelo qual as autoridades competentes podem solicitar toda a informação que considerem necessária para a avaliação da segurança do medicamento. Para facilitar o registo de determinados medicamentos à base de plantas, a directiva prevê a elaboração, por parte do Comité dos Medicamentos à Base de Plantas, de uma lista de substâncias derivadas de plantas, preparações e associações das mesmas, que em certas condições de utilização são consideradas seguras. Esta lista deve incluir, para cada substância derivada de plantas, a indicação terapêutica, a dosagem especificada e a posologia, a via de administração e quaisquer outros dados necessários para a sua utilização segura como medicamento tradicional. Assim, se um requerente apresentar um pedido de registo de utilização tradicional relativamente a uma substância derivada de plantas, preparação ou associações das mesmas constante desta lista, não necessitará de apresentar os dados especificados nas alíneas b), c) e d) do nº 1 do artigo 16º C, i.e., qualquer autorização ou registo, obtidos pelo requerente noutro Estado-Membro ou num país terceiro, com vista à introdução do medicamento no mercado, bem como pormenores sobre qualquer eventual decisão de recusa de concessão de autorização ou de registo, na Comunidade ou num país terceiro, e os motivos de tal decisão; dados bibliográficos ou pareceres de peritos que provem que o medicamento em questão, ou um medicamento correspondente, teve uma utilização terapêutica pelo menos durante os 30 anos anteriores à data do pedido, incluindo pelo menos 15 anos no território da Comunidade; uma revisão bibliográfica dos dados de segurança, acompanhada de um relatório pericial e, nos casos em que a autoridade competente, mediante pedido suplementar, assim o exija, os dados necessários para a avaliação da segurança do medicamento.

A qualidade de um medicamento é independente da sua utilização tradicional, pelo que os medicamentos tradicionais devem apresentar, tal como qualquer outro medicamento, os dados referentes aos ensaios físico-químicos, biológicos ou microbiológicos.

O artigo 16º C descreve detalhadamente quais os dados e documentos que devem acompanhar o pedido de registo de utilização tradicional.

### **Causas de recusa de autorização**

O registo de utilização tradicional deve ser indeferido se o pedido não cumprir todos os critérios necessários, ou seja, se o requerente e o titular de registo não estiverem estabelecidos na Comunidade Europeia; se o pedido de registo não incluir todos os dados e documentos requeridos; ou se se verificar, pelo menos, uma das condições que se seguem:

- A composição qualitativa e/ou quantitativa não serem as declaradas;
- As indicações não observarem as condições definidas no artigo 16º A;
- O medicamento poder ser nocivo em condições normais de utilização;
- Os dados sobre a utilização tradicional serem insuficientes, designadamente se os efeitos farmacológicos ou a eficácia não forem plausíveis, tendo em conta a utilização e a experiência de longa data;

- A qualidade farmacêutica não ter sido devidamente demonstrada.

### **Rotulagem e folheto informativo**

Além dos requisitos previstos para qualquer medicamento, a rotulagem e o folheto informativo devem conter uma menção que refira que:

- O produto é um medicamento tradicional à base de plantas para utilização na ou nas indicações especificadas, baseado exclusivamente numa utilização de longa data; e que
- O utilizador deve consultar um médico ou um profissional de cuidados de saúde qualificado se os sintomas persistirem durante o período de utilização do medicamento ou se surgirem efeitos adversos não mencionados no folheto informativo.

Além disso, os Estados-Membros poderão exigir que a rotulagem e o folheto informativo indiquem a natureza da tradição em questão.

### **Publicidade**

Além dos requisitos previstos para qualquer medicamento, a publicidade dos medicamentos registados ao abrigo do presente capítulo deve conter a seguinte menção: medicamento tradicional à base de plantas, para utilização na ou nas indicações especificadas, baseado exclusivamente numa utilização de longa data.

### **Comité dos Medicamentos à Base de Plantas**

O artigo 16ºH institui, na Agência Europeia de Medicamentos, o Comité dos Medicamentos à Base de Plantas. As competências atribuídas a este Comité são as seguintes:

Relativamente aos registos simplificados

- Emitir pareceres sobre a adequação das provas da longa utilização do medicamento, ou de um medicamento correspondente - a pedido do Estado-Membro onde foi apresentado o pedido de registo de utilização tradicional, o Comité dos Medicamentos à Base de Plantas elabora um parecer sobre a adequação das provas da longa utilização do medicamento, devendo o referido Estado-Membro apresentar documentos justificativos pertinentes.
- Decidir se um medicamento que tenha sido utilizado na Comunidade durante menos de 15 anos, mas que cumpra os outros requisitos necessários para poder ser considerado de utilização tradicional poderá beneficiar do registo simplificado – sempre que tal situação ocorra o Estado-Membro onde tiver sido apresentado o pedido de registo de utilização tradicional remete o medicamento para o Comité dos Medicamentos à Base de Plantas. Compete ao Estado-Membro apresentar os documentos justificativos pertinentes dessa remissão. O comité ponderará a questão de saber se estão satisfeitos todos os outros critérios de registo simplificado. Se o comité o considerar possível, elaborará uma monografia comunitária de plantas medicinais, que será tida em conta pelo Estado-Membro aquando da sua decisão final.
- Desempenhar as funções relacionadas com o procedimento de registo por reconhecimento mútuo.
- Preparar um projecto de lista de substâncias derivadas de plantas, preparações e associações das mesmas - esta lista deve incluir, para cada substância derivada de plantas, a indicação terapêutica, a dosagem especificada e a posologia, a via de administração e quaisquer outros dados necessários para a sua utilização segura como medicamento tradicional.
- Elaborar monografias comunitárias de medicamentos tradicionais à base de plantas.

Relativamente às autorizações de introdução no mercado

- Elaborar monografias comunitárias de plantas medicinais destinadas aos medicamentos à base de plantas (uso medicinal bem estabelecido).
-

#### Relativamente às arbitragens

- Encarregar-se de emitir parecer sobre as questões levantadas, em casos de arbitragem apresentados à Agência Europeia dos Medicamentos, durante um procedimento de reconhecimento mútuo.
- Sempre que a Agência seja consultada, durante um procedimento de reconhecimento mútuo, sobre outros medicamentos que contenham substâncias derivadas de plantas, deve, se necessário, dar um parecer sobre a substância derivada de plantas.

#### Outras

- O Comité dos Medicamentos à Base de Plantas desempenhará quaisquer outras funções que lhe sejam atribuídas pela legislação comunitária.

### Transposição nacional

Para dar cumprimento ao estipulado na Directiva 2004/24/CE, todos os Estados-Membros, deveriam ter transposto esta Directiva para o seu direito interno até 30 de Outubro de 2005.

### REFERÊNCIAS

Directiva 2004/24/CE, JO L 136, 30.04.2004  
Directiva 2004/27/CE, JO L 136, 30.04.2004  
Regulamento 726/2004, JO L 136, 30.04.2004  
Directiva 2001/83/CE, JO L 311, 28.11.2001  
Directiva 75/318/CEE, JO L 147, 09.06.1975  
Directiva 75/319/CEE, JO L 147, 09.06.1975  
Directiva 65/65/CEE, JO 22, 09.02.1965  
Regulamento 2309/93, JO L 214, 24.08.1993

### ANEXO I

General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine (WHO, 2000).  
WHO Strategy on Traditional Medicine: 2002-2005 (WHO, 2002).  
Annex 08 - Good Manufacturing Practices: Supplementary Guidelines for the Manufacture of Herbal Medicinal Products (WHO, 1996).  
Annex 11 - Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines (WHO, 1996).  
General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine (WHO, WHO/EDM, 2000).  
Guidelines for the Appropriate use of Herbal Medicines (WHO/WPRO, 1998).  
Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines (WHO/WPRO, 1993).  
WHO guidelines on developing consumer information on proper use of traditional, complementary and alternative medicine (WHO, 2004).  
WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants (WHO, 2003).  
WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems (WHO, 2004).  
WHO/IUCN/WWF Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants (IUCN, 1993).  
Regulatory Situation of Herbal Medicines - A Worldwide Review (WHO/TRM, 1998).  
Report of a WHO Consultation on Traditional Medicine and AIDS: Clinical Evaluation of Traditional Medicines and Natural Products (Geneva, 26-28 September 1990) (WHO, 1990).  
WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 1 (WHO, 1999).  
WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2 (WHO, 2004).  
Medicinal plants in China (WHO/WPRO, 1989).  
Medicinal plants in the Republic of Korea (WHO/WPRO, 1998).  
Medicinal plants in Viet Nam (WHO/WPRO, 1990).  
Basic Tests for Drugs - Pharmaceutical Substances, Medicinal Plant Materials and Dosage Forms (WHO, 1998).  
Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials (WHO, 1998).

## O GÉNERO *HYPERICUM* L. EM PORTUGAL\*

M. T. D. Nogueira

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P., Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas, Produtos Naturais, Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F, 1649-038 Lisboa, Portugal

### RESUMO

O estudo do género *Hypericum* L. (*Guttiferae*) abrange os treze *taxa* existentes em Portugal Continental. Está em curso o estudo dos restantes quatro *taxa* presentes na Madeira e Açores.

Apresenta-se a revisão taxonómica das treze espécies e os mapas de distribuição geográfica dos onze *taxa* espontâneos.

Analisou-se a composição química dos óleos essenciais de populações dos treze *taxa* por técnicas cromatográficas (GC e GC-MS). Estudou-se o aroma total de plantas e óleos essenciais por olfactometria. Foram ensaiadas culturas dos *taxa* raros e dos medicinais. Realizou-se ensaios de diferentes processos de secagem e conservação das plantas.

Os resultados foram tratados por métodos de análise estatística multivariada (aglomeração e análise de componentes principais) para se obter uma classificação dos treze *taxa* e proceder a uma interpretação das combinações de componentes dos óleos essenciais subjacente à estrutura quimiotaxonómica. Verificou-se a existência de diferenças significativas na análise do aroma e dos óleos essenciais de *H. androsaemum* relativamente aos das restantes espécies. Dentro do grupo de *taxa*, exceptuando *H. androsaemum* e *H. tomentosum*, nota-se alguma diversidade de composição dos respectivos óleos essenciais correlacionada com caracteres taxonómicos (morfológicos). Este padrão de separação não se alterou ao se tomar em consideração os componentes dos óleos essenciais dos restantes seis *taxa* estudados a nível mundial.

### INTRODUÇÃO

Tem-se notado ultimamente uma intensificação na procura e utilização terapêutica de plantas medicinais em todo o mundo. Dos medicamentos à base de plantas com maior incremento de vendas nos últimos anos surgem em primeiro lugar os que compreendem *Hypericum perforatum*, administrados essencialmente para estados depressivos suaves a moderados. Das muitas actividades farmacológicas atribuídas a esta espécie, salientam-se a antidepressiva, antiviral e antibacteriana de extractos alcoólicos e aquosos, as quais confirmam algumas das suas utilizações tradicionais (Barnes *et al.* 2001). O *H. perforatum* está incluído nas monografias da Comissão E Alemã, da ESCOP e em várias farmacopeias.

As restantes espécies do género *Hypericum* presentes em Portugal continental têm sido menos estudadas, surgindo, no entanto, algumas referências do ponto de vista fitoquímico, essencialmente para o *H. androsaemum* (Morteza-Semnani e Saeedi 2005, Guedes *et al.* 2004, Guedes *et al.* 2003, Valentão *et al.* 2003, Dias *et al.* 1999, Andrade *et al.* 1998, Seabra e Alves 1989, Seabra e Alves 1990, Seabra 1988), *H. calycinum* (Klingauf *et al.* 2005, Decosterd *et al.* 1991), *H. hircinum* (Bertoli *et al.* 2000), *H. undulatum* (Kitanov e Nedialkov 1998, Seabra *et al.* 1991), *H. perforatum* (Touafek *et al.* 2005, Couladis *et al.* 2001) e *H. elodes* (Piovan *et al.* 2004, Seabra e Alves 1991, Seabra e Alves 1988). São referidos estudos de bioactividade para *H. androsaemum* (Valentão *et al.* 2004), *H. calycinum* (Öztürk *et al.* 1996) e *H. hircinum* (Pistelli *et al.* 2000).

São várias as espécies deste género com popularidade na medicina tradicional e no mercado dos produtos naturais em Portugal, salientando-se entre as mais procuradas o *H. androsaemum*, o *H. perforatum* e, por vezes, o *H. undulatum*.

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 36-47, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

No seguimento de estudos que se tem vindo a efectuar no género *Hypericum* (Nogueira *et al.* 1998, Nogueira *et al.* 1999, Nogueira *et al.* 2000, Farinha *et al.* 2002, Nogueira 2002), apresenta-se um enquadramento quimiotaxonómico dos treze *taxa* presentes em Portugal Continental (populações espontâneas e cultivadas). Este estudo baseia-se em caracteres taxonómicos, morfológicos e de composição química dos óleos essenciais, das seguintes espécies *Hypericum androsaemum* L. ("hipericão-do- Gerês"), *H. pulchrum* L., *H. montanum* L., *H. tomentosum* L., *H. pubescens* Boiss., *H. elodes* L., *H. perforiatum* L., *H. linarifolium* Vahl., *H. humifusum* L., *H. undulatum* Schousb. ex. Willd ("hipericão-Kneip"), *H. perforatum* L. ("milfurada, erva-de-S.João"), *H. calycinum* L. e *H. hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson. Os resultados foram tratados por métodos estatísticos multivariados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material estudado

Procedeu-se ao estudo corológico para Portugal Continental dos 11 *taxa* espontâneos, uma vez que o *Atlas Florae Europaeae* ainda não abrangeu este género. Os elementos de localização de cada espécie recolhidos nos herbários portugueses (BRESA, COI, ELVE, LISE, LISFA, LISI, LISU e PO - GS) foram reunidos em mapas, elaborados com a quadrícula UTM (Universal Transverse Mercator Coordinates) de 10x10 km.

Foram estudadas diferentes populações de cada *taxon*, tentando cobrir a sua área de distribuição geográfica. Fez-se prospecção e colheita da parte aérea de cada amostra no estado fenológico de floração / frutificação, tendo-se procedido ainda ao estudo de diferentes estados fenológicos de algumas espécies, conforme descrito anteriormente (Nogueira 2002).

Procedeu-se à cultura dos *taxa* raros e dos já cultivados (*H. montanum*, *H. pubescens*, *H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. hircinum* ssp. *majus*). Cultivou-se também *H. humifusum* para comparação com populações espontâneas e eventual utilização industrial.

Optimizou-se um processo de secagem durante 8 dias em estufa com ventilação com a temperatura controlada entre 25 a 30 °C. A conservação das plantas após colheita fez-se a cerca de -15 °C em embalagens sob vácuo.

### Análises químicas e tratamento dos dados

#### Extracção

Destilação em aparelho tipo Clevenger modificado (Farmacopeia Portuguesa 2002) da parte aérea do material vegetal seco, durante 3h, com um débito de 3mL/min e com água destilada como líquido de arrastamento, tendo os óleos essenciais extraídos sido separados por decantação no próprio aparelho. Este método permitiu a determinação do rendimento em óleo essencial dos diversos *taxa* estudados.

Destilação em microversão do aparelho de Marcusson modificado (Bicchi *et al.* 1983), no caso de amostras com pequenas quantidades de planta (cerca de 15g). Destilou-se a parte aérea seca, durante 2h e usando também água destilada como líquido de arrastamento. O óleo essencial foi recolhido em ciclo-hexano.

#### Análise química

*Cromatografia gás-líquido* (GC): Carlo Erba Mega HR 5300 com 2 detectores FID; Colunas – OV-1 e Carbowax 20 M (25 m x 0,25 mm d.i. e 0,3 µm de espessura de filme); Gás de arrastamento, hidrogénio, fluxo de saída 1,5 mL/min; injeção com relação de divisão 1/20; temperatura do forno foi programada para 50°C, 1 min, aumentando até 220°C (3°C/min), 220°C durante 20min; temperatura do injectore e detector, 230°C e 250°C, respectivamente.

*Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa* (GC-MS): Hewlett Packard 5890, Serie II; Coluna OV-1 (25m x 0,25mm d.i. e 0,3µm de espessura de filme); Gás de arrastamento, hélio; fluxo de saída, 1mL/min; Injeção com relação de divisão 1/10; temperatura

do forno foi programada para 50°C, 1 min., aumentando até 220°C (3°C/min.), 220°C durante 20 min; temperatura do injectador 230°C; detector massa modelo 5988; energia de ionização 70 eV; Temperatura da interface 280°C.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi assegurada por comparação dos seus índices de retenção (IR nas colunas OV-1 e Carbowax 20M), relativamente a uma mistura padrão de hidrocarbonetos C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> e ainda pelos espectros de massa com os correspondentes dados de compostos de referência.

*Olfactometria*: “Headspace”, Detector electrónico – A32/50S, Gás de arraste, azoto e unidade de aquisição e tratamento de dados. A olfactometria é uma forma instrumental de caracterização aproximada do aroma total, por detecção electrónica (nariz electrónico). Este equipamento contém um conjunto de 32 sensores químicos, revestidos com 32 polímeros diferentes, que permitem a detecção dum espectro de compostos voláteis semelhante às 30 famílias de receptores do nariz humano. Este método baseia-se na interacção dos compostos químicos voláteis com os polímeros semicondutores, originando alteração da resistência eléctrica de cada um, a qual é medida e dá origem ao “fingerprint” ou impressão digital do aroma total (Nogueira 1999).

### Análise multivariada

A análise multivariada foi efectuada recorrendo ao programa NTSYSpc 2.10u – “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” (Rohlf 2002): as percentagens de 50 componentes dos óleos essenciais em estudo foram agrupadas numa matriz com 55 amostras de *Hypericum*.

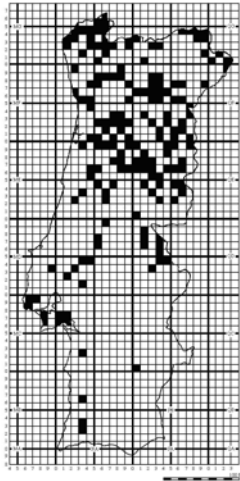
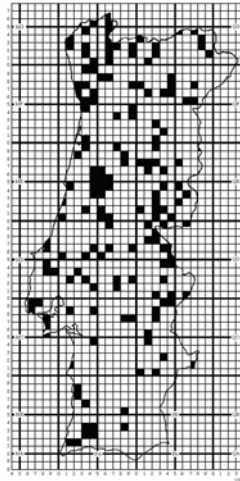
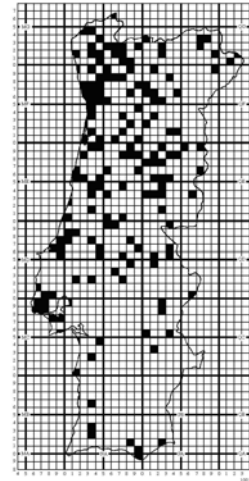
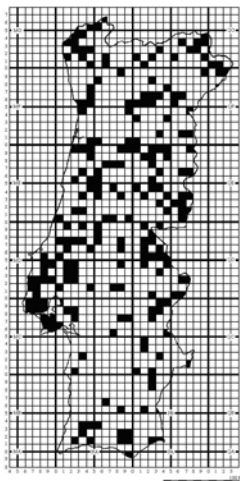
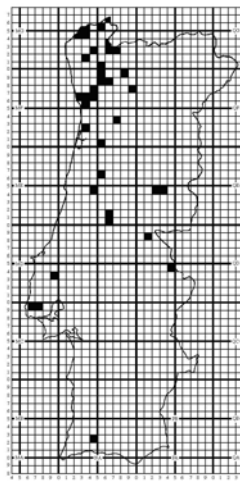
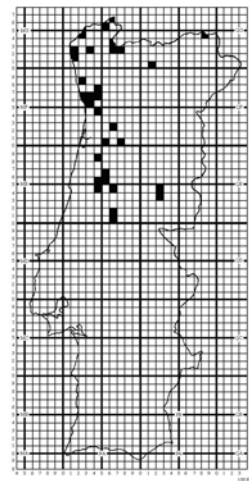
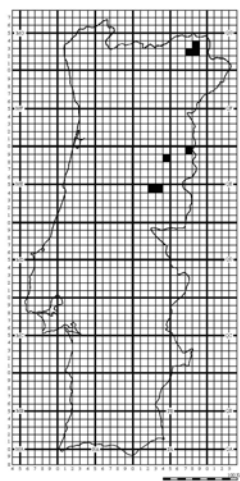
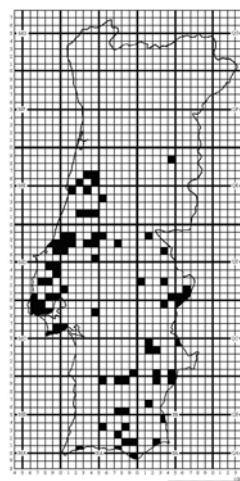
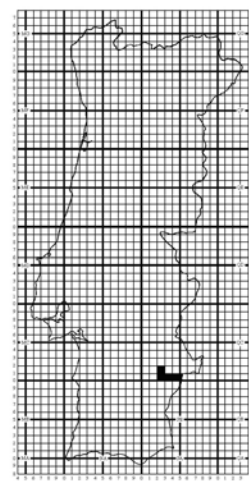
A classificação de amostras e componentes foi feita por análise aglomerativa em grupos (“cluster analysis”), sendo a estratégia de aglomeração o método SINGLE Linkage (vizinho mais próximo). A medida de similaridade considerada entre amostra foi calculada pelo coeficiente da distância Manhattan média. Os resultados da análise aglomerativa em grupos são expressos em dendrogramas.

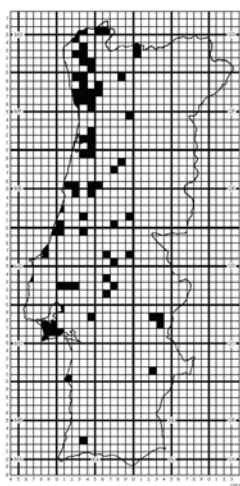
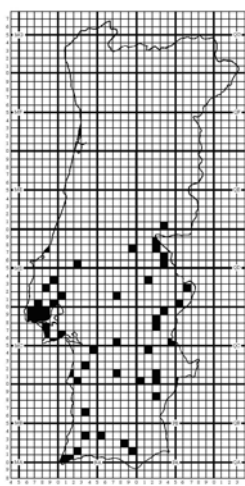
Para a representação simultânea de amostras e componentes obtendo redução das dimensões da estrutura dos dados realizou-se Análise em Componentes Principais (ACP) na matriz. Esta técnica de ordenação permite ter uma ideia da distribuição das 55 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelos 50 caracteres químicos, em que a distância entre cada par de amostras exprime o seu grau de parecimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da revisão corológica dos 11 *taxa* espontâneos do género *Hypericum* L. verifica-se diferenças significativas da sua distribuição geográfica em Portugal Continental, sendo referida de seguida a principal ocorrência de cada *taxon*:

- O *H. linariifolium*, o *H. humifusum*, o *H. undulatum* e o *H. perforatum* são relativamente vulgares no nosso país, como se pode observar nas figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.
- O *H. androsaemum* é uma espécie de características atlânticas aparecendo essencialmente em altitude no Norte e Centro de Portugal Continental (Fig. 5).
- O *H. pulchrum* ocorre também no Norte e Centro do país, predominantemente em regiões de fraca continentalidade (Fig. 6).
- O *H. montanum* surge em locais montanhosos de tendência continental, sendo raro (Fig. 7).
- O *H. tomentosum* distribui-se principalmente no Centro e Sul de Portugal (Fig. 8).
- O *H. pubescens* ocorre exclusivamente no concelho de Serpa, sendo muito raro (Fig. 9).
- O *H. elodes* ocorre essencialmente no Norte e Centro da metade litoral de Portugal Continental (Fig. 10).
- O *H. perfoliatum* distribui-se maioritariamente no Centro e Sul do país (Fig. 11).

Fig. 1. Distribuição de *H. linarifolium*.Fig. 2. Distribuição de *H. humifusum*.Fig. 3. Distribuição de *H. undulatum*.Fig. 4. Distribuição de *H. perforatum*.Fig. 5. Distribuição de *H. androsaemum*.Fig. 6. Distribuição de *H. pulchrum*.Fig. 7. Distribuição de *H. montanum*.Fig. 8. Distribuição de *H. tomentosum*.Fig. 9. Distribuição de *H. pubescens*

Fig. 10. Distribuição de *H. elodes*.Fig. 11. Distribuição de *H. perfoliatum*.

O rendimento médio obtido em óleo essencial (% v/p) foi de 0,4 para *H. calycinum*; 0,3 para *H. undulatum*, *H. humifusum* e *H. elodes*; 0,2 para *H. perfoliatum* e *H. pulchrum* e 0,1 para *H. androsaemum*, *H. hircinum* ssp. *majus*, *H. perforatum*, *H. linarifolium*, *H. tomentosum* e *H. pubescens*.

Os componentes químicos dos óleos essenciais das várias amostras de cada uma das treze espécies de *Hypericum* estudadas são apresentados na Tabela 1, sendo referidos os valores da percentagem média ( $\mu$ )  $\pm$  desvio padrão ( $\sigma$ ) para cada espécie. Os compostos desconhecidos são designados pelo respectivo índice de retenção.

Os óleos essenciais das diferentes populações dos 13 taxa em estudo são constituídos fundamentalmente por hidrocarbonetos monoterpénicos e hidrocarbonetos sesquiterpénicos, embora, em alguns casos existam percentagens significativas de outros compostos. Os monoterpénos oxigenados surgem no *H. tomentosum*, sendo os sesquiterpénos oxigenados muito pouco significativos, Tabela 2.

Na figura 12 apresenta-se um dendrograma obtido pela análise aglomerativa em grupos dos resultados do perfil quantitativo em 50 componentes dos óleos essenciais das 55 amostras de *Hypericum*. Ao nível da espécie, os 13 taxa parecem bem circunscritos em grupos distintos, confirmando a classificação taxonómica.

Pela Análise de Componentes Principais (ACP) e no plano definido pelos eixos 3 e 2, representado na Fig. 13, é evidente uma forte oposição entre *H. androsaemum* e os restantes taxa.

Um padrão semelhante de agrupamento de amostras surge no espaço definido pelos 3 primeiros eixos, onde *H. androsaemum* e *H. tomentosum* estão igualmente afastados dos restantes taxa, como se pode observar na fig. 14.

Acrescentando aos resultados do presente estudo, os dos restantes 6 taxa mundiais estudados anteriormente (*H. foliosum* – Santos *et al.* 1999, *H. olympicum* - Gudzic *et al.* 2001, *H. scabrum* - Çakir *et al.* 1997, *H. dogonbadanicum* – Sajjadi *et al.* 2001, *H. ericoides* – Cardona *et al.* 1983 e *H. elodeoides* – Mathela *et al.* 1984) e ainda dados de outros autores referentes a *H. perforatum* (Weyerstahl *et al.* 1995, Gudzic *et al.* 2001, Çakir *et al.* 1997 e Chialva *et al.* 1981), *H. hircinum* (Bertoli *et al.* 2000) e *H. perfoliatum* (Couladis *et al.* 2001), confirma-se o mesmo padrão de agrupamento de amostras, com *H. androsaemum* e *H. tomentosum* afastados dos restantes taxa. Neste caso surge ainda um grupo formado pelo *H. elodeoides* (Fig. 15).



Tabela 2. Teor médio dos grupos de componentes dos 13 taxa (%). HM – Hidrocarbonetos monoterpênicos, MO – Monoterpenos oxigenados, HS - Hidrocarbonetos sesquiterpênicos, SO - Sesquiterpenos oxigenados.

Taxa	Componentes agrupados				
	HM	MO	HS	SO	Outros
<i>H. calycinum</i>	80	2	10	2	4
<i>H. androsaemum</i>	6	<1	32	1	4
<i>H. hircinum</i> ssp. <i>majus</i>	3	<1	41	4	36
<i>H. perforatum</i>	18	<1	30	7	21
<i>H. undulatum</i>	1	<1	13	2	63
<i>H. perfoliatum</i>	63	<1	6	1	25
<i>H. humifusum</i>	69	1	11	2	5
<i>H. linarifolium</i>	38	1	23	4	7
<i>H. pulchrum</i>	61	1	15	4	5
<i>H. montanum</i>	9	0	47	7	9
<i>H. tomentosum</i>	1	19	16	4	6
<i>H. pubescens</i>	50	1	19	3	5
<i>H. elodes</i>	4	<1	21	5	60

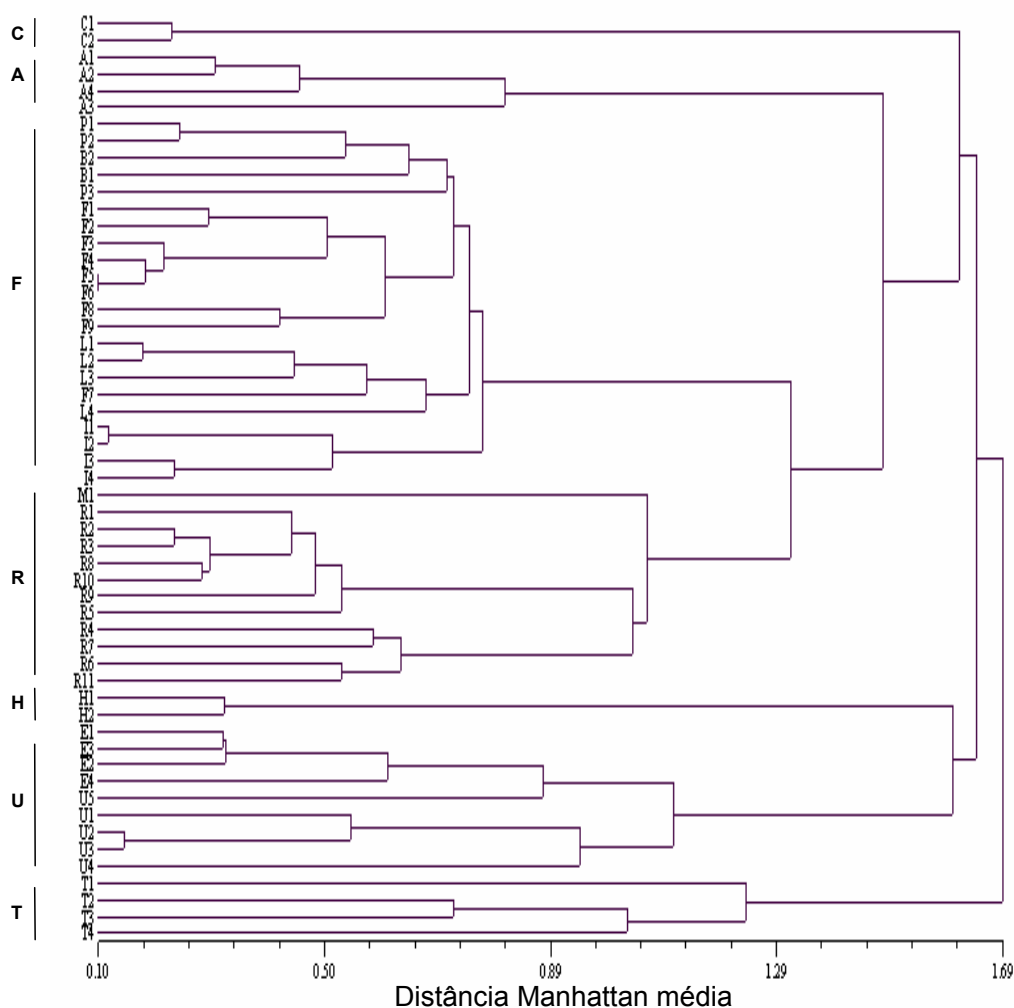


Fig. 12. Dendrograma das 55 amostras de *Hypericum* obtido pela análise aglomerativa em grupos e pela estratégia de aglomeração Single. C – *H. calycinum*; A – *H. androsaemum*; F – *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. linarifolium* e *H. perfoliatum*; R – *H. montanum* e *H. perforatum*; H – *H. hircinum* ssp. *majus*; U – *H. elodes* e *H. undulatum*; T – *H. tomentosum*.

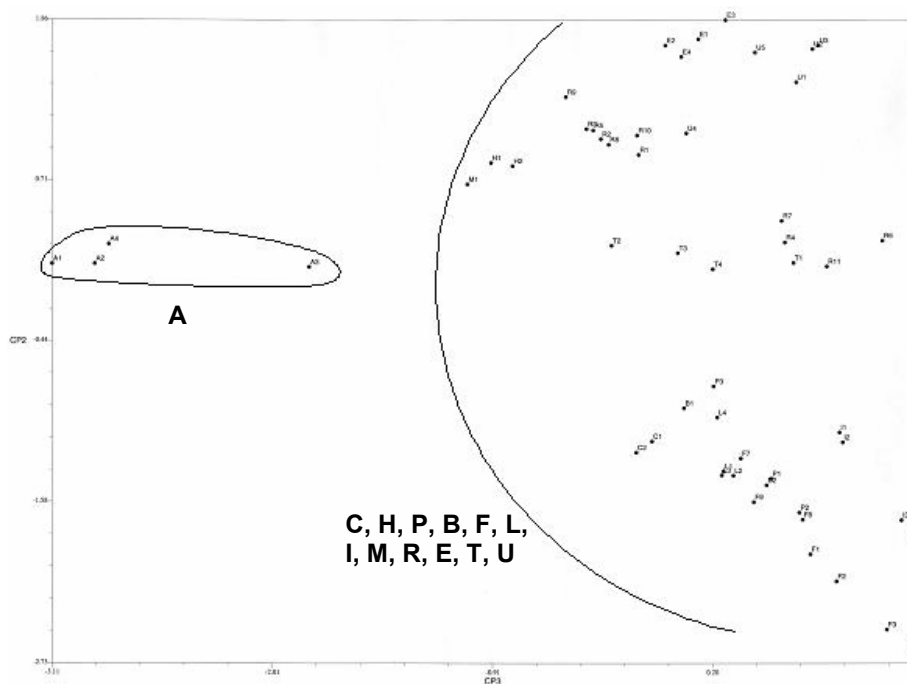


Fig. 13. Ordenação (ACP) das 55 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelas CP3 e CP2. **A** – *H. androsaemum*; **C, H, P, B, F, L, I, M, R, E, T, U** – *H. calycinum*, *H. hircinum* ssp. *majus*, *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. linarifolium*, *H. perfoliatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. elodes*, *H. tomentosum* e *H. undulatum*.

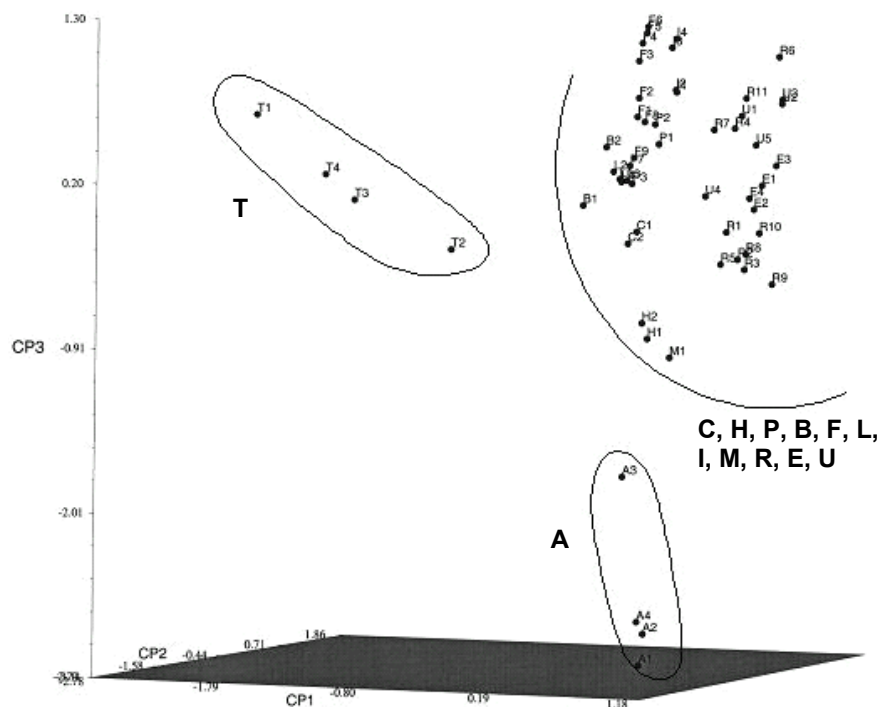


Fig. 14. Ordenação (ACP) das 55 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelas CP1, CP2 e CP3. **A** – *H. androsaemum*; **T** – *H. tomentosum*; **C, H, P, B, F, L, I, M, R, E, U** – *H. calycinum*, *H. hircinu* ssp. *majus*, *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. linarifolium*, *H. perfoliatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. elodes*, e *H. undulatum*.

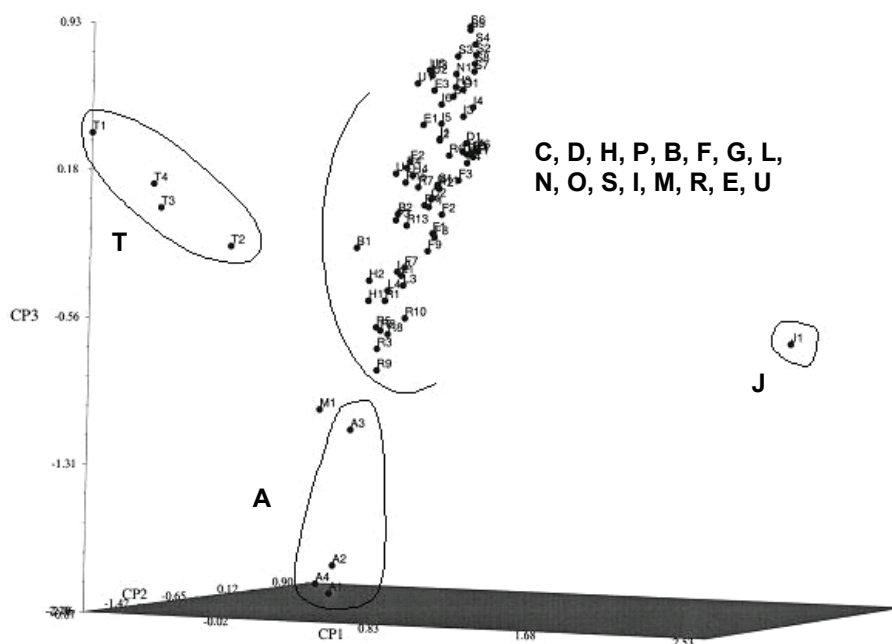


Fig. 15. Ordenação (ACP) das 76 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelas CP1, CP2 e CP3. **A** – *H. androsaemum*; **T** – *H. tomentosum*; **J** – *H. elodeoides*; **C, D, H, P, B, F, G, L, N, O, S, I, M, R, E, U** – *H. calycinum*, *H. dogonbadanicum*, *H. hircinum* ssp. *majus*, *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. scabrum*, *H. linarifolium*, *H. ericoides*, *H. olympicum*, *H. foliosum*, *H. perfoliatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. elodes*, e *H. undulatum*.

A interpretação dos resultados da ACP sugere que os componentes dominantes e os exclusivos são os de maior poder discriminante para separar os *taxa*:

***H. calycinum*** ( $\beta$ -pineno 48%)

***H. hircinum* ssp. *majus*** ( $\beta$ -cariofileno 34%)

***H. pulchrum*** ( $\alpha$ -pineno 45%)

***H. pubescens*** ( $\alpha$ -pineno 40%)

***H. humifusum*** ( $\alpha$ -pineno 61% e ác. dodecanoico 1%)

***H. linarifolium*** ( $\alpha$ -pineno 29%)

***H. perfoliatum*** ( $\alpha$ -pineno 59%)

***H. montanum*** (germacreno D 30%)

***H. perforatum*** (2-metiloctano 15%, 2-metildecano 2% e RI 1622 3%)

***H. elodes*** (*n*-nonano 49%, *cis*- $\beta$ -ocimeno 3% e RI 1256 2%)

***H. undulatum*** (*n*-nonano 33%, 3-metilnonano 15%, 2-metiloctano 10% e RI 1336 5%)

***H. androsaemum*** (componentes com RI 1496 2%, 1510 6%, 1520 6% e 1531 20%)

***H. tomentosum*** (RI 1057 14%, 1141 5%, 1546 4%, linalol 8%, *cis* e *trans*-óxido de linalilo 5 e 3% e pulegona 2%).

A ACP dos resultados do aroma total dos óleos essenciais de *Hypericum*, pelo método de olfactometria, confirma a oposição das amostras de *H. androsaemum* relativamente às das restantes *taxa* (Fig. 16). Neste método o próprio equipamento possui uma unidade de aquisição e tratamento de dados, usando uma técnica de ordenação (Sammon Mapping) idêntica à ACP (Nogueira 1999), o que é uma vantagem.

Do estudo de análise multivariada das fontes de variabilidade intrínsecas dos óleos essenciais dos 13 *taxa* do género *Hypericum* estudados pode concluir-se que diferenças inter-específicas são sempre superiores às intra-específicas, resultando agrupadas amostras dos mesmos *taxa*. Verificou-se alguma variação intra-específica quantitativa, nomeadamente ao longo das variações

sazonais e seguindo características ambientais ou biogeográficas. Não se notou alteração significativa da composição do óleo essencial com a cultura.

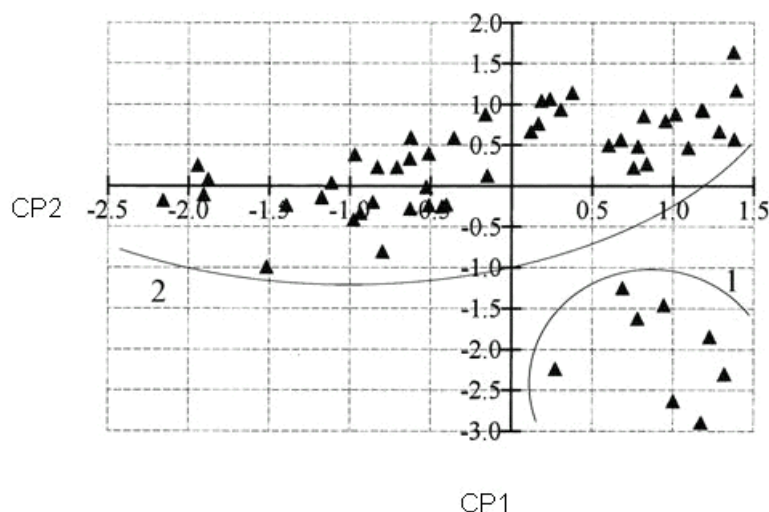


Fig. 16. Ordenação (ACP) das amostras do aroma total de óleos essenciais de taxa de *Hypericum* no espaço definido pelas CP1 e CP2. 1 – *H. androsaemum*; 2 - *H. pulchrum*, *H. undulatum*, *H. perforatum*, *H. linarifolium*, *H. humifusum*, *H. perfoliatum* e *H. tomentosum*.

Os resultados da análise de componentes principais sugerem alguns padrões para a definição quimiotaconómica dos taxa:

- Predominância de determinado componente do óleo essencial: *H. calycinum* (48% de  $\beta$ -pineno), *H. pubescens* (40% de  $\alpha$ -pineno), entre outros.
- Presença de componente(s) exclusivo(s) do taxon (taxa): *H. androsaemum*, *H. tomentosum*, *H. linarifolium* e *H. humifusum*.

A circunscrição dos 13 taxa do género *Hypericum*, usando como caracteres diferenciadores os principais componentes dos respectivos óleos essenciais confirma a classificação taxonómica (baseada essencialmente em caracteres morfológicos e anatómicos), excepto para o ***Hypericum androsaemum*** e o ***H. tomentosum***.

O ***H. androsaemum*** aparece como um grupo separado quer pela análise multivariada dos compostos do aroma total quer pela análise dos componentes dos óleos essenciais. Este taxon já foi anteriormente considerado um género ***Androsaemum Duhamel*** (Choisy 1821 in Robson 1977) separado do género *Hypericum*.

O ***H. tomentosum*** surge também como um grupo destacado da espécie anterior e dos restantes taxa somente na análise dos componentes dos óleos essenciais.

Estes taxa, em especial o ***H. androsaemum***, poderia(m) enquadrar-se noutra categoria taxonómica.

Ao alargar a análise multivariada dos resultados de composição dos óleos essenciais dos 13 taxa presentes em Portugal Continental aos restantes 6 taxa do género *Hypericum* estudados a nível mundial, confirma-se o mesmo padrão de agrupamento de amostras.

A técnica de olfactometria pode ser relevante no controlo de qualidade de produtos de origem vegetal (plantas e fármacos) e na classificação preliminar de amostras, antes da utilização de métodos analíticos (GC e GC-MS).

Os estudos quimiotaconómicos podem contribuir para o conhecimento fitoquímico que serve de base ao controlo de qualidade dos produtos naturais com *Hypericum* e, ainda, para a selecção de taxa com interesse industrial.

## REFERÊNCIAS

- Andrade PB, RM Seabra, P Valentão, F Areias (1998) Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids and coumarins in seven medicinal species by HPLC/DAD. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 21(18): 2813-2820.
- Barnes J, LA Andersen, JD Phillipson (2001) *Hypericum perforatum* L.: A Review of its Chemistry,

- Pharmacology and Clinical Properties. *J. of Pharmacy and Pharmacology* 53: 583-600.
- Bertoli A, L Pistelli, I Morelli (2000) Constituents of *Hypericum hircinum* oils. *J. Essent. Oil Res.* 12: 617-620.
- Bicchi C, A D'Amato, GM Nano, C Frattini (1983) Improved method for the analysis of small amounts of essential oils by microdistillation followed by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 279: 409-416.
- Çakir A, ME Duru, M Harmandar, R Ciriminna, S Passannanti, F Piozzi (1997) Comparison of the volatile oils of *H. scabrum* L. and *H. perforatum* L. from Turkey. *Flavour Fragr. J.* 12:285-287.
- Cardona ML, JA Marco, JM Sendra, E Seoane, JT Ibañez (1983) Waxes and volatile oils in *H. ericoides* (*Guttiferae*). *Lipids* 18: 439-442.
- Chialva F, G Gabri, PAP Liddle, F Ulian (1981) Indagine sulla composizione dell'olio essenziale di *H. perforatum* L. e di *Teucrium chamaedrys* L. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 63: 286-288.
- Couladis M, P Baziou, PV Petrakis, C Harvala (2001) Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece *Flavour Fragr. J.* 16: 204-206.
- Decosterd LA, E Hoffmann, R Kyburz, D Bray, K Hostettmann (1991) A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity *Planta Med.* 57: 548-551.
- Dias ACP, RM Seabra, PB Andrade, M Fernandes-Ferreira (1999) The development and evaluation of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from *in vivo* and *in vitro* biomass of *Hypericum* species. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22(2): 215-227.
- Farinha A, JM Martins, T Nogueira, R Tavares, F Duarte (2002) HPLC Analysis of *Hypericum* L. species from Portugal in Rauter et al. (eds.), *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 125-134.
- Farmacopeia Portuguesa (2002) VII ed. INFARMED, Lisboa: 191-192.
- Gudziec B, S Dordevic, R Palic, G Stojanovic (2001) Essential oils of *H. olympicum* L. and *H. perforatum* L. *Flavour Fragr. J.* 16: 201-203.
- Guedes AP, LR Amorim, A Vicente, M Fernandes-Ferreira (2004) Variation of the essential oil content and composition in leaves from cultivated plants of *Hypericum androsaemum* L. *Phytochem. Anal.* 15: 146-151.
- Guedes AP, LR Amorim, AMS Vicente, G Ramos, M Fernandes-Ferreira (2003) Essential oils from plants and *in vitro* shoots of *Hypericum androsaemum* L. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1399-1404.
- Kitanov GM, PT Nedialkov (1998) Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:647-653.
- Klingauf P, T Beuerle, A Mellenthin, SAM El-Moghazy, Z Boubakir, L Beerhues (2005) Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures *Phytochemistry* 66: 139-145.
- Mathela D K, CS Mathela, V Dev (1984) Volatile constituents of *H. elodeoides* Choisy. *J. Indian Chem. Soc.* 61: 792-793.
- Morteza-Semnani K, M Saeedi (2005) The essential oil composition of *Hypericum androsaemum* L. leaves and flowers from Iran. *Flavour Fragr. J.* 20: 332-334.
- Nogueira T (2002) O género *Hypericum* L. em Portugal Continental. Contribuição para o estudo quimiotaxonómico. Tese de doutoramento, UTL – ISA, Lisboa.
- Nogueira T, F Duarte, F Venâncio, R Tavares, M Lousã, C Bicchi, P Rubiolo (1998) Aspectos Quimiotaxonómicos do Género *Hypericum* L. em Portugal. *Silva Lusitana* 6: 55-61, Portugal.
- Nogueira T, F Duarte, R Tavares, MJ Marcelo-Curto, J Capelo, AC Freitas (1999) Comparative study of the aromas of *Hypericum* L. species from Portugal using olfactoscopy. *Flavour Fragr. J.* 14: 195-9.
- Nogueira T, F Duarte, R Tavares, MJ Marcelo-Curto, C Bicchi, P Rubiolo, J Capelo, M Lousã (2000) Quimiotaxonomia do género *Hypericum* L. em Portugal Continental. *Portugaliae Acta Biol.* 19: 21-30.
- Öztürk Y, S Aydin, R Beis, KHC Baser (1996) Effects of *Hypericum calycinum* L. extract on the central Nervous system in mice. *Phytotherapy Research* 10: 700-702.
- Piovan A, R Filippini, R Caniato, A Borsarini, LB Maleci, EM Cappelletti (2004) Detection of hypericins in the "red glands" of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS. *Phytochemistry* 65:411-414.
- Pistelli L, A Bertoli, S Zucconelli, I Morelli, L Panizzi, F Menichini (2000) Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia* 71: S138-S140.
- Rohlf, FJ (2002) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.10u, Exeter Software, Setauket, New York.
- Santos, PAG, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, JJC Scheffer (1999) Composition of the essential oil of *Hypericum foliosum* Aiton from five Azorean Islands. *Flavour Fragr. J.* 14: 283-286.
- Seabra RM e AC Alves (1989) Identificação de 3-sulfato de quercetina em *Hypericum androsaemum*. *Revista Portuguesa de Farmácia* 39(1): 16-18.
- Seabra RM e AC Alves (1990) Flavonoids from *Hypericum* species. *Fitoterapia* 61(2): 146-147.
- Seabra RM (1988) Identificação de  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -sitosterol em *Hypericum androsaemum*. *Revista Portuguesa de Farmácia* 38(1): 67-69.
- Seabra RM, MH Vasconcelos e AC Alves (1991) Flavonoid sulphates from *Hypericum undulatum*. *Revista*

- Portuguesa de Farmácia* 41(4): 16-18.
- Seabra RM, AC Alves (1991) Quercetin 3'-sulphate from *Hypericum elodes*. *Phytochemistry* 30(4): 1344-1345.
- Seabra RM, AC Alves (1988) Quercetin 3-glucuronide-3'-sulphate from *Hypericum elodes*. *Phytochemistry* 27(9): 3019-3020.
- Sajjadi SE (2001) Constituents of Essential Oil of *Hypericum dogonbadanicum* Assadi, J. *Essent. Oil Res.*, 13: 43-44.
- Touafek O, A Nacer, A Kabouche, Z Kabouche (2005) Analysis of the essential oil of Algerian *Hypericum perforatum*. *Flavour Fragr. J.* 20(6): 669-670.
- Valentão P, M Carvalho, E Fernandes, F Carvalho, PB Andrade, RM Seabra, ML Bastos (2004) Protective activity of *Hypericum androsaemum* infusion against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in isolated rat hepatocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 79-84.
- Valentão P, M Carvalho, F Carvalho, E Fernandes, RP Neves, ML Pereira, PB Andrade, RM Seabra, ML Bastos (2004) *Hypericum androsaemum* infusion increases tert-butyl hydroperoxide-induced mice hepatotoxicity *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 345-351.
- Valentão P, A Dias, M Ferreira, B Silva, PB Andrade, ML Bastos, RM Seabra (2003) Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Natural Product Research* 17(2): 135-140.
- Weyerstahl P, U Splittgerber, H Marschall, VK Kaul (1995) Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. from India. *Flavour Fragr. J.* 10: 365-370.
-

## OS TOMILHOS DE PORTUGAL\*

*L. Salgueiro*

Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia/CEF, Universidade de Coimbra

### INTRODUÇÃO

Sob a denominação vulgar de tomilho incluem-se as plantas pertencentes ao género *Thymus* L. e ainda a espécie *Thymbra capitata* (L.) Cav., que alguns autores incluíram em *Thymus*, pela sua grande semelhança com as plantas deste género.

Atendendo ao número de espécies, *Thymus* é considerado um dos oito géneros mais importantes da família das Labiadas. Segundo Ramon Morales (2002), são conhecidas 214 espécies e 36 subespécies, num total de 250 taxa.

De um modo geral, na nomenclatura comercial, é aplicado o termo “tomilho” a um *taxon* muito aromático, que tem a particularidade de produzir óleos essenciais com teores elevados de timol e/ou carvacrol. O óleo essencial de *Thymus zygis* Loefl. ex L. constitui a qualidade de referência no mercado dos óleos essenciais. De acordo com a Farmacopeia Europeia (2002), o fármaco (*Thymi herba*) é constituído pelas partes aéreas floridas dessecadas de *Thymus vulgaris* e/ou *Thymus zygis* e deve conter um mínimo de 1,2% (v/p) de óleo essencial e 0,5% (v/p) de fenóis voláteis, expressos em timol. A Farmacopeia inclui ainda a monografia do óleo essencial de tomilho (*Thymi aetheroleum*), definindo-o como o óleo obtido por destilação por arrastamento por vapor de água das partes aéreas floridas frescas de *T. vulgaris* ou pela mistura de ambas. Estas duas espécies caracterizam-se por ter um acentuado polimorfismo químico, fenómeno muito comum no Reino Vegetal e em particular nas espécies produtoras de óleos essenciais. O género *Thymus* tem sido um dos mais estudados e com maior número de taxa químicos infra-específicos caracterizados (Sáez e Stahl-Biskup 2002).

Os tomilhos são muito utilizados pelas suas propriedades aromáticas, condimentares e medicinais. O fármaco tem actividade anti-espasmódica, expectorante, antiséptica, sendo muito utilizado em diversas afecções respiratórias. As actividades anti-inflamatória e antiséptica do tomilho justificam o seu uso em estomatites e em algumas afecções do aparelho genital feminino. Também estimula as secreções gástricas e tem actividade anti-oxidante (Canigual e Vanaclocha 2000). Estas actividades devem-se fundamentalmente aos seus óleos essenciais e aos polifenóis, particularmente os flavonóides. Relativamente aos óleos essenciais, os terpenos fenólicos, timol e carvacrol, são os que apresentam maior actividade. Num trabalho de revisão sobre óleos essenciais de tomilhos, Stahl-Biskup (2002) verificou que num total de 162 taxa estudados mais de 50% das espécies produzem óleos de “tipo fenólico” (muitas vezes com teores entre 20 e 50% de fenóis), considerando-se, assim, o timol e o carvacrol como os dois compostos mais importantes deste género. No Reino Vegetal à parte do género *Thymus*, poucos taxa (*Thymbra*, *Origanum*, *Satureja*, *Monarda*) produzem teores significativos destes fenóis.

Estas plantas têm, pois, uma grande importância económica sendo compreensível a existência de elevado número de monografias sobre tomilhos (Farmacopeias, ESCOP, Comissão E Alemã, WHO) e o interesse constante, partilhado por muitos investigadores, no estudo destas plantas aromáticas.

Em Portugal, graças à sua situação geográfica e ao seu clima predominantemente mediterrânico, o género *Thymus* está amplamente distribuído, com elevado número de espécies endémicas, tanto ibéricas como lusitanas. Estas plantas têm sido objecto de vários estudos, particularmente dos seus óleos essenciais, pelo que se apresentam resumidamente alguns dos resultados sobre a composição química e actividade anti-fúngica destes óleos.

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 48-54, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

## TOMILHOS PORTUGUESES: TAXONOMIA E QUIMIOTAXONOMIA

De acordo com um dos autores que mais estudou o género *Thymus* na Península Ibérica (Morales 1986) consideram-se sete secções, ocorrendo em Portugal apenas cinco: sect. *Mastichina* (Mill.) Benth., sect. *Micantes* Velen., sect. *Pseudothymbra* Benth., sect. *Thymus* subsect. *Thymus*, sect. *Thymus* subsect. *Thymastra* R. Morales, sect. *Serpyllum* (Mill.) Benth. subsect. *Alternantes* Klover, sect. *Serpyllum* subsect. *Pseudomarginati* (H. Braun & Borbás) Jalas.

Das onze espécies que ocorrem em Portugal algumas apresentam polimorfismo morfológico, sendo possível considerar nessas espécies taxa infra-específicos com áreas fitogeográficas diferentes. Assim, consideram-se no total catorze taxa portugueses: *T. mastichina* (L.) L. subsp. *mastichina*; *T. mastichina* (L.) L. subsp. *donyanae* R. Morales; *T. albicans* Hoffmanns. & Link; *T. caespititius* Brot; *T. lotocephalus* G. López & R. Morales; *T. villosus* L. subsp. *villosus*; *T. villosus* L. subsp. *lusitanicus* (Boiss.) Coutinho; *T. carnosus* Boiss; *T. zygis* Loefl. ex L. subsp. *zygis*; *T. zygis* Loefl ex L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Brot. ex Coutinho; *T. capitellatus* Hoffmanns. & Link; *T. camphoratus* Hoffmanns. & Link; *T. pulegioides* L.; *T. praecox* Opiz subsp. *ligusticus* (Briq.) Paiva & Salgueiro. Deste último taxon só se conhece material da colheita original.

O género *Thymus* é taxonomicamente bastante complexo não só por constituir uma série poliploide como pela ocorrência natural de híbridos. Como auxiliar da taxonomia clássica os metabolitos secundários, nomeadamente os óleos essenciais, têm-se revelado de grande utilidade, particularmente para os taxa morfológicamente difíceis de distinguir, como por exemplo os híbridos. Estes herdaram alguns caracteres dos progenitores, algumas vezes com o predomínio dos de um sobre os do outro. Assim, nos casos em que as características morfológicas não permitem identificar facilmente o híbrido, a composição do respectivo óleo essencial pode auxiliar na sua caracterização. Apresenta-se o exemplo de *T. x mourae* Paiva & Salgueiro, cuja composição do óleo alertou para a sua origem híbrida (Salgueiro *et al.* 2000), uma vez que foi possível identificar os principais compostos de cada um dos progenitores no respectivo óleo. Assim, o óleo de *T. x mourae* apresenta teores elevados de borneol e de 1,8-cineol como o progenitor *T. mastichina* subsp. *donyanae* e percentagem elevada de sesquiterpenos oxigenados dos quais se destaca o intermedeol, provenientes de *T. lotocephalus*. Com efeito, apesar da grande semelhança morfológica desta planta com o progenitor *T. lotocephalus*, uma análise morfológica mais detalhada permitiu observar a presença de caracteres morfológicos intermédios entre os dois progenitores, como dois tipos de folhas, umas denticuladas na margem e não revolutas como *T. mastichina* e outras inteiras e revolutas, mais ou menos ciliadas na base como *T. lotocephalus*. Apresenta, também, cálice com caracteres métricos intermédios entre os progenitores, nomeadamente o tamanho e as dimensões dos dentes superiores. Este e outros exemplos ilustram como a quimiotação baseada no estudo dos óleos essenciais pode ser um precioso auxiliar da taxonomia clássica, neste caso tendo permitido identificar um híbrido novo no género *Thymus*.

## COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE TOMILHOS PORTUGUESES

Atendendo a que os tomilhos com maior interesse comercial são os produtores de óleos ricos em terpenos fenólicos (tomilhos fenólicos), serão estes que irão ser objecto de maior desenvolvimento neste trabalho. Os tomilhos da secção *Mastichina* são também considerados à parte, pela importância industrial de *T. mastichina* no mercado dos óleos essenciais (Lawrence e Tucker 2002). Os restantes tomilhos serão abordados resumidamente. Todos os resultados apresentados resultam da análise de elevado número de óleos essenciais (amostras colectivas e individuais) por GC, GC-MS e sempre que necessário por <sup>13</sup>C-NMR (Salgueiro *et al.* 1997).

### Tomilhos fenólicos

Consideram-se tomilhos fenólicos os taxa que produzem óleos com teores significativos de timol e/ou de carvacrol. No entanto, a maioria deles apresenta acentuado polimorfismo químico. Em Portugal podemos considerar como tomilhos fenólicos *T. zygis* Loefl. ex L., *T. pulegioides* L.,

*T. caespitius* Brot e *Thymbra capitata* (L.) Cav.

#### *Thymus zygis* subsp. *zygis*

Em Portugal este taxon está amplamente distribuído em Trás-os-Montes. Os seus óleos essenciais são ricos ou nos monoterpenos aromáticos timol e/ou carvacrol, ou nos monoterpenos oxigenados acíclicos acetato de geranilo e geraniol.

Os resultados do estudo de um elevado número de amostras individuais evidenciaram uma acentuada variabilidade infra-específica no seio das populações (Salgueiro 2004, Salgueiro *et al.* 2003), tendo sido possível caracterizar quatro quimiotipos: timol, carvacrol, acetato de geranilo/geraniol e acetato de geranilo/geraniol/timol. Nos quimiotipos fenólicos, o *p*-cimeno e o  $\gamma$ -terpineno, percursores de timol e de carvacrol, estão sempre presentes em teores significativos. De um modo geral, estes resultados são concordantes com os obtidos por outros investigadores com plantas espanholas, com excepção do quimiotipo linalol que apenas foi assinalado em Espanha (Saéz 1995). Em Portugal este quimiotipo é específico da subespécie *sylvestris*. Por outro lado, as populações espanholas que têm óleo essencial do tipo fenólico, apresentam, normalmente, teores mais elevados de timol e/ou de carvacrol do que as portuguesas do mesmo tipo.

#### *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*

Este taxon está amplamente distribuído na zona centro de Portugal, formando grandes manchas. Esta subespécie é muito difícil de distinguir tanto morfológicamente como quimicamente da subespécie *zygis*. Assim, apresenta os quimiotipos timol, carvacrol e acetato de geranilo/geraniol como a subespécie tipo, distinguindo-se desta apenas pelos quimiotipos ricos em linalol e em 1,8-cineol, que podem ser considerados específicos da subespécie *sylvestris* (Salgueiro 1994, Salgueiro *et al.* 2006).

#### *Thymus pulegioides*

Esta espécie vegeta a Norte de Portugal, particularmente em Trás-os-Montes. Tal como em *T. zygis*, as populações são muito heterogéneas, particularmente nos conteúdos de timol, carvacrol, acetato de geranilo e geraniol. Salienta-se a presença em teores significativos de compostos não terpénicos, nomeadamente a octan-3-ona, que pode ser considerado um constituinte característico que permite distinguir este óleo dos de *T. zygis* (Salgueiro 1993). Caracterizaram-se os seguintes quimiotipos: timol, carvacrol, timol/carvacrol, acetato de geranilo/geraniol e geraniol/acetato de geranilo/timol (Salgueiro *et al.* 2005). Nos quimiotipos ricos em timol, este fenol está presentes em teores mais elevados do que nos quimiotipos de *T. zygis*, o que evidencia boas potencialidades comerciais para este taxon.

#### *Thymus caespitius*

É uma planta que ocorre na parte ocidental da Península Ibérica, assim como nas ilhas da Madeira e dos Açores. Os óleos essenciais das plantas que vegetam em Portugal Continental caracterizam-se pela sua grande homogeneidade química (Salgueiro *et al.* 1997). A principal característica destes óleos é a sua grande riqueza em  $\alpha$ -terpineol (>30%) e a presença de elevado número de sesquiterpenos, particularmente oxigenados. O *trans*-dihidroagarofurano, que foi identificado pela primeira vez no género *Thymus*, pode ser considerado um composto característico. Por outro lado, as plantas que vegetam nos Açores apresentam acentuado polimorfismo químico. No âmbito de um projecto de investigação sobre plantas aromáticas da Macaronésia (desenvolvido na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa sob a responsabilidade dos Prof. Doutores José Gonçalves Barroso, Ana Cristina Figueiredo e Luís Pedro) foram caracterizados em oito ilhas do arquipélago dos Açores vários quimiotipos: carvacrol; timol;  $\alpha$ -terpineol; sabineno, carvacrol/ $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -terpineol/T-cadinol e carvacrol/timol (Salgueiro *et al.* 1997, Pereira *et al.* 2000 e 2003, Santos *et al.* 2005). Relativamente às plantas

que vegetam na Madeira observou-se, tal como nas do Continente, homogeneidade química, com predomínio de  $\alpha$ -terpineol nos óleos essenciais (Santos *et al.* 2005).

Nestes quatro tomilhos fenólicos, apesar da acentuada variabilidade química observada nas populações não foi possível estabelecer correlação entre a composição química dos óleos e os locais de colheita ou o clima, atribuindo este polimorfismo químico fundamentalmente à variabilidade genética das populações.

#### *Thymbra capitata*

É uma espécie circum-mediterrânica, que em Portugal está particularmente bem difundida no Algarve. Os óleos deste taxon apresentam grande homogeneidade química (Proença da Cunha e Roque 1986, Salgueiro *et al.* 2004), com teores sempre elevados de carvacrol (>60%) e baixos dos seus precursores biogénicos ( $\gamma$ -terpineno e  $p$ -cimeno), contrariamente ao que acontece em *T. zygis*. Apesar do elevado número de amostras estudadas, em Portugal não foi identificado o tipo timol presente noutros países (Fleisher *et al.* 2002). Assim este taxon é o único que em Portugal produz sempre óleos fenólicos, tipo carvacrol.

### **Tomilhos da secção *Mastichina***

#### *Thymus mastichina* subsp. *mastichina*

É um endemismo muito difundido na Península Ibérica e em Portugal está amplamente distribuído de norte a sul. Os óleos essenciais obtidos de plantas colhidas em diversas regiões do país caracterizam-se por ter 1,8-cineol como constituinte principal, muitas vezes com teores superiores a 60%, constituindo excepção os óleos de plantas da região da Estremadura (Serra da Arrábida e Sesimbra) que, além do 1,8-cineol, podem ter teores elevados de linalol (Salgueiro *et al.* 1997). Recentemente, Faleiro *et al.* (2003) caracterizam óleos de plantas provenientes da região da Estremadura com teores de linalol superiores a 60%. Através de um estudo que envolveu mais de três centenas de indivíduos provenientes de dezanove populações, foi possível caracterizar três tipos de óleos: 1,8-cineol, que corresponde a mais de 90% das amostras analisadas; linalol/1,8-cineol e linalol (Salgueiro *et al.* 1997). Pelos resultados obtidos verificámos que os quimiotipos linalólicos (linalol e linalol/1,8-cineol) vegetam apenas em ecossistemas menos xéricos, como acontece na Serra da Arrábida e Sesimbra. Tudo indica que o óleo das plantas do litoral estremenho, ricos em linalol, possa estar relacionado com habitats marítimos muito húmidos, sob influência climática atlântica, bem como em solos calcários, o que não acontece noutras localidades onde as plantas estão sujeitas a outros factores ambientais e edáficos.

#### *Thymus mastichina* subsp. *donyanae*

Este taxon foi assinalado apenas numa única localidade do Algarve (Quinta de Marim) (Paiva e Salgueiro 1994). Tal como a subespécie tipo também o 1,8-cineol é o constituinte maioritário, mas neste caso acompanhado de teores elevados de borneol. Neste taxon, até ao momento, observou-se homogeneidade na composição dos seus óleos (Salgueiro *et al.* 1997).

#### *Thymus albicans*

É um endemismo da zona costeira do sudoeste da Península Ibérica, vegetando em Portugal apenas no Algarve. Tal como outros taxa da secção *Mastichina*, os seus óleos são predominantemente cineólicos, podendo considerar-se uma característica desta secção. No entanto, tal como em *T. mastichina* subsp. *mastichina* também foram caracterizados três quimiotipos: 1,8-cineol; linalol e 1,8-cineol/linalol (Salgueiro *et al.* 1997). Diferentemente de *T. mastichina*, não foi possível correlacionar a distribuição destes quimiotipos com factores ambientais e edáficos, sendo frequente vegetarem indiscriminadamente os três quimiotipos na mesma área.

### Tomilhos endémicos

São conhecidos quatro taxa endémicos em Portugal: *T. villosus* subsp. *villosus*, *T. lotocephalus*, *T. camphoratus* e *T. capitellatus*. A maioria destes tomilhos têm áreas de distribuição muito restritas e circunscritas ao centro e sul de Portugal e, por este facto, deveriam estar incluídas na lista de espécies botânicas a proteger em Portugal pela Convenção de Berna. Apesar de vegetarem em áreas muito restritas, todos estes tomilhos apresentam acentuada variabilidade infra-específica. Assim, foi possível caracterizar os seguintes quimiotipos, a maioria com o predomínio de vários compostos:

*T. villosus* subsp. *villosus*: *p*-cimeno/cânfora/linalol; *p*-cimeno/borneol; linalol/geraniol/acetato de geraniol;  $\alpha$ -terpineol/cânfora/mirceno (Salgueiro *et al.* 1997).

*T. lotocephalus*: 1,8-cineol; linalol/1,8-cineol; linalol/óxido de cariofileno/cânfora; acetato de linalilo/linalol/óxido de cariofileno; acetato de geraniol/intermedeol (Salgueiro *et al.* 2000).

*T. capitellatus*: 1,8-cineol; borneol/1,8-cineol; acetato de linalilo/linalol/1,8-cineol (Figueiredo *et al.* 1993, Salgueiro *et al.* 2005).

*T. camphoratus*: T-cadinol/linalol; linalol/acetato de linalilo; linalol/acetato de geraniol; borneol/canfeno/cânfora; 1,8-cineol/borneol; 1,8-cineol (Salgueiro *et al.* 1997).

### Outros tomilhos

#### *Thymus carnosus*

Em Portugal vegeta preferencialmente em dunas litorais, no litoral estremenho, alentejano e algarvio. Os óleos essenciais obtidos de plantas colhidas em diversas localidades caracterizam-se por ter borneol como constituinte principal, constituindo excepção os óleos de plantas colhidas na região da Estremadura, nas quais o linalol apresentou teores muito elevados, por vezes superiores aos do borneol. Através de um estudo que envolveu cerca de uma centenas de indivíduos provenientes de diversas populações do Algarve, Alentejo e Estremadura foi possível caracterizar três tipos de óleos: borneol/*cis*-hidrato de sabineno/terpineno-4-ol; borneol/canfeno e linalol/borneol/*trans*-hidrato de sabineno (Salgueiro *et al.* 1995). Apenas as plantas oriundas da Estremadura pertencem ao quimiotipo rico em linalol. Fenómeno idêntico ocorreu também com *T. mastichina* subsp. *mastichina* daquela região. Tudo indica que a ocorrência destas plantas do litoral estremenho, ricas em linalol, esteja relacionada com factores ambientais e edáficos. Nesta região *T. carnosus* ocorre num habitat um pouco distinto do habitual, pois vegeta na plataforma da escarpa de calcarenitos, grés e areias mais ou menos consolidadas.

#### *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus*

É um endemismo da parte ocidental da Península Ibérica, vegetando em Portugal na Estremadura e Beira Litoral. As populações são quimicamente heterogéneas, com diferenças quantitativas significativas nos principais compostos (linalol, acetato de geraniol e geraniol). Foi possível caracterizar cinco quimiotipos: linalol/terpineno-4-ol/*trans*-hidrato de sabineno; linalol/cineol; linalol; acetato de geraniol/geraniol e acetato de geraniol/geraniol/1,8-cineol (Salgueiro *et al.* 1997). Assim, as duas subespécies de *T. villosus*, que são morfologicamente bem diferenciadas, são também quimicamente distintas, pois a subespécie tipo é normalmente rica em *p*-cimeno e a subespécie *lusitanicus* em linalol e/ou acetato de geraniol e geraniol.

### ACTIVIDADE ANTI-FÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Vários testes *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os óleos essenciais de tomilhos podem ser usados como antifúngicos (Zarzuelo e Crespo 2002). Neste sentido, foram avaliadas as actividades de alguns óleos de tomilhos portugueses contra várias estirpes de *Candidas*, *Aspergillus* e dermatófitos, pela determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas letais pelo método da NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997). Verificou-se que os óleos de tomilhos fenólicos, nomeadamente os quimiotipos

timol e/ou carvacrol de *T. zygis*, *T. pulegioides* e *Thymbra capitata* apresentavam uma boa actividade antifúngica (Pina Vaz *et al.* 2004, Salgueiro *et al.* 2004, Pinto *et al.* 2005). Óleos de outras espécies, sem fenóis, nomeadamente o de *T. capitellatus*, também revelou alguma actividade contra dermatófitos (Salgueiro *et al.* 2005).

Os óleos que apresentaram maior actividade foram usados para iniciar estudos de mecanismo de acção, nomeadamente estudos sobre a lesão directa da membrana em estirpes de leveduras e de *Aspergillus*. Para isso recorreu-se à citometria de fluxo, após marcação de células tratadas e não tratadas com Iodeto de Propídeo. Este constituinte só penetra em células com severas lesões de membrana mostrando uma fluorescência vermelha. Uma cinética da entrada do composto na célula revelou um efeito fungicida por lesão directa e primária da membrana celular fúngica (Pina Váz *et al.* 2004, Salgueiro *et al.* 2004, Pinto *et al.* 2005).

Estes resultados evidenciam para alguns tomilhos portugueses boas potencialidades como agentes antifúngicos e estimulam que se façam estudos de toxicidade, bem como determinações de concentrações óptimas para aplicações clínicas.

## REFERÊNCIAS

- Canigual S, B Vanaclocha (2000) Usos terapêuticos do tomilho. *Revista de Fitoterapia* 1 (1): 5-13.
- Council of Europe. European Pharmacopoeia. 4<sup>th</sup> Ed. (2002) Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. Strasbourg Cedex.
- Faleiro ML, MG Miguel, F Ladeiro, F Venâncio, R Tavares, JC Brito, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2003) Antimicrobial activity of essential oils isolated from portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology* 36: 35-40.
- Fleisher Z, A Fleisher (2002) Volatiles of *Coridothymus capitatus* chemotypes growing in Israel. *J. Essent Oil Res.* 14: 105-106.
- Lawrence B, O Tucker (2002) The genus *Thymus* as a source of comercial products. In: Stahl Biskup E, F Sáez (Eds) *Thyme, the genus Thymus*, pp 252-262. Taylor & Francis, London.
- Morales R (1986) Taxonomia de los generos *Thymus* y *Thymbra* en la Peninsula Ibérica. *Ruizia* 3: 1-324.
- Morales R (2002) The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup E, F Sáez (Eds), *Thyme, the genus Thymus*, pp 1-43. Taylor & Francis, London.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M27-A e M38-P. Wayne, Pa, USA 1997.
- Paiva J, LR Salgueiro (1994) Novedades corológicas, taxonómicas e nomenclaturales en tomillos portugueses (*Thymus L. Labiatae*). *An. Jard. Bot. Madr.* 52 (1): 114-117
- Pereira SI, PAG Santos, JG Barroso, AC Figueiredo, LG Pedro, LR Salgueiro, SG Deans, JC Scheffer (2000) Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry* 55: 241-246.
- Pereira SI, PAG Santos, JG Barroso, AC Figueiredo, LG Pedro, LR Salgueiro, SG Deans, JJC Scheffer (2003) Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). *Phytochemical Analysis* 14: 228-231.
- Pina-Vaz C, AG Rodrigues, E Pinto, S Costa-de-Oliveira, C Tavares, L Salgueiro, C Cavaleiro, MJ Gonçalves, J Martinez-de-Oliveira (2004) Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 18: 73-78.
- Pinto E, C Pina-Váz, L Salgueiro, MJ Gonçalves, S Oliveira, C Cavaleiro, A Rodrigues, J Martinez-Oliveira Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Submetido a publicação no (2005) *Journal Medical Microbiology*.
- Proença da Cunha A, O Roque (1986) Contribuição para o estudo analítico do óleo essencial de *Thymus capitatus*. *Bol. Faculdade Farmácia Coimbra* 10 (2):31-41.
- Sáez F (1995) Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in southeastern Spain. *Phytochemistry* 40: 819-825.
- Sáez F, E Stahl Biskup (2002) Essential oil polymorphism in the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup E, F Sáez (Eds) *Thyme, the genus Thymus*, pp 125-143. Taylor & Francis, London.
- Salgueiro LR, A Proença da Cunha, J Paiva (1993) Chemotaxonomic characterization of *Thymu* hibrid from Portugal. *Flavour Frag. J.* 8: 325-330.
- Salgueiro L (1994) Os tomilhos portugueses e os seus óleos essenciais. Dissertação de Doutoramento, Universidade de Coimbra.
- Salgueiro LR, R Vila, X Tomas, F Tomi, S Cañigual, J Casanova, A Proença da Cunha, T Adzet (1995)

- Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochemistry* 38 ( 2): 391-396.
- Salgueiro LR, R Vila, F Tomi, AC Figueiredo, JG Barroso, S Cañigüeral, J Casanova, A Proença da Cunha, T Adzet (1997) Variability of the essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry* 45 (2): 307-311.
- Salgueiro LR, R Vila, X Tomas, S Cañigüeral, A Proença da Cunha, T Adzet (1997) Essential oil of *Thymus villosus* L. subsp. *villosus* and its chemical polymorphism. *Flavour Fragrance Journal* 12: 117-122.
- Salgueiro LR, R Vila, X Tomas, F Tomi, S Cañigüeral, J Casanova, A Proença da Cunha, T Adzet (1997) Composition and infraspecific variability of the essential oil of *Thymus camphoratus*. *Phytochemistry* 45 (6): 1177-1183.
- Salgueiro LR, R Vila, X Tomàs, S Cañigüeral, A Proença da Cunha, T Adzet (1997) Composition and variability of the essential oils of *Thymus* species from Section *Mastichina* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology* 25 (7): 659-672.
- Salgueiro LR, R Vila, X Tomàs, S Cañigüeral, A Proença da Cunha, T Adzet (2000) Essential oil composition and variability of two endemic taxa from Portugal, *Thymus lotocephalus* and *Thymus* × *mourae*. *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 457-470.
- Salgueiro L, C Cavaleiro, E Pinto, C Pina-Vaz, AG Rodrigues, A Palmeira, C Tavares, S Costa-de-Oliveira, MJ Gonçalves, J Martinez-de-Oliveira (2004) Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. *Planta Medica* 70: 569-571.
- Salgueiro L, E Pinto, MJ Gonçalves, C Pina-Vaz, C Cavaleiro, A Rodrigues, A Palmeira, C Tavares, SG Costa-Oliveira, J Martinez-de-Oliveira (2005) Antifungal activity and chemical composition of the essential oil of *Thymus capitellatus*. *Flavour and Fragrance Journal* (in press).
- Salgueiro L, C Cavaleiro, MJ Gonçalves (2006) Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* (a submeter).
- Santos PAG, JG Barroso, AC Figueiredo, L Pedro, L Salgueiro, S Fontinha, SG Deans, JJC Scheffer (2005) Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils. *Plant Science* 169: 1112-1117.
- Stahl Biskup E (2002) Essential oil chemistry of the genus *Thymus* – a global view. In: Stahl Biskup E, F Sáez (Eds), *Thyme, the genus Thymus*, pp 75-125. Taylor & Francis, London.
- Zarzuolo A, E Crespo (2002) The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In: Stahl Biskup E, F Sáez (Eds), *Thyme, the genus Thymus*, pp 263-292. Taylor & Francis, London.
-

## PLANTAS AROMÁTICAS E ÓLEOS ESSENCIAIS EM FARMÁCIA E MEDICINA\*

C. Cavaleiro

Laboratório de Farmacognosia, CEF / Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal

### INTRODUÇÃO

A farmácia e a medicina modernas consomem apenas uma escassa quota-parte da produção mundial de plantas aromáticas e óleos essenciais, destinada sobretudo ao abastecimento da indústria alimentar, de perfumaria e cosmética e da indústria química. Porém, a maioria dos capítulos da história do medicamento, inclui referências às plantas aromáticas e/ou aos seus óleos essenciais, tendo a actividade farmacêutica contribuído decisivamente para o conhecimento e reconhecimento das propriedades e potencialidades, quer das plantas, quer dos seus óleos.

Muitas plantas aromáticas integram o património etnofarmacológico de comunidades, desde as mais remotas às mais desenvolvidas. A validação científica do potencial medicinal de remédios tradicionais preparados com plantas aromáticas tem conferido a algumas e alguns produtos delas obtidos, o estatuto de fármaco e o reconhecimento pelos sistemas de medicina alopática com maior implantação. Muitas plantas aromáticas e em particular os seus óleos essenciais, servem a indústria do medicamento por possuírem actividades biológicas com valor terapêutico. As características odoríferas dos óleos essenciais fundamentam também a sua inclusão como adjuvantes - correctivos de sabor e odor - em medicamentos destinados à administração por via oral, ou como aromatizantes em medicamentos para aplicação sobre a pele e mucosas. A indústria farmacêutica recorre, igualmente, a alguns óleos essenciais para isolar compostos naturais que servem de base à semissíntese de outras moléculas. São exemplos a semi-síntese da vitamina A a partir do citral, da vanilina a partir do eugenol, do safrolaco ou de prostanóides a partir do safrol.

A utilização de óleos essenciais como fármacos activos ou como adjuvantes na preparação de medicamentos, quer em sistemas de medicina convencional, quer em sistemas complementares como a aromaterapia tem obrigado a comunidade farmacêutica a uma sensibilização reforçada sobre os potenciais efeitos adversos, incluindo toxicidade aguda e crónica e interacções com outros fármacos. Pela complexidade das composições não é negligenciável a possibilidade de ocorrência de compostos com elevada toxicidade ou de compostos capazes interferir com sistemas fisiológicos ou interagir na farmacocinética e/ou na farmacodinamia de outros xenobióticos administradas concomitantemente.

Nos parágrafos que se seguem resumimos alguns exemplos e alguns factos relevantes associados à valorização das plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina, seu potencial terapêutico e toxicológico.

### POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS PLANTAS AROMÁTICAS E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

#### Fármacos oficiais

A Farmacopeia Portuguesa inscreve actualmente cerca de cinco dezenas de fármacos preparados a partir de mais de trinta *taxa* de plantas aromáticas. São órgãos ou partes de plantas, apresentados inteiros ou pulverizados, frescos ou secos, bem com óleos essenciais.

Não obstante a descrição e normalização de um fármaco numa Farmacopeia possa ser entendido como o reconhecimento da sua utilidade oficial, nem todos os fármacos e matérias-primas usados em terapêutica e/ou na preparação do medicamento estão descritas nesse tipo de documentos. A comunidade científica farmacognósica, dedicada ao estudo dos fármacos de

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 55-62, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

origem natural, tem revelado um vasto número de *taxa* aromáticos, dos quais se obtêm produtos e extractos com elevado potencial para a terapêutica e grande interesse na indústria do medicamento.

Tabela 1. Fármacos aromáticos inscritos na Farmacopeia Portuguesa VIII.

<b>Fármaco inscrito</b>	<b>Descrição</b>	<b>Taxon de origem</b>
Absinto	Folhas basilares ou as inflorescências ligeiramente folhadas, ou a mistura destes órgãos, inteiros ou fragmentados, secos	<i>Artemisia absinthium</i> L.
Alcarávia	Aquénios	<i>Carum carvi</i> L.
Alecrim	Folhas inteiras ou fragmentadas, secas	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Alfazema	Flores, secas	<i>Lavandula angustifolia</i> P. Miller
Anis	Diaquénios maduros	<i>Pimpinella anisum</i> L.
Anis estrelado	Frutos múltiplos de folículos, secos	<i>Illicium verum</i> Hooker fil
Arnica	Capítulos, inteiros ou fragmentados, secos	<i>Arnica montana</i> L.
Camomila	Capítulos secos	<i>Matricaria recutita</i> L.
Camomila-romana	Capítulos secos	<i>Chammamaelum nobile</i> (L.) All.
Canela da china	Casca seca	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
Canela de Ceilão	Casca seca, privada do súber e do parênquima adjacente, dos rebentos que crescem nos entalhes feitos nos troncos.	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees
Casca de laranja amarga	Parte mais externa do epicarpo, seco	<i>Citrus aurantium</i> L. ssp. <i>aurantium</i>
Coentro	Diaquénios	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Cravinho	Botão floral inteiro	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merril et L. M. Perry
Curcuma-de-Java	Rizoma cortado em fatias e seco	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.
Eucalipto	Folhas secas, inteiras ou cortadas, obtidas dos ramos mais idosos	<i>Eucalyptus globulus</i> Labillardière
Flor de laranjeira amarga	Botões floríferos, secos	<i>Citrus aurantium</i> L. ssp. <i>aurantium</i>
Funcho amargo	Aquénios	<i>Foeniculum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i> Miller
Funcho-doce	Aquénios	<i>Foeniculum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> var. <i>dulce</i> Miller
Hortelã-pimenta	Folhas secas, inteiras ou cortadas	<i>Mentha x piperita</i> L.
Melissa	Folhas ou ramos floridos, secos	<i>Melissa officinalis</i>
Nós moscada	Amêndoas do fruto	<i>Myristica fragans</i> Houtt
Óleo essencial de alecrim	Destilado com arrastamento de vapor das partes aéreas floridas	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Óleo essencial de alfazema	Destilado com arrastamento de vapor das partes aéreas floridas	<i>Lavandula angustifolia</i> P. Miller
Óleo essencial de anis	Destilado com arrastamento de vapor dos diaquénios maduros	<i>Pimpinella anisum</i> L.
Óleo essencial de anis estrelado	Destilado com arrastamento de vapor dos frutos	<i>Illicium verum</i> Hooker fil
Óleo essencial de camomila	Destilado com arrastamento de vapor dos capítulos secos	<i>Matricaria recutita</i> L.
Óleo essencial de canela da china	Destilado com arrastamento de vapor das cascas dos ramos jovens	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
Óleo essencial de canela de Ceilão	Destilado com arrastamento de vapor das cascas dos ramos jovens	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees
Óleo essencial de Caneleira	Destilação das folhas de caneleira	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees
Óleo essencial de cravinho	Destilação dos botões floríferos secos	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merril et L. M. Perry

Óleo essencial de eucalipto	Destilado com arrastamento de vapor das folhas	<i>Eucalyptus globulus</i> Labillardière
Óleo essencial de flor de laranjeira amarga	Destilado com arrastamento de vapor das flores recentes	<i>Citrus aurantium</i> L. ssp. <i>aurantium</i>
Óleo essencial de fruto de funcho amargo	Destilado com arrastamento de vapor dos aquênios	<i>Foeniculum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> var. <i>vulgare</i> Miller
Óleo essencial de fruto de funcho-doce	Destilado com arrastamento de vapor dos aquênios	<i>Foeniculum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> var. <i>dulce</i> Miller
Óleo essencial de hortelã-japonesa parcialmente desmentolado	Destilado com arrastamento de vapor das partes aéreas floridas seguida de separação do mentol por arrefecimento a -22°C	<i>Mentha arvensis</i> L., var. <i>glabrata</i> (Benth.)
Óleo essencial de hortelã-pimenta,	Destilado com arrastamento de vapor das partes aéreas floridas	<i>Mentha piperita</i> L.
Óleo essencial de laranja doce	Obtido por meios mecânicos	<i>Citrus sinensis</i> L.
Óleo essencial de limão	Obtido por meios mecânicos	<i>Citrus limon</i> (L.) Burman fil
Óleo essencial de melaleuca	Destilado com arrastamento de vapor das folhas e dos caules terminais	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden et Betch) Cheel e outros taxa.
Óleo essencial de noz-moscada	Destilado com arrastamento de vapor pelo vapor de água das nozes secas e moidas	<i>Myristica fragans</i> Houtt
Óleo essencial de salva-esclareia	Destilado com arrastamento de vapor dos ramos floridos	<i>Salva sclarea</i> L
Óleo essencial de terebintina	Destilação da óleo-resina com rectificação	<i>P. pinea</i> L e <i>Pinus pinaster</i> Ait
Óleo essencial de tomilho	Destilado com arrastamento de vapor das partes aéreas floridas recentes	<i>Thymus vulgaris</i> L e <i>T. zygis</i> Loefl. ex L.
Óleo essencial de zimbro	Destilado com arrastamento de vapor das gábulas maduras não fermentadas	<i>Juniperus communis</i> L
Salva	Folhas secas, inteiras ou fragmentadas	<i>Salvia officinalis</i> L.
Salva-trilobada	Folhas secas, inteiras ou fragmentadas	<i>Salvia fructicosa</i> Miil.
Serpão	Partes aéreas floridas, secas, inteiras ou fragmentadas	<i>Thymus serpyllum</i> L
Tomilho	Folhas e flores inteiras, destacadas dos ramos, previamente secos	<i>Thymus vulgaris</i> L ou <i>T. zygis</i> Loefl. ex L.
Zimbro	Gábulas maduras	<i>Juniperus communis</i> L.

### ACTIVIDADE BIOLÓGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

No domínio da utilização terapêutica, as actividades biológicas atribuídas para as plantas aromáticas nem sempre têm correspondência com as que se atribuem aos óleos essenciais que delas se podem isolar. Uma das razões decorre do facto de as plantas possuírem outras substâncias biologicamente activas para além dos óleos essenciais. Outra, está associada à forma como os extractos destinados à administração aos doentes são preparados, nem sempre viabilizando a extracção dos constituintes voláteis e hidrófobos característicos dos óleos essenciais. Por exemplo, o fármaco “Alecrim”, constituído pelas folhas de *Rosmarinus officinalis*, interessa à terapêutica não pelo seu óleo essencial, mas sobretudo pela composição em ácidos fenólicos, cafeico e rosmarínico, com utilidade na normalização de funções hepatobiliares. A extracção destes compostos é efectuada em meio aquoso limitante da co-extracção de constituintes voláteis hidrófobos. Outra razão, ainda, decorre do facto de nos óleos essenciais cada componente ter uma concentração 50 a 200 vezes superior do que a original, na planta. Essa concentração superior pode ser determinante para a efectividade de determinado composto activo.

Algumas actividades biológicas dos óleos essenciais decorrem da sua interacção com funções e mecanismos da fisiologia humana (ou animal). Algumas fundamentam utilizações com fins medicinais, quer por administração directa de óleos essenciais, quer pela sua inclusão em

formulações medicamentosas. São, por isso, usualmente designadas como actividades farmacológicas. Em rigor, são acções farmacodinâmicas uma vez que, apesar de conhecida a biodisponibilidade e a farmacocinética de muitos terpenos voláteis (Kohlert *et al.* 2000), não é possível falar de biodisponibilidade ou de farmacocinética e conseqüentemente de farmacologia de misturas complexas de inúmeros constituintes, como é o caso dos óleos essenciais.

São muitas as actividades farmacodinâmicas atribuídas aos óleos essenciais e que decorrem, naturalmente, da grande variedade e diversidade das suas composições químicas. Usados directamente ou incluídos em medicamentos, os óleos essenciais são especialmente solicitados pelos seus efeitos sobre o sistema digestivo e aparelho respiratório, pela actividade analgésica e anti-inflamatória ou por efeitos inespecíficos, particularmente sobre a pele e tecidos expostos.

No sistema digestivo, alguns óleos, como os de *Zingiber officinale*, de *Genciana lutea* ou de *Juniperus communis*, são fármacos clássicos com propriedades estimulantes das secreções digestivas, usados como protectores gástricos e no tratamento de dispepsias. Um estudo de validação da actividade de uma espécie aromática usada na medicina tradicional de povos da Amazónia, *Croton cajucara*, veio revelar o potencial do seu óleo essencial como agente gastroprotector e antiulceroso (Hiruma-Lima *et al.* 1999). Outros óleos essenciais, como os de *Foeniculum vulgare*, de *Chamomilla recutita*, de *Chamaemelum nobile*, de *Alium sativum*, de *Salvia officinalis*, de *Mentha piperita*, de *Melissa officinalis*, de *Pelargonium* sp. ou de *Rosmarinus officinalis*, destacam-se pelos efeitos carminativos e antiespasmódicos intestinais. Estes efeitos, de acordo com resultados da avaliação de actividade miorelaxante e antiespasmódica de óleos essenciais em ensaios com órgãos isolados, poderão ser explicados pela diminuição do tónus basal dos esfíncteres e da musculatura lisa do intestino (Magalhães *et al.* 1998), decorrente de mecanismos pós-sinápticos ainda não totalmente esclarecidos (Lis-Balchin e Hart 1998, Lis-Balchin *et al.* 1997). Alguns constituintes de óleos essenciais, como o  $\alpha$ -pineno, o canfeno, o acetato de linalilo, o linalol, o germacreno D, o *E*-cariofileno, o eugenol, o citronelol, o citronelal, o citral, o nerol, o geraniol e a artemísia cetona, foram relacionados com a actividade espasmolítica (Lis-Balchin *et al.* 1996, Perfumi *et al.* 1999, Mazzanti *et al.* 1998b).

São também bem conhecidas as propriedades hepatoprotectoras dos óleos essenciais de *Mentha piperita* ou de raiz de *Foeniculum vulgare* que decorrem da sua actividade colerética e colagoga. O aumento da secreção de bilis e de ácidos biliares após administração de óleo essencial de *Mentha piperita* ou de mentol foi já demonstrado em animais de laboratório. A detecção na bilis de catabolitos dos produtos administrados é indicadora da respectiva metabolização no hepatócito (Avato *et al.* 1998).

No aparelho respiratório destacam-se especialmente as actividades mucolítica e broncodilatadora. A estimulação da actividade secretora do epitélio respiratório e o efeito miorelaxante da musculatura brônquica por óleos essenciais, como os de *Eucalyptus globulus* ou de *Melaleuca cajuputi*, facilitam a fluidificação e expulsão de secreções e favorecem a ventilação. Para tal, contribui também o aumento da actividade ciliar, especialmente relacionada com o conteúdo em 1,8-cineol, e o facto de grande parte dos compostos voláteis, ou os seus catabolitos, serem eliminados pela via pulmonar.

As actividades analgésica e anti-inflamatória de óleos essenciais têm também justificado a sua utilização na preparação de medicamentos, em particular, de uso externo. Os azulenos e germacranólidos conferem essas actividades aos óleos de *Chamomilla recutita* e *Chamaemelum nobile*. O salicilato de metilo, um inibidor da biossíntese das prostaglandinas mediadoras dos mecanismos da inflamação e, conseqüentemente, da dor associada representa mais de 95% da composição total do óleo essencial de *Gaultheria procumbens*. É por isso uma matéria-prima passível de ser usada na indústria farmacêutica, apesar de no presente não ser concorrencial com o salicilato de metilo sintético, produzido a custos mais baixos.

Ensaaios com animais de laboratório demonstraram a actividade analgésica e anti-inflamatória de outros óleos essenciais, potencialmente úteis para fins terapêuticos. O óleo de *Lippia alba*, quimiotipo citral, em doses de 10 a 50mg/Kg administradas *per os*, mostrou actividade anti-inflamatória significativa sobre o edema induzido pela carragenina, em ratos. O óleo do quimiotipo carvona, na mesma dose, não demonstrou actividade sobre o edema induzido pela carragenina mas mostrou-se activo na redução do edema induzido pelo dextrano (Viana *et. al.*

1998). Uma dose de 50 mg/Kg de óleo essencial de *Cedrus deodara*, administrada *per os*, inibiu o edema da pata induzido em ratos de laboratório. Concentrações de 25 a 200 µg/ml inibem significativamente a desgranulação de mastócitos peritonias do rato e, em concentrações de 200 µg/ml, inibem a actividade da lipoxigenase. A acção anti-inflamatória do óleo essencial de *Cedrus deodara* pode ser atribuída à estabilização da actividade mastocitária e à inibição da biossíntese de leucotrienos (Shinde *et al.* 1999).

Actividades inespecíficas fundamentam outras aplicações dos óleos essenciais. São os casos da irritação e da inflamação cutâneas que, induzidas por aplicação tópica de alguns óleos essenciais, fundamentam as acções rubfaciente, revulsiva e cicatrizante. Por exemplo, a essência de terebintina é incluída como ingrediente de diversos medicamentos balsâmicos analgésicos. Essa inclusão não se justifica pelas propriedades analgésicas, mas pelos efeitos rubfacientes que favorecem a absorção de outros ingredientes do medicamento.

As actividades antioxidante e antiradicalar perspectivam a utilidade dos óleos essenciais como quimiopreventivos da peroxidação dos lípidos das membranas biológicas e das alterações fisiopatológicas que lhes estão associadas (Deans *et al.* 1994, Dorman *et al.* 2000).

Os óleos essenciais são, também, frequentemente associados à actividade antimicrobiana, em particular a antibacteriana e a antifúngica. Essa associação tem raízes remotas, comuns à história da antibioterapia e à história da aromaterapia. Robert Koch (1843-1910) foi pioneiro no estudo da acção bactericida de óleos essenciais tendo publicado em 1881 os primeiros relatos da actividade da essência de terebintina sobre os esporos do bacilo do carbúnculo. René-Maurice Gattefossé, perfumista e químico francês usa pela primeira vez em 1937 - dois anos antes do isolamento da penicilina e dos seus primeiros ensaios clínicos por Chain and Florey - a designação aromaterapia para descrever a utilização de óleos essenciais como agentes antifecciosos.

Alguns óleos essenciais, como os dos tomilhos fenólicos (*Thymus sp.*), de cravinho (*Syzygium aromaticum*), de alfazema (*Lavandula sp.*) ou de segurelha (*Satureja sp.*) são exemplos clássicos dos que têm sido usados em medicina humana pela actividade antimicrobiana, quer em aplicações directas, quer por incorporação em medicamentos antissépticos e desinfectantes para uso externo. A actividade está, em geral, associada à presença de compostos oxigenados com reduzido volume molecular, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio e que têm hidrossolubilidade razoável (Griffin *et al.* 1999). São exemplos, o timol, o carvacrol, o eugenol, o linalol, o geraniol, o aldeído cinâmico o neral ou o geranial. Esses compostos actuam por modificação da permeabilidade da membrana externa dos microorganismos e por inibição de enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o balanço energético da célula (Helander *et al.* 1998, Griffin *et al.* 1999, Markkam *et al.* 2000). A eficácia na inibição do desenvolvimento de bactérias de Gram negativo e de Gram positivo, de leveduras e fungos filamentosos, mesmo de estirpes usualmente resistentes aos antibióticos convencionais, tem motivado o interesse para a avaliação e caracterização da actividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre diversos microorganismos. Referimos o exemplo recente da demonstração de inibição de estirpes clínicas de fungos dermatófitos por de óleos essenciais de *Juniperus* (Cavaleiro *et al.* 2006).

O valor ou o potencial dos óleos essenciais como agentes anti-infecciosos não se limita, no entanto, às actividades bacteriostática ou bactericida e fungistática ou fungicida. O óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* é um fármaco clássico pela actividade anti-helmíntica atribuída ao seu principal constituinte, o ascaridol. A mesma actividade justifica o uso terapêutico de óleos essenciais de algumas espécies de *Mentha*, em particular da *M. crispa* onde predomina o óxido de piperitona (Pianowski 2001).

Estudos recentes demonstraram a actividade de óleos essenciais sobre protozoários responsáveis por parasitoses humanas. Apesar de estudada apenas a actividade *in vitro*, esses óleos essenciais reúnem duas condições fundamentais para poderem ser avaliados como potenciais agentes terapêuticos de protozooses, nomeadamente, a elevada toxicidade sobre o agente infeccioso e a baixa toxicidade para as células do hospedeiro. A toxicidade dos óleos de *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Melaleuca alternifolia* para as formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* é de 50 a 80 vezes maior que a demonstrada sobre células humanas HL-60. O terpineno-4-ol, principal constituinte do óleo de *M. alternifolia* é 1000 vezes mais tóxico para os tripanosomas que do que para as células humanas HL-60 (Mikus *et al.* 2000). Também os óleos

essenciais de *Cochlospermum tinctorium* e de *C. planchonii* demonstraram maior toxicidade para o *Plasmodium falciparum*, o agente do paludismo, do que para a linha celular humana K562 (Benoit-Vical *et al.* 1999). Recentemente, Cavaleiro *et al.* (2007) demonstraram a eficácia na inibição *in vitro* de trofozoítos de *Giardia lamblia* por alguns óleos essenciais de composição fenólica (IC<sub>50</sub> 0,07 - 0,15 µL/ml).

A actividade antiviral de óleos essenciais ou dos seus compostos foi também já demonstrada em ensaios *in vitro*. O isborneol, composto abundante em muitos óleos essenciais, é, em baixas concentrações (0,016 - 0,08%), um potente inibidor da replicação de *Herpes simplex* 1 sem apresentar citotoxicidade significativa (Armaka *et al.* 1999). O óleo de *Santalum album* inibe a replicação dos vírus *Herpes simplex* 1 e 2 em concentrações não tóxicas para células de rim de macaco sem, contudo, revelar actividade virucida (Benencia e Courreges 1999). De forma diferente, o óleo de *Salvia fruticosa* e os seus principais constituintes, o 1,8-cineol, a  $\alpha$ - e a  $\beta$ -tujona e a cânfora têm actividade virucida sobre *Herpes simplex* 1 e elevada citotoxicidade (Sivropoulou *et al.* 1997).

## EFEITOS ADVERSOS

As formulações medicamentosas desenvolvidas segundo rigorosos critérios de segurança, registadas nas entidades reguladoras ou as preparações farmacêuticas extemporâneas officinais, raramente incorporam óleos essenciais em percentagens superiores a 5%. Nestas condições, salvo exemplos excepcionais, incluindo sobredosagens ou casos de hipersensibilidade individual a algum constituinte do óleo, é pouco provável a ocorrência de efeitos adversos imputáveis aos óleos essenciais. Por exemplo, para que o óleo de quenopódio (*Chenopodium ambrosioides* L.) um dos óleos essenciais mais tóxicos (DL<sub>50</sub> estimada em 0,25g.Kg<sup>-1</sup>), incorporado numa formulação medicamentosa a 5% desencadeie consequências letais num indivíduo de 50Kg, este terá que ingerir cerca de 250g do medicamento!

A preocupação com os efeitos adversos desencadeados por óleos essenciais não decorre da presença destes em medicamentos registados ou executados segundo a arte oficial, usados nas condições de prescrição, mas sim da exposição involuntária ou mesmo voluntária, bem como da ingestão de quantidades significativas (alguns mililitros) de óleos essenciais “puros” ou em baixa diluição, como prescrevem algumas práticas.

Entre os óleos essenciais mais tóxicos encontram-se os óleos de boldo (folha), quenopódio, mostarda, artemísia, poejo ou cálamo por conterem compostos como o ascaridol, o isotiocianato de alilo, a  $\alpha$ - e a  $\beta$ -tujona, a pulegona ou a  $\beta$ -asarona (Tisserand e Balacs, 1995).

Outros óleos essenciais mais comuns contêm compostos capazes de desencadear toxicidade crónica por interacção com diversos sistemas funcionais. Óleos essenciais como o anis, de anis estrelado ou de funcho, pelo *E*-anetol, de manjerição ou de estragão, pelo metilchavicol, são susceptíveis de desencadear toxicidade hepática. O óleo de hortelã-pimenta pode também comprometer a integridade do hepatócito em indivíduos com deficiência em glicose-6-fosfatodesidrogenase - deficiência que afecta 12% dos afroamericanos masculinos - dado o envolvimento desta enzima no catabolismo do mentol.

O apiol do óleo de salsa ou de aneto, bem como hidrocarbonetos do óleo essencial de zimbro ou da essência de terebintina podem desencadear episódios de nefrotoxicidade aguda ou crónica.

A administração de alguns óleos essenciais “puros” ou em baixa diluição, deve ainda ser ponderada em indivíduos debilitados. A exposição a óleos com efeitos convulsivantes, como o óleo de hissopo ou de absinto anual é absolutamente contra-indicada em doentes com quadro epiléptico ou condição febril.

No domínio das interacções medicamentosas, são previsíveis ou foram já notificados efeitos aditivos e sinérgicos de alguns óleos essenciais como o do wintergreen com anti-inflamatórios não esteróides, ou o óleo de caneleira ou de cravinho com anticoagulantes orais.

## REFERÊNCIAS

- Armaka M, E Papanikolaou, A Sivropoulou, M Arsenakis (1999) Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of *Herpes simplex* virus type 1. *Antiviral Research* 43 (1999) 79-92.
- Avato P, C Ruvo, S Cellamare, A Carotti, M Mazzoccoli, G Siro-Brigiani, C De Ruvo (1998) Effect of *Thapsia* essential oils on bile composition in rats. *Pharmaceutical Biology* 36 (1998) 335-340.
- Benencia F, MC Courreges (1999) Antiviral activity of sandalwood oil against *Herpes simplex* viruses -1 and -2. *Phytomedicine* 6 (1999) 119-123.
- Benoit-Vical F, A Valentin, M Mallie, JM Bastide, JM Bessiere (1999) In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of *Cochlospermum tinctorium* and *C. planchonii* leaf extracts and essential oils. *Planta Medica* 65 (1999) 378-381.
- Cavaleiro C, E Pinto, MJ Gonçalves, L Salgueiro (2006) Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophytes, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology* 100 1333-1338.
- Cavaleiro, C.; Gaspar, B.; Salgueiro, L.; Piores-da-Silva, J.P.; Sousa, M. C. Anti-giardial activity of phenolic essential oils. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases / 25th International Congress of Chemotherapy (ECCMID / ICC) 31 March - 3 April 2007, Munich, Germany.
- Deans SG, RC Noble, A Mcpherson, G Pézses, SG Imre (1994) In Hofecker G, M Skalicky (Eds). *Aspects of Ageing and Disease*, Vienna: Vienna Ageing Series, Facultas Press, 1994.
- Dorman HJD, AC Figueiredo, JG Barroso, SG Deans (2000) In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 15 (2000) 12-16.
- Griffin S, S Wyllie, J Markam, D Leach (1999) The role of structure and molecular proprieties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14 (1999) 322-332.
- Helander IM, HL Alakomi, K Latva-Kala, T Mattila-Sandholm, I Pol, E J Smid, L Gorris, A Wright, A von Wright (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 3590-3595.
- Hiruma-Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Nunes, D. S.; Souza-Brito, A. (1999) Effects of an essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51 (1999) 341-346.
- Instituto da Farmácia e do Medicamento (2005) Farmacopeia Portuguesa VIII. Lisboa.
- Kohlert C, I Rensen, R Marz, G Schindler, E Graefe, M Veit (2000) Bioavailability and Pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. *Planta Medica* 66: 495-505.
- Lis-Balchin M, SL Hart (1998) An investigation of the actions of the essential oils of Manuka (*Leptospermum scoparium*) and Kanuka (*Kunzea ericoides*), *Myrtaceae* on guinea-pig smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50 (1998) 809-811.
- Lis-Balchin M, SL Hart, Deans S, E Eaglesham (1996) Comparision of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 4 (1996) 69-86.
- Lis-Balchin M, S Hart, G Roth (1997) The spasmolytic activity of the essential oils of scented Pelargoniums (*Geraniaceae*). *Phytotherapy Research* 11 (1997) 583-584
- Magalhães P, D Criddle, R Tavares, EM Melo, T Mota, J Leal-Cardoso (1998) Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. *Phytotherapy Research* 12 (1998) 172-177.
- Markkam JL, SG Griffin, SD Cox, SG Wyllie (2000) The significance of the outer membrane in resistance of gram negative bacteria to monoterpenes. Plenary lecture. In 31<sup>st</sup> International Symposium on Essential Oils, Hamburg, 2000 Abstract book, L20.
- Mazzanti G, M Lu, G Salvatore, F Capasso, F Basso, R Pasquale, FJ Evans, N Mascolo (1998) Spasmolytic action of the essential oil from *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* and its major components. *Phytotherapy Research* 12 (1998) S92-S94.
- Mikus J, M Harkenthal, D Steverding, J Reichling (2000) In vitro Effect of Essential Oils and Isolated Mono- and Sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Medica* 66 (2000) 366-368.
- Perfumi M, G Valentini, B Bellomaria, E Biondi (1999) Chemical constituents and spasmolytic activity in guinea-pig ileum of essential oil of *Artemisia alba* from two geographically and ecologically different localities. *Journal of Essential Oil Research* 11 (1999) 223-228.
- Pianowski LF, (2001) Desenvolvimento farmacêutico de um produto fitoterápico. Porto e Recife: [s.n.], 2001. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.
- Shinde UA, KR Kulkarni, AS Phadke, AM Nair, A Mungantiwar, VJ Dikshit, MN Saraf (1999) Mast cell stabilizing and lipoxygenase inhibitory activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. *Indian Journal of Experimental Biology* 37 (1999) 258-261.
- Sivropoulou A, C Nikolaou, E Papanikolaou, S Kokkini, T Lanaras, M Arsenakis (1997) Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry* 45 (1997) 3197-3201.

Tisserand R, T Balacs (1995) *Essential oil safety. A guide for health care professionals*. Churchill Livingstone, New York, 1995

Viana G, T Vale, V Rao, F Matos, TG do-Vale (1998) Analgesic and anti-inflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. *Pharmaceutical Biology* 36 (1998) 347-351.

---

## BOAS PRÁTICAS AGRÍCOLAS, DE COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS\*

M. T. D. Nogueira

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P., Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas, Produtos Naturais, Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F, 1649-038 Lisboa, Portugal

### INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas o interesse por medicamentos à base de plantas aumentou em todo o mundo. Os mercados globais e nacionais de plantas medicinais / fármacos vegetais estão em rápido crescimento, com mais-valias económicas significativas.

No ano 2000 as vendas globais de medicamentos à base de plantas foram estimadas em cerca de 50 mil milhões de euros, de acordo com o Secretariado da Convenção para a Diversidade Biológica.

O número de casos de problemas de saúde causados pela adulteração de medicamentos à base de plantas tem também vindo a aumentar. Uma das principais causas referidas para estes efeitos adversos está directamente relacionada com a má qualidade dos produtos medicinais, incluindo as respectivas matérias primas.

A colheita de produtos de elevado valor como as plantas medicinais espontâneas continua a ser prática comum nos países desenvolvidos por razões culturais e económicas (Jones *et al.* in Schippmann *et al.* 2002).

Das 422.000 espécies de plantas vasculares existente no mundo (Govaert 2001) estima-se que 12,5% são utilizadas com fins medicinais, ou seja, cerca de 52.000, supondo-se que cerca de 8% (4.160) estão ameaçadas de extinção (Walter e Gillett 1998).

Lange e Schippmann (1997 in Schippmann *et al.* 2002) referem que das 1.543 espécies de Plantas Aromáticas e Medicinais (PAM) comercializadas na Alemanha, só 50-100 espécies (3-6%) são exclusivamente provenientes de cultivo. Assume-se que o número de espécies de PAM actualmente sob cultivo para produção comercial, a nível mundial, não excede poucas centenas, de acordo com Schippmann *et al.* (2002).

Neste contexto, a Organização Mundial de Saúde (WHO) preparou directivas de Boas Práticas Agrícolas e de Colheita (BPAC) de plantas medicinais. BPAC foram também desenvolvidas a nível regional/nacional pela União Europeia, através da Agência Europeia de medicamentos (EMA), pela China e Japão. No presente trabalho são abordadas essencialmente as orientações das directivas da WHO (2003) e da EMA (2005), para além de alguns aspectos relacionados com a secagem e conservação de PAM após colheita (Nogueira 2002).

É importante que as BPAC sejam seguidas e adoptadas por agricultores, produtores, e processadores de materiais vegetais medicinais de modo a obter produtos de alta qualidade.

Assim, os principais **objectivos** das BPAC de plantas medicinais são os seguintes:

- Contribuir para assegurar as especificações das matérias primas de plantas medicinais no sentido de garantir a qualidade, segurança e eficácia terapêutica dos produtos finais e a protecção da saúde pública e
- Apoiar a cultura e colheita sustentáveis de plantas medicinais de boa qualidade, respeitando a protecção dos recursos naturais.

### BOAS PRÁTICAS AGRÍCOLAS DE PLANTAS MEDICINAIS

#### Identificação de plantas medicinais

A espécie ou variedade seleccionada para cultivo deve, preferencialmente, estar especificada

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 63-71, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

numa farmacopeia ou noutro documento de referência. Para plantas medicinais introduzidas, a espécie deve ser descrita na medicina tradicional do país de origem.

A identificação taxonómica de cada planta medicinal sob cultivo deve ser verificada e registados os seguintes elementos:

- Nome científico: género, espécie, sub-espécie / variedade, autor
- Nome da cultivar, ecotipo, quimiotipo ou fenotipo
- Família
- Nome(s) vulgar(es)

Para o primeiro registo da planta medicinal ou em caso de dúvida de identificação, um exemplar deve ser depositado num herbário.

### **Materiais de propagação**

As sementes e material de propagação vegetativa devem ser especificados. Deve ser fornecida a informação relativa à identidade, qualidade e características dos produtos.

Os materiais de propagação devem estar livres de contaminações (impurezas químicas ou microbiológicas) e doenças.

Sementes e outro material de propagação vegetativa utilizado para produção biológica deve ser certificado.

O material de propagação geneticamente modificado deve estar de acordo com a legislação e adequadamente rotulado e documentado.

### **Cultivo**

A qualidade de determinada planta medicinal depende do local de colheita, solo, clima e outros factores ecológicos e geográficos. Estas diferenças podem modificar a morfologia, biologia e também a constituição química da planta. E. g.:

- Clima: horas de luz, disponibilidade de água e temperatura,
- Solo: drenagem, retenção de água, fertilidade (nutrientes e matéria orgânica), pH.

Deverá ser implementada preferencialmente a agricultura biológica.

A gestão integrada de pragas deverá ser seguida.

A introdução de plantas medicinais exóticas deverá ser avaliada, pois pode ter impacto na biologia e ecologia da região.

A produção em pequena escala pode ser vantajosa.

Os riscos de contaminação devido à poluição do solo, ar ou água devem ser evitados.

### **Colheita**

A época ideal para a colheita de determinada planta medicinal deve ser determinada de acordo com a qualidade e quantidade dos constituintes biologicamente activos. A época de colheita poderá estar disponível nas Floras, Farmacopeias, monografias oficiais ou livros de referência. Durante a colheita, deve-se garantir que infestantes ou plantas tóxicas não são misturadas com o material vegetal pretendido.

É importante evitar o elevado conteúdo em humidade para prevenir fermentações microbianas e aparecimento de fungos.

Instrumentos de corte e máquinas agrícolas devem ser mantidas limpas, guardadas em locais secos, sem insectos, roedores e outras pragas.

O material vegetal colhido deve ser transportado e guardado em locais limpos, secos e bem arejados para evitar contaminações microbianas e consequente perda de qualidade.

### **Meios humanos**

Os produtores devem ter um conhecimento adequado das plantas medicinais, nomeadamente no que respeita aos seguintes aspectos:

- Identificação taxonómica,

- Características de cultivo,
- Requisitos ambientais,
- Colheita e
- Armazenamento

Todas as pessoas envolvidas nas fases de propagação, cultivo, colheita e operações pós-colheita de plantas medicinais devem receber formação relativamente às responsabilidades de higiene.

Os produtores devem proteger o ambiente e a conservação das espécies de plantas medicinais.

## BOAS PRÁTICAS DE COLHEITA DE PLANTAS MEDICINAIS ESPONTÂNEAS

### Autorização para colheita

As práticas de colheita de plantas medicinais espontâneas devem garantir a sobrevivência a longo prazo das respectivas populações e seus habitats e contribuir para a colheita/utilização sustentável das espécies de plantas medicinais. Existem Directivas sobre conservação de plantas medicinais (WHO/IUCN/WWF 1993).

Legislação nacional como as “red lists”, devem ser consultadas e respeitadas antes da colheita de qualquer planta espontânea.

Outra documentação importante e necessária no caso de exportação/importação do material vegetal do país de colheita:

- Autorização para exportação,
- Certificado fitossanitário,
- Permissão no âmbito da CITES – Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Selvagem Ameaçadas de Extinção (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).
- Regulamentação UE sobre comércio de espécies protegidas:
  - N° 1497/2003
  - N° 834/2004
  - N° 1808/2001 and N° 338/1997.

### Planeamento técnico

A distribuição geográfica (Fig. 1) e a densidade das populações de determinada espécie medicinal devem ser determinadas. **As espécies raras não devem ser colhidas.**

Exemplares da espécie colectada devem ser depositados num Herbário.

Deve ser obtida a seguinte informação da espécie em questão:

- Taxonomia, fenologia, diversidade genética, etnobotânica,
- Variabilidade das populações e
- Condições ambientais dos locais de prospecção

### Colheita

A espécie seleccionada para colheita deve estar especificada numa farmacopeia ou outro documento de referência. Para plantas medicinais introduzidas, a espécie deve estar referenciada na medicina tradicional do país de origem.

A altura ideal para colheita (época do ano ou hora do dia) deve ser determinada de acordo com a qualidade e quantidade dos constituintes biologicamente activos da planta medicinal seleccionada.

As plantas medicinais não devem ser colhidas nas proximidades de áreas possivelmente contaminadas, tais como bermas de estradas, lixeiras e zonas industriais.

O material colhido deve ser colocado em locais limpos e bem ventilados, sem materiais estranhos e protegido de insectos, roedores e outras pragas.

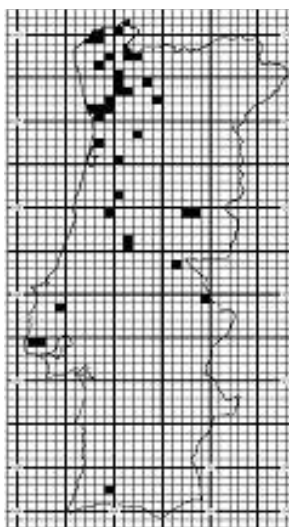


Fig. 1. Exemplo da distribuição geográfica de *H. androsaemum* L. em Portugal Continental. Este mapa foi elaborado com a quadrícula UTM (*Universal Transverse Mercator Coordinates*) de 10 x 10 km, recorrendo aos elementos de localização desta espécie recolhidos nos seguintes herbários portugueses: BRESA, COI, ELVE, LISE, LISFA, LISI, LISU e PO (GS) (Nogueira 2002).

### Meios humanos

Os colectores devem ter formação botânica, nomeadamente identificação taxonómica, devendo conhecer as plantas medicinais e os respectivos nomes científicos.

Os colectores devem receber instruções sobre os aspectos mais relevantes para a protecção do ambiente e conservação das espécies, bem como os benefícios sociais da colheita sustentável de plantas medicinais.

Todas as pessoas envolvidas devem estar protegidas das plantas tóxicas e causadoras de dermatites, animais venenosos e insectos eventualmente portadores de doenças.

## ASPECTOS TÉCNICOS DAS BOAS PRÁTICAS DE CULTURA E COLHEITA DE PLANTAS MEDICINAIS

### Processamento pós-colheita

A matéria prima de plantas medicinais deve ser sujeita a inspecção visual antes do processamento, tal como detecção de contaminação cruzada por outras espécies não pretendidas e potencialmente tóxicas, procura de materiais estranhos e avaliação organoléptica, e.g. aparência, defeito, dimensão, cor e cheiro.

O material vegetal para ser utilizado fresco deve ser armazenado sob refrigeração ou utilizando enzimas ou outras medidas de conservação de modo a prevenir fermentações microbiológicas e degradações térmicas.

Quando o material vegetal é preparado para utilização no estado seco, o teor de humidade do mesmo deve ser mantido o mais baixo possível, de modo a reduzir o aparecimento de contaminações por fungos e outros microorganismos.

As plantas medicinais podem ser sujeitas a vários processos de secagem, controlando a temperatura e humidade para evitar a alteração dos respectivos constituintes químicos, referindo-se de seguida os métodos mais significativos:

- Ao ar ambiente, na maior parte dos casos à sombra e também ao sol, só quando é especificamente recomendado para determinada planta;
- Em tabuleiros de secagem, em camadas finas para circulação de ar adequada;
- Em estufas de secagem / secadores solares;
- Por liofilização ou através de infravermelhos.

O método e a temperatura de secagem podem ter um impacto considerável na qualidade resultante do material vegetal medicinal e dependem da parte da planta em estudo, raiz, casca, caule, folhas ou flores. Por exemplo, a secagem à sombra é indicada para manter ou minimizar a perda de cor das folhas e flores e, por outro lado, baixas temperaturas devem ser utilizadas no

caso de plantas medicinais contendo óleos essenciais.

Foi otimizado um processo de secagem para diferentes espécies do género *Hypericum* L., em que se pretendia estudar os constituintes dos respectivos óleos essenciais como marcadores quimiotaxonómicos, tendo-se obtido os melhores resultados para o processo de secagem em estufa com ventilação e com controlo da temperatura entre 25 a 30 °C durante 8 dias (Nogueira, 2002).

### **Empacotamento e rotulagem**

O empacotamento do material processado deve ser rápido para protecção contra possíveis ataques de pragas e outras fontes de contaminação.

As embalagens e recipientes devem estar limpos, secos, sem poluentes e de acordo com procedimentos de operação normalizados e regulamentações do produtor e dos países de destino dos produtos medicinais.

O rótulo deve indicar:

- Nome científico da planta medicinal
- Parte da planta
- Local de origem (cultura ou planta espontânea)
- Data de cultura ou colheita
- Nomes dos produtor/colector e processador
- Informação quantitativa
- Certificação de qualidade
- Prazo de validade

Para diversas espécies do género *Hypericum* L., foi otimizado um processo de conservação das plantas secas em embalagens sob vácuo e posteriormente mantidas a -15 °C. Após dez anos de conservação por este método foram efectuadas análises de composição química dos óleos essenciais de várias plantas e concluiu-se que as alterações verificadas são somente de 1 a 3% para alguns monoterpenos, mantendo o material vegetal também as principais características de aspecto e cor (Nogueira, em publicação).

### **Armazenamento e transporte**

O transporte / armazenamento de grandes quantidades de material vegetal deve ser limpo, seco e bem ventilado de modo a remover a humidade da planta, prevenir condensação e, assim, reduzir o risco de contaminação por fungos ou ainda a ocorrência de fermentações.

O material vegetal fresco / seco deve ser armazenado a baixas temperaturas

- 1-5 °C ou
- -20 °C, para armazenamento de longa duração

Todas as fumigações contra pragas, agentes de fumigação e datas de aplicação devem ser documentadas.

### **Garantia de qualidade**

Medidas de garantia de qualidade (auditorias) devem ser verificadas regularmente:

- Locais de cultivo
- Locais de colheita
- Instalações de processamento

Peritos em representação de produtores e compradores devem estar de acordo relativamente à qualidade, assim como ao conteúdo em princípios activos, propriedades macroscópicas e olfactivas, valores limite para contaminações microbianas, metais pesados, etc.

Deverão ser feitas inspecções por autoridades nacionais e/ou locais.

### **Outros aspectos relevantes**

Seria importante a elaboração de um inventário nacional ou regional das plantas medicinais, da

sua distribuição geográfica e abundância, pois pode facilitar a identificação das plantas utilizadas pela comunidade, incluindo as espécies ameaçadas de extinção. Pode ainda ser útil nas questões respeitantes aos direitos de propriedade intelectual.

É indispensável investigação no sentido de desenvolver e melhorar as técnicas agronómicas das plantas medicinais cultivadas, promover a troca de informação da produção agrícola e ainda inventariar o impacto social e ambiental provocado pelo cultivo e colheita das plantas medicinais.

Monografias sobre plantas medicinais devem ser elaboradas, tendo em conta a situação particular de cada país ou região. Estas informações podem ser instrumentos úteis para promover avanços técnicos. Formação geral e também específica deve ser ministrada a produtores e colectores de plantas medicinais.

## GLOSSÁRIO

Relativo a medicamentos à base de plantas, de acordo com WHO e EMEA:

*Herbs*: material vegetal tal como folhas, flores, frutos, sementes, caules, casca, raízes, ou outras partes de planta, que pode ser inteiro, fragmentado ou em pó.

*Herbal substances* ou *Herbal drugs*, segundo EMEA e Farmacopeia Europeia: plantas ou partes de plantas inteiras ou fragmentadas, algas, fungos ou líquenes não processados, secos ou frescos e definidos pelo nome científico (género, espécie, variedade e autor).

*Herbal materials* ou *medicinal plant materials*: sumos frescos, substâncias gomosas, óleos fixos, óleos essenciais, resinas ou pós secos de plantas.

*Herbal preparations* ou *Herbal drug preparations*, segundo EMEA e Farmacopeia Europeia: materiais vegetais triturados ou pulverizados, extractos, tinturas ou óleos essenciais. São produzidos por extracção, destilação, fraccionamento, purificação, concentração ou fermentação.

*Finished herbal products*: preparações a partir de uma ou mais plantas. Podem conter excipientes para além dos ingredientes activos.

*Herbal medicines*: inclui *Herbs*, *Herbal materials*, *Herbal preparations* e *Finished herbal products*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Konstantin Keller, Coordenador da Comissão dos Medicamentos à base de Plantas da Agência Europeia do Medicamento (EMA), à Dr<sup>a</sup> Ana Paula Martins, da Direcção de Medicamentos e Produtos de Saúde (DMPS) do INFARMED, à Dr<sup>a</sup> Helena Pinto Ferreira, Avaliadora da DMPS do INFARMED, à Dr<sup>a</sup> Maria do Céu Costa, Directora da Direcção de Avaliação Técnico-Científica do INFARMED e à Dr<sup>a</sup> M. João Marcelo Curto, Directora do DTIQ do INETI, pelo apoio prestado.

## REFERÊNCIAS

EMA (European Agency for Evaluation of Medicinal Products) / HMPC (Herbal Medicinal Products Committee) / 246816 / 05 (2005) Public Statement on Good Agriculture and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin, London.

European Pharmacopoeia (2002-2004), 4th Edition - Book, CD-ROM, ONLINE.

Govaerts R (2001) How many species of seed plants are there? *Taxon* 50, 1085-1090.

Jones ET, RJ McLain, J Weigand (2002) *In* Schippmann *et al.* Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. Published in FAO 2002 Rome.

JNCC (2005) The Vascular Plant Red Data List for Great Britain, London.

Lange D, U Schippmann (1997) *In* Schippmann *et al.* (2002) Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. Published in FAO 2002 Rome.

Mabberley DJ (1997) *The Plant-Book: A portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press, 2nd ed.

Nogueira T (2002) O género *Hypericum* L. em Portugal Continental Contribuição para o estudo quimiotaxonómico. Tese de doutoramento, UTL – ISA, Lisboa.

Schippmann U, DJ Leaman, AB Cunningham (2002) Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. Published in FAO 2002 Rome.

Walter KS, HJ Gillett (1998) 1997 IUCN Red List of threatened plants. Gland, Switzerland.

WHO/IUCN/WWF (1993) Guidelines on the conservation of medicinal plants. Gland, Switzerland, IUCN – The World Conservation Union (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources).

World Health Organization (2003) WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva.

---

**ANEXO****Folha de registo para plantas medicinais cultivadas, de acordo com WHO (2003)****Identificação da planta medicinal cultivada**

Nome científico (género, espécie, autor) e família  
 Nome comum  
 Nome comum em inglês (caso exista)  
 Parte da planta a colher  
 Código de colheita

**Identificação do local de cultura**

Local  
 Concelho, província, país

**Identificação do agricultor**

Nome  
 Morada  
 Data (dd/mm/aaaa) início cultura  
 Data (dd/mm/aaaa) fim cultura

**Sementes e materiais de propagação**

Origem do material  
 Descrição física do material  
 Disponível comercialmente: sim ou não  
 Se sim, nome da cultivar e nome do fornecedor

**Cultura**

Método de propagação: sementeira directa / transplante  
 Data da 1ª sementeira/plantação  
 Percentagem de sementes germinadas  
 Data da 2ª sementeira/plantação  
 Percentagem de sementes germinadas  
 Distância entre linhas (cm)  
 Distância entre plantas (cm)  
 Dimensão da área plantada (m<sup>2</sup>)  
 Nº de plantas por unidade de área  
 Rotação de culturas  
 Tipo de solo: % argila                      % areia                      % matéria orgânica                      % outros  
 pH solo    fertilidade solo: boa ou má  
 Retenção humidade solo: boa ou má                      drenagem solo: boa ou má  
 Rega: sim ou não    terreno: plano ou inclinado  
 Tipo de rega: alagão, rego, aspersão ou gota a gota  
 Origem da água: fornecimento municipal, lago, rio, poço ou outra  
 Qualidade da água: boa ou má  
 Teor em sais: baixo ou alto  
 Nome das plantas nas proximidades  
 Insectos nas plantas das proximidades

**Agroquímicos**

Adubo aplicado antes da plantação: orgânico ou químico

Nome Método  
 Hora/Data (d/m/a) Quantidade

Herbicida aplicado antes da plantação

Nome Método  
 Hora/Data (d/m/a) Quantidade

Herbicida aplicado depois da plantação

Nome Método  
 Hora/Data (d/m/a) Quantidade

Pesticida aplicado

Nome Método  
 Hora/Data (d/m/a) Quantidade

**Colheita**

Data Hora do dia

Condições Método

Rendimento

**Condições adversas que podem influenciar a qualidade**

Condições climáticas extremas

Exposição a substâncias perigosas

**Resumo das condições de crescimento da planta****Ano**

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<b>Horas de sol</b>												
<b>Média temp. diurna (° C)</b>												
<b>Média temp. nocturna (° C)</b>												
<b>Média pluviosidade (mm)</b>												
<b>Altura planta (cm)</b>												
<b>Diâmetro planta (cm)</b>												
<b>Botões florais</b>												
<b>Formação cálice</b>												
<b>Ataque insectos</b>												
<b>Doenças</b>												
<b>Herbicida aplicado</b>												
<b>Pesticida aplicado</b>												
<b>Ramificação</b>												
<b>Colheita</b>												
<b>Rega</b>												
<b>Geda / arrefecimento</b>												
<b>Vento</b>												
<b>Seca</b>												
<b>Rendimento por planta</b>												

Observações e recomendações

## ÓLEOS ESSENCIAIS: A NORMALIZAÇÃO E A SUA IMPORTÂNCIA NO ÂMBITO DO REGULAMENTO REACH\*

*M. T. D. Nogueira e J. A. A. Lourenço<sup>1,2</sup>*

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P., Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas, Produtos Naturais, Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F, 1649-038 Lisboa, Portugal

### INTRODUÇÃO

A Organização Internacional de Normalização de Óleos Essenciais (ISO/TC 54), de que Portugal faz parte, através da Comissão Técnica de Óleos Essenciais (CT 5), conjuntamente com mais 14 Estados membros e 30 Estados observadores, representa uma grande parte dos produtores, intermediários e consumidores da indústria mundial de óleos essenciais.

A uniformização das especificações destas Normas com as das monografias da Farmacopeia Europeia, e também com as do “Food Chemicals Codex – FCC”, é um objectivo importante que poderá ser de grande utilidade para todas as entidades interessadas nos óleos essenciais. A simples existência de Normas é igualmente importante para o cumprimento da nova legislação europeia para as substâncias químicas - o Regulamento REACH, acrónimo de “Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals” - aspecto que é analisado neste trabalho.

### NORMALIZAÇÃO

Os óleos essenciais compreendem a fracção volátil, obtida por destilação com arrastamento por vapor de água, responsável pelo aroma característico da planta de origem (Harborne, 1984). Com base na Norma Portuguesa (NP-90, 1987) define-se tecnologicamente um óleo essencial como o produto aromático obtido por destilação com vapor de água (ou por destilação fraccionada) de materiais vegetais ou, por expressão, no caso do pericarpo dos citrinos, com posterior separação da fase aquosa por processos físicos (centrifugação).

A Normalização de Óleos Essenciais consiste no estabelecimento de métodos de análise e especificações incluindo a realização de monografias de normalização de qualidade de todos os óleos, abrangendo a normalização de métodos analíticos para controlo de qualidade e abordando também aspectos relacionados com o transporte, rotulagem e nomenclatura, nomeadamente a utilização de nomes científicos.

A importância da Normalização no sector dos óleos essenciais pode abordar-se quer do ponto de vista técnico quer comercial. No primeiro caso, através das especificações de qualidade, baseadas no estabelecimento das características físicas, químicas e organolépticas, assim como no perfil cromatográfico dos óleos essenciais, pode-se prevenir e detectar adulterações, para além da determinação dos componentes limitados pela legislação na área da saúde. Do ponto de vista comercial as Normas podem ser utilizadas como fonte de informação para a indústria e como especificações que contribuem para a estabilidade da qualidade e genuinidade oferecidas.

Actualmente existem 15 estados Membros e 30 estados Observadores na Organização Internacional de Normalização de Óleos Essenciais (ISO/TC 54), representando a maior parte dos produtores, intermediários e consumidores da indústria mundial de óleos essenciais.

Devido à crescente internacionalização e volume das trocas nos mercados, as Normas têm tido importância igualmente crescente, em especial na identificação e fixação de níveis de qualidade dos óleos mais utilizados.

Estima-se que a produção mundial de óleos essenciais seja superior a 42 000 toneladas, dos quais 35% são provenientes de frutos de citrinos, 33% de plantas cultivadas, 1% de plantas espontâneas e 31% de outras fontes (Figura 1).

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 72-79, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

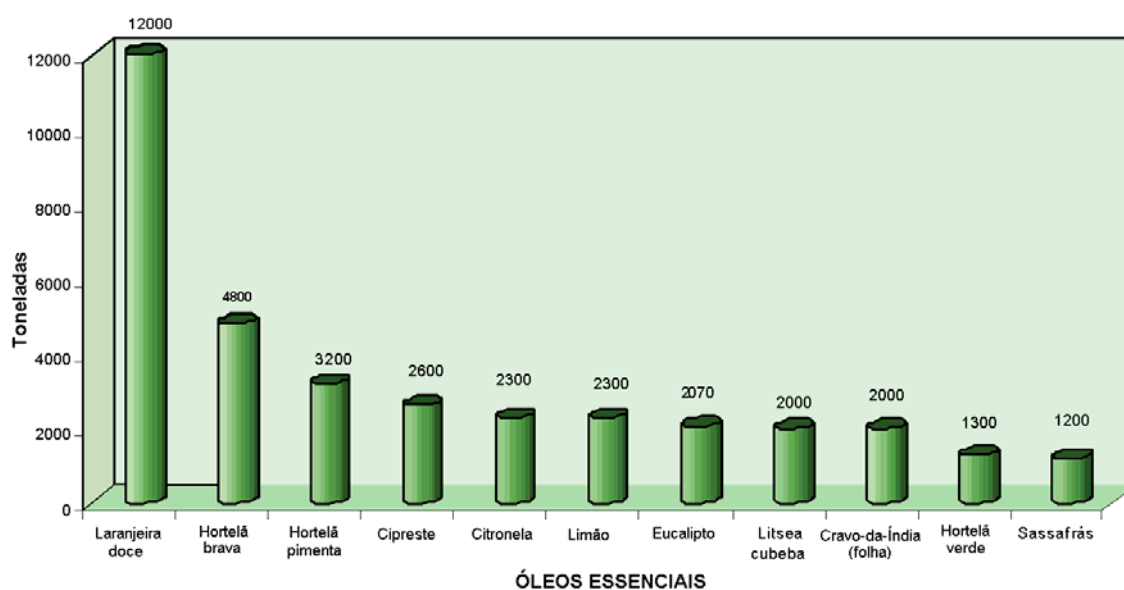


Figura 1. Produção de Óleos Essenciais superior a 1000 toneladas (ISO/TC 54, 2004).

Tabela 1. Estimativa da Produção Mundial de Óleos Essenciais (ISO/TC 54, 2004).

	País	Produção (1000 US\$)	%
Países europeus da zona mediterrânica	França	20000	8,8
	Itália	19000	
	Espanha	10000	
	Portugal	3000	
	Grécia	2000	
Outros países da Europa	Fed. Russa	30000	9,6
	Bulgária	26000	
	Jugoslávia / Hungria	2000 / 1000	
Países fora da Europa	EUA	145000	24,6
	Austrália / Canadá	4000 / 2000	
	China	110000	46,8
	Brasil	45000	
	Turquia	33000	
	Indonésia	32000	
	Marrocos	30000	
	Índia	25000	
	Egipto	12000	
	Outros	62200	
<b>TOTAL</b>		<b>613200 (em 1000 US\$)</b>	

Por outro lado, o desenvolvimento económico e industrial na área dos óleos essenciais acompanha alterações globais, ocorrendo actualmente a maior produção, mais de 2/3, em países exteriores à Europa (Tabela 1). No entanto o consumo e a preocupação com o controlo de qualidade e com os aspectos relacionados com a saúde humana são particularmente significativos na Europa.

<sup>1</sup> Presentemente colocado como Perito Nacional Destacado na Comissão Europeia no Joint Research Center - Institute for Health and Consumer Protection - Toxicology and Chemical Substances (European Chemicals Bureau), em Ispra, Itália.

<sup>2</sup> Este texto exprime as posições pessoais dos autores não reflectindo necessariamente a opinião oficial da Comissão Europeia sobre os assuntos abordados.

Os objectivos e estratégias para o futuro no âmbito da Normalização de óleos essenciais convergem portanto no sentido de facilitar o comércio mundial destes produtos, promover a qualidade dos óleos essenciais produzidos e comercializados, proteger a saúde pública e o ambiente, promover a segurança de produtos e processos industriais e ainda a aplicação de tecnologias industriais inovadoras.

## O REGULAMENTO REACH E OS ÓLEOS ESSENCIAIS

A Comissão Europeia, acompanhando o empenho manifestado por diversas correntes - científicas, económicas e sociais - na necessidade de dotar a Comunidade Europeia de um enquadramento legislativo das substâncias químicas, capaz de promover a defesa da saúde, de proteger o ambiente e de uniformizar as condições de acesso ao mercado em todos os países membros da Comunidade - propôs e viu aprovada pelo Parlamento Europeu, em 18 de Dezembro de 2006, o Regulamento REACH, acrónimo de “Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals”.

A legislação aprovada, entrou em vigor em todos países da Comunidade sem necessidade de ser transposta para a legislação nacional, sendo as autoridades nacionais competentes as responsáveis pelo seu cumprimento.

Ficou deste modo definido um conjunto de procedimentos que implicam produtores, importadores de substâncias, preparações ou artigos, e utilizadores profissionais de substâncias químicas ou de preparações.

Estão em causa as cercas de 30 000 substâncias químicas actualmente presentes no mercado e, entre estas, as que constituem os produtos naturais, nomeadamente os extraídos de espécies vegetais, como por exemplo, os óleos essenciais ou os extractos.

Um elemento central na implementação da legislação é a obrigação dos agentes por ela abrangidos procederem ao registo das substâncias que fabricam, importam, utilizam profissionalmente ou incluem nos seus artigos. Esse registo é feito por via informática na Agência Europeia de Substâncias Químicas – ECHA (European Chemicals Agency), criada pelo Regulamento, cuja actividade se inicia oficialmente a 1 de Junho de 2007 e que tem a sua sede em Helsínquia, na Finlândia.

Para além dos casos em que a substância é fabricada, importada ou utilizada em quantidades inferiores a 1 tonelada/ano, ficando fora do âmbito do REACH, outros casos existem, de isenção parcial (Artº 2(5)). Refira-se em particular a aplicação da substância em produtos medicinais para uso humano ou veterinário que estejam em conformidade com o Regulamento 726/2004(EC) e com as Directivas 2001/82/EC e 2001/82/EC, em produtos utilizados na alimentação humana ou animal, conformes com o Regulamento (EC) 178/2002, nomeadamente como aromatizantes em alimentos, quando de acordo com a Directiva 88/388/EEC (ver também a Decisão 1999/217/EC e o Regulamento 2232/96). Esta isenção parcial abrange o articulado do REACH respeitante ao registo de substância (Título II), aos utilizadores profissionais (Título V), à avaliação das substâncias (Título VI) e à sua autorização (Título VII).

O Regulamento refere, no seu texto, a sua aplicação a três entidades: substâncias, preparações e artigos. Em todas estas entidades podemos eventualmente estar na presença de óleos essenciais ou outros produtos naturais, pelo que convém registar em primeiro lugar a sua definição, para que cada interessado se possa situar, face ao texto, no seu caso particular.

- **Substância:** é um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de fabricação, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo usado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afectar a estabilidade da substância ou modificar a sua composição.
- **Preparação:** é uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.
- **Artigo:** é um objecto ao qual durante a sua fabricação é dada forma, superfície ou desenho determinando a sua função, em maior grau do que a sua composição química.

No caso das substâncias notar-se-á que não estamos necessariamente na presença de um

composto quimicamente puro, mas de uma substância resultante de um processo de produção, a qual, por esse facto, pode ter associada outros constituintes, tais como impurezas ou outras substâncias necessárias à sua estabilização. De notar que esta definição é idêntica à já utilizada na Directiva 67/548/EEC (Directiva das Substâncias Perigosas).

São raros os casos em que um dado constituinte de um produto natural com origem nas plantas aromáticas e medicinais se apresenta como largamente maioritário. Tal acontece, sobretudo, quando a espécie vegetal já contempla na sua genuinidade esse elevado teor num dado composto (como por exemplo o limoneno na aguarrás obtida da espécie *Pinus pinaster*). Assim, na grande maioria dos casos, os óleos essenciais apresentar-se-ão como substâncias multi-constituíntes.

Sendo a definição da entidade "preparação", imediatamente compreensível, a definição de "artigo", pode ser clarificada citando um exemplo no qual podemos encontrar alguns óleos essenciais ou derivados: os aromatizadores de ambiente, cuja forma é determinante no desempenho da sua função.

Um outro aspecto importante a ter em consideração na sua relação com o REACH, é o da situação da substância relativamente ao mercado no passado. As substâncias referenciadas como tendo acedido ao mercado europeu dividem-se actualmente por três listas: a das que acederam ao mercado entre 1 de Janeiro de 1971 e 18 de Setembro de 1981 e que estão listadas no European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (lista EINECS, com 100204 entradas) e são designadas no texto do Regulamento REACH como substâncias "phase-in"; a das que o fizeram depois desta última data, e que se encontram listadas na European List of New Chemical Substances (lista ELINCS, com 4381 entradas); e finalmente a lista dos "No-longer Polymers" (com 702 entradas), a qual resultou de uma "desclassificação" de um determinado número de substâncias consideradas como polímeros até à redefinição desta categoria no âmbito da Directiva 92/32/EEC (7º Emenda da Directiva 67/548/EEC). Foi o caso, por exemplo, de diversos derivados de pez. Em conjunto estas três listas constituem o designado "EC inventory". Elas serão agrupadas numa lista única nova a criar no âmbito do regulamento REACH.

No presente texto concentrar-nos-emos nas designadas substâncias existentes, ou substâncias "phase-in", as quais, satisfazendo os requisitos de inclusão no âmbito do REACH, nomeadamente o de serem produzidas, importadas ou utilizadas em quantidade igual ou superior a 1 tonelada/ano, estão sujeitas a uma fase inicial de pré-registo junto da Agência Europeia das Substâncias Químicas, o qual prepara o passo seguinte, o de registo da substância. De notar que quer no caso das preparações quer no caso dos artigos, o objecto do registo é sempre uma substância (presente na preparação ou no artigo).

A importância deste passo é lapidarmente enunciada no Artigo 5º do Regulamento: sem dados não é possível aceder ao mercado, não sendo autorizado o fabrico, a importação ou a utilização da substância. Este registo é da responsabilidade de fabricantes ou importadores de substâncias químicas, estemes ou em preparações e de fabricantes ou importadores de artigos que as incluam, e que se enquadrem no âmbito das disposições legislativas. Será o caso de um produtor de óleos essenciais ou de extractos, de um importador dos mesmos, ou eventualmente de um fabricante de artigos, por exemplo de aromatizadores que empreguem óleos essenciais para a sua libertação intencional na atmosfera, em quantidade superior a 1 tonelada/ano e que não estejam abrangidos pelas isenções acima referidas. De notar que não existem obrigações face ao REACH para os distribuidores.

O pré-registo é feito mediante notificação à Agência, entre 1 de Junho e 1 de Dezembro de 2008. Esta formalidade vai permitir que a constituição de mecanismos de partilha da informação científica, nomeadamente sobre os testes exigidos, entre as empresas interessadas na mesma substância (Substance Information Exchange Fora, SIEFs, *ver adiante*), ao mesmo tempo que permite à Agência tomar conhecimento do número previsível de entidades que se apresentarão para efeitos de registo, de acordo com as suas bandas mássicas.

Para as substâncias "phase-in" a diferenciação no tempo para efeitos de registo em função da banda mássica, - após o pré-registo -, obedece ao seguinte calendário:

- Para substâncias acima de 1000 ton./ano : até 1 de Dezembro de 2010;
- Substâncias a partir de 100 ton./ano e abaixo de 1000 ton./ano : até 1 de Junho de 2013;

- Substâncias a partir de 1 ton./ano e abaixo de 100 ton./ano : até 1 de Junho de 2018.

São constituídas como casos particulares, com obrigação de registo antecipado em relação à sua banda mássica, as substâncias carcinogénicas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução (substâncias CMR) e as substâncias que apresentam efeitos de longo prazo adversos para o ambiente (classificados com a frase de risco R50/53) – *ver Artº 23 do Regulamento*.

A informação exigida na fase de pré-registo, para além dos dados identificadores do potencial registante, é constituída pelo:

- Nome da substância;
- Número EINECS e número CAS (ou, se este não existir, outro código de identificação disponível);
- Data limite para o registo, em função da banda mássica estimada;

No entanto ela é de extrema importância, ao permitir a inserção do registo neste calendário. Se tal não acontecer o registo deverá ter lugar imediatamente após a publicação da lista das substâncias pré-registadas, implicando a suspensão da produção, importação ou utilização da substância.

O registo constitui uma fase em que o registando tem que submeter à Agência um dossier técnico (Artº 10). Este inclui elementos identificativos do registando, a identidade da substância, informação sobre o processo de fabricação e sobre os usos identificados da substância, a sua classificação e rotulagem, instruções sobre o seu uso seguro, e sumários da informação exigida sobre as propriedades e sobre o comportamento da substância, relevantes para a saúde humana e para o ambiente. Entrar em detalhe sobre a natureza desta informação, a ser obtida pelo registando sob sua inteira responsabilidade e cumprindo requisitos mínimos de acordo com a banda mássica do registando, está, pela sua extensão, fora do âmbito deste texto.

Sublinhe-se entretanto que existem dispositivos baseados na formação de entidades que possibilitam a partilha de informação - e concomitantemente os custos relativos à sua obtenção - entre os registandos de substância idênticas (SIEFs – Substance Information Exchange Fora), submissão conjunta de dados por múltiplos registandos). A possibilidade de pertença a estes grupos assenta na identidade da substância de interesse (ver Anexo VI, sobre os requisitos de informação respeitantes ao Artº 10, no ponto 2., sobre a identificação da substância).

## A IDENTIFICAÇÃO DE OLEOS ESSENCIAIS NO ÂMBITO DO REACH

Os parâmetros identificadores de uma substância no Regulamento REACH são:

### Nome ou outro identificador da substância

- Nome de acordo com a nomenclatura IUPAC, ou outro nome químico internacional;
- Outros nomes (nome trivial, nome comercial, abreviatura);
- EINECS ou ELINCS (se disponível);
- Nome e número CAS (se disponível);
- Outro código de identificação (se disponível);

### Informação relacionada com a fórmula molecular e estrutural de cada substância

- Formulas molecular e estrutural (incluindo notação Smiles, se disponível);
- Informação sobre a actividade óptica e sobre a razão típica dos estereo-isómeros (se aplicável e apropriado);
- Peso molecular e gama de pesos moleculares;

### Composição de cada substância

- Grau de pureza (%);
- Natureza das impurezas, incluindo isómeros e sub-produtos;
- Percentagem para as impurezas principais;
- Natureza das impurezas, incluindo isómeros e sub-produtos;
- Natureza e ordem de grandeza de (...ppm,...%) de quaisquer aditivos (em geral agentes

- estabilizadores ou inibidores);
- Dados espectrais (UV, IR, NMR, MS);
- Cromatogramas HPLC, GPC;
- Descrição dos métodos analíticos ou referências bibliográficas apropriadas para a identificação da substância e, se apropriado para a identificação de impurezas e aditivos. A informação terá de ser suficiente para a reprodução dos métodos.

As regras para a identificação e atribuição de nome dependem no entanto do tipo de substância. Eventualmente não será possível satisfazer todos os parâmetros atrás indicados, quer porque não seja tecnicamente possível, quer porque não é cientificamente necessário. Em todos os casos será no entanto necessário produzir justificação adequada.

No caso dos óleos essenciais, ou de outros extractos de produtos naturais, o problema da sua identificação exige o recurso a informação adicional para além dos parâmetros indicados, não podendo ser baseada unicamente no conhecimento da informação relativa à natureza química dos seus constituintes, ao teor destes e à sua descrição. A sua constituição química pode variar, e nem todos os componentes podem ser facilmente identificados.

No entanto e no mínimo, todos os constituintes presentes em concentração superior a 10% devem ser referenciados pelo seu nome IUPAC e, se disponível, pelo seu número CAS. Também as gamas de variação dos teores destes constituintes devem ser indicadas. Deve no entanto ter-se em atenção que constituintes com teores abaixo de 10% podem ser significativos e fundamentais na definição do perfil da substância e eventualmente nas suas características, face à saúde humana e ao ambiente. Será o caso, por exemplo da presença de  $\Delta^3$ -careno na aguarrás com origem em certas espécies resinosas.

O número EC de identificação das substâncias, bi-univocamente atribuído a cada uma, é uma informação relevante na identificação da substância. O uso identificador deste número (quando exista) nem sempre é evidente no caso dos produtos naturais, dado que em alguns casos a natureza das substância a que se referem, segundo a descrição registada, tem um âmbito heterogéneo, gerando alguma ambiguidade, nomeadamente no caso dos óleos essenciais e no dos extractos vegetais. Estes números permitem explorar a informação contida no Inventário de Substâncias Químicas da CE (EC Inventory). No endereço <http://ecb.jrc.it/esis/> é possível consultar o ESIS – European Chemical Substances Information System, que agrega a informação relativa às listas EINECS, ELINCS e NLP e que também inclui, entre outras, a informação sobre a classificação e rotulagem das substâncias.

De notar também que a consulta pelo nome da substância pode induzir em erro, se não se utilizarem "wildcards" na pesquisa. Sem estes a informação, por exemplo sobre a substância "Lavender, Lavandula hybrida, ext., acetylated", só seria recuperada escrevendo o nome exactamente como ele se encontra na base. Noutro caso, uma pesquisa sobre "aguarrás", utilizando a palavra "turpentine", daria como resultado a recolha de informação sobre a substância com o n° EC 232-688-5 e com o n° CAS 9005-90-7, enquanto que a pesquisa por "turpentine, oil" conduziria à substância EC 232-350-7 e n° CAS 8006-64-2. Apenas esta última corresponderia provavelmente ao interesse de um produtor nacional.

A necessidade de informação adicional no REACH é comum a outras substâncias, as quais, em conjunto, são agrupadas sob a designação de substâncias UVCB ("Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products or Biological materials"). Uma das razões para a integração dos óleos essenciais e extractos neste grupo reside na variabilidade da sua composição, de acordo com a sua origem geográfica e sazonalidade, e estas características, para além de modificarem a natureza da substância em termos absolutos, têm igualmente significado no valor comercial e na posição da substância no mercado.

Tratando-se de substâncias com origem em espécies vegetais, estas devem ser indicadas através da designação da sua espécie, género e família. Por outro lado, torna-se também importante indicar a parte da planta utilizada na obtenção do óleo, dada a variabilidade na sua composição, de acordo com a parte utilizada na sua obtenção (folhas, flores e ramos obtidos por colheita mecânica, flores, etc.).

Em relação à substância é igualmente importante a indicação do processo utilizado na sua

obtenção/extracção, dada a estreita relação que este tem com os constituintes presentes, com os valores associados aos parâmetros identificadores, bem como à sua manutenção dentro de limites definidos. Refira-se por exemplo neste caso, a variação que pode resultar para um óleo proveniente de um material vegetal idêntico no caso de se proceder a uma extracção com um solvente, seja um solvente orgânico comum ou um fluido supercrítico, ou de se estar na presença de uma extracção por arrastamento com vapor. Considerem-se ainda os casos em que têm lugar operações posteriores à extracção do óleo, tais como por exemplos operações de desterpenização.

De notar que um óleo extraído por um processo de arrastamento por vapor e o mesmo óleo, após uma operação de refinamento, como por exemplo uma desterpenização, darão lugar a duas substâncias distintas, e logo a dois registos distintos.

Estas informações podem ser extremamente importantes no momento de constituição dos SIEFs. Estes grupos constituídos unicamente pelos registandos constituem-se automaticamente, reunindo todos os registandos que procedam ao pré-registo de substâncias idênticas, os quais devem então analisar a possibilidade de procederem à submissão conjunta de dados por múltiplos registandos, partilhando informação, custos relacionados com a sua obtenção e simultaneamente contribuindo para a redução de ensaios envolvendo vertebrados.

A importância da identificação da substância resulta então da verificação que será feita nesses SIEFs sobre a alegada identidade da substância, momento em que a consideração da existência de erros nessa identificação poderá levar à rejeição da sua integração nesse particular SIEF.

No caso dos óleos essenciais a compatibilidade com normas nacionais ou internacionais aceites, como por exemplo as normas ISO, podem desempenhar um papel da maior importância no estabelecimento e aceitação inter-pares da sua identidade.

Finalmente refira-se que o registo das substâncias está sujeito ao pagamento de uma taxa e a obtenção dos dados para a sua realização, bem como as despesas associadas à obtenção dos mesmos, que são da responsabilidade dos registantes. A não efectivação dos registos é gravosa, implicando a saída do mercado dos agentes envolvidos. Existem no entanto situações que dispensam o registo conforme acima indicado. Torna-se deste modo prioritário que todos os que estejam em condições de ser abrangidos pela nova legislação – e muitos destes estariam anteriormente afastados de procedimentos semelhantes – analisem a sua posição no novo contexto, e antecipem de modo adequado as suas obrigações e os prazos necessários para o seu cumprimento.

Serviços de "helpdesk" e documentação de apoio desenvolvida entre outros pela European Chemicals Bureau, pela DG Enterprise pela DG Environment da Comissão Europeia e por representantes das partes interessadas ("stakeholders"), serão disponibilizados, mantidos e actualizados pela Agência, constituindo os designados "Technical Guidance Documents" - TGD). Será igualmente disponibilizada uma ferramenta informática – o Navigator – permitindo aos interessados avaliar a sua forma de inserção e as suas obrigações face ao REACH. Fundamental será igualmente o apoio que as associações empresariais e as entidades nacionais disponibilizem, desde já ou no futuro.

## CONCLUSÕES

A legislação REACH, que entra em vigor em todos os países da Comunidade sem necessidade de ser transposta para a legislação nacional, vai impor um conjunto de procedimentos que implicam produtores, importadores de substâncias químicas, de preparações e de artigos que as incorporem. Um elemento central na implementação da legislação é a necessidade destes agentes procederem ao registo dessas substâncias, nomeadamente as substâncias com origem em fontes biológicas vegetais, por exemplo, óleos essenciais ou extractos, desde que se encontrem nas condições de aplicação do Regulamento, verificação de cujo procedimento é aconselhável às empresas o mais cedo possível.

A normalização dos óleos essenciais num mercado onde, juntamente com a intensificação da procura, a adulteração e a deficiência de controlo são por vezes moeda corrente tem posto em

evidência os seus benefícios.

Em muitas das aplicações dos óleos – sobretudo as relacionadas com a saúde humana e a alimentação - existem já regras estritas de controlo e Directivas que as abrangem e as colocam fora do âmbito do REACH e esta é outra verificação à qual as empresas devem proceder com brevidade.

Nos restante casos o Regulamento REACH vem juntar-se a estas na defesa da saúde e na protecção do ambiente. Na sua implementação a existência de Normas torna-se numa informação de extrema relevância na identificação de substâncias biológicas, nomeadamente no caso dos óleos essenciais.

Embora a panóplia regulamentar seja por vezes encarada como um esforço adicional para as empresas, estas têm igualmente a possibilidade de, pelo seu cumprimento, valorizarem o seu empenho em causas gerais como a protecção da saúde e do ambiente, podendo igualmente beneficiar com o saneamento de um mercado que penalize os não cumpridores.

## REFERÊNCIAS

- Harborne, J.B. 1984. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Second edition, Chapman and Hall.
- ISO/TC 54 Draft Report of the 25rd plenary meeting of ISO/TC 54 "Essential Oils" 2006. Document ISO/TC 54 - N 2405
- ISO/TC 54 Draft Business Plan 2004. Document ISO/TC 54 - N 2020
- NP-90 1987. Óleos essenciais, definição. Instituto Português de Qualidade
- Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH).

## DESTILAÇÃO INDUSTRIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS\*

J. A. A. Lourenço

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P., Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas, Produtos Naturais, Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F, 1649-038 Lisboa, Portugal

### FUNDAMENTOS NA DESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

#### Introdução

A obtenção de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais por destilação é uma prática tradicional em relação à qual o desenvolvimento tecnológico e o aumento de escala da operação imposta pela sua aplicação industrial vieram motivar a necessidade de um maior conhecimento, cientificamente fundamentado.

Quando nos referimos à destilação dos óleos essenciais é importante ter em conta o contexto da sua obtenção. Assim, nos laboratórios em que se estudam as espécies de plantas aromáticas e medicinais, a obtenção dos óleos é feita em dispositivos que operam sobre amostras reduzidas da planta. Estas são em geral representativas de uma dada parte da planta e as operações são levadas a cabo de modo a obter uma informação tanto quanto possível exaustiva, em termos de rendimento em óleo e sua composição química. Destes dispositivos dois dos mais correntes são os aparelhos de Clevenger (Fig. 1) e o de Likens-Nickerson. Não entram na sua utilização preocupações relativas à economia das actividades industriais, nomeadamente com os factores tempo e custo de operação. Para que se consiga otimizar o funcionamento de uma instalação industrial é no entanto fundamental ter em conta estes aspectos, entender os fenómenos que estão em jogo na operação e quais os dados que são necessários ao correcto dimensionamento dos equipamentos. Neste contexto há igualmente que ter em atenção que as operações se ligam a formas de exploração do material vegetal, as quais, por si mesmas, condicionam a solução óptima dos problemas.

A separação dos óleos da sua matriz por acção do vapor de água, sendo o mais económico, é o mais corrente. Outro processo também referido é a extracção com solventes orgânicos – de uso restrito devido aos inconvenientes na utilização destes. Na procura de métodos alternativos tem tido relevo a extracção com fluidos supercríticos, a qual apresenta no entanto como inconvenientes o custo dos equipamentos, que operam a pressões bastante elevadas.

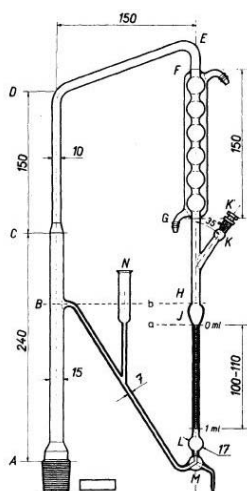


Fig. 1. Aparelho de Clevenger.

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 80-95, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

## A destilação com vapor de água

A operação de obtenção dos óleos essenciais em que o agente do processo é a água é frequentemente referida como sendo uma hidrodestilação. O termo é, por exemplo, utilizado nos casos em que a planta está inicialmente mergulhada em água líquida, a qual, entrando em ebulição, promove a separação e obtenção do óleo. Alguma literatura de língua inglesa - por exemplo, Dean (1991) - designa este processo como “water distillation”. Por sua vez “water and steam distillation” designa o caso em que a planta se encontra - no interior do destilador - sobre água em ebulição, sendo contactada pelo vapor ascendente. Nos casos em que não há água na base do destilador e o vapor é injectado directamente no destilador, estamos perante uma “steam distillation”\*. É este último o caso mais vulgar, e no que se segue, restringir-nos-emos a ele, referindo-o como “destilação com vapor de água”.

Sistematizaremos então os fenómenos e os mecanismos que governam a destilação dos componentes dos óleos na presença de vapor de água. Distinguiremos também os casos em que o óleo tem uma distribuição superficial, em glândulas que se rompem e expõem o óleo imediatamente após o contacto com o vapor - em geral Labiadas -, como por exemplo, o alecrim, as mentas ou as lavandas, e a óleos que têm uma distribuição mais profunda nos tecidos, obrigados a difundir-se até à superfície exposta da planta antes de serem destilados. É, por exemplo, o caso do eucalipto. No entanto utilizaremos apenas o caso da destilação dos óleos do primeiro tipo na exposição de alguns conceitos fundamentais.

### A pressão de vapor de um líquido puro

Imaginemos um líquido puro de um composto presente num óleo essencial. Num espaço fechado confinante de um líquido puro e onde só esse composto esteja presente, a cada temperatura abaixo da de ebulição, corresponde uma pressão de equilíbrio na fase de vapor. Esta pressão será a sua pressão de vapor ( $p_v$ ) e corresponde ao equilíbrio que se estabelece entre o número de moléculas que passam da fase líquida para a de vapor e inversamente. Os valores dos pares pressão-temperatura que assim se estabelecem dependem da natureza do composto, e cada um deles ajustar-se-á a uma variação do outro, de acordo com uma correlação que se pode estabelecer entre aquelas variáveis. Uma das formas das correlações mais frequentemente utilizada é a de Antoine, em que  $T$  representa a temperatura de equilíbrio e  $A$ ,  $B$  e  $C$  são parâmetros específicos para cada composto:

$$\ln p_v(T) = A - \frac{B}{T + C} \quad (1)$$

Se se elevar a temperatura e a pressão de vapor igualar a pressão total reinante sobre o líquido num espaço que não é fechado, o líquido entra em ebulição, mantendo-se constante a temperatura durante essa fase. Enquanto existir fase líquida a ebulição prosseguirá, mas a sua manutenção e a velocidade de passagem do líquido para a fase de vapor, dependem do fornecimento de energia, numa quantidade que é função de uma grandeza específica do composto, o calor latente de evaporação.

Se o líquido confinar com um espaço fechado a sua ebulição originará uma elevação da pressão à qual passará a corresponder uma temperatura de equilíbrio mais elevada. Também neste caso tem que haver fornecimento de energia ao sistema. Se tal não acontecer a ebulição pára.

Se o espaço sobre o composto líquido não for confinado e as moléculas responsáveis pela pressão do composto nesse espaço estiverem a ser continuamente removidas o equilíbrio pode não chegar a ser atingido. O líquido poderá esgotar-se por continuada passagem à fase de vapor,

---

\* O mesmo termo - “steam distillation” - é utilizado para designar a destilação por arrastamento com vapor. De notar no entanto que neste último caso o processo baseia-se na ascensão de bolhas de vapor de um composto no seio de um líquido no qual é imiscível. Teoricamente existem condições para que neste movimento sejam atingidas situações de equilíbrio entre o líquido e o espaço da bolha. Em geral este equilíbrio não é atingido quando uma corrente de vapor passa em fluxo contínuo sobre o líquido.

sem ser atingido o valor de equilíbrio para a pressão, eventualmente sem que este consiga ultrapassar a pressão total (portanto sem haver ebulição). Não obstante a evaporação que tem lugar nesse processo continuaria a consumir energia. Se subtraído ao líquido esse consumo energético traduzir-se-ia num abaixamento da temperatura deste. Se alimentado pela fase de vapor registar-se-ia uma condensação de vapor se se tratasse de vapor em equilíbrio, ou em alternativa, uma diminuição da sua temperatura.

No entanto na destilação de um óleo essencial não temos um componente puro, mas sim uma mistura de componentes. Veremos em seguida este caso.

#### Misturas de compostos solúveis e insolúveis.

Quando temos uma mistura de compostos numa fase de vapor num dado volume em que estes e só estes estão presentes, cada um contribui para a pressão total ( $P$ ) na fase, com a pressão que exerceria se se encontrasse isolado nesse volume (Lei de Dalton). Esta é a pressão parcial do componente na mistura ( $p_j$ ).

$$P = \sum_{j=1}^n p_j \quad (2)$$

A pressão parcial de cada componente pode também definir-se como sendo,

$$p_j = y_j P \quad (3)$$

em que  $y_j$  é a fracção molar do componente  $j$  da mistura.

Vejamos agora o que se passa quando a mistura na fase de vapor está em contacto com a fase líquida correspondente, e em equilíbrio com ela. Ao considerar uma mistura de compostos no estado líquido, e para fazermos uma análise semelhante à que desenvolvemos anteriormente, consideraremos dois casos para a fase líquida: um em que os compostos são todos mutuamente solúveis, e outro, em que se formam duas fases líquidas imiscíveis.

Para simplificar consideremos apenas dois compostos, A e B e analisemos o caso em que estes formam entre si uma solução ideal. A lei de Raoult estabelece que, a uma dada temperatura, a pressão parcial de cada componente na fase de vapor ( $p_j$ ) em equilíbrio com uma solução líquida ideal, iguala o produto da fracção molar do componente na fase líquida ( $x_j$ ) pela sua pressão de vapor ( $p_{vj}$ ) a essa temperatura. Considerando também a lei de Dalton teremos que,

$$y_j P = p_j = x_j p_{vj} \quad (4)$$

A pressão de vapor da mistura ( $P$ ) resulta então da ponderação da pressão de vapor de cada um dos compostos pela sua fracção molar na mistura,

$$P(T) = x_A p_{v_A}(T) + x_B p_{v_B}(T) \quad (5)$$

A mistura entrará em ebulição quando a pressão  $P$  igualar a pressão total  $P_T$ .

No caso dos dois compostos A e B serem imiscíveis a pressão de vapor da mistura resultará da soma das pressões de vapor dos componentes como se estivessem isolados.

$$p(T) = p_{v_A}(T) + p_{v_B}(T) \quad (6)$$

A pressão de vapor da mistura a uma dada temperatura deixa então de depender das proporções em que os componentes A e B se encontram na mistura, tal como a composição da fase de vapor.

O comportamento de misturas de líquidos imiscíveis permite que uma mistura entre em ebulição a uma temperatura inferior à mais baixa das temperaturas de ebulição dos compostos na mistura, quando considerados em separado. A composição do destilado mantém-se constante,

enquanto não se esgotar um dos componentes.

Exemplo 1:

Consideremos uma mistura de acetato de linalilo e de água, compostos que são mutuamente insolúveis. Estando a mistura submetida a uma pressão de 760mmHg a soma das pressões de vapor dos dois compostos atinge esse valor quando a temperatura for de 99,6°C.

$$P_T = 760 \text{ mmHg} = p_{v_{\text{Acetato linalilo}}}(99.6^\circ \text{C}) + p_{v_{\text{Água}}}(99.6^\circ \text{C})$$

As temperaturas de ebulição do acetato de linalilo e da água a 760mmHg são, respectivamente, de 220°C e 100°C. Se o acetato de linalilo fosse levado à temperatura de ebulição isoladamente o composto decompor-se-ia rapidamente.

Vejamos agora nas condições de ebulição da mistura imiscível considerada no Exemplo 1 qual a composição do vapor resultante da sua ebulição. Atendendo que à temperatura de 99,6°C as pressões de vapor dos compostos são, de 12mmHg para o acetato, e de 748mmHg para a água, teríamos para a composição da fase de vapor os seguintes valores em função das pressões parciais:

$$y_{\text{Acetato}} = \frac{12 \text{ mmHg}}{760 \text{ mmHg}} = 0.016 \qquad y_{\text{Água}} = \frac{748 \text{ mmHg}}{760 \text{ mmHg}} = 0.984$$

Esta composição manter-se-á até ao esgotamento de um dos componentes. A taxa de ebulição dependerá do fluxo de energia que for mantido para alimentar a ebulição.

Apesar da fracção molar do acetato no vapor ser muito baixa (0,015) notar-se-á que em geral as massas moleculares dos componentes dos óleos essenciais são muito superiores à massa molecular da água, o que faz com que, em termos de massa, a proporção do componente de pressão de vapor mais baixa esteja num valor mais elevado comparativamente com a proporção em termos de fracção molar. Assim, no caso que temos vindo a examinar,

$$\frac{y_{\text{Acetato}}}{y_{\text{Água}}} = \frac{0,016}{0,984} = 0,016 \qquad \frac{m_{\text{Acetato}}}{m_{\text{Água}}} = \frac{0,016 * 196}{0,984 * 18} = 0,18$$

### O papel da energia na destilação

O óleo que acompanha o vapor numa destilação é geralmente em quantidade menor do que aquela que resultaria do seu cálculo tal como exemplificado. No entanto constata-se que quando se utiliza vapor saturado a uma pressão comparativamente mais elevada (logo, a uma temperatura mais elevada) a proporção óleo/água aumenta. Isto parecia confirmar um modelo para a operação em que se considerava o seu desenrolar meramente em função da temperatura. Valeria então a pena aumentar a temperatura, recorrendo a vapor sobressaturado para aumentar a proporção do óleo no condensado final e deste modo poupar vapor.

A experiência não correspondia no entanto a estas expectativas. Elas mostravam-se inadequadas porque o modelo subjacente não levava em linha de conta a energia posta em jogo no processo.

Consideremos o caso de uma mistura cujos compostos são solúveis entre si. Se não houver lugar à formação de azeótropos (caso em que, entrando a solução em ebulição, a pressão e temperatura constantes, a composição do destilado se mantém também constante) a composição do destilado é, para cada componente, proporcional à pressão de vapor e à fracção molar do componente no líquido. Havendo um componente mais volátil a composição da fase de vapor em contacto com o líquido fica enriquecida nesse componente, e se for condensada, o processo pode repetir-se, concentrando progressivamente o componente mais volátil. É este o mecanismo de

separação de compostos numa coluna de destilação, em que uma fase vapor ascendente de um dado prato de destilação condensa em contacto com o líquido que desce do prato superior onde a temperatura de equilíbrio é mais baixa.

Inicialmente o vapor (saturado), em contacto com a planta, condensa sobre ela. A energia libertada na condensação vai contribuir para a elevação da temperatura do material vegetal, nomeadamente do óleo. Com a subida da temperatura a pressão de vapor de cada componente aumenta, aumentando a pressão parcial dos componentes na fase de vapor (a qual está em movimento).

A evaporação continuada do óleo vai no entanto implicar um consumo de energia. Qual a origem desta energia? Estando o vapor de água a uma temperatura superior à do meio dá-se uma transferência de energia do vapor para o meio que se encontra a uma temperatura mais baixa. Atingindo (ou estando) o vapor no estado de saturação essa transferência de energia dá-se à custa da sua condensação. Em determinados pontos de localização do óleo forma-se então uma mistura imiscível de água condensada em contacto e imiscível com o óleo. Esta mistura, conforme vimos acima, atinge o ponto de ebulição abaixo da menor temperatura de ebulição dos componentes presentes à pressão reinante. Na espessura de vapor imediatamente em contacto com a mistura é atingida a saturação a essa temperatura,  $T_0$ . Mas à medida que a corrente de vapor vai arrastando e transportando esta atmosfera a concentração dos componentes do óleo vai baixando. A temperatura de equilíbrio correspondente a esta seria mais baixa. Também no equilíbrio a esta temperatura mais baixa corresponderia uma pressão de vapor de água mais baixa. Acontece que a pressão total não se altera sendo compensada pelo vapor de água alimentado, o qual se encontra a uma temperatura  $T_1$  superior à que foi necessária para fazer entrar o óleo em ebulição. Temos assim um gradiente de temperatura estabelecido que vai corresponder à energia fornecida por condensação para manter a evaporação do óleo. Este gradiente reflecte o fluxo de transferência de energia e, logo, a velocidade de evaporação do óleo\*.

Tratando-se de vapor saturado a energia cedida provém fundamentalmente da condensação. Caso contrário a sua cedência é governada pela lei de Fourier e é significativamente menor o que explica o observado no caso da utilização de vapor sobressaturado.

#### Modelo para a destilação de óleos localizados superficialmente

Dean (1991) num trabalho em que sistematiza a destilação industrial dos óleos essenciais, desenvolveu um modelo em que, cada gota de óleo exposta é considerada rodeada de água (da planta, ou proveniente de vapor condensado). Na Fig. 2 representa-se graficamente este modelo, representando-se uma situação em que, estando a evaporação em curso, a temperatura no óleo é inferior à temperatura na água e no vapor circundante. O gradiente de temperatura formado constituía-se assim como a “driving force” na transferência de energia necessária para alimentar o processo de evaporação.

Neste modelo o tempo necessário para reduzir a zero o raio da gota de óleo representa o tempo total da destilação. Este tempo depende de dois processos interligados: a remoção das moléculas de óleo da fase de vapor junto à superfície da gota e o fornecimento da energia que alimenta o processo de evaporação (através da condensação de vapor ou por transferência através do contacto com vapor a uma temperatura superior). Em qualquer dos casos a velocidade

---

\* No espaço imediatamente acima do óleo estabelecer-se-à em principio uma composição correspondente ao equilíbrio, caracterizado pela temperatura  $T_0$ . Admitindo que a ebulição/evaporação se constituía como um processo contínuo, esse é um espaço varrido pelo vapor, o qual acentua o gradiente da concentração. Pode aqui residir uma explicação alternativa para um efeito de “feedback” (proposto por Denny, 1991, pg. 29) que consiste em admitir que o enriquecimento da fase de vapor no óleo teria um limite dinâmico que, uma vez atingido, faria baixar a temperatura no seio da corrente de vapor, aproximando este valor de  $T_0$ . O gradiente da temperatura diminuiria atingindo igualmente um limite que era por sua vez também um limite à transferência de energia, logo à taxa de evaporação.

A situação poderia ser igualmente analisada em termos de gradiente de concentração, o qual, pelas características hidrodinâmicas da corrente de vapor sobre a superfície do óleo, atingiria um limite a partir do qual um aumento do caudal de vapor não o influenciaria.

de evaporação será directamente proporcional ao caudal de vapor alimentado ao destilador. Logo o tempo da destilação será, por sua vez, inversamente proporcional a essa velocidade.

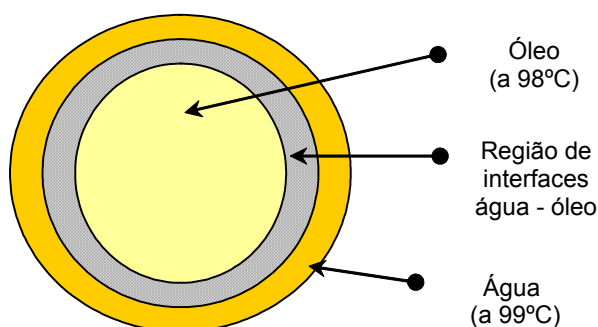


Fig. 2. Representação esquemática de uma gota de óleo essencial em processo de destilação.

O desenvolvimento e aplicação do modelo assenta na determinação de dois parâmetros característicos de cada planta: um tempo básico  $t$ , que corresponde ao tempo necessário para que uma gota de óleo, representativa das que ficam expostas quando o óleo se liberta das glândulas, se evapore; o parâmetro  $s$ , que representa o acréscimo de área das gotas de óleo por unidade de altura de carga no destilador, à medida que o óleo destilado vai subindo na carga, enriquecendo as camadas da carga, das inferiores para as superiores.

Tomando o modelo esquemático representado na Fig. 2 considere-se então que, a um dado caudal de constante de vapor, a gota se evapora totalmente (raio  $r = 0$ ) no tempo  $t$ , e que este é proporcional ao raio  $r$ .

$$t = E^{-1}r \Rightarrow t = E^{-1}\left(\frac{a}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{7}$$

Nesta expressão  $E^{-1}$  é uma constante de proporcionalidade.

À medida que o óleo vai subindo no destilador, numa sucessão de evaporações e condensações, a área das gotas vai aumentando, sendo  $\delta a$  o incremento que a área  $a$  regista por unidade de altura de carga no destilador. O parâmetro  $s$  define-se então como  $s = a/\delta a$ .

Supondo que a altura da carga no destilador é  $H$ , o incremento total na área ao atingir-se a camada de topo da carga do destilador seria de  $a + H \cdot \delta a$ . O tempo total da destilação  $T$ , por sua vez, seria dado por,

$$T = E^{-1}\left(\frac{a + H \cdot \delta a}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{8}$$

Esta expressão permite então obter o incremento no tempo de destilação quando se passa de uma altura  $H$  para uma altura  $H'$ .

$$\frac{T}{T'} = \left(\frac{a + H' \cdot \delta a}{a + H \cdot \delta a}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{9}$$

$$\frac{T}{T'} = \left(\frac{s + H'}{s + H}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{10}$$

Através do parâmetro  $t$ , pode então relacionar-se o aumento relativo no tempo de extracção com o incremento  $\delta a$  na área  $a$ . Recorrendo à expressão (7) obtemos para o parâmetro  $t$ .

$$\frac{T}{t} = \frac{E^{-1} \left( \frac{a + H\delta\alpha}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}}}{E^{-1} \left( \frac{a}{\pi} \right)} \quad (11)$$

Conhecido os parâmetros  $t$  e  $s$ , o tempo de extração depende então unicamente da altura da carga:

$$T = t \left( \frac{s + H}{s} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

O modelo traduzido nestas fórmulas permite-nos, com uma informação experimental mínima, obtida em ensaios-piloto, estimar o tempo necessário para destilar uma dada carga num destilador com uma dada altura e desse modo, calcular a capacidade de processamento de uma dada instalação, o que pode ser aproveitado quer no seu projecto, quer na avaliação da capacidade de um equipamento existente. É no entanto necessário determinar os parâmetros  $s$  e  $t$ . O parâmetro  $s$  poderá ser obtido pelos dados de tempo de extração e altura de carga de dois ensaios, recorrendo à equação (10). Obtido o parâmetro  $s$  e utilizando a equação (12), de novo com um par experimental de tempo de extração e altura de carga, obteremos finalmente o parâmetro  $t$ .

No entanto de destilação para destilação de uma mesma espécie o teor de óleo na planta pode variar. Igualmente pode variar a velocidade do vapor na passagem pelo destilador. Para comparar ensaios os parâmetros  $s$  e  $t$  terão que ser ajustados a estas variações.

#### Estabelecimento de uma base de comparação de ensaios de destilação

A informação experimental proveniente de operações de destilação distintas, para ser utilizada comparativamente, tem que ser ajustada às diferentes condições em que as destilações se realizaram. Isto é importante, nomeadamente na realização de ensaios-piloto, destinados a obter dados úteis no aumento de escala de instalações.

Não existindo um termo de comparação absoluto é necessário indicar quais as condições do ensaio que se tomam para referência nas destilações a comparar. Nos ensaios-piloto procurar-se-á que essas condições correspondam aproximadamente às da instalação industrial, mantendo-se tanto quanto possível uma densidade constante de empilhamento da planta, um mesmo caudal de injeção de vapor e planta representativa das condições que esta vai apresentar no processamento.

Mas como acima se referiu os parâmetros  $s$  e  $t$  terão que ser ajustados às variações de teor em óleo volátil e caudal de vapor que tenham existido entre os ensaios.

Este ajuste é obtido - para cada destilação - pelo ajuste individual de variáveis e parâmetros influentes no valor de  $s$  e de  $t$  às condições da operação que se elegeram para referência. Essas variáveis e parâmetros são:

- O instante inicial;
- O instante final (dependente da quantidade de óleo e do caudal de vapor);
- O tempo total de extração (função do caudal de vapor de água);
- A altura da carga;
- O teor em óleo da planta.

Para cada um dos ensaios é necessário dispôr da evolução do volume do destilado (vapor de água condensado + óleo). Esta pode ser obtida considerando a divisão do período total da destilação em intervalos de duração arbitrária, e efectuando a recolha do destilado, para cada um deles, em recipiente separado. A partir da determinação das quantidades de óleo e de vapor recolhidas em cada intervalo, estabelece-se uma curva da evolução do óleo acumulado a qual é traçada, (ou extrapolada), até ao ponto em que a sua evolução corre paralelamente ao eixo da abcissas, numa linha cuja ordenada corresponde ao chamado "conteúdo em óleo na exaustão".

Reunindo o destilado total obtém-se as correspondentes quantidades totais de água e óleo.

Vejamos então como se procede às mencionadas correcções.

#### *Instante inicial*

Este ajuste é função do comportamento inicial do vapor de água injectado. O momento que se deve considerar como o inicial, em função do aparecimento do primeiro destilado na saída do condensador, pode não ser o adequado para essa designação, devido à instabilidade inicial do caudal de destilação. Para obviar a esta dificuldade poderá recorrer-se a um procedimento expedito, fazendo corresponder ao vapor de água recolhido no destilado nos períodos em que se registou a oscilação, um valor médio de caudal estabilizado, e em função dele, calcular o intervalo temporal a considerar como correspondente ao período inicial de destilação.

#### *O instante final*

Para comparar duas destilações, no mesmo equipamento ou em equipamentos idênticos, é necessário que os instantes finais considerados na comparação correspondam a situações equivalentes no processo de extracção do óleo. O ajuste é feito em função do caudal de destilação do óleo na destilação de referência, corrigido para o teor de óleo na planta  $O$  [mL/kg], e para o caudal de vapor de água.  $q_{H_2O}$  [mL/min],

$$q_{oleo} = q_{oleo\ ref} \left( \frac{O}{O_{ref}} \right) \left( \frac{q_{H_2O}}{q_{H_2O\ ref}} \right) \quad (13)$$

O instante final correspondente pode então ser calculado através do ponto de tangência da recta de inclinação correspondente ao caudal corrigido traçada no gráfico da evolução do óleo acumulado em função do tempo (ver Gráfico 1).

O instante final pode também resultar do estabelecimento de uma equivalência de tempos de extracção, ajustando-os ao facto destes serem inversamente proporcionais aos caudais de vapor. No caso de equipamentos distintos o ajuste terá que ter igualmente em conta a diferença nas secções quadradas dos destiladores, tendo em conta que os tempos de extracção serão inversamente proporcionais aos caudais de vapor.

#### *Altura da carga*

Duas destilações em que todas as condições sejam idênticas, à excepção da uniformidade das cargas, não obstante estas se apresentarem com alturas idênticas, não são equivalentes, e as suas alturas terão que ser ajustadas à carga de referência. O ajuste será feito através de uma altura virtual, obtida dividindo o conteúdo total em óleo da carga pelo conteúdo de óleo por unidade de altura, na destilação de referência.

$$H_{virtual} = \frac{\text{Óleo total}}{\left( \frac{\text{Óleo total}}{\text{Altura}} \right)_{referência}} \quad (14)$$

Por exemplo, caso as cargas fossem uniformes entre elas, a expressão (12) seria directamente aplicável a ambas.

Quando tal não aconteça será necessário fazer o ajuste para uma altura virtual  $H_{virtual}$  para que a expressão se possa aplicar.

#### *Estimativa do conteúdo total de óleo na carga*

Através da recolha experimental de dados relativos à evolução da quantidade de óleo

acumulada à saída do destilador, não é na prática possível determinar o momento a partir do qual cessou totalmente a destilação do óleo. Com efeito, a curva correspondente vai-se aproximando assintoticamente do valor total. Este valor pode no entanto ser obtido através da recta correspondente a um período em que o valor acumulado se apresente estabilizado. Na prática não é no entanto importante saber qual o instante em que cessa a destilação do óleo, porque antes de atingido esse ponto, na fase final da operação, o gasto de vapor exigido para a recuperação das últimas fracções tornam o objectivo de exaustão total do óleo não-económico. Há então que definir um outro critério de paragem ou de comparação de ensaios, por exemplo, a remoção de uma certa percentagem do óleo total (por ex. 95%).

### EXEMPLO DE APLICAÇÃO

Vejamos agora um caso prático de aplicação dos conceitos atrás desenvolvidos, para plantas com uma distribuição superficial das glândulas de óleo\*. Na Tabela 1 representam-se os dados registados em três destilações de campo. Na Fig. 3 está feita a sua representação. Todas as destilações foram levadas à exaustão. Nos gráficos, em ordenadas, está representada a quantidade acumulada de óleo destilado (mL) e, em abcissas, o tempo de cronómetro(s).

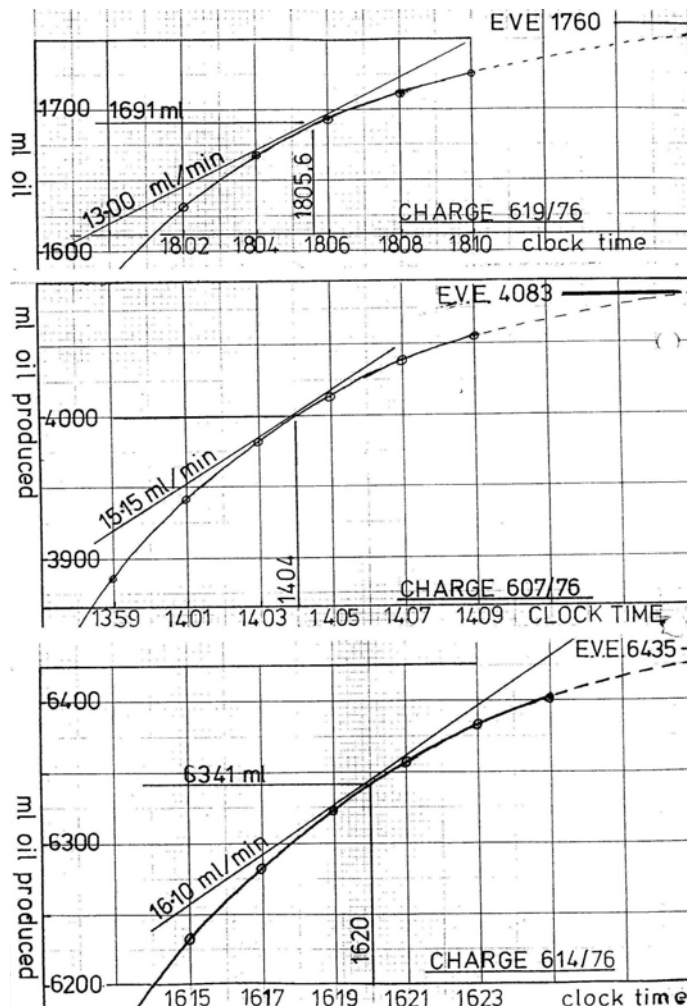


Fig. 3. Evolução do óleo acumulado em função do tempo de cronómetro para três ensaios distintos com a mesma espécie.

O primeiro passo para ajustar estes ensaios consiste na escolha das condições de referência, indicadas na Tabela 2.

No passo seguinte ajustam-se às condições de referência, para cada destilação, os caudais

\* Baseado num exemplo proposto por Denny (1991)

terminais de destilação do óleo (caudal de referência, 10mL/min) tendo em conta o caudal de vapor condensado (3170mL) e o teor em óleo na carga (9,09mL/kg).

Assim obtém-se os valores que, na tangente à curva de evolução do óleo acumulado, de uma recta com o valor do caudal terminal, vão determinar em cada caso, o instante final das três destilações, equivalente entre elas.

Tabela 1. Resultados de 3 ensaios de destilação experimentais.

Notas sobre a carga	Tempo de cronómetro (remoção do recipiente colector)	H <sub>2</sub> O na fracção (mL)	Óleo na fracção (mL)	Óleo acumulado (mL)
<b>Ensaio 619</b>	1752	3730	620	
<b>Carga:</b> 156kg	1754	6160	550	1170
<b>Secção quadrada:</b> 1,026m <sup>2</sup>	1756	6470	220	1390
<b>Teor em óleo:</b> 1760mL	1758	6550	115	1505
	1800	6630	75	1580
	1802	6620	52	1632
	1804	6650	36	1668
	1806	6640	25	1693
	1808	6640	18	1711
	1810	6630	14	1725
<b>Ensaio 607</b>	1345	4970	1050	
<b>Carga:</b> 298kg	1347	6100	1030	2080
<b>Secção quadrada:</b> 1,026m <sup>2</sup>	1349	6290	710	2790
<b>Teor em óleo:</b> 4083mL	1351	6240	480	3270
	1353	6410	270	3540
	1355	6350	166	3706
	1357	6400	107	3813
	1359	6430	73	3886
	1401	6420	55	3941
	1403	6410	40	3981
	1405	6330	32	4013
	1407	6390	25	4038
	1409	6370	21	4059
<b>Ensaio 614</b>	1555	5900	1380	
<b>Carga:</b> 473kg	1557	6105	1190	2570
<b>Secção quadrada:</b> 1,1675m <sup>2</sup>	1559	6840	1030	3600
<b>Teor em óleo:</b> 6435mL	1601	6630	800	4400
	1603	6740	610	5010
	1605	6690	460	5470
	1607	6780	287	5757
	1609	6790	190	5947
	1611	6790	125	6072
	1613	6770	91	6163
	1615	6870	69	6232
	1617	6750	50	6282
	1619	6820	42	6324
	1621	6810	33	6357
	1623	6830	27	6384
	1625	6830	17	6401

Tendo em conta o vapor de água condensado acumulado entre o instante final da primeira recolha e o instante final agora determinado, calcula-se um valor médio de caudal. Com este valor determina-se o instante inicial da destilação tendo em conta o vapor de água condensado obtido na primeira recolha.

Estamos então em condições de calcular o tempo total de extracção, o qual será também corrigido, em cada caso, para o caudal de referência de vapor e para a secção quadrada do

destilador.

Estes valores são então utilizados para determinar as alturas virtuais, e estas vão-nos permitir determinar os parâmetros  $s$  e  $t$ . Com estes podemos determinar, para a mesma espécie, para qualquer destilador, com qualquer secção quadrada, o tempo de destilação.

Tabela 2. Condições de referência para a comparação de ensaios de destilação.

---

**Secção quadrada:** 1,026m<sup>2</sup> para cargas até 310kg e 1,1675m<sup>2</sup> para cargas superiores  
**Densidade de empilhamento do material vegetal:** 308kg/m<sup>3</sup>  
**Caudal de vapor condensado:** 3170 mL/min  
**Teor em óleo na carga:** 9,09mL/kg (corresponde ao resultado obtido num ensaio escolhido como referência)  
**Ponto de paragem:** caudal de óleo terminal de 10mL/min .  
**Estado do material vegetal:** planta processada imediatamente após a colheita  
**Outras condições:** Vapor proveniente de banho de água à pressão atmosférica.

Em seguida é necessário determinar o instante inicial para cada ensaio, para o que se traça um gráfico com a curva de evolução do volume de vapor de água condensado e acumulado em cada operação.  
 Determinam-se os conteúdos totais de óleo destilado, os quais, nos ensaios 978/75, 978/75 e 981/75 têm respectivamente os valores 1506mL, 2736mL e 4518mL.

---

Os tempos de destilação assim obtidos permitem-nos determinar com rigor a capacidade de uma dada instalação e a duração das operações, deste modo ajustando à dimensão das culturas e à sua sazonalidade a operação de destilação dos óleos essenciais.

Os dados obtidos permitem-nos igualmente derivar, para a mesma planta mas para instalações com diferentes características, as suas condições de funcionamento.

## EQUIPAMENTOS E PROCESSAMENTO EM INSTALAÇÕES INDUSTRIAIS

### Cultivo da planta

Não se pretendendo entrar no domínio das práticas agrícolas chama-se no entanto a atenção para a influência que as especificidades dos cultivos podem ter nas instalações industriais de obtenção de óleos essenciais.

Esta influência é particularmente importante nos casos em que a planta dispõe de uma estreita janela temporal para ser colhida e processada para a obtenção do óleo, facto que tem óbvia influência na capacidade da instalação e no dimensionamento das utilidades que a servem.

Boas práticas agrícolas e de colheita são condições indispensáveis para produzir matéria-prima de qualidade, garantindo também a qualidade, segurança e eficácia dos produtos finais. Estas boas práticas apoiam o cultivo e colheita sustentável de plantas, respeitando a protecção dos recursos naturais. No caso dos materiais vegetais para uso medicinal as boas práticas agrícolas e de colheita, seguidas e adoptadas por produtores e processadores contribuem para a diminuição do número de casos de problemas de saúde originados pela má qualidade do material vegetal.

Existem “guidelines” de boas práticas agrícolas e de colheita na União Europeia, China e Japão (World Health Organization, 2003; EMEA, 2002).

### Colheita

Um dos aspectos a ter em atenção relativamente à colheita diz respeito à utilização de meios mecânicos na colheita. Estes são mais agressivos para a planta do que os métodos manuais e podem ser causa na diminuição do rendimento da planta em óleo, sobretudo se esta não for imediatamente processada. Este é um problema a ter em particular atenção no caso das plantas em que a localização das glândulas dos óleos é superficial, nas folhas e nas flores, como por exemplo nas Labiadas. É menos importante quando o óleo é extraído de sementes.

Um método interessante em qualquer dos casos consiste na carga directa da planta em corpos de destilador, que são carregados e depois directamente inseridos como parte do destilador

---

completo, o que diminui substancialmente o tempo dispendido nas operações relacionadas com a sua carga (Fig. 4). Haverá no entanto que assegurar que a planta fica uniformemente distribuída e bem compactada no contentor, de modo a que a destilação seja eficiente. É conveniente que destilador, contentor colector de planta e capacidade de fornecimento de vapor sejam projectados em conjunto, para assegurar a sua adequada articulação.

Nos casos em que a destilação se segue imediatamente à colheita é importante assegurar que o ritmo de colheita é superior ao da destilação para evitar interrupções nesta.



Fig. 4. Colheita mecânica de lavanda directamente para contentor de destilação (Denny 1991).

### Transporte da planta

Munõz (1993) cita a utilização de atrelados de uso específico, com capacidades na ordem das 5 toneladas, equipados com guardas móveis que facilitem o acesso à carga, (tipicamente carregam o equivalente à produção de 1ha de uma cultura de lavandin), ou de atrelados convencionais, de quatro rodas, aceitando até 6 toneladas de carga. Certos modelos têm dispositivos com aptidão para comprimirem as cargas. Quando se trata de grandes capacidades pode justificar-se a utilização de um camião.

O autor acima citado aconselha a manter uma destilaria no centro de uma região com não mais de 40km de diâmetro no acesso, quer à planta cultivada quer, se for caso disso, à planta espontânea.

### Armazenagem do material antes da destilação

Sendo necessário armazenar a planta antes da destilação, a instalação correspondente deve garantir protecção contra o sol e contra a chuva, possuindo também fácil acesso à zona de carga dos destiladores. Deve igualmente ser bem ventilada, para evitar fermentações. Durante o armazenamento a planta perderá parte do seu peso em água.

O espaço de armazenagem não necessita de acolher mais material do que o necessário para o funcionamento dos destiladores durante 2 dias.

Em certos casos não são necessárias instalações de armazenamento. É o caso do funcho, o qual deve ser destilado imediatamente após a colheita, para não baixar o teor no composto anetole (30 a 60%), bastante volátil.

### Destilação

O método mais comum de extração ou destilação dos óleos essenciais realiza-se fazendo passar vapor de água pela carga das plantas no destilador, conforme anteriormente referido. O vapor utilizado pode ser produzido a pressões próximas da atmosférica, caso em que um simples evaporador de água tem capacidade para o fazer, ou utilizando-se vapor acima da pressão atmosférica. O vapor dos destiladores que operam com vapor acima da pressão atmosférica é gerado em caldeiras e directamente injectado no destilador (Fig. 5).

Os destiladores que operam com vapor de baixa pressão tem capacidades que tipicamente

vão de  $1\text{ m}^3$  aos  $10\text{ m}^3$ . Os destiladores que operam com vapor a pressões acima da atmosférica têm capacidades típicas entre os  $0,6\text{ m}^3$  e  $1\text{ m}^3$ .

Muñoz (1993) refere ainda a utilização de pequenos destiladores portáteis, em aço inoxidável, com capacidades da ordem de 200L. É uma solução interessante para ensaios experimentais ou para utilização em pequenas produções de elevado valor assentes em origens geograficamente distantes.

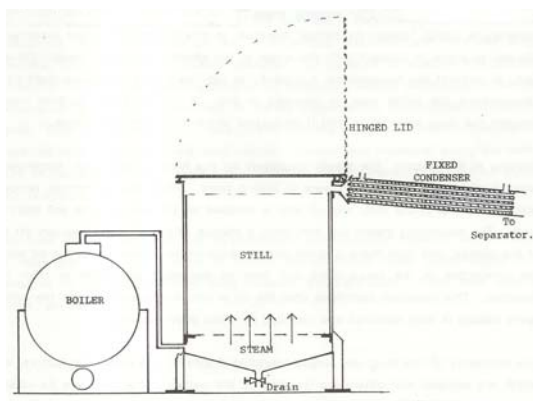


Fig. 5. Esquema de destilador funcionando com vapor directamente gerado numa caldeira (Denny 1991).

A opção por um ou outro tipo de sistema produtor de vapor depende sobretudo da espécie e da condição da planta a destilar. As plantas alimentadas secas têm geralmente vantagem em serem destiladas com vapor húmido, tal como é gerado nos evaporadores simples. Muñoz (1993) recomenda a utilização de destiladores deste tipo, sobretudo na destilação de Labiadas, sublinhando como vantagens a qualidade do óleo obtido e o facto de trabalharem a baixas pressões, o que dispensa precauções particulares com a segurança de funcionamento do equipamento.

Os destiladores que operam com vapor a pressões superiores à atmosférica, em geral de 1 bar a 2 bar, são recomendados principalmente na extracção de óleo de sementes. O seu uso é no entanto flexível porque podem operar de modo análogo ao dos evaporadores. Com efeito o teor em humidade do vapor que produzem pode ser facilmente ajustado pelo contacto com uma fase aquosa líquida.

Os destiladores que consomem vapor à pressão atmosférica são principalmente do tipo Eysseric ou de “banho-maria”, representado num esquema simples na Fig. 6. A transmissão de calor com origem nos gases de combustão é mediada pela água que ou envolve o destilador ou está na sua base (Fig. 7). Ao receber a energia libertada na combustão produz-se vapor, o qual é encaminhado para o espaço onde se encontra a planta, no interior do destilador. Muñoz (1993) ilustra a implementação de um sistema do primeiro tipo no projecto de uma destilaria composta por dois destiladores, cada um com  $6\text{ m}^3$  de capacidade.

O vapor de baixa pressão pode ter origem na utilização de queimadores de óleo (Fig. 7). Outra solução aparentemente atraente consistiria em utilizar como fonte de energia produtora do vapor a combustão de resíduos lenhosos. Estes serão, em primeira linha, os resíduos resultantes das operações de extracção, depois de secos, valorizando-os e eliminando a quase totalidade do volume de resíduos produzidos. O seu baixo poder calorífico pode no entanto ser uma desvantagem a ter em consideração.

Em qualquer dos casos aos destiladores estão associados sistemas de elevação e movimentação das cargas. A compactação da planta no destilador, antes da extracção, pode ser feita com um pneu de tractor no interior do qual se moldou um aro em cimento.

Para cada espécie a destilação faz-se em geral em campanhas de curta duração (2 a 3 semanas). A carga estimada de massa vegetal no volume de um destilador é de cerca de 20% a 25% ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ). Segundo Muñoz as operações demoram entre 25 e 40 minutos.

A capacidade de destilação a instalar depende da sazonalidade das espécies, as quais, coincidindo na época propícia à extracção e não podendo esperar pelo processamento após a

colheita, exigem resposta suficiente, do volume da produção e do tempo de processamento para cada espécie.

O volume de material vegetal de cada espécie vai depender em princípio do seu interesse económico e dos terrenos de cultivo disponíveis e adequados. Quanto ao tempo de processamento de cada espécie, se considerado *a priori*, temos como alternativas o uso de valores médios estimados ou a obtenção de dados experimentais, através da realização de ensaios-piloto, tal como anteriormente referido para a obtenção dos rendimentos da extracção por unidade de massa de material processado.

Como estimativa do peso de planta seca por unidade de volume de um destilador pode registar-se o valor indicado por Muñoz, que é equivalente a 20-25% do seu volume em litros.

Um dos mais importantes parâmetros de projecto de uma unidade destilação de óleos essenciais reside no valor dos caudais de vapor a disponibilizar para as destilações, sendo este um factor mais importante que a pressão à qual o vapor é utilizado.

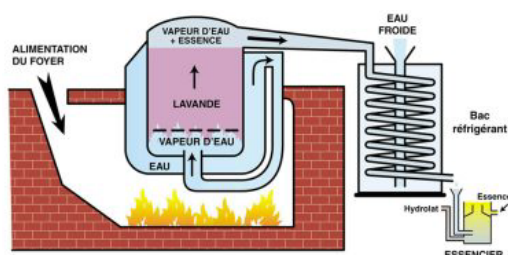


Fig. 6. Esquema de funcionamento de um destilador de Eysseric com vapor transportado da parte alta do destilador para a base.\*

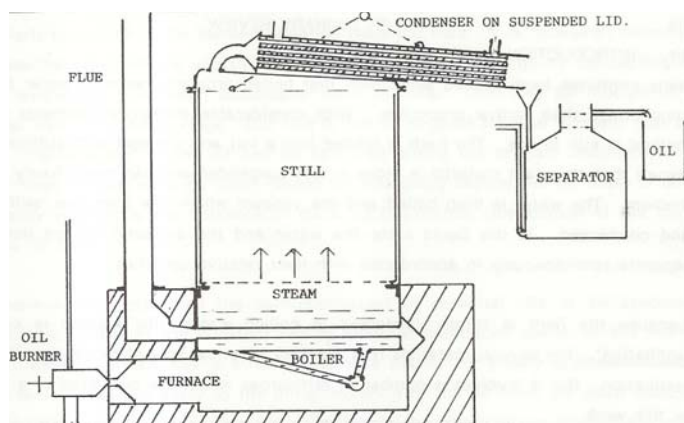


Fig. 7. Esquema de funcionamento de um destilador de Eysseric com vapor gerado na base do destilador (Denny, 1991).

### O problema da água

O abastecimento de água garantido e abundante é fundamental para o funcionamento de uma destilaria. A água é consumida na alimentação de caldeiras, para produção de vapor (o que exige o seu tratamento para remoção de sais e de oxigénio) e, principalmente, na condensação das misturas vapor+óleo.

Muñoz exemplifica consumos de água na ordem de 18m<sup>3</sup>/h para uma destilaria francesa de grande capacidade (2 destiladores de 10m<sup>3</sup> cada, e outro de 5m<sup>3</sup>, o que representaria 0,72m<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O/m<sup>3</sup> de capacidade instalada). Este elevados consumos são um problema a ter em consideração na localização de uma unidade industrial, tanto mais importante quanto maior fôr a sua dimensão e menor a abundância de água. Sendo a água um bem tendencialmente escasso e valorizado, exige-se a sua reciclagem e reaproveitamento, o que poderá implicar a necessidade de instalar depósitos de armazenamento. Estes tem a vantagem suplementar de prevenir falhas no abastecimento. Convém igualmente possuir uma reserva de água sempre acessível,

\* retirado do site: <http://www.futura-sciences.com/comprendre/d/imprimer.php?id=261>

para prevenir a eventual ocorrência de um incêndio.

### Condensação e separação do sistema água-óleo

Um tipo de condensador tradicionalmente utilizado na indústria é constituído por enrolamentos concêntricos de tubo em espiral, por onde o óleo e o vapor fluem, colocados no interior de um cilindro cheio de água, que quando em funcionamento, não deve ultrapassar os 40°C. Para este tipo de condensador estima-se que utilizando água a 25°C serão necessários cerca de 12L de água por cada kg de vapor a condensar. Este tipo de condensador é pouco eficiente, sendo preferível utilizar um condensador “tube-and-shell” convencionalmente utilizado na indústria química. Neste tipo de condensadores os vapores passam à fase líquida no interior de tubos, dispostos em feixe paralelo no interior de um cilindro. Entre este cilindro externo e os tubos circula água - que é normalmente o fluido refrigerante - forçada a sucessivos desvios pela colocação de chicanas no seu trajecto. Podem ser instalados próximo da horizontal, com uma ligeira inclinação para facilitar a saída do condensado (Fig. 8) ou verticalmente. Neste última posição são mais eficientes, requerendo menos fluido de arrefecimento para idênticos níveis de condensação relativamente aos horizontais. Estes últimos podem no entanto tornar-se necessários para um “lay-out” do equipamento mais conveniente.

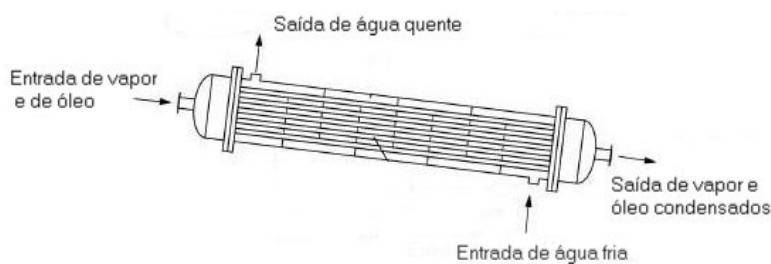


Fig. 8. Condensador “tube-and-shell” (Bandoni 2003).

O condensador não tem no entanto por único objectivo a condensação. Ele deve igualmente arrefecer o líquido condensado a uma temperatura tal que minimize as perdas por evaporação à saída sem prejuízo das condições de quebra da emulsão formada na condensação. Este último requisito pode limitar o arrefecimento do condensado dado que as temperaturas mais elevadas, nos óleos essenciais de densidade inferior à da água, actuam no sentido de facilitar a separação das fases.

À saída do condensador a mistura do vapor de água e do óleo condensados é então recolhida num separador especial, denominado “florentino”. Na Fig. 9 ilustram-se dois tipos de vasos “florentinos”, um para a recolha de óleos menos densos que a água e outro para os óleos mais densos.



Fig. 9. “Florentinos” para separação do vapor condensado do óleo (Bandoni 2003).

### Embalagem e armazenamento dos óleos

O armazenamento pode ser feito em tambores galvanizados (capacidades até cerca dos

250L). As instalações de armazenamento devem ser frescas e (temperaturas nunca excedendo os 25°C). Para óleos susceptíveis de alteração podem utilizar-se recipientes e embalagens em alumínio. Tratando-se de quantidades reduzidas pode-se recorrer a recipientes em vidro escuro. Neste caso é igualmente importante que o armazenamento seja feito em local ao abrigo da luz.

Para algumas das espécies abordadas é possível indicar um prazo de armazenamento máximo: para os óleos de alecrim e de rosmaninho ele poderá ir até 7 anos. Para o óleo de orégãos, 2 anos.

## REFERÊNCIAS

- Bandoni A (2003) Los Recursos Vegetales Aromáticos em Latinoamérica – Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, CYTED, Buenos Aires, 2nd. Ed., 417 pp.
- Denny EFK (1991) *Field Distillation for Herbaceous Oils*, McKenzie Associates, Australia.
- Mateus EM, C Lopes, T Nogueira, JAA Lourenço, MJ Marcelo Curto (2005) Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal, *Silva Lusitana* (aceite para publicação), 22 pp.
- Muñoz F (1993) *Plantas Medicinales y Aromaticas*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- World Health Organization (2003) WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants, Geneva.
-

## PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS E BIOLOGIA MOLECULAR\*

*H. Trindade*

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

### CONCEITO DE MARCADOR: MORFOLÓGICO VS MOLECULAR

Desde sempre a observação directa de caracteres morfológicos em diferentes indivíduos de uma população tem contribuído para o conhecimento da variação natural, classificação e agrupamento de indivíduos, selecção de variedades, entre outros. Estes estudos baseiam-se em **marcadores morfológicos**, nos quais a hereditariedade pode ser observada directamente sem o recurso a técnicas bioquímicas ou moleculares especializadas. As características morfológicas que são controladas por um único *locus* podem ser usadas como marcadores genéticos desde que a sua expressão seja reprodutível em diferentes ambientes. No entanto, a expressão destes marcadores é influenciada pelo ambiente e vem também alterada por interacções epistáticas (interacções génicas) e peliotrópicas (múltiplos efeitos resultantes de um único gene).

Existe uma outra classe de marcadores, designados de **marcadores moleculares**, que revelam a variação existente no material genético, não sendo influenciáveis pela acção do ambiente. Os marcadores moleculares que revelam polimorfismos ao nível das proteínas são designados de **marcadores bioquímicos**, enquanto que outros constituem os **marcadores de DNA** e revelam polimorfismos na sequência de DNA. Estes marcadores existem em maior número relativamente aos marcadores morfológicos e, tratando-se de marcadores associados ao DNA, estão presentes em qualquer célula, em qualquer órgão e em qualquer idade. Outra vantagem importante é que têm um efeito epistático ou pleiotrópico mínimo e não apresentam em geral efeito sobre o fenótipo.

### APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para aplicações bem diversas, entre as quais se destacam as seguintes (*in* Kumar, 1999):

#### Construção de mapas genéticos de *linkage*

Os marcadores de DNA em plantas têm sido usados no desenvolvimento de mapas de *linkage* detalhados. O conceito de *linkage* é a base do mapeamento genético. Trata-se da associação na hereditariedade de determinadas características, resultante da localização física de genes no mesmo cromossoma, de tal modo que há uma distorção na taxa de segregação Mendeliana: as combinações dos gametas parentais são mais frequentes do que os gametas recombinantes.

Para se conseguir utilizar os inúmeros polimorfismos (revelados pelos marcadores) de modo eficiente como marcadores genéticos, é necessário conhecer a sua localização genómica individual. Assim, um mapa genético de *linkage* representa graficamente, ao longo do cromossoma, o arranjo dos inúmeros *loci*, resultantes da informação de marcadores morfológicos, isoenzimas e de DNA. A distância entre estes *loci* é expressa em centimorgans (cM), que representa as taxas de recombinação entre os diferentes *loci* (1cM=1% de recombinação). Não há uma relação específica entre a distância de recombinação e a distância física (expressa em pares de bases), uma vez que a taxa de recombinação varia ao longo do cromossoma.

---

\* *In*: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 96-105, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

---

### **Análise de mapeamento comparativo**

Uma das aplicações mais úteis dos mapas genéticos de *linkage* tem sido a comparação de genomas de grupos taxonômicos distantes ou de cruzamento incompatível. Nesta estratégia de comparação de mapas, a informação mapeada de um grupo é utilizada para prever a relação de *linkage* entre grupos aparentados ou distantes fazendo recurso a um conjunto de sondas de hibridização de DNA comuns e a informação assim obtida é muito útil para prever a organização do genoma e a evolução de espécie em estudo. Os marcadores de DNA tornaram esta comparação possível, que não teria sido possível fazer de outra forma, sobretudo para espécies incompatíveis.

### **Conhecimento da variação natural**

O conhecimento e gestão da variação natural presente entre as cultivares domesticadas e os indivíduos selvagens de uma determinada espécie é muito importante no estabelecimento de um programa de melhoramento eficiente. O explorar a variação natural é muito importante por várias razões: a uniformidade genética é indesejável uma vez que pode ocorrer vulnerabilidade a epidemias e desastres ambientais conduzindo a perdas nas colheitas. Muitos indivíduos selvagens contêm genes que podem conferir resistência a *stresses* bióticos (pestes e doenças) e tolerância a *stresses* abióticos (seca, frio e salinidade, p. ex.).

Os marcadores de DNA têm sido usados para quantificar a diversidade genética e para determinar as relações fenéticas em diferentes espécies vegetais. A análise de grupos (análise de cluster) é útil para estudar as relações entre indivíduos aparentados, enquanto que a análise de componentes principais permite uma representação mais completa entre grupos maiores.

A diversidade genética usando os marcadores moleculares também tem sido aplicada em estudos de biodiversidade, identificação de variedades e análise filogenética, em estudos de ecologia vegetal e na análise de populações de patógenos.

### **Identificação de genes economicamente importantes**

Uma aplicação directa dos mapas genéticos de *linkage* é na procura de genes de importância económica com os marcadores moleculares. Em termos gerais, a probabilidade de identificar um marcador em ligação com um gene de interesse é inversamente proporcional à distância entre o marcador e o gene.

Muitas características com interesse agronómico tais como produção, qualidade, maturação e resistência a diferentes *stresses* bióticos e abióticos são controladas por um número relativamente grande de loci, cada um dos quais tem uma pequena contribuição, positiva ou negativa, para o valor fenotípico final da característica. Estes loci são designados "quantitative trait loci", QTLs e as características que apresentam uma variação contínua no fenótipo são designadas "características poligénicas" uma vez que a expressão fenotípica final é determinada pela variação genética num número grande de loci, modificado pelos efeitos ambientais.

### **Seleccção assistida por marcadores**

A seleccção assistida por marcadores (MAS - *marker assisted selection*) baseia-se no conceito de que é possível inferir a presença de um gene pela presença de um marcador que esteja intimamente ligado a esse gene. Se o marcador e o gene estiverem distantes, então a possibilidade de serem transmitidos juntos para a descendência será reduzida devido à existência de *crossing over* e recombinação. Assim, um pré-requisito para a utilização destes marcadores na seleccção é que eles estejam intimamente ligados ao gene de interesse.

### **CLASSIFICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES**

De uma forma resumida, existem várias classes de marcadores moleculares, entre os quais se salientam três classes: as isoenzimas, polimorfismos baseados em hibridização ou polimorfismos

baseados no PCR.

### Isoenzimas

São diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, resultantes da existência de mais que um gene codificando para essa enzima. A detecção de isoenzimas envolve a extração de proteínas dos tecidos, a separação das proteínas em gel de electroforese e a coloração histoquímica do gel.

As isoenzimas de um mesmo grupo diferem entre si na sequência de aminoácidos que possuem, o que poderá influenciar a natureza da estrutura proteica secundária, terciária e quaternária da enzima. A expressão das isoenzimas é co-dominante, sendo que num indivíduo diplóide ambos os alelos de um *locus* são expressos e visualizados.

### Polimorfismos baseados em hibridização

Os **RFPLs** (*restriction fragment length polymorphisms*) resultam de polimorfismos no comprimento dos fragmentos obtidos por corte da cadeia dupla de DNA com enzimas de restrição. A diferente localização de zonas de corte enzimático na cadeia de DNA vai gerar fragmentos de diferentes tamanhos. A comparação de fragmentos de DNA é baseada na homologia de sequência após hibridização de uma sequência clonada (sonda) com fragmentos de sequência homóloga distribuídos ao longo do genoma (autoradiografia). Os RFLPs existem devido a mutações pontuais, inversões, deleções ou translocações.

Os polimorfismos, no caso dos loci VNTR (*variable number tandem repeats*), são devidos a uma diferença no número de repetições.

Nos **RFLPs** e nos loci **VNTR** sondas tais como clones genómicos aleatórios, cDNAs (cadeia de DNA complementar produzida por transcrição reversa a partir de um mRNA) e sondas para sequências de microsátélites ou minisátélites são utilizadas na hibridização com filtros contendo DNA digerido com enzimas de restrição.

### Polimorfismos baseados no PCR

A reacção de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), originalmente descrita por Saiki *et al.* (1985) envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA (molde ou *template*) na presença de uma enzima, a Taq polimerase (DNA polimerase termoestável). Esta multiplicação específica é devida à presença de *primers*, que são polinucleótidos de cadeia simples que reconhecem e se ligam às sequências de DNA complementares no DNA molde.

O processo de amplificação, Fig.1, começa com a **desnaturação** da dupla cadeia molde de DNA numa cadeia simples, a temperatura elevada (geralmente 90-95°C), seguido da **ligação** específica do *primer* ao molde de cadeia simples de DNA (*annealing*), a uma temperatura mais baixa. Ocorre então a **extensão** enzimática da cadeia, pela acção da Taq polimerase. A repetição do ciclo de **desnaturação-ligação do primer-extensão** leva a uma acumulação exponencial dos fragmentos de DNA da sequência definida, que têm geralmente 2-3Kbp. De facto, para haver amplificação, a distância entre dois locais de hibridização adjacentes deve ser de cerca de 2Kb, o tamanho limite de um fragmento de PCR em condições normais. Em cada novo ciclo a quantidade de DNA é duplicada, Fig.2, resultando num aumento exponencial do DNA alvo que pode ser então directamente visualizado num gel (p.ex de agarose).

Os polimorfismos baseados no PCR podem ser **aleatórios** ou **específicos**, dependendo do tipo de *primer* usado, as condições da reacção de PCR e o método de separação e detecção dos fragmentos.

Os **RAPDs** (random amplified polymorphic DNA), por exemplo, geram marcadores de PCR **aleatórios**. Na reacção de RAPD utilizam-se vários oligonucleótidos de sequência arbitrária como *primers* alvo de sites específicos mas desconhecidos no genoma. Os *primers* têm 10 nucleótidos (10-mers) e os produtos de amplificação são detectados em géis de agarose e visualizados após coloração com brometo de etídio sob luz UV. Estes géis estão limitados à detecção apenas dos produtos de reacção principais. Cada *primer* pode levar à amplificação de várias bandas,

correspondentes a vários loci. Uma vez que o número de *primers* que pode ser usado é praticamente ilimitado, estes marcadores cobrem potencialmente todo o genoma.

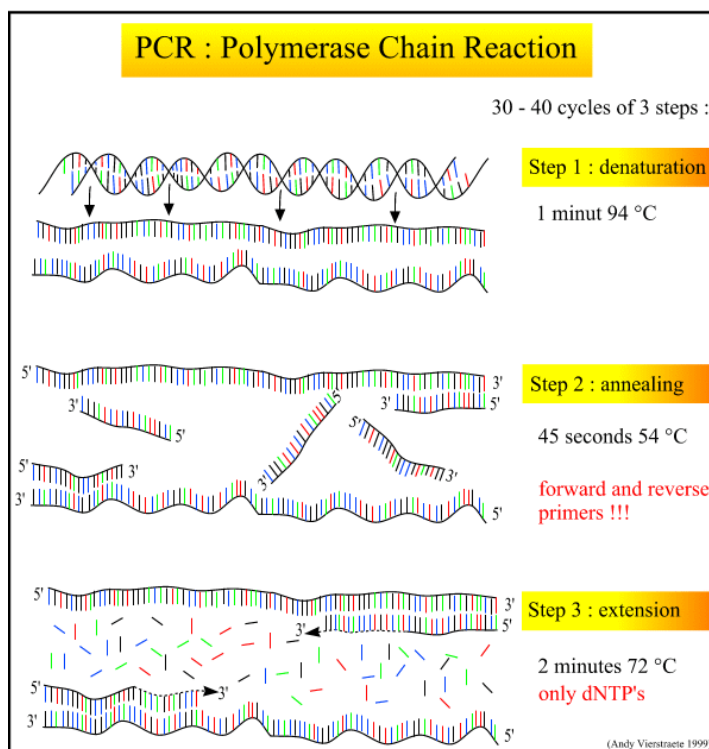


Fig. 1. Esquema exemplificativo da reacção de PCR, com os 3 passos principais: desnaturação, ligação e extensão (adaptado de Vierstraete 1999).

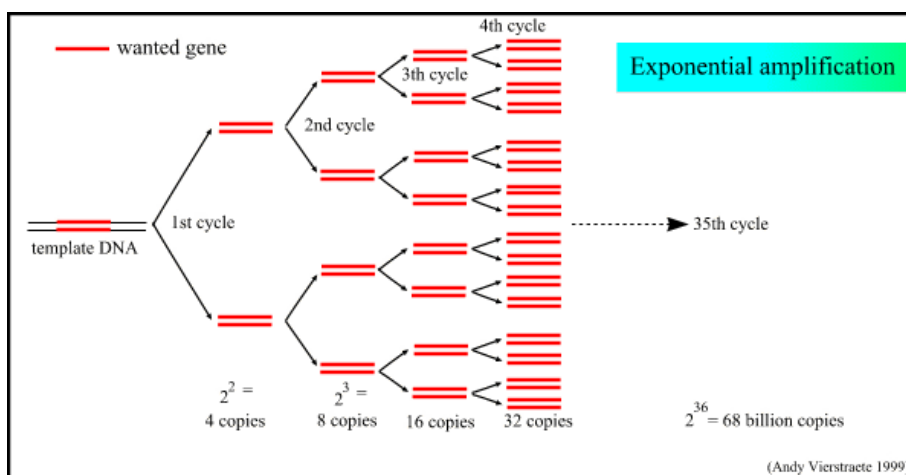


Fig. 2. Os primeiros 4 ciclos do PCR vistos em detalhe (adaptado de Vierstraete 1999).

Uma desvantagem destes marcadores é que eles são dominantes (isto é, presença/ausência da banda), resultando na incapacidade de distinção entre os indivíduos heterozigóticos e os homozigóticos dominantes. Por outro lado, os RAPDs têm revelado dificuldades na reprodutibilidade (ver Jones *et al.* 1997), mesmo assegurando que se mantêm as condições para a reacção de amplificação ocorrer.

Uma vantagem destes marcadores é a facilidade de execução técnica e a não exigência do

conhecimento prévio do genoma. Várias empresas comercializam kits de RAPDs (p.ex. Operon), tornando-o assim um método de *fingerprinting* bastante conveniente, Fig.3.

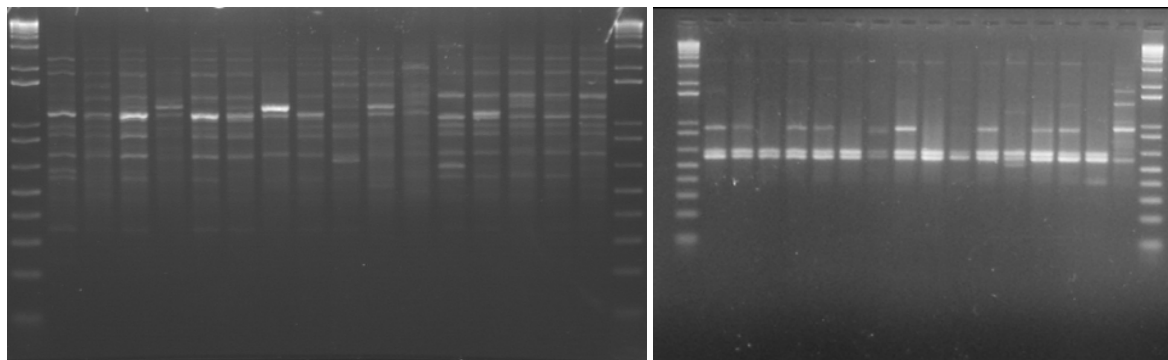


Fig. 3. Géis com produtos de reacção de RAPDs, evidenciando a amplificação com os primers D03 e B08 em *Th. caespitiosus*. Em cada gel, os poços da esquerda e da direita foram carregados com o marcador e os restantes poços correspondem a diferentes plantas.

Os polimorfismos **ISSR** (*inter-simple sequence repeat*) derivam dos **SSR** (microsatélites) por ancoragem terminal de um *primer*, havendo amplificação de dois SSR do mesmo tipo. O polimorfismo ocorre quando no genoma há falta de um dos SSR ou ocorreu uma deleção ou inserção que modifica a distância entre as repetições.

Os marcadores de **SSR** ou microsatélites são sequências repetidas de 1-4 nucleótidos (p. ex.  $(AC)_n$ ), intercaladas no genoma e que podem ser amplificadas usando *primers* que ladeiam essas regiões. Estes marcadores também podem ser designados de SLP (*single sequence length polymorphism*) ou STMS (*sequence-tagged microsatellite sites*). Numa mistura de DNA desnaturado, os SSR reassociam-se rapidamente, dada a sua baixa complexidade na composição em nucleótidos. Utilizando pares de *primers* (20-30 bp) complementares às sequências únicas que flanqueiam os microsatélites, é possível amplificar as regiões que contêm as sequências repetidas. Os microsatélites podem ser usados para identificação de diferentes estirpes ou raças de organismos e para avaliar a proximidade genética em populações. Estimativas apontam para a existência de  $5 \times 10^3$ - $3 \times 10^5$  microsatélites por genoma vegetal (Condit e Hubbell 1991).

Os *primers* para a análise de SSR podem ser construídos após consulta no GENE BANK para loci de SSR em espécies semelhantes ou pela procura em bibliotecas genéticas. A pesquisa de informação existente em bases de dados constitui assim uma forma rápida de desenvolver uma sonda para o fingerprinting de DNA sem ser necessário o conhecimento prévio da sequência.

Os **AFLPs** (*amplified fragments length polymorphisms*) são essencialmente uma combinação dos RFPLs com técnicas de PCR. O DNA genómico é digerido previamente com uma enzima de restrição apropriada. Como resultado, uma série de fragmentos representando vários loci são ligados a adaptadores sintéticos e amplificados com *primers* específicos que são complementares à sequência selectiva nos adaptadores. Várias centenas de fragmentos podem ser gerados desta forma. A separação subsequente dos fragmentos resultantes é realizada num gel de sequenciação com elevado poder de resolução e visualizados por autoradiografia. O gel de poliácridamida pode detectar diferenças tão pequenas quanto um par de bases. Em alternativa pode não usar-se nucleótidos radioactivos no passo envolvendo o PCR, utilizando-se técnicas de coloração de prata ou fluorescência para visualização dos produtos de amplificação.

A análise por AFLPs é semelhante aos RAPDs na medida em que em nenhuma das técnicas é necessário o conhecimento prévio das sequências; no entanto, os AFLPs detectam um número de *loci* muito superior aos detectados com os RAPDs. A complexidade dos perfis de AFLPs é dependente dos *primers* e das enzimas de restrição escolhidas, bem como pela composição do DNA genómico. Os *primers* de AFLP podem ser facilmente distribuídos entre laboratórios pela publicação das sequências dos *primers*.

## CARACTERÍSTICAS DE UM MARCADOR MOLECULAR

Um marcador molecular deve possuir algumas características entre as quais se destacam o **polimorfismo**, isto é, existir em alguns indivíduos mas não noutros, terem uma **ocorrência aleatória** e apresentarem **herança co-dominante** (permitindo a discriminação entre os indivíduos homo e heterozigóticos). A reprodutibilidade é também um factor importante, bem como a facilidade de execução técnica e os custos associados. É difícil encontrar um único marcador que tenha todas estas características, Tabela 1.

Tabela 1. Comparação das características dos marcadores moleculares de DNA mais importantes.

Característica	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
Quantidade DNA necessária (µg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
Qualidade do DNA	elevada	elevada	moderada	moderada	elevada
Baseada em PCR	não	sim	sim	sim	sim
Nº <i>loci</i> polimórficos analisados	1-3	1.5-5	20-100	1-3	1
Facilidade de execução	difícil	fácil	fácil	fácil	fácil
Possibilidade de automatização	pequena	moderada	moderada	grande	grande
Reprodutibilidade	elevada	não fiável	elevada	elevada	elevada
Custo desenvolvimento	baixo	baixo	médio	elevado	elevado
Custo por análise	elevado	baixo	médio	baixo	baixo

## IMPORTÂNCIA RELATIVA DOS MARCADORES

Em cada genoma, o número de marcadores morfológicos e isoenzimas é sempre limitado quando comparado com os marcadores baseados no DNA, que são ubíquos e numerosos. Outra grande vantagem reside no facto de os marcadores de DNA não terem efeito no fenótipo uma vez que são reflexos da variação natural presente na sequência de DNA. Os marcadores de DNA estão livres de efeitos pleiotrópicos, permitindo que um grande número de marcadores possa ser monitorizado numa única população. A análise de DNA pode ainda ser realizada em qualquer estágio do ciclo de vida e um organismo e a partir de praticamente todos os tecidos, incluindo material de herbário e tecidos mumificados. Os marcadores baseados em PCR necessitam de apenas alguns nanogramas para a análise.

Os marcadores morfológicos e bioquímicos, por seu lado, dependem da expressão de certos genes que por sua vez são controlados pelas condições ambientais, especificidade do tecido e estágio de desenvolvimento.

## PAM E BIOLOGIA MOLECULAR

A análise sistemática e filogenética das plantas aromáticas foi tradicionalmente baseada em características morfológicas, quer macroscópicas quer microscópicas. Uma vez que os metabolitos secundários são muitas vezes semelhantes entre membros de um mesmo agrupamento, a sua ocorrência ou ausência poderia ser tomada como indicação de uma descendência comum e como tal maior proximidade. O valor potencial da contribuição dos metabolitos secundários para a taxonomia foi reconhecida há cerca de 200 anos, no entanto apenas nos últimos 40 anos é que a quimiotaxonomia tem tido um impacto considerável na sistemática vegetal e novos sistemas de classificação foram desenvolvidos considerando a distribuição desses metabolitos (*in* Wink, 2003). Mais recentemente, a análise de sequências de DNA (cloroplastidial e nuclear) tem contribuído grandemente para a reconstrução da filogenia em várias espécies.

A utilização da análise genética conjuntamente com a análise de perfis dos metabolitos secundários permite examinar e discutir as semelhanças e diferenças na informação gerada pelos

duas abordagens. A este respeito, e como bem discutido em Adams *et al.* (2003), cada conjunto de dados obtido pelas diferentes abordagens constitui apenas uma “pequena janela” no grande genoma de um indivíduo.

As estimativas actuais sugerem que os genomas vegetais contenham entre 20000-30000 genes, dos quais apenas alguns são expressos (exões). Por exemplo, o projecto de mapeamento do genoma humano (Venter *et al.* 2001) revelou que apenas 1.1-1.4% do genoma humano é expresso. Em *Arabidopsis*, que tem um dos menores genomas conhecidos em plantas, foram referidos cerca de 25498 genes (The Arabidopsis Genome Project, 2000), e neste caso os exões representam cerca de 28,8% do DNA total.

As micromoléculas estão geralmente sob controlo genético simples. Irving e Adams (1973) usando uma aproximação biométrica estimaram o número de genes que controlam os monoterpénos em *Hedeoma sp.*. Eles referem cerca de 20 monoterpénóides controlados por um mínimo de 39 genes (1.95 genes/característica).

Quando se utiliza a morfologia ou a análise dos óleos essenciais (ou de outros produtos do metabolismo secundário) para fins taxonómicos ou simplesmente para definição de clusters, a “janela” de observação constitui apenas uma pequena quantidade de informação comparada com todo o genoma dos indivíduos estudados. Em *Juniperus sp.* a comparação da análise de diferentes genótipos utilizando ISSR, RAPDs, dados de sequências de ITS e análise de terpenóides voláteis revelou haver uma concordância muito maior entre os dados moleculares do que com os terpenóides (Adams *et al.* 2003), no entanto, e como referido pelos mesmos autores, os terpenóides são úteis ao nível da espécie e não no nível taxonómico em que foram utilizados no trabalho.

Em *Thymus vulgaris*, embora não tenha sido encontrada correlação entre as características anatómicas / morfológicas e a composição química, existe uma correlação entre a composição dos óleos essenciais e os dados genéticos, o que permite considerar a análise de RAPDs como bastante útil na selecção assistida por marcadores (Echeverrigaray *et al.* 2001). De facto, acredita-se que a variação na composição dos óleos essenciais tem uma forte base genética, como por exemplo em *Cunila galioides* (Echeverrigaray *et al.* 2003) e a utilização de RAPDs revelou a existência de agrupamento semelhante aos quimiotipos previamente obtidos (Fracaro *et al.* 2005).

Também em *Salvia fruticosa* os padrões gerados pelos perfis químicos parecem corresponder aos padrões genéticos gerados pelos RAPDs, sugerindo também neste caso a existência de uma base genética (Skoula *et al.* 1999). Ainda um outro exemplo surge em *Ocimum gratissimum*, em que os marcadores de RAPD identificados estão intimamente correlacionados com os produtos secundários analisados, permitindo a distinção entre os três quimiotipos (eugenol, geraniol e timol) nesta espécie (Vieira *et al.* 2001)

## BIBLIOGRAFIA

- Adams RP, AE Schwarzbach, RN Pandey (2003) The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochem. System. & Ecol.* 31: 375-387
- Condit R, SP Hubbell (1991) Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34 : 66-71
- Echeverrigaray S, G Agostini, L Atti-Serfini, N Paroul, GF Pauletti, AC Atti dos Santos (2001) Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4220-4223.
- Echeverrigaray S, F Fracaro, AC Atti dos Santos, N Paroul, R Wasum, L Atti-Serfini (2003) Essential oil composition of South Brazilian populations of *C. galioides* Benth and its relation with the geographic distribution. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 467-475
- Fracaro F, J Zacaria, S Echeverrigaray (2005) RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochem. System. Ecol.* 33: 409-417
- Irving RS, RP Adams (1973) Genetic and biosynthetic relationships of monoterpenes. In: *Terpenoids: Structure, biogenesis, and distribution. Recent Advances in Phytochemistry, Series 6*, VC Runeckles, TJ Mabry (Eds), pp. 187–214, Academic Press, New York
- Jones CJ, KJ Edwards, S Castaglione, MO Winfield, F Sala, C van de Wiel, G Bredemeijer, B Vosman, M

- Matthes, A Daly, R Brettschneider, P Bettini, M Buiatti, E Maestri, A Malcevschi, N Marmiroli, R Aert, G Volckaert, J Rueda, R Linacero, A Vazquez, A Karp (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390
- Kumar LS (1999) DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechn. Adv.* 17: 143-182
- The Arabidopsis Genome Project (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Saiki RK, S Scharf, FA Faloona, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich, N Arnheim (1985) Enzymatic amplification of f1-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Skoula M, I El Hilali, AM Makris (1999) Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem. System. Ecol.* 27: 559-568
- Venter JC *et al* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Vieira RF, RJ Grayer, A Paton, JE Simon (2001) Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem. System. Ecol.* 29: 287-304
- Vierstraete A (1999) <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* 64: 3-19
-

## ANEXO I

### Protocolo de extracção e isolamento de DNA

Foi feita uma modificação do protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1987), consistindo previamente na maceração das folhas mais jovens em almofariz com azoto líquido. A extracção foi realizada em tampão de extracção contendo CTAB (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide-brometo de cetil trietilamónio*), a quente.

No final o DNA foi resuspenso em Tampão TE (Tris-EDTA) e foi quantificada a sua concentração.

### Quantificação do DNA

O DNA pode ser quantificado directamente em gel de agarose (0.8%) por comparação com padrões de concentrações conhecidas de  $\lambda$  DNA (DNA do bacteriófago  $\lambda$ ). A corrida pode ser feita a 100v durante 1h. Pode também utilizar-se um espectrofotómetro e medir a absorvância a A260 e A280 fazendo uma diluição prévia do DNA purificado.

### Reacção de RAPDs

Para a optimização da reacção de RAPD, há vários factores que têm de ser optimizados:

- Perfil das temperaturas (no PCR)
- Tipo de polimerase utilizado
- Concentração de Mg
- DNA template
- *Primers*
- Outros aditivos (p. ex. BSA)

#### Exemplo de uma reacção de RAPDs:

Preparação de *master-mix*, sempre em gelo. Utilizam-se luvas.

COMPONENTES	STOCK	MIX $\mu$ L	X10
H <sub>2</sub> O		15,8	158
Tampão de reacção da enzima (R. Mix)	10x	2,5	25
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5	15
dNTPs	10 mM	0,5	5
BSA	10 mg/mL	2,5	25
<i>Primer</i>	25 $\mu$ M	1,0	10
Taq	5 U/ $\mu$ L	0,2	2

Pipetar 24  $\mu$ L de *master mix* para cada tubo de PCR e adicionar depois 1  $\mu$ L de DNA purificado (e diluído em Tampão TE a uma concentração final de 10  $\mu$ g/ $\mu$ L). Agitar bem, sem vortexar. Manter no gelo até transferir para o PCR.

### Preparação de um gel de agarose

Para separação dos fragmentos resultantes da amplificação em PCR, utiliza-se um gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1x. A agarose tem de ser previamente fervida em microondas para completa dissolução. Após arrefecer, adiciona-se 3  $\mu$ L brometo de etídio (para 100 mL de tampão) e verte-se em tabuleiro onde previamente se colocou um pente. Deixa-se solidificar durante 10-15 minutos, e retira-se o pente. O gel está pronto a ser carregado.

Atenção: O brometo de etídio é carcinogénico; é obrigatório a utilização de luvas.

**Carregamento do gel de agarose com produtos RAPDs**

Em cada poço do pente (que contém 15 ou 20 poços) vai-se carregar uma mistura de *loading buffer* e amostra, preparada antes sobre parafilme, da seguinte forma:

2  $\mu$ L LB + 12  $\mu$ L produtos de PCR (DNA amplificado)

O poço da esquerda e da direita do pente contém DNA marcador, 3  $\mu$ L de 1Kb DNA ladder.

Assegurar-se de que o gel fica imerso em tampão (TAE 1x) e que as amostras ficam mais próximo do pólo negativo. Ligar a fonte de alimentação. Fazer a corrida a 60v durante 3-3,5h. O DNA é uma molécula carregada negativamente, que vai migrar para o ânodo (pólo positivo). No final observar o gel sob luz UV, em transiluminado.

**Análise de dados**

Inicialmente faz-se uma análise das bandas observadas em gel de agarose. Apenas se consideram as bandas distintas, com tamanhos entre 350bp e 2,5Kb. A presença de uma banda específica de DNA amplificado foi marcada como 1, se presente ou como 0, se ausente, construindo-se matrizes binárias.

Podem utilizar-se 3 coeficientes de similaridade: "Simple Matching", SM, "Jaccard", J e "Dice", D, obtendo-se matrizes de similaridade com as quais se constroem dendrogramas.

---

## PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS: MÉTODOS DE ANÁLISE\*

M. G. Miguel

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro Portugal

### OXIDAÇÃO E ANTIOXIDANTES: CONCEITOS GERAIS

No dia a dia, fala-se cada vez mais em antioxidantes e na sua importância não só na alimentação e saúde, como nas indústrias alimentar, farmacêutica, dos plásticos, nos óleos de lubrificação e em muitas outras áreas. A aplicação dos antioxidantes é tão vasta que é difícil encontrar uma definição para o termo antioxidante.

Na tecnologia alimentar, um antioxidante é definido como uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de impedir ou retardar significativamente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis como, por exemplo, as gorduras (Becker *et al.*, 2004). Resumindo, um antioxidante é usado para inibir a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a rancidez dos alimentos. Contudo, não são apenas os lípidos as únicas macromoléculas que podem sofrer oxidação, outras moléculas ou substratos podem sofrer oxidação. Antioxidante pode, então, ser definido como sendo uma substância que, quando presente em concentrações pequenas comparativamente às do substrato oxidável, impede ou atrasa significativamente a oxidação do substrato. Esta definição é muito mais ampla porque inclui muitas macromoléculas vulneráveis à oxidação, como sejam os lípidos, os hidratos de carbono, as proteínas, o DNA, entre outras. A partir desta definição, em termos biológicos, qualquer molécula que seja capaz de retardar ou impedir a acção de agentes oxidantes pode ser considerada um antioxidante. Nestas condições, uma substância que seja capaz de inibir uma enzima oxidante específica, ou que reaja com agentes oxidantes antes que estes danifiquem outras moléculas, ou que forme complexos com iões metálicos perniciosos ou que seja mesmo capaz de reparar sistemas como as proteínas transportadoras de ferro, pode ser considerada um antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1999; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Não só é difícil definir o termo antioxidante, como também não existe um antioxidante universal. Por exemplo, o ascorbato é capaz de proteger os lípidos plasmáticos contra a peroxidação, provocada pelo fumo do tabaco, mas não é capaz de evitar os danos provocados nas proteínas. Por causa desta complexidade a definição de antioxidante tem de ser ampla (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Em conclusão, nenhuma das definições atrás referidas descreve o conceito de actividade antioxidante e não há nenhuma definição aceite internacionalmente para o termo antioxidante ou capacidade antioxidante (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Se há antioxidantes, então é porque há agentes oxidantes. O que é, então, um agente oxidante? Um agente oxidante é aquele que oxida outra substância química, isto é, que é capaz de lhe tirar electrões ou hidrogénio ou dar oxigénio. Ao contrário, um agente redutor é aquele que é capaz de reduzir outra substância química, isto é, que é capaz de lhe dar electrões, hidrogénio ou que é capaz de lhe remover oxigénio. Um antioxidante pode, então, ser definido também em termos mecanísticos. Nestas condições, um antioxidante é aquele que é capaz de dar hidrogénio ou electrões (Halliwell e Gutteridge, 1999; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Em termos termodinâmicos, a acção antioxidante depende do potencial de redução padrão. Este parâmetro determina a possibilidade que um determinado composto tem para poder reduzir quimicamente um outro composto. A Tabela 1 representa os valores de potenciais de redução padrão de algumas espécies biologicamente relevantes.

Um sistema com um potencial de redução padrão  $E^{\circ}$  é capaz de reduzir um sistema com um potencial de redução padrão  $E^{\circ}$  menos negativo, com um potencial de redução padrão de zero ou positivo.

---

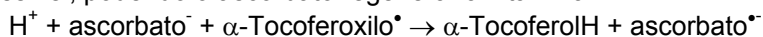
\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 106-136, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

Tabela 1. Potenciais de redução de algumas espécies reactivas oxigenadas (ERO), a pH = 7.

ERO <sup>a</sup>	Par redox	E°/mV
Radical hidroxilo	•OH, H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O	+2310
Radical alcoxilo alifático	•OR, H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O	+1600
Radical peróxido alquílico	•OOR, H <sup>+</sup> /ROOH	+1000
Radical glutationilo	GS <sup>•</sup> /GS <sup>-</sup>	+920
Ácido gordo poli-insaturado	PUFA <sup>•</sup> , H <sup>+</sup> /PUFA-H	+600
Vitamina E	•OT, H <sup>+</sup> /TOH	+480
Vitamina C (Asc)	Asc <sup>••</sup> , H <sup>+</sup> /Asc	+282
Complexo ferro	Fe <sup>3+</sup> EDTA/Fe <sup>2+</sup> EDTA	+120
Superóxido	O <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	-330
Glutathione oxidado	RSSR/RSSR <sup>•-</sup>	-1500
Radiação ionizante	H <sub>2</sub> O/e <sup>-</sup> <sub>aq</sub>	-2870

<sup>a</sup> As espécies reactivas oxigenadas estão listadas de modo que o potencial oxidante mais forte está no topo da tabela e o potencial redutor mais forte está em baixo. As espécies reactivas oxigenadas que estão no topo da tabela podem remover electrões de espécies reduzidas que se encontram no fundo da tabela. O balanço destas espécies na célula é muito importante na manutenção das boas condições celulares e, portanto, da saúde (Temple *et al.*, 2005).

Da Tabela 1 é possível, então, dizer que o sistema radical ascorbato/ascorbilo é capaz de reduzir o sistema radical tocoferoxilo/ $\alpha$ -tocoferol, por aquele possuir um potencial de redução menos positivo. Assim, a reacção do ascorbato (forma iónica a pH = 7,4) é termodinamicamente possível, podendo o ascorbato regenerar a vitamina E:



A acção oxidante depende também das constantes de velocidade. Por exemplo, o radical hidroxilo é um oxidante muito forte não só por causa do potencial de redução muito elevado (+2310 mV), como também pelas constantes de velocidade relativamente elevadas (Gardès-Albert e Jore, 2005). A Tabela 2 representa alguns valores de constantes de velocidade dos radicais hidroxilo com vários substratos biológicos.

Tabela 2. Constantes de velocidade dos radicais hidroxilo com vários substratos biológicos (Gardès-Albert e Jore, 2005).

Substrato biológico	Constante de velocidade k (HO <sup>•</sup> + substrato) mol <sup>-1</sup> .L.s <sup>-1</sup>
Guanina	9,2 x 10 <sup>9</sup>
Citosina	4,9 x 10 <sup>9</sup>
DNA	4,0 x 10 <sup>8</sup>
Triptofano (pH = 6,9)	1,4 x 10 <sup>10</sup>
Tirosina (pH = 7,8)	1,0 x 10 <sup>10</sup>
Cisteína (pH = 5,5)	4,0 x 10 <sup>10</sup>
Albumina	2,3 x 10 <sup>10</sup>
Hemoglobina	3,6 x 10 <sup>10</sup>
Linoleato	1,1 x 10 <sup>10</sup>
Ribose	1,6 x 10 <sup>9</sup>
Glucose	7,4 x 10 <sup>8</sup>
Ascorbato	1,1 x 10 <sup>10</sup>

O radical hidroxilo é capaz de reagir com as bases do DNA, com os aminoácidos constituintes das proteínas e ainda com os ácidos gordos poli-insaturados lipídicos.

A ordem de grandeza das constantes de velocidade (10<sup>10</sup> mol<sup>-1</sup>.L.s<sup>-1</sup>) é característica de reacções limitadas apenas pelo movimento das moléculas. Esta ordem de grandeza verificada para o radical hidroxilo com muitos substratos revela que há reacção logo que ocorra uma colisão entre as duas entidades, isto é, com uma energia de activação praticamente nula. Os radicais hidroxilo são de uma extrema reactividade, com uma difusão muito pequena, o que significa que reagem praticamente no local onde são produzidos ou apenas a algumas dezenas de nanómetros

de distância. Os radicais hidroxilo têm ainda uma meia-vida muito curta, não ultrapassando alguns microssegundos ( $10^{-6}$  s) (Gardès-Albert e Jore, 2005).

O radical hidroxilo combina-se rapidamente com qualquer molécula que se encontre próxima, contudo, como as reacções radicalares são em cadeia, os danos podem ir até locais relativamente longínquos comparativamente ao sítio de formação dos radicais hidroxilo (Deshpande *et al.*, 1995).

### ESPÉCIES REACTIVAS OXIGENADAS

O oxigénio pode actuar como um agente oxidante apesar da sua baixa reactividade devido aos *spin* paralelos dos electrões nas duas orbitais de valência  $\pi^*$  2p antiligantes (Fig. 1).

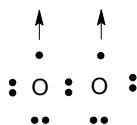


Fig. 1. Oxigénio no estado fundamental

Esta situação restringe a aceitação de electrões, ao mesmo tempo, de moléculas que vão ser oxidadas e que contêm pares de electrões de *spin* opostos. Isto vai de encontro ao princípio de Pauli que postula o seguinte: apenas os electrões com *spin* opostos (números quânticos diferentes) podem formar um par de electrões (Fig. 2).

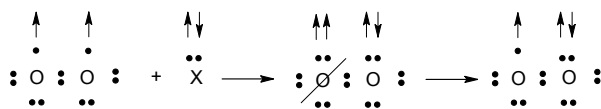


Fig. 2. Reacção do oxigénio com uma molécula X. O oxigénio no estado fundamental reage com uma molécula (X) que vai ser oxidada para originar o radical superóxido

Os produtos altamente reactivos resultantes da redução do oxigénio são conhecidos como espécies reactivas oxigenadas. Estas espécies incluem radicais livres: superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ), carbonato ( $CO_3^{\bullet -}$ ), peróxido ( $RO_2^{\bullet}$ ), alcóxido ( $RO^{\bullet}$ ), radical dióxido de carbono ( $CO_2^{\bullet -}$ ) e o oxigénio singlete ( $^1\Sigma_g^+O_2$ ) e moléculas não radicalares de reactividade elevada: peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), ácido hipobromoso ( $HOBr$ ), ozono ( $O_3$ ),  $^1O_2$  singlete ( $^1\Delta_gO_2$ ), peróxidos orgânicos ( $ROOH$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), peroxinitrato ( $O_2NOO^-$ ), ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), peroxomonocarbonato ( $HOOCO_2^-$ ), nitrosoperoxocarbonato ( $ONOOCO_2^-$ ), entre outros. O peroxinitrito, o peroxinitrato e o ácido peroxinitroso apesar de terem sido considerados espécies reactivas oxigenadas são também classificados como espécies reactivas azotadas. No presente texto, serão considerados como espécies reactivas azotadas. Os ácidos hipocloroso e hipobromoso podem também ser classificados como espécies reactivas cloradas e brominadas, respectivamente (Halliwell, 2006).

A reactividade elevada daquelas espécies baseia-se na especificidade das suas configurações electrónicas. Deste modo, os radicais livres, contendo electrões desemparelhados nas orbitais de valência, facilmente formam pares com outros electrões de *spin* opostos (Fig. 3).

Na espécie reactiva oxigenada não radicalar  $^1O_2$  (oxigénio singlete), os electrões  $\pi^*$  (antiligantes) têm *spin* antiparalelos, tendo sido obtida a partir do  $O_2$  no estado fundamental após absorção de energia (Fig. 4).

Do exposto, na molécula de  $^1O_2$  não há restrições de *spin*, sendo a sua capacidade oxidante considerável (Edreva, 2005), como se verifica na Fig.5.

As espécies são facilmente interconvertíveis. Os metais de transição (Fe, Cu, Mn...) que têm electrões desemparelhados nas orbitais de valência aceitam e dão electrões simples, promovendo, assim, a transferência de um electrão para o  $O_2$  e a interconversão das espécies reactivas oxigenadas. A reacção de Fenton, um componente do ciclo de Haber-Weiss, consiste na conversão do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a  $HO^{\bullet}$  promovida pelo  $Fe^{2+}$  (Fig.6). Na reacção de

Fenton, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  sofre uma cisão heterolítica. Ao aceitar um electrão do  $\text{Fe}^{2+}$  parte do peróxido de hidrogénio é reduzida ao radical livre hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), sendo o  $\text{Fe}^{2+}$  oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$ . A outra parte do peróxido de hidrogénio é o anião hidroxilo  $\text{HO}^-$ . No passo seguinte  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por aceitar um electrão do radical livre superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e este é oxidado a  $\text{O}_2$ .

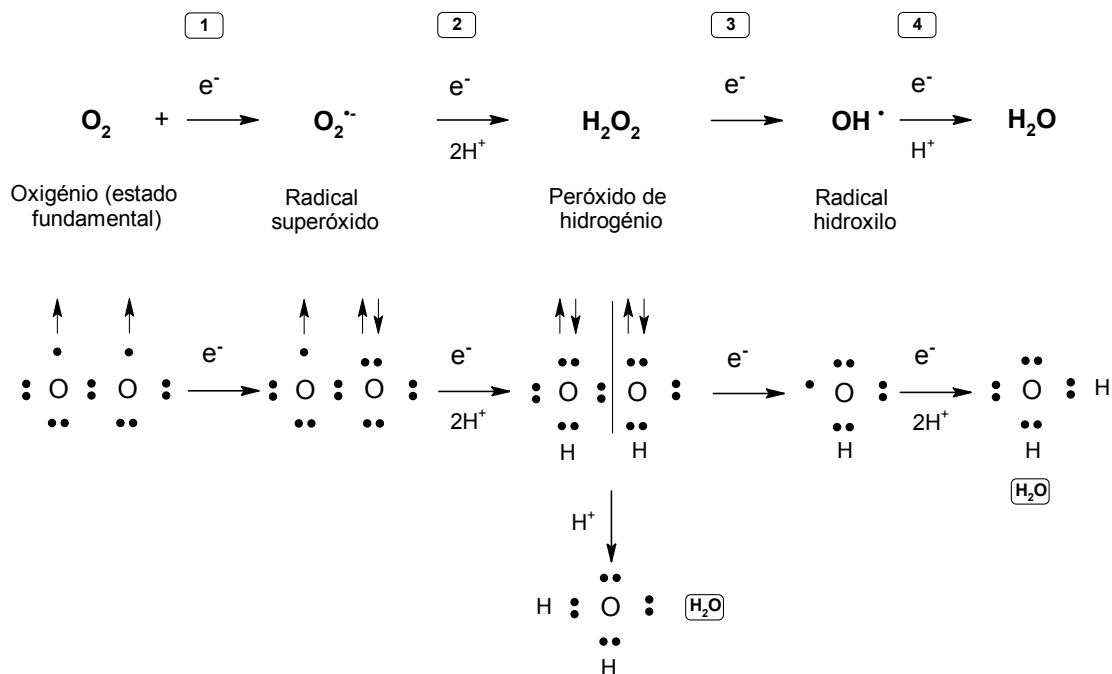


Fig. 3. Redução do oxigénio. A redução do oxigénio ( $\text{O}_2$ ) que ocorre em 4 passos consecutivos origina espécies reactivas oxigenadas e duas moléculas de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). No primeiro passo, forma-se o superóxido por aceitação de um electrão. Este passo é endotérmico e, portanto, é um passo limitante. Os passos seguintes são exotérmicos e, conseqüentemente, espontâneos. A protonação do superóxido origina o radical hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^\bullet$ ). No segundo passo, o superóxido é reduzido ao aceitar um electrão e protonado por  $2 \text{H}^+$ , resultando daqui a formação de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). No terceiro passo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  sofre uma cisão heterolítica em que um átomo de oxigénio recebe os dois electrões da ligação covalente quebrada. Esta metade é protonada formando-se água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). A outra metade recebe um electrão e é transformada em radical livre hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ). No quarto passo, o radical hidroxilo  $\text{HO}^\bullet$  recebe um electrão e, após protonação, origina uma molécula de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Edreva, 2005).

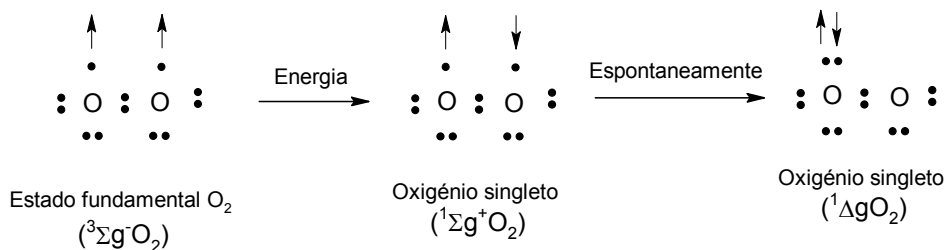


Fig. 4. Formação do oxigénio singlete.

O radical livre superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reduz o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  produzindo  $\text{O}_2$  ou sofre uma conversão em  $\text{H}_2\text{O}_2$  quer de uma forma espontânea ou por catálise enzimática. Este processo designa-se por dismutação.

A produção de radicais hidroxilo na reacção de Fenton é responsável por danos importantes nos sistemas biológicos porque este radical é um dos mais reactivos, atacando e danificando quase todas as moléculas dos seres vivos. A grande reactividade do radical hidroxilo parece dever-se à sua meia-vida muito curta nos sistemas biológicos, combinando-se rapidamente com

qualquer molécula que se encontre próxima, contudo, como as reacções radiculares são em cadeia, os danos podem ir até locais relativamente longínquos comparativamente ao sítio de formação dos radicais hidroxilo (Deshpande *et al.*, 1995). A Fig. 7 representa de uma forma sucinta as principais fontes das espécies reactivas oxigenadas.

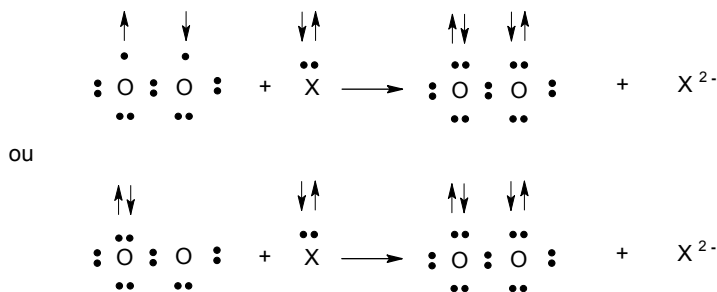


Fig. 5. Reactividade do oxigénio singleto.

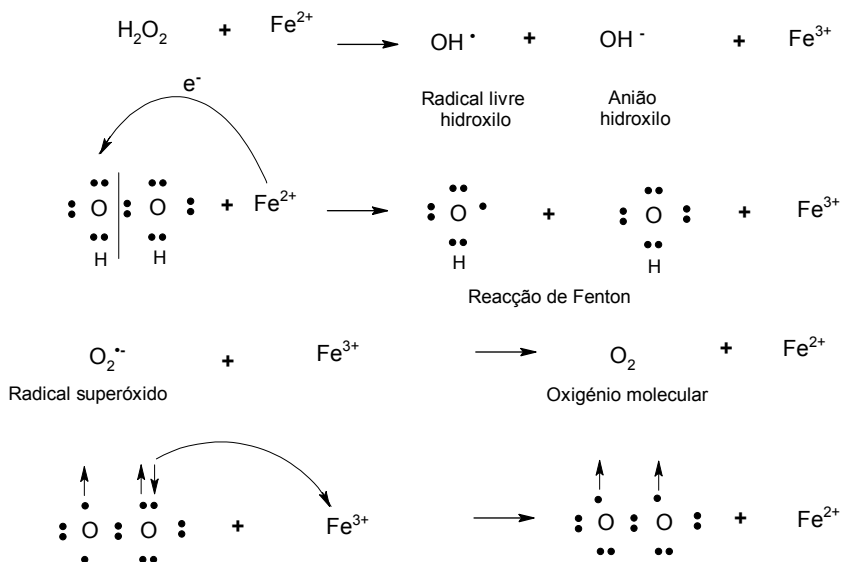
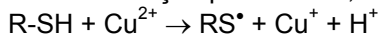


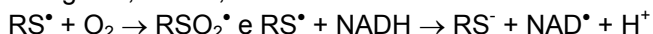
Fig. 6. Reacção de Fenton.

**OUTROS RADICAIS LIVRES**

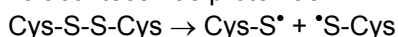
Para além das espécies reactivas oxigenadas radiculares, altamente oxidantes, existem outros radicais livres onde os electrões desemparelhados estão centrados noutros átomos, para além do oxigénio. Existem radicais livres em que o electrão desemparelhado está centrado em átomos como o enxofre, carbono ou azoto. Os compostos tiol (R-SH) oxidam na presença de iões de metais de transição para formar, entre outros produtos, radicais tiilo (RS<sup>•</sup>):



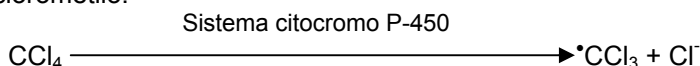
Estes radicais com enxofre são consideravelmente reactivos e podem facilmente combinar-se com oxigénio, NADH, ácido ascórbico:



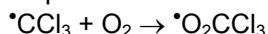
Os radicais tiilo podem também ser formados por cisão homolítica das ligações dissulfureto como acontece nas proteínas:



Os radicais livres, em que o electrão desemparelhado está no átomo de carbono, são formados em muitos sistemas biológicos durante a metabolização de alguns xenobióticos, como por exemplo, o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) pelos microsomas hepáticos, originando o radical triclorometilo:



O radical triclorometilo muitas vezes reage rapidamente com oxigénio originando os correspondentes radicais peróxido:



Os radicais livres centrados no átomo de azoto, como, por exemplo, o radical fenildiazina ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}\cdot$ ), é formado durante a oxidação da fenilhidrazina nos eritrócitos (Deshpande *et al.*, 1995).

As células também são capazes de produzir espécies azotadas reactivas a partir da reacção do radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para formar peroxinitrilo ( $\text{ONOO}\cdot$ ) e o radical dióxido de azoto ( $\text{NO}_2\cdot$ ), que é capaz de nitrar aminoácidos aromáticos, provocar lesões no DNA e oxidar tióis (Temple *et al.* 2005).

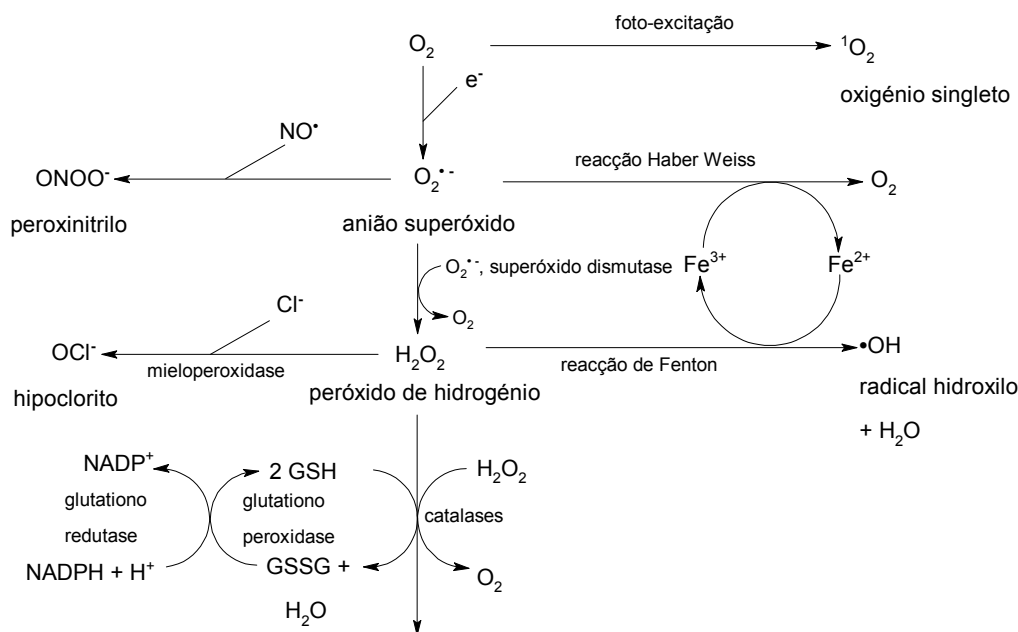


Fig. 7. Espécies reactivas oxigenadas formadas nas células. A mieloperoxidase é produzida pelos neutrófilos como um sistema de defesa celular contra os microrganismos (Temple *et al.*, 2005).

### ORIGEM E EFEITOS BIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES

As espécies reactivas oxigenadas produzidas pelas células eram tradicionalmente considerados produtos tóxicos do metabolismo, podendo alterar os constituintes lipídicos, proteicos ou o DNA das células. Para se protegerem dos efeitos perniciosos eventualmente provocados pelas espécies reactivas oxigenadas, as células possuem várias enzimas antioxidantes:

- superóxido dismutase (SOD), que reduz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$
- catalase e glutatióno peroxidase, que reduz  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ .

Para além destes sistemas enzimáticos existem outras moléculas não enzimáticas antioxidantes: vitaminas C, A e E, carotenóides, lipoato, tióis como o glutatióno (GSH), ubiquinona, tioredoxina (Trx), glutarredoxina, bilirrubina, hormonas sexuais (estrogénios), ácido úrico, melaninas e melatonina (Beaudeux e Vasson, 2005; Thérond e Bonnefont-Rousselot, 2005).

A alimentação tem um papel primordial para prevenir a produção de radicais livres. A prevenção nutricional do stress oxidante e das suas consequências implica a optimização dos aportes em antioxidantes na alimentação. Os benefícios de uma alimentação rica em frutos e legumes são reconhecidos e atribuídos ao teor relativamente elevado em antioxidantes (Prior, 2003). Deste modo, uma alimentação rica em antioxidantes, em micronutrientes (vitaminas C, E, carotenóides, selénio, zinco) e outros microconstituintes (fenóis, flavonóides, sulfuretos de alho,

entre outros) diminui o aparecimento de cancro, de doenças cardiovasculares e de doenças degenerativas (Hu, 2003; Riboli e Norat, 2003; Roussel *et al.*, 2005).

O stress oxidativo intracelular surge por haver um desequilíbrio no balanço entre a produção das espécies reactivas oxigenadas e a capacidade antioxidante da célula para impedir as lesões oxidativas. Uma produção excessiva de espécies reactivas oxigenadas e/ou uma deficiência nos sistemas protectores antioxidantes são responsáveis pelos mecanismos fisiopatológicos de várias doenças (arterosclerose, doenças neurodegenerativas...) (Beaudeau e Vasson, 2005).

A produção das espécies reactivas oxigenadas nas células dos mamíferos é, sobretudo, de origem enzimática que estão presentes em diversos locais da célula: NAD(P)H oxidase membranar, complexo enzimático mitocondrial da cadeia respiratória, xantina oxidase, enzimas da via do ácido araquidónico (lipoxigenases, cicloxigenases), enzimas do retículo endoplasmático (citocromo P<sub>450</sub>), mieloperoxidase dos lisossomas, glicolato oxidase, urato oxidase, hidroxiácido oxidase, entre outras enzimas presentes nos peroxissomas e citocromo oxidases presentes no núcleo (Beaudeau e Vasson, 2005). Existem outros componentes biológicos capazes de produzir espécies reactivas oxigenadas como, por exemplo, o superóxido: as catecolaminas e o ácido ascórbico na presença de metais de transição em quantidades vestigiais, a hemoglobina, a mioglobina, as flavinas (FADH<sub>2</sub>, FMNH<sub>2</sub>), os tióis, as semiquinonas, o Fe<sup>2+</sup> e o Cu<sup>2+</sup> (Schröder e Krutmann, 2005).

A produção de espécies reactivas oxigenadas não tem só uma origem metabólica. As radiações UV, IV, a radiação ionizante, a poluição atmosférica, a nutrição, entre outros factores são igualmente responsáveis pelo stress oxidativo (Nohl *et al.*, 2005).

As espécies reactivas oxigenadas para além de serem produtos potencialmente tóxicos do metabolismo são igualmente moléculas essenciais à regulação celular. O receptor da insulina é um exemplo de receptor activado pelas espécies reactivas oxigenadas. A actividade deste receptor requer a sua fosforilação, que pode ser assegurada, na ausência da insulina, por concentrações relativamente elevadas de espécies reactivas oxigenadas (>0,1 mM). Concentrações mais baixas (<0,1 mM) não são suficientes para desencadear uma fosforilação do receptor na ausência da insulina, mas amplificam a resposta da célula a uma concentração baixa da insulina (100 nM). Estes dados parecem mostrar que o sinal redox celular pode assegurar uma função de co-regulador da activação do receptor da insulina em condições fisiológicas (Beaudeau e Vasson, 2005).

Os radicais livres têm uma reactividade com uma meia-vida muito curta e um raio de acção também muito baixo. No entanto, quando estas moléculas reagem com compostos não radiculares, formam-se radicais novos que, por sua vez, também reagem. Daqui resulta uma reacção em cadeia provocando efeitos biológicos longe do local onde se iniciou a primeira reacção. Um exemplo, é a peroxidação lipídica em que os radicais secundários e os produtos de degradação podem provocar efeitos nocivos muito longe do local inicial de produção do radical livre. Os compostos carbonilo de baixo peso molecular (formaldeído, acetaldeído, acroleína, malonaldeído, glioxal e metilo de glioxal) são compostos resultantes da peroxidação lipídica e que são bastante reactivos capazes de formar aductos rapidamente com biomoléculas (proteínas, fosfolípidos e DNA) (Shibamoto, 2006).

A peroxidação lipídica está associada a várias doenças: cancro, mutagénese, doença de Alzheimer, artrite, inflamação, diabetes, arterosclerose, SIDA, entre outras. O próprio processo de envelhecimento parece dever-se, em parte, também à peroxidação lipídica (Shibamoto, 2006).

Os diferentes modos dos radicais livres provocarem danos celulares incluem:

- ligação covalente dos radicais livres a enzimas membranares e/ou receptores, modificando assim as actividades dos componentes das membranas;
- ligação covalente dos radicais livres aos componentes da membrana provocando alterações da estrutura celular e afectando a função da membrana;
- distúrbio dos processos de transporte através da ligação covalente, oxidação dos grupos tiol ou alteração da relação ácidos gordos poli-insaturados/proteína;
- iniciação da peroxidação lipídica dos ácidos gordos poli-insaturados com efeitos directos na estrutura membranar alterando a sua permeabilidade, modificando as interacções lípido-proteína e formação de produtos de degradação bioactivos que podem igualmente

interferir na fluidez, estrutura e na função da membrana (Deshpande *et al.*, 1995; Boonstra e Post, 2004).

Todos os componentes celulares como sejam os lípidos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os hidratos de carbono podem ser danificados por terem reagido com espécies reactivas oxigenadas, originando danos metabólicos e celulares (Zwart *et al.* 1999; Boonstra e Post, 2004). As reacções dos radicais livres com as várias macromoléculas podem provocar diversos danos (Fig. 8).

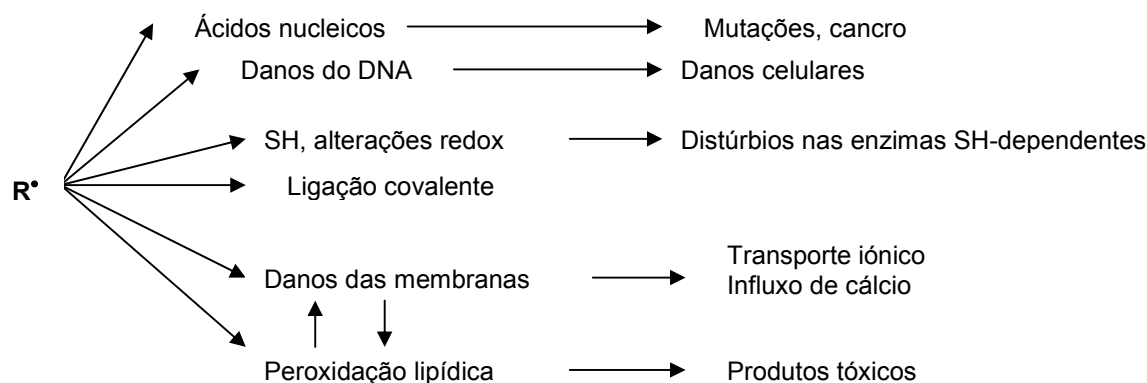


Fig. 8. Radicais livres e danos celulares (adaptado de Deshpande *et al.*, 1995).

#### DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

São diversos os métodos analíticos e os substratos utilizados para a determinação da actividade antioxidante de uma amostra. Por vezes, os valores obtidos por diferentes métodos não são comparáveis e tal pode dever-se a vários factores: a) estrutura física do sistema, b) natureza do substrato para a oxidação, c) presença de componentes que interactivam, d) modo de indução da oxidação, e) método analítico para medir a oxidação (Frankel e Meyer, 2000; Becker *et al.*, 2004).

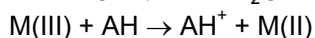
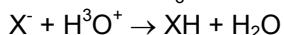
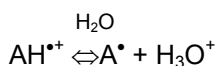
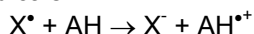
Para os alimentos, alguns autores propõem um esquema que inclui três passos principais na avaliação antioxidante das amostras: quantificação e identificação dos compostos fenólicos nos produtos alimentares ou nos de dieta, quantificação da capacidade de captar radicais dos diferentes antioxidantes usando mais do que um método e considerando o efeito do solvente no mecanismo do antioxidante, e avaliação da capacidade do antioxidante para inibir ou parar a oxidação lipídica em sistemas modelo adequados (Becker *et al.*, 2004).

Os antioxidantes podem desactivar os radicais por dois mecanismos principais: Por transferência de átomos de hidrogénio e/ou por transferência de um electrão. Ambos os mecanismos podem ocorrer em simultâneo e o mecanismo dominante é determinado pela estrutura do antioxidante e pelas suas propriedades, solubilidade e coeficiente de partilha e pelo sistema de solventes. A energia de dissociação da ligação e o potencial de ionização são dois factores que determinam o mecanismo e a eficácia dos antioxidantes (Wright *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2005).

No método que se baseia na transferência de átomos de hidrogénio, o antioxidante captura o radical, dando-lhe um átomo de hidrogénio:  $X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$ . A reactividade relativa deste mecanismo é determinada pela energia de dissociação da ligação do hidrogénio do antioxidante, dominando para compostos com um intervalo de energia de dissociação de  $\approx -10$  kcal/mol e um potencial de ionização inferior a  $-36$  kcal/mol. Este mecanismo é independente do pH e do solvente, sendo geralmente um processo rápido, e completo em poucos segundos ou minutos. A presença de agentes redutores, incluindo metais, é um problema para este método porque pode originar uma reactividade aparentemente elevada e que está errada (Prior *et al.*, 2005).

No método que se baseia na transferência de um electrão verifica-se que há capacidade para transferir um electrão para reduzir qualquer composto, incluindo metais, grupos carbonilo e

radicais:



Neste método, depois da transferência do electrão com a consequente formação de um catião radical  $AH^{\bullet+}$ , há rapidamente uma desprotonação reversível. Em praticamente todas as amostras ocorrem os dois mecanismos: o que se baseia na transferência de um hidrogénio e o que se baseia na transferência de um electrão, sendo o balanço determinado pela estrutura do antioxidante e pelo pH. A reactividade relativa do método em que se verifica uma transferência de electrão baseia-se na desprotonação e no potencial de ionização do grupo funcional reactivo (Lemańska *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001; Prior *et al.*, 2005). Os métodos em que há transferência de electrão dependem do pH do sistema. Geralmente, verifica-se uma diminuição do potencial de ionização quando há um aumento dos valores de pH, o que reflecte uma maior capacidade de transferência de electrões com a desprotonação. O mecanismo antioxidante é predominantemente do tipo de transferência de electrão se os valores do potencial de ionização são superiores a -45 kcal/mol.

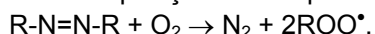
As reacções que se baseiam na transferência de electrões são geralmente lentas e os cálculos não são baseados em termos cinéticos. Quando  $AH^{\bullet+}$  tem uma vida relativamente elevada, podem ocorrer as reacções secundárias que interfere com o ensaio, podendo levar mesmo a toxicidade ou mutagenicidade *in vivo* (Sartor *et al.*, 1999).

### Métodos que se baseiam na transferência de um hidrogénio

Existem diversos métodos que se baseiam na transferência de hidrogénio, mas apenas irão ser referidos dois no presente trabalho: método “oxygen radical absorbance capacity” (ORAC) e o método “total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP). Em ambos os casos, há um gerador de radicais que, por acção do calor se decompõe originando um fluxo constante de radicais peroxilo. Estes actuam sobre um substrato. O antioxidante adicionado ao sistema vai competir com o substrato para os radicais e inibir ou retardar a oxidação do substrato. Nos métodos referidos no presente trabalho há quatro aspectos comuns: a) a presença do gerador de radicais, geralmente AAPH; b) um substrato para monitorizar (UV ou fluorescência) o progresso da reacção; c) a presença do antioxidante; d) recolha dos parâmetros cinéticos reaccionais para quantificação da actividade antioxidante. A quantificação da actividade antioxidante, nos dois casos, é diferente: o método ORAC utiliza a área abaixo da curva cinética (AUC), ao passo que o método TRAP utiliza o tempo *lag* (Huang *et al.*, 2005).

#### “Oxygen radical absorbance capacity” (ORAC)

Neste ensaio mede-se a capacidade antioxidante ou a capacidade de absorvância dos radicais peroxilo presentes nas amostras. O radical peroxilo reage com um composto fluorescente para formar um produto não fluorescente, que é passível de ser quantificado por fluorescência. Neste método há uma fonte controlável que produz os radicais peroxilo, geralmente, a termod decomposição do composto  $\alpha, \alpha'$ -azodiisobutiramidina, 2HCl (AAPH):



Uma substância fluorescente, como a B-ficoeritrina (B-PE), fluoresceína ou diclorofluoresceína oxidam na presença dos radicais peroxilo, formando-se compostos não fluorescentes. Os produtos de oxidação da fluoresceína induzidos pelos radicais peroxilo podem ser identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). Outra forma mais simples de quantificar a actividade antioxidante consiste na utilização de um espectrofluorímetro, medindo a diminuição da fluorescência nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 528 nm, respectivamente:

$ROO^{\bullet} + \text{substância fluorescente (fluoresceína)} \rightarrow ROOH + \text{fluoresceína oxidada (sem fluorescência)}$ .

A reacção é seguida durante intervalos de tempo regulares (1 minuto) até 30 minutos ou mais de reacção. A presença de um antioxidante impede a perda de fluorescência da fluoresceína, uma vez que esta não é oxidada pelos radicais peróxilo.

Este método inicialmente não podia ser usado com antioxidantes lipofílicos, que são particularmente importantes no impedimento da peroxidação lipídica. Deste modo, o método ORAC teve de ser adaptado de modo a poder ser usado quer por antioxidantes hidrofílicos, quer lipofílicos. Para tal, utilizam-se soluções de 50 % acetona/50 % água (v/v), contendo 7 % de  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas, para solubilizar os antioxidantes. A utilização das ciclodextrinas permite aumentar a solubilidade dos antioxidantes lipofílicos (vitamina E ou antioxidantes fenólicos lipofílicos) em soluções aquosas (Huang *et al.*, 2002). Outros autores referem a utilização de outros geradores de radicais peróxilo: BO-DIPY 665/676 [4,4-difluoro-3,5-bis(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno] ou AMVN [2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo)]. As reacções podem ocorrer em sistemas com lipossomas, ou em sistemas constituídos por misturas de octano e butironitrilo. Com estes compostos foi possível determinar a capacidade antioxidante de alguns carotenóides (Naguib, 2000), apesar de ser cerca de 100 vezes menos sensível comparativamente aos restantes geradores de radicais peróxilo (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

O método em si, consiste em adicionar às amostras, aos controlos e aos padrões (Trolox em diferentes concentrações) uma solução de fluoresceína e por a incubar, durante um intervalo de tempo determinado, a 37 °C, e adicionar o gerador de radicais peróxilo (AAPH). A intensidade da fluorescência é seguida durante 30 minutos ou mais a 37 °C e a pH = 7,4. À medida que a reacção progride, a fluoresceína é consumida e a intensidade da fluorescência do substrato vai diminuindo. Na presença do antioxidante, a fluorescência não ocorre ou, então, acontece mas de uma forma mais lenta. Com estes dados constrói-se, no final, uma curva da intensidade da fluorescência em função do tempo. A actividade antioxidante pode ser calculada do seguinte modo:

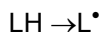
- Cálculo das áreas sob as curvas atrás obtidas (AUC) do branco e da amostra para calcular AUC real ( $AUC_{amostra} - AUC_{branco}$ );
- Gráfico padrão de AUC em função da concentração do Trolox (linear ou quadrática entre 0,78 e 12,6  $\mu$ M Trolox)
- Cálculo dos equivalentes Trolox da amostra usando a curva padrão referida em b).

Trolox é um composto hidrossolúvel análogo da vitamina E.

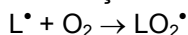
#### “Total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP)

“Total radical-trapping antioxidant parameter” (TRAP) foi inicialmente usado para avaliar a capacidade antioxidante do plasma. O método é baseado nas propriedades de compostos azo-, como o ABAP de, ao decomporem-se, produzirem um fluxo de radicais peróxilo, a uma temperatura determinada. Estes radicais peróxilo têm energia suficiente para retirar um hidrogénio a um substrato lipídico, iniciando-se, assim, a peroxidação lipídica:

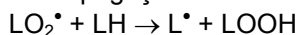
- Iniciação (formação do radical livre)



- Reacção do radical com o oxigénio



- Propagação



O consumo do oxigénio dissolvido é o marcador da taxa da peroxidação lipídica e, portanto, uma medição indirecta da capacidade do plasma para inibir a reacção. A fase *lag* induzida pelo plasma no consumo de oxigénio é comparada com a fase *lag* induzida por uma quantidade conhecida de Trolox (análogo hidrossolúvel do  $\alpha$ -tocoferol). Neste ensaio, o TRAP é expresso em micromoles de radicais peróxilo capturados por um litro de plasma (Ghiselli *et al.*, 2000).

Em vez do plasma, pode utilizar-se um substrato externo: R-PE, uma proteína extraída de *Corallina officinalis* (Ghiselli *et al.*, 2000).

Neste método utiliza-se como geradores de radicais peróxilo os compostos AAPH ou ABAP (2,2'-diazobis-(2-amidinopropano). Como composto passível de sofrer oxidação utiliza-se o R-PE

e que é monitorizado fluorimetricamente ( $\lambda_{exc.} = 495 \text{ nm}$  e  $\lambda_{emissão} = 575 \text{ nm}$ ), ou o ABTS [ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)] que é monitorizado lendo a variação da absorvância (Bartosz *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 2005). Outro substrato que pode ser utilizado é o AMVN, útil para geradores de radicais peróxido lipossolúveis. Também pode ser o diacetato de diclorofluoresceína, que na presença de AAPH, é oxidado e hidrolisado para produzir diclorofluoresceína, que é fluorescente. Se há um aumento da fluorescência significa que está a ocorrer oxidação (Huang *et al.*, 2005).

A capacidade antioxidante de uma amostra é expressa em equivalentes Trolox (micromoles de radicais peróxido capturados por litro de solução), através da seguinte equação:

$$C_{\text{Trolox}}/T_{\text{Trolox}} = X/T_{\text{amostra}}$$

Esta equação é obtida a partir de um gráfico que representa a diminuição da fluorescência, por exemplo, do R-PE, em função do tempo, na presença da amostra e, posteriormente, do Trolox. Assim,  $C_{\text{Trolox}}$  é a concentração do Trolox;  $T_{\text{Trolox}}$  é a fase *lag* induzida pelo Trolox e  $T_{\text{amostra}}$  é a fase *lag* induzida pela amostra. Os antioxidantes reagem com os radicais peróxido 100 vezes mais rapidamente quando comparado com o R-PE. No final da fase *lag*, quando todo o antioxidante tenha sido completamente usado, R-PE começa a ser oxidado que se detecta pela perda das suas propriedades fluorescentes de uma forma linear. Quando a fluorescência do R-PE é cerca de metade do valor inicial adiciona-se o Trolox e segue-se a reacção até que a diminuição da fluorescência volte a ser linear. A fase *lag* é calculada extrapolando o declive da oxidação máxima do R-PE antes e depois da adição do Trolox, até à intersecção dos declives das fases de indução da amostra e do Trolox. X é a capacidade antioxidante da amostra. X é depois multiplicado por 2 (factor estequiométrico do Trolox: este reage com duas moléculas de peróxido) e pelo factor de diluição da amostra para dar o valor TRAP em  $\mu\text{mol/l}$ . (Ghiselli *et al.*, 1995).

Este método foi introduzido para medir o estádio antioxidante total do plasma humano. Vários autores têm utilizado este método para analisar a influência do consumo do chá, do vinho tinto e do tomate na actividade antioxidante do plasma humano, seguindo a cinética de oxidação através da diminuição da fluorescência do R-PE num determinado intervalo de tempo (90 minutos) (Serafini *et al.*, 1996, 1998; Pellegrini *et al.*, 1999). Este método também tem sido utilizado para a avaliação *in vitro* da actividade antioxidante de bebidas e alimentos (Serafini *et al.*, 1997; Ghiselli *et al.*, 1998; Pietta *et al.*, 1998).

### Métodos que se baseiam na transferência de um electrão

Os métodos que se baseiam neste princípio são os mais populares. Nestes métodos há um oxidante (substrato) que retira um electrão do antioxidante, provocando uma alteração da cor do substrato. A tonalidade da solução é proporcional à capacidade antioxidante. A variação da absorvância em função da concentração do antioxidante, origina uma recta, cujo declive reflecte a capacidade redutora (expressa como equivalentes Trolox ou equivalentes de ácido gálico).

Neste grupo destacam-se os seguintes métodos: quantificação dos fenóis totais, o método TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), o método FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), o método DMPD (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine), o método da capacidade de redução do Cu(II) e o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

### Quantificação dos fenóis totais pelo reagente Folin-Ciocalteu

Geralmente é necessário extrair os compostos polifenólicos quando se quer determinar a actividade. Muitas vezes, esta extracção faz-se utilizando soluções metanólicas ou etanólicas contendo alguma água. Uma identificação dos compostos fenólicos nos alimentos pode facilitar a quantificação da capacidade antioxidante ou a discussão da potencial actividade antioxidante. Geralmente para este procedimento recorre-se à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a uma coluna de fase reversa e com um detector ultra-violeta – visível (Merken e Beecher, 2000; Mattila e Kumpulainen, 2002). Contudo, estes métodos, muitas vezes, só permitem quantificar compostos fenólicos simples, estando ainda apenas disponíveis, como padrões, compostos de baixa massa molecular (Becker *et al.*, 2004).

A quantificação dos fenóis totais é geralmente feita pelo método de Folin-Ciocalteu que se baseia no número de grupos fenólicos ou noutros potenciais grupos oxidáveis presentes nos compostos da amostra. A natureza química do reagente de Folin-Ciocalteu não é conhecida exactamente, mas crê-se que contenha hetero-polifosforungstato-molibdato. Sequências de reacções de redução reversíveis envolvendo um ou dois electrões, originam espécies azuis, muito possivelmente  $(\text{FenóisMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$ . Crê-se que o Mo é mais fácil de ser reduzido no complexo e as reacções de transferência do electrão ocorrem entre os agentes redutores e o Mo(VI):  $\text{Mo(VI)} + e^- \rightarrow \text{Mo(V)}$ . Os compostos fenólicos só reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico. Esta é a razão pela qual é necessário adicionar carbonato de sódio para que a solução fique com um pH próximo de 10. A este pH forma-se o anião fenolato a partir do composto fenólico, por perda do protão. O ião fenolato é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, formando-se compostos azuis. Estes são independentes da estrutura dos compostos fenólicos (Huang *et al.*, 2005).

Vários são os padrões que podem servir de referência para comparar com as amostras: ácido gálgico, catequina, ácido tânico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, entre outros (Vinson *et al.*, 2001; Katsube *et al.*, 2003; Maranz *et al.*, 2003; Mingfu *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Prior *et al.*, 2005).

#### “Trolox equivalent antioxidant capacity” (TEAC) ou método ABTS

Neste método utiliza-se um oxidante que é o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , que se forma por oxidação do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ( $\text{ABTS}^{2-}$ ) por acção do persulfato de potássio (Re *et al.*, 1999). Para obter o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que é estável, dissolve-se 7 mmol de amónio de ABTS em água e adiciona-se 2,45 mmol de persulfato de potássio. Esta mistura permanece durante 12-16 horas até ficar com uma coloração azul escura. Esta solução é diluída com etanol ou tampão (pH = 7,4) até que a absorvância atinja 0,7 num comprimento de onda de 734 nm. A um mililitro da solução resultante adiciona-se 10  $\mu\text{l}$  da amostra. A absorvância é lida a 30 °C, ao fim de 1, 4 e 6 minutos. Faz-se um gráfico da variação da absorvância em função da concentração do antioxidante. Deve obter-se uma recta. A concentração de antioxidante que dê a mesma variação percentual de absorvância do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que 1 mM de Trolox é o TEAC.

$\text{ABTS}^{\bullet+}$  pode ser formado usando o persulfato de amónio que oxida o  $\text{ABTS}^{2-}$ , mas existem outras formas, igualmente químicas (ex: dióxido de manganésio, ABAP), mas também enzimáticas (ex: metmioglobina, hemoglobina ou peroxidase de rábano-bastardo). A forma química de produção ou requer muito tempo (16 horas para o persulfato de potássio) ou temperaturas elevadas (60 °C para o ABAP) (Prior *et al.*, 2005).

Os valores TEAC para antioxidantes puros não mostram uma relação clara entre os valores TEAC e o número de electrões que um antioxidante pode dar. Por exemplo, enquanto os valores TEAC para o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, glutationo, e ácido úrico são 1,05, 0,97, 1,28 e 1,01, respectivamente; para o ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, os valores TEAC são 1,90 e 2,00, respectivamente. Nestes últimos compostos estão, portanto envolvidos dois electrões. Contudo, o ácido cafeico, com uma estrutura química muito semelhante ao do ácido ferúlico, tem um valor TEAC de 1,00. A estrutura química muito semelhante do campferol e da quercetina é outro bom exemplo da diferença entre os valores de TEAC que eles apresentam. Para o primeiro o valor é de 1,00, enquanto para o segundo o valor é de 3,00 (Huang *et al.*, 2005).

Este método permite que a capacidade antioxidante das amostras possa ser determinada quer em fases aquosas quer em fases lipídicas (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Termodinamicamente, um composto é capaz de reduzir o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  se tiver um potencial redox inferior ao do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (0,68 V). Muitos polifenóis têm potenciais redoxes mais baixos e, portanto, são capazes de reagir com o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (Prior *et al.*, 2005).

#### Método DMPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine)

É um método semelhante ao do TEAC, só que o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é substituído pelo  $\text{DMPD}^{\bullet+}$ , que é corado ( $\lambda = 505 \text{ nm}$ ) e estável. O catião radicalar é obtido a partir do DMPD na presença de cloreto férrico e num meio ácido. Um composto antioxidante é capaz de descorar a solução por

fazer desaparecer o  $\text{DMPD}^{*+}$ . A reação é rápida (menos de 10 minutos) e é proporcional à concentração do antioxidante. A capacidade antioxidante é expressa como equivalentes Trolox usando uma curva de calibração com diferentes concentrações de Trolox. Este método é usado para medir compostos hidrofílicos. Este método tem sido usado para medir a capacidade antioxidante de vinhos, frações hidrossolúveis do tomate, infusões de chá verde e sumo de romã (Fogliano *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000). Uma condicionante deste método é a interferência dos ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico, presentes nalguns extractos. Nestes casos, o método tem de ser usado com muito cuidado, segundo a opinião de alguns autores (Gil *et al.*, 2000).

#### “Ferric ion reducing antioxidant power” (FRAP)

Neste método, um sal férrico,  $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$  (TPTZ = 2,4,6-tripiridil-s-triazina), é utilizado como agente oxidante. O potencial redox do sal  $\text{Fe(III)}$  é de aproximadamente 0,70 V. A diferença entre este método e o do TEAC é que este ocorre em pH neutro, ao passo que o método FRAP ocorre em meio ácido (pH = 3,6).

O oxidante é preparado misturando TPTZ (2,5 ml, 10 mM em 40 mM HCl), 25 ml de tampão acetato e 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20 mM). A solução final possui 1,67 mM de  $\text{Fe(III)}$  e 0,83 mM de TPTZ (Huang *et al.*, 2005).

Neste método, utilizam-se 300  $\mu\text{l}$  do reagente FRAP preparado na altura, 10  $\mu\text{l}$  de amostra e 30  $\mu\text{l}$  de água destilada ou metanol. Se a amostra tiver capacidade redutora consegue transformar o  $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$  que apresenta uma absorvância máxima a 593 nm. As leituras são feitas durante 4 minutos, em intervalos de tempo regulares. A variação da absorvância é dada pela fórmula:  $\Delta A = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$  e comparada com a  $\Delta A$  de uma solução padrão de  $\text{Fe(II)}$ .  $\Delta A$  é proporcional à concentração do antioxidante. Uma unidade FRAP é definida como a redução de uma mole de  $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$ . Os valores FRAP para o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e ácido úrico são de 2,0; ao passo que o valor FRAP para a bilirrubina é de 4,0. Isto quer dizer que uma mole de ácido ascórbico é capaz de reduzir 2 moles de  $\text{Fe(III)}$  e que uma mole de bilirrubina é capaz de reduzir 4 moles de  $\text{Fe(III)}$ . Contudo, quer a bilirrubina quer o ácido ascórbico são dadores de 2 electrões. Quando a bilirrubina é oxidada, transforma-se em beliverdina, por perda de 2 átomos de hidrogénio, que tem uma absorção máxima a 593 nm com um coeficiente de extinção  $\varepsilon = 1 \times 10^4$ , comparável à do  $\text{Fe(II)(TPTZ)}_2$  (Huang *et al.*, 2005).

O tempo geralmente utilizado no método FRAP (4 minutos) para a determinação da capacidade antioxidante dos polifenóis determinados em solução aquosa ou metanólica revelou-se não ser suficiente, precisando de muitas horas. Os polifenóis com este comportamento incluíam na sua composição o ácido cafeico, ácido tânico, ácido ferúlico, ácido ascórbico e quercetina (Pulido *et al.*, 2000).

O método FRAP não é capaz de medir a capacidade antioxidante de compostos tiólicos, como seja o glutatono (Prior *et al.*, 2005).

#### Método da capacidade de redução do $\text{Cu(II)}$

Este método não tem sido muito usado ou, então, não tem sido muito descrito. O ensaio baseia-se na redução do  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$  pelo antioxidante presente na amostra. O  $\text{Cu(I)}$  formado é complexado com um reagente cromogénico, a batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina). Este complexo tem uma absorvância máxima a 490 nm. Uma mole de  $\alpha$ -tocoferol é capaz de reduzir 2 moles de  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$  (Huang *et al.*, 2005).

#### Método do $\text{DPPH}^*$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

O radical  $\text{DPPH}^*$  é um dos muito poucos radicais orgânicos azotados estáveis comercializáveis. Este radical apresenta uma absorção máxima a 515 nm. Após redução do radical, na presença de um antioxidante, há uma descoloração que pode ser seguida espectrofotometricamente.

Tecnicamente este ensaio é simples. A uma solução metanólica do radical  $\text{DPPH}^*$  (3,9 mL,

25 mg/L), de cor roxa, é adicionado 0,1 mL da amostra e a reacção é seguida, medindo a absorvância a 515 nm, durante 30 minutos ou até que a cor permaneça estável. A percentagem de DPPH remanescente é calculada do seguinte modo:  $\%DPPH_{rem} = 100 \times [DPPH]_{rem}/[DPPH]_{t=0}$

$\%DPPH_{rem}$  é proporcional às concentrações do antioxidante, e a concentração que é responsável pela diminuição do DPPH inicial de 50 % define-se como sendo  $EC_{50}$ . O tempo necessário para que a cor estabilize, utilizando a concentração  $EC_{50}$ , é calculado a partir da curva cinética e definido como  $T_{EC50}$ . Existe, ainda, o parâmetro EA (eficiência anti-radicalar) que expressa a capacidade antioxidante de um determinado antioxidante e que é calculado do seguinte modo:  $EA = (1/EC_{50})T_{EC50}$  (Sánchez- Moreno *et al.*, 1998).

Apesar da simplicidade do método, existem algumas desvantagens: o DPPH\* é um radical azotado bastante estável e, portanto, com muito pouca semelhança com os radicais peróxido envolvidos na peroxidação lipídica; os antioxidantes podem reagir rapidamente *in vivo* com os radicais peróxido e lentamente com o radical DPPH\*. A cinética da reacção entre DPPH\* e antioxidante não é linear para diferentes concentrações de DPPH\*, logo o cálculo do  $EC_{50}$  é, muitas vezes, problemático. (MacDonald-Wicks e *tal.*, 2006).

Inicialmente pensava-se que o DPPH\* era reduzido à correspondente hidrazina quando reagia com substâncias dadores de hidrogénio. Contudo, estudos mais recentes têm mostrado que o que existe principalmente é uma transferência rápida de electrão dos iões fenóxido da amostra para o DPPH\*. A remoção do átomo de hidrogénio do composto fenólico pelo DPPH\* é marginal porque ocorre muito lentamente na presença de solventes com capacidade para formar ligações de hidrogénio, como é o caso do metanol. A presença acidental de ácidos ou bases no metanol pode influenciar bastante o equilíbrio de ionização dos fenóis e provocar uma redução ou um aumento das constantes de velocidade, respectivamente (Huang *et al.*, 2005).

No método do DPPH\* pode haver compostos que reajam de uma maneira reversível com o radical DPPH\*, o que pode dar valores de capacidade antioxidante falsamente baixos. Um exemplo é o eugenol ou outros compostos fenólicos com uma estrutura similar (o-metoxifenol) (Huang *et al.* 2005). Isto quer dizer que moléculas fenólicas pequenas que tenham um efeito estérico menos importante e, conseqüentemente, com melhor acesso ao radical apresentam valores aparentemente mais elevados. A interpretação dos resultados é, ainda, difícil para compostos que apresentem espectros que se sobreponham aos do DPPH\* a 515 nm, como acontece, por exemplo, com os carotenóides (Prior *et al.*, 2005).

### Ensaio para a detecção da captação de radicais livres

A quantificação da captação de radicais pode ser avaliada por diversos métodos.

#### Captação de espécies reactivas oxigenadas e nitrogenadas

Há sete espécies reactivas principais que interactivam e danificam as macromoléculas quer em alimentos quer nos organismos vivos: anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), oxigénio singlete ( $^1O_2$ ), óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) (MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

#### **Captação do radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )**

O ião superóxido é incapaz de iniciar a oxidação lipídica directamente, mas é capaz de originar outro radical muito mais reactivo, o radical hidroxilo, desde que esteja na presença de iões metálicos, que já consegue oxidar os lípidos. A determinação da capacidade de captar aniões superóxido deve ser interpretada com muito cuidado porque a formação destas entidades químicas ocorre de uma forma constante, não sendo, portanto, atingido um equilíbrio. Deste modo e de acordo com alguns autores, quantificar os radicais superóxido pelos métodos até agora desenvolvidos, é problemático (Frankel e Meyer, 2000; MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

A actividade captadora de aniões superóxido por um antioxidante é medida em termos de inibição de formação de  $O_2^{\bullet -}$ . A formação desta espécie reactiva oxigenada pode ser conseguida através do sistema hipoxantina-xantina oxidase ou de um sistema não enzimático em que se

utiliza o metossulfato de fenazina na presença de NADH e oxigénio molecular. Em ambos os métodos, o superóxido formado reduz o azul de nitrotetrazólio em formazam a pH = 7,4 à temperatura ambiente. A formação de formazam é seguida espectrofotometricamente a 560 nm. Qualquer substância que reaja com o anião superóxido impede a formação de formazam (Sánchez-Moreno, 2002).

A xantina oxidase é uma das fontes principais de formação de espécies reactivas oxigenadas *in vivo*. A xantina oxidase em situações normais ocorre nos tecidos sob a forma de xantina desidrogenase que transfere electrões ao NAD, oxidando a xantina ou a hipoxantina em ácido úrico. Em condições de stress, a xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase que produz superóxido também a partir da xantina ou hipoxantina, mas a transferência de electrões não é para o NAD, mas sim para o oxigénio molecular transformando-o em anião superóxido (Sánchez-Moreno, 2002). Esta metodologia tem sido adaptada de modo a poder usar-se uma microplaca. Nestas condições, utiliza-se o citocromo c em vez do azul de nitrotetrazólio e a leitura da absorvância é feita a 530 nm. O citocromo c, para além de poder ser reduzido pelo anião superóxido, pode ser reduzido directamente pelos antioxidantes, o qual pode também inibir a xantina oxidase. Este método não é adequado para quantificar antioxidantes não enzimáticos (Huang *et al.*, 2005).

A função principal do sistema (hipo)xantina/xantina oxidase é a de oxidar a xantina ou a hipoxantina a ácido úrico. Portanto, a inibição da actividade da xantina oxidase é quantificada pela avaliação da produção do ácido úrico, que se forma simultaneamente com o anião superóxido (Kweon *et al.*, 2001). Alguns autores consideram que há determinados antioxidantes que actuam apenas por captação do superóxido directamente sem inibirem a função da xantina oxidase (Unno *et al.*, 2000).

Para comparar os ensaios, é útil comparar a inibição obtida do antioxidante com a inibição obtida pela superóxido dismutase, ou, então, comparar a inibição do antioxidante com a inibição de antioxidantes padrão (ácido ascórbico ou  $\alpha$ -tocoferol).

É importante estabelecer uma relação de substrato (hipoxantina) e enzima adequada, para assegurar que se formam as quantidades óptimas do radical superóxido. Se houver muito substrato, ocorre uma transferência de dois electrões o que leva à formação de hidroperóxido e, portanto, reacções laterais indesejadas que podem interferir nos resultados finais (MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

O azul de nitrotetrazólio pode ser substituído por cloreto de hidroxilamónio. A formação de nitrilo a partir do hidroxilamónio é seguida medindo a absorvância a 530 nm. A produção de nitrilo é inibida por moléculas capazes de reagir com o anião superóxido (Wang e Jiao, 2000). Quer utilizando o azul de nitrotetrazólio quer o cloreto de hidroxilamónio, a diminuição da absorvância revela uma actividade captadora de aniões superóxido (Sánchez-Moreno, 2002).

A capacidade de inibição da produção do anião superóxido pode também ser avaliada usando o ácido  $\alpha$ -cetometiollbutírico. A decomposição deste composto provocado pelo superóxido liberta eteno, que é quantificado por cromatografia gás-líquido. Neste método utiliza-se como fonte geradora de aniões superóxido, o sistema (hipo)xantina/xantina oxidase (Kruegener *et al.*, 1995; Lavelli *et al.*, 1999; 2000). Utilizando ainda este sistema, a captação do superóxido pode ser avaliada por espectrometria de ressonância de *spin* electrónico. Neste sistema, o superóxido é captado pelo 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO), formando-se um aducto DMPO-OH que é detectado por ressonância de *spin* electrónico. Utiliza-se como padrão interno o óxido de manganésio (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonal-Wicks *et al.*, 2006).

### Captação do radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ )

Existem vários métodos para determinar a capacidade de captar radicais hidroxilo. O teste da desoxirribose é um exemplo. Neste método há uma mistura de cloreto férrico e ácido etilenodiamina-tetracético (EDTA) que, na presença de ácido ascórbico, reage para formar um complexo  $Fe^{2+}$ -EDTA mais ascorbato oxidado. O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) adicionado reage com o  $Fe^{2+}$ -EDTA formando  $Fe^{3+}$ -EDTA e  $HO^{\bullet}$  (reacção de Fenton:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{\bullet}$ ). Os radicais hidroxilo não sendo captados por nenhum dos reagentes mencionados

atacam o açúcar desoxirribose, degradando-o em diversos fragmentos. Alguns destes fragmentos são capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, após aquecimento e a pH ácido, originando um pigmento rosa susceptível de ser quantificado por espectrofotometria (Sánchez-Moreno, 2002). Compostos que sejam capazes de captar os radicais hidroxilo impedem a formação do cromagénio. O método da desoxirribose pode ser modificado não adicionando o ácido ascórbico. Nestas condições é possível saber se as próprias amostras têm actividade pró-oxidante, porque os compostos em estudo substituem o ácido ascórbico na reacção de Fenton (Hagerman *et al.*, 1998). Alguns compostos inibem a formação do cromagénio não por reacção com os radicais hidroxilo, mas por terem formado complexos estáveis com o ião metálico o que impede a formação dos radicais hidroxilo. Para identificar os compostos que complexam os iões metálicos, não se adiciona o EDTA (Hagerman *et al.*, 1998; Sánchez-Moreno, 2002). Na ausência de capacidade complexante dos compostos em análise, os iões ferro são complexados pela desoxirribose, provocando danos provocados pelos radicais hidroxilo. Se as substâncias em estudo têm capacidade quelante, complexando o ferro, os danos provocados pelo radical hidroxilo são menores e a coloração rosa é mais ténue.

Alguns autores utilizaram uma mistura de tetracloro-hidroquinona e peróxido de hidrogénio que hidroxila o ácido salicílico para formar o ácido 2,3- e 2,5-di-hidroxibenzóico, um processo que é inibido pelos agentes captadores de radicais hidroxilo (Zhu *et al.*, 2000).

O grupo hidroxilo pode, ainda, ser detectado utilizando moléculas detectoras, geralmente, com ligações N=O que reagem com o radical. Um exemplo é o 5,5-dimetilpirrolina-N-óxido (DMPO), que reage com o radical hidroxilo, originando o radical mais estável e com um espectro característico DMPO-OH<sup>\*</sup>, utilizando o método da ressonância de *spin* electrónico (Sánchez-Moreno, 2002). Estes aductos que se formam são estáveis e relativamente mais fáceis de se determinarem do que os próprios radicais hidroxilo que têm uma vida muito curta. Na presença de um captador de radicais hidroxilo diminui o sinal DMPO-OH<sup>\*</sup> na ressonância de *spin* electrónico.

O radical hidroxilo é muito reactivo, portanto, a capacidade de uma molécula captar tal radical é irrelevante *in vivo*. É preferível, então, desenvolver métodos que permitam detectar compostos com capacidade de captar iões metálicos porque previne a reacção que leva à formação de radicais hidroxilo. Um composto que se comporte deste modo acaba por ser um antioxidante preventativo. Ou *et al.* (2002) desenvolveu um método para medir a capacidade quelante dos compostos que denominou por HORAC: Hydroxyl (HO), radical (R), averting (A), capacity (C). O radical hidroxilo é gerado através de uma reacção Fenton mediada pelo Co(II), e a produção do radical é confirmada indirectamente por hidroxilação do ácido *p*-hidroxibenzóico que é medido por cromatografia líquida de alta resolução acoplado a espectrometria de massa. A capacidade captadora é medida usando um composto fluorescente, a fluoresceína, tal como para o método ORAC. A curva que representa a diminuição da fluorescência da fluoresceína é controlada quer na ausência quer na presença do antioxidante, sendo, depois, a área sob as curvas (AUC) calculadas por integração. A actividade do antioxidante é calculada subtraindo o AUC do branco do AUC da amostra antioxidante. O método quantitativo é o mesmo do que foi usado para o método ORAC, excepto no padrão utilizado. No método HORAC utiliza-se o ácido gálico. O valor HORAC está relacionado directamente com a capacidade do antioxidante para quelatar iões metálicos, e a capacidade para formar um complexo estável entre o Co(II) e o antioxidante. A capacidade para impedir a formação de radicais hidroxilo de uma substância deve-se sobretudo à sua capacidade para quelatar metais (Huang *et al.*, 2005).

#### **Captação de peróxido de hidrogénio**

Um dos métodos mais comuns utiliza uma peroxidase do rábano-bastardo e o peróxido de hidrogénio para oxidar a escopoletina num produto não fluorescente. A presença de uma molécula capaz de captar o peróxido de hidrogénio impede a oxidação da escopoletina (Sánchez-Moreno, 2002). No entanto, alguns autores consideram que a natureza desta inibição pode ser ambígua por três razões principais: o antioxidante pode reagir directamente com o peróxido de hidrogénio, o antioxidante pode reagir com intermediários formados da enzima e do peróxido de hidrogénio e o antioxidante pode inibir a peroxidase do rábano-bastardo (Martínez-Tomé *et al.*, 2001; Huang *et*

*al.*, 2005).

Há também métodos não enzimáticos para a determinação da captação de peróxido de hidrogénio que se baseiam na reacção de quimioluminescência do luminol ou da lucigenina com o hipoclorito. Este ensaio baseia-se na oxidação do luminol pelo hipoclorito de sódio (NaOCl) em diazaquinona, que é depois convertida, pelo peróxido de hidrogénio, em aminofalato excitado. Esta reacção tem um sinal de luminiscência muito curto (2 s) num comprimento de onda máximo de 431 nm (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). No caso da lucigenina, está é convertida, pelo peróxido de hidrogénio, em *N*-metilacridona excitada (Costa *et al.*, 2005).

Outros ensaios têm sido usados para a determinação do peróxido de hidrogénio. Wang e Jiao (2000) usaram um método que media a reacção directa do peróxido de hidrogénio com o titânio (IV). O complexo Ti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado era dissolvido em ácido sulfúrico e medido a 410 nm. Os autores utilizaram este método para determinar a capacidade de captação de peróxido de hidrogénio de diversos sumos de fruta.

### **Captação de oxigénio singleto**

O oxigénio singleto é geralmente formado na presença de luz e de fotossensibilizadores. Pensa-se que o oxigénio singleto é responsável pelos danos na pele dependentes da radiação UV, pela formação de cataratas e pela fotossensibilidade resultante da ingestão ou absorção de fitoquímicos, fármacos e pesticidas que actuam como fotossensibilizadores. A formação de oxigénio singleto, *in vivo*, sem a presença da luz parece ser resultado da dismutação espontânea do anião superóxido. Quimicamente o oxigénio singleto pode ser gerado através da decomposição não fotoquímica do peróxido de hidrogénio pelos metais ou pelo hipoclorito (Huang *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

O oxigénio singleto pode interactuar com outras moléculas de duas maneiras principais: ou reage quimicamente com as referidas moléculas, formando, por exemplo, endoperóxidos, ou pode transferir a sua energia de excitação, voltando ao estado fundamental enquanto a outra molécula fica no estado excitado. Este fenómeno designa-se por “quenching” do oxigénio singleto. No laboratório são usadas várias moléculas como “quenching” ou captadores de oxigénio singleto: histidina, DABCO, difenilisobenzofurano e azida (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O oxigénio singleto emite fosforescência característica a 1270 nm. A diminuição da intensidade da luz emitida tem sido usada para medir a capacidade de remoção de oxigénio singleto por um determinado composto. Wang e Jiao (2000) determinaram a capacidade de captação do oxigénio singleto por parte de vários sumos de fruta utilizando um método espectrofotométrico em que utilizaram como agentes produtores de oxigénio singleto uma mistura de hipoclorito de sódio e de peróxido de hidrogénio. A *N,N*-dimetil-*p*-nitrosoanilina foi usado como aceitador selectivo de oxigénio singleto. A quantidade de oxigénio singleto formado foi determinado medindo a diminuição da absorvância do aceitador selectivo a 440 nm. A eficácia relativa de remoção (% inibição na produção de oxigénio singleto) foi calculada através da diferença da absorvância da *N,N*-dimetil-*p*-nitrosoanilina com e sem a adição do sumo de fruta.

### **Captação do óxido nítrico (\*NO)**

A actividade captadora dos radicais de óxido nítrico pode ser medida num espectrofluorímetro registando a oxidação do 4,5-diaminofluoresceína induzida pelo óxido nítrico, a triazolofluoresceína, utilizando como comprimentos de onda de excitação e de emissão 495 nm e 521 nm, respectivamente (Nagata *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2003).

### **Captação de peroxinitrito**

O proxinitrito (ONOO-) não é um oxidante forte, em contrapartida, a forma protonada, o ácido peroxinitroso, já é um oxidante muito forte. A pH fisiológico, o ácido peroxinitroso rearranja de modo a formar nitrato, uma forma menos oxidante. Quer o peroxinitrito quer o ácido peroxinitroso são capazes de nitrar ou de hidroxilar compostos aromáticos, como a tirosina, originando a nitrotirosina. Sob condições fisiológicas, o peroxinitrito também forma um aducto com o dióxido de

carbono dissolvido nos fluidos corporais. O aducto parece ser responsável pelos danos oxidativos das proteínas (Huang *et al.*, 2005).

Existem dois métodos principais para medir a captação de peroxinitrito: inibição da nitração da tirosina e inibição da oxidação da di-hidro-rodamina 123. Alguns autores (Pannala *et al.*, 1998) mediram a capacidade antioxidante da catequina e de outros compostos polifenólicos determinando as alterações na concentração da tirosina a 275 nm e da 3-nitrotirosina (o produto principal da nitração da tirosina) a 430 nm na presença de várias concentrações do antioxidante. Simultaneamente fizeram uma confirmação por HPLC separando e quantificando a nitro-tirosina.

O outro método consiste na oxidação da di-hidro-rodamina 123, pelo peroxinitrito, a rodamina 123 que é fluorescente. A intensidade da fluorescência é medida num espectrofluorímetro utilizando como comprimentos de onda de excitação e de emissão 500 nm e 536 nm, respectivamente (Kooy *et al.*, 1994). Os antioxidantes inibirão a oxidação da di-hidro-rodamina 123 induzida pelo peroxinitrito. A oxidação da di-hidro-rodamina 123 pelo peroxinitrito é rápida. A reacção é linear e dependente da concentração. O produto final é estável (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

### **Avaliação da capacidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica**

Contrariamente aos testes que se baseiam na captura de radicais livres, na avaliação da capacidade de inibir a oxidação lipídica é necessária a presença de substratos lipídicos. A avaliação dos antioxidantes nestes sistemas lipídicos pode fazer-se ou medindo as alterações das concentrações dos compostos que vão sendo oxidados, o desaparecimento do oxigénio ou a formação de produtos de oxidação (Becker *et al.*, 2004).

Na avaliação da capacidade antioxidante de um composto, pode quantificar-se o desaparecimento dos reagentes, ou a formação de radicais ou a formação de produtos de oxidação primários ou secundários, dependendo do estágio de oxidação (Becker *et al.*, 2004). Muitas vezes, a correlação entre os métodos (absorção de oxigénio, índice de peróxidos, aparecimento de produtos secundários) é muito baixa porque não correspondem ao mesmo estágio de evolução da oxidação.

Num processo de auto-oxidação, consideram-se normalmente três fases: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação há o desaparecimento dos substratos de oxidação (oxigénio, ácido gordo), no processo de propagação há o aparecimento dos produtos primários de oxidação: os peróxidos e na terminação há o aparecimento dos produtos secundários de oxidação, obtidos por recombinação e cisão a partir dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis) (Berset e Cuvelier, 1996).

A auto-oxidação é um sistema dinâmico, que evolui no tempo e onde há uma cadeia de transformações dos produtos da reacção. Uma das dificuldades, para medir um estado de oxidação definido, é o de determinar em que momento se deve efectuar a medição. Geralmente, procura avaliar-se o “período de indução” da reacção, isto é, o tempo necessário para atingir quer uma alteração de gosto, quer uma aceleração brusca da velocidade reaccional. A medição não pode, pois, ser pontual, é necessário seguir-se a reacção ao longo do tempo, devendo, ainda, ser representativa da duração de vida do produto.

A avaliação da estabilidade oxidativa pode ser feita nas condições normais de armazenamento (testes de estabilidade em tempo real) ou recorrendo a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica) que permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa do lípido ou a eficácia de um antioxidante (testes acelerados) (Silva *et al.*, 1999).

Nos testes de oxidação acelerada, a temperatura e a oxigenação são factores muito importantes: a velocidade de oxidação depende da concentração em oxigénio cuja solubilidade decresce com a elevação da temperatura. Na presença de um antioxidante, a energia de activação da reacção aumenta (o antioxidante diminui a velocidade da reacção). O índice de protecção global medido a temperaturas elevadas, para um determinado antioxidante, será, geralmente, menor do que quando medido a temperaturas mais baixas (Frankel *et al.*, 1994). A eficácia dos antioxidantes pode depender, assim, da temperatura à qual foi sujeito. Por exemplo, o

$\alpha$ -tocoferol é mais eficaz como antioxidante a temperaturas inferiores a 60 °C, contrariamente ao que se verifica com os seus isómeros  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis. Também o ácido ascórbico não protege o ácido linoleico de uma oxidação quando se encontra a temperaturas elevadas, mas à temperatura ambiente funciona como um agente anti-radicalar em meio metanólico (Berset e Cuvelier, 1996).

A Tabela 3 refere alguns testes de estabilidade convencionais bem como as condições de trabalho.

Tabela 3. Testes de estabilidade convencionais bem como as condições de trabalho (adaptado de Frankel, 1993)

Teste	Condições	Características
Armazenamento à T ambiente	T ambiente, P atmosférica	Muito lento
Luz	T ambiente, P. atmosférica	Mecanismo diferente
Presença de metais	T ambiente, P atmosférica	Maior decomposição
Método da pesagem	30-80 °C, P atmosférica	Ponto crítico duvidoso
Forno Schaal	60-70 °C, P atmosférica	Menos problemas
Uptake oxigénio	80-100 °C, P atmosférica	Mecanismo diferente
Bomba de oxigénio (ASTM) <sup>a</sup>	99 °C, 65-115 psi O <sub>2</sub>	Mecanismo diferente
Oxigénio activo (AOM)	98 °C, borbulhamento de ar	Mecanismo diferente
Rancimat <sup>b</sup>	100-140 °C	Ponto crítico duvidoso

<sup>a</sup> ASTM, American Society for Testing Materials

<sup>b</sup> Produzido pelo METROM Lda., CH-9100, Herisau, Suíça

T, temperatura

P, pressão

Os testes de estabilidade à temperatura ambiente apesar de serem os que mais se aproximam das condições reais de armazenamento dos alimentos apresentam a desvantagem de serem extremamente lentos e, portanto, pouco práticos. Em condições de oxidação lenta, a reprodutibilidade dos resultados pode ficar comprometida por diversas variáveis que são difíceis de controlar em condições de armazenamento prolongadas.

Apesar dos métodos que utilizam a luz ou metais serem ensaios relativamente rápidos apresentam problemas. O mecanismo da foto-oxidação é diferente do da auto-oxidação. Na foto-oxidação há a formação de diversos precursores aromáticos que originam diferentes produtos voláteis. A oxidação catalisada por metais pode originar uma elevada proporção de compostos carbonílicos em comparação com os hidroperóxidos primários.

O método do ganho de peso que se baseia no aumento do peso devido à absorção do oxigénio, não é muito sensível. O ponto crítico requer um nível de oxidação acima do ponto onde se começa a detectar o cheiro a ranço resultante da deterioração oxidativa das gorduras. O teste do forno de Schaal apresenta menos limitações e, geralmente, o ponto crítico representa um grau de oxidação mais baixo e os resultados relacionam-se razoavelmente bem com os tempos de prateleira. A 60 °C, o número de reacções secundárias é mínimo comparativamente a temperaturas mais elevadas. As temperaturas elevadas dos testes "oxygen uptake", bomba de oxigénio, método do oxigénio activo e método Rancimat fazem com que os dados obtidos não sejam muito seguros porque o mecanismo da oxidação lipídica altera bastante a temperaturas elevadas. Os níveis de ácidos voláteis que se mede, por exemplo, no Rancimat só são significativos a temperaturas elevadas e, portanto, não são relevantes em condições normais de armazenamento.

As principais limitações nos testes de estabilidade que utilizam temperaturas elevadas são:

- As taxas de oxidação tornam-se dependentes da concentração do oxigénio porque a solubilidade deste gás diminui no caso de temperaturas elevadas;
- A oxidação ocorre rapidamente o que provoca alterações drásticas na disponibilidade do oxigénio;
- O período de indução ocorre a um nível de oxidação muito alto e muito antes do ponto em que os componentes finais, com cheiro característico, sejam detectados;
- Podem ocorrer reacções secundárias, tais como polimerização e ciclização, que não são

- relevantes em condições de temperaturas de armazenamento normais;
- Compostos voláteis, tais como o BHA ou o BHT, também se perdem a temperaturas elevadas;
  - Os antioxidantes fenólicos presentes em extractos naturais também se degradam a temperaturas elevadas (Frankel, 1993).

## ANÁLISE DOS SUBSTRATOS DE OXIDAÇÃO

### Medição do consumo de oxigénio

O estudo cinético do consumo de oxigénio permite medir o tempo relativo à fase de iniciação e o seu comportamento sob o efeito de antioxidante. Os métodos são geralmente manométricos (manómetro de Warburg), polarográficos ou gravimétricos, medindo-se o aumento do peso resultante da fixação do oxigénio aos ácidos gordos. A principal limitação destes métodos deve-se à existência, em meios complexos, de reacções secundárias, elas próprias consumidoras de oxigénio. Por outro lado, a produção de compostos voláteis por decomposição dos peróxidos a temperaturas relativamente elevadas pode falsear os resultados (Rajalakshmi e Narasimhan, 1995; Berset e Cuvelier, 1996).

Os métodos de absorção de oxigénio têm por base o facto da oxidação das gorduras se traduzir num consumo mensurável de oxigénio atmosférico. Vários são os métodos, referindo-se aqui apenas alguns. No ensaio com a bomba de oxigénio, a amostra é colocada numa bomba de aço inoxidável, a qual está ligada a um registador de pressão. O processo oxidativo é acelerado pelo oxigénio sobre pressão (65-115 psi O<sub>2</sub>) e pelo aquecimento (99 °C). Como há absorção de oxigénio, a pressão no interior da bomba diminui.

No método da pesagem, a amostra é rigorosamente pesada e incubada em estufa (30-80 °C) na ausência de luz. Determina-se o aumento do peso da amostra, resultante da adição de oxigénio, em intervalos de tempo regulares, durante o período de incubação (Silva *et al.*, 1999).

### Doseamento dos ácidos gordos não oxidados residuais

Geralmente, faz-se a cinética de desaparecimento de um ou de vários ácidos gordos insaturados presentes na amostra, após extracção, metilação e cromatografia em fase gasosa. Este método tem dois pontos críticos: a dificuldade da extracção da matéria gorda e as possíveis perdas quando se procede a derivatização (Berset e Cuvelier, 1996).

## Análise de peróxidos

### Medição do índice de peróxidos (IP)

Os hidroperóxidos, produtos primários da oxidação, são intermediários transitórios instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas ou na presença de metais, originando compostos com grupos carbonilo e hidroxilados. Ao longo do tempo, o índice de peróxidos passa por um máximo. Isto quer dizer que um índice de peróxidos baixo não significa uma taxa de oxidação baixa, porque pode ser o sinal de uma alteração já mais avançada do lípido.

O índice de peróxidos exprime-se em miliequivalentes de oxigénio activo por Kg de matéria gorda. Existem dois métodos principais para quantificar os peróxidos: o método iodométrico e o método colorimétrico.

### Método iodométrico

Os hidroperóxidos ou os peróxidos formados são avaliados iodometricamente, isto é, faz-se reagir a amostra com uma solução aquosa saturada de iodeto de potássio. Na presença de peróxidos há libertação de iodo que é titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio.

Neste método existem dois factores que podem contribuir para erros:

- O iodo libertado pode fixar-se às ligações duplas dos ácidos gordos insaturados,

originando um valor de peróxidos menor;

- O oxigénio presente no meio pode fazer libertar o iodo a partir do iodeto de potássio, originando valores de índice de peróxidos elevados.

A titulação volumétrica do iodo na presença do amido (indicador) pode ser substituída por um método potenciométrico com a ajuda de um eléctrodo de platina (Berset e Cuvelier, 1996).

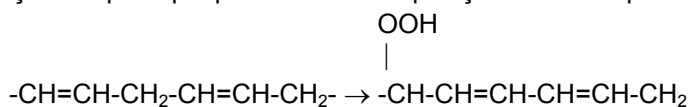
No método do oxigénio activo (AOM), também conhecido pelo nome do teste de Swift, faz-se passar uma corrente de ar purificada pela matéria gorda aquecida a 98 °C num banho de óleo e o teor de peróxidos é determinado a intervalos de tempo regulares pelo método iodométrico. Mede-se o tempo necessário para atingir um valor de índice de peróxidos de 100. Este método tem merecido algumas críticas porque a formação e a decomposição dos peróxidos não decorrem à mesma velocidade. A temperaturas superiores 60-70 °C a decomposição dos peróxidos é mais rápida do que a formação. A decomposição dos peróxidos formados a partir de ácidos gordos poli-insaturados é também mais rápida relativamente aos dos ácidos gordos mono-insaturados ou di-insaturados. Por esta razão, a determinação do índice de peróxidos não está indicada para avaliar o estado de oxidação dos óleos de peixe, fortemente insaturados, porque o índice de peróxidos seria sempre muito baixo Berset e Cuvelier, 1996).

### Método colorimétrico

Os peróxidos presentes oxidam o Fe(II) a Fe(III) que se doseia posteriormente sob a forma de cloreto ou de tiocianato férrico (Berset e Cuvelier, 1996).

### Determinação dos dienos conjugados

A oxidação dos ácidos gordos poli-insaturados é acompanhada de uma deslocação das ligações duplas que passam de uma posição malónica para uma posição conjugada:



Os dienos conjugados absorvem a 232 nm. Os produtos secundários de oxidação, principalmente as  $\alpha$ -dicetonas ou as cetonas insaturadas têm um máximo de absorção a 268 nm. Esta distinção permite diferenciar os estádios de evolução da oxidação: quando os valores de absorvância a 232 nm forem grandes, tal significa que o teor em peróxidos é elevado. Se a absorvância a 268 nm é elevada comparativamente à encontrada para o comprimento de onda de 232 nm, então, os produtos secundários da oxidação predominam. Neste método pode haver interferência porque podem existir vários compostos na amostra que absorvam fortemente a 200-220 nm (Berset e Cuvelier, 1996).

### Outros métodos

A análise de peróxidos pode, ainda, ser seguida através de outros métodos:

- Método calorimétrico que se efectua entre 80 a 140 °C e sob um fluxo de oxigénio, para avaliar o tempo de indução correspondente à formação rápida de hidroperóxidos. As limitações são as mesmas que aquelas referidas para os métodos que utilizam temperaturas elevadas.
- Método de quimioluminescência que mede os fotões produzidos durante a transição dos electrões, do estado excitado para o estado fundamental, no decurso da formação dos peróxidos. Na presença de um antioxidante, a quantidade de luz detectada é sempre mais fraca. Por falta de sensibilidade dos aparelhos de medição, é necessário aumentar artificialmente o rendimento em fotões ou aquecendo o produto, ou eliminando com um flash de luz ou adicionando um oxidante forte (hidroperóxido exógeno ou hipoclorito de sódio). Parece não haver, contudo, relação simples entre o teor de peróxidos e a intensidade da quimioluminescência, que depende também da estrutura dos compostos.
- Cromatografia líquida de alta resolução permite separar e dosear os hidroperóxidos produzidos, utilizando colunas de fase inversa. Detectores UV ou amperométricos

podem ser usados nesta metodologia.

- Termólise em que se analisam, por cromatografia em fase gasosa, os produtos voláteis formados por termodecomposição dos hidroperóxidos, quer directamente, quer após derivatização sob a forma de 2,4,6 triclorofenil-hidrazonas. Neste método é necessário que os hidroperóxidos não tenham começado a decompor-se no momento do choque térmico (Berset e Cuvelier, 1996).

### **Análise dos produtos secundários da oxidação**

No decurso da decomposição dos peróxidos formam-se compostos de natureza muito diversa: aldeídos, cetonas, hidróxi-ácidos, hidrocarbonetos e polímeros. Enquanto que os hidroperóxidos são incolores e inodoros, muitos dos compostos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos apresentam um odor desagradável.

#### Análise dos compostos aldeídicos

A natureza dos aldeídos e as suas proporções relativas dependem muito do ácido gordo oxidado. Existem dois métodos colorimétricos muito usados para quantificar os aldeídos formados: teste do ácido 2-tiobarbitúrico e o índice de *p*-anisidina.

#### Teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

Neste método uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico formando-se um complexo avermelhado que absorve a 532-535 nm. Os resultados são expressos em unidades de absorvância por unidade de peso da amostra ou em “valor de ácido tiobarbitúrico” definido como o peso, em miligramas, de malonaldeído por quilograma de amostra. Neste caso, a padronização é feita com a ajuda de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

O malonaldeído forma-se unicamente a partir de ácidos gordos que possuam pelo menos 3 ligações duplas. Este teste não será adequado para os derivados do linoleato ou do oleato. O malonaldeído não é o único produto de oxidação que reage com o ácido tiobarbitúrico. Os 4-hidroxialcenais, os 2,4-alcadienais e os 2-alcenais formam também um cromogénio que absorve no mesmo comprimento de onda. Deste modo, prefere-se chamar ao teste do ácido tiobarbitúrico o método das espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico.

A reacção tem de ter lugar em meio ácido (pH = 1-2) e a uma temperatura elevada ( $\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para acelerar a velocidade e aumentar a sensibilidade.

Existem vários compostos que podem interferir com este método: a sacarose e a glucose que apresentam um efeito sinérgico sobre as espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico. O malonaldeído pode, ainda, complexar-se com proteínas, aminas, não podendo reagir ao ácido tiobarbitúrico (Berset e Cuvelier, 1996).

#### Índice de *p*-anisidina (IpA)

A *p*-anisidina, em meio acético, forma um complexo amarelo com os dienais conjugados. Esta reacção ocorre principalmente com o *trans*-2, *trans*-4-decadienal, proveniente do ácido linoleico. O índice de *p*-anisidina é definido como 100 vezes a absorvância, medida a 350 nm, de uma solução resultante da reacção de 1 g de lípido em 100 ml de solvente que contém a *p*-anisidina.

O valor do índice de *p*-anisidina está muitas vezes associado à do índice de peróxidos para dar o valor Totox (valor de oxidação total):  $\text{Totox} = 2(\text{IP}) + 1(\text{IpA})$

Esta combinação permite associar os peróxidos, que representam o potencial de degradação da qualidade organoléptica, e os aldeídos representativos de um estado de deterioração já efectivo. Considera-se que um corpo gordo bem conservado deve ter um valor Totox inferior a 10 (Berset e Cuvelier, 1996).

O índice carbonilo é uma medida dos compostos de carbonilo formados durante a oxidação da gordura. Este método baseia-se na reacção, em meio ácido, dos compostos de carbonilo com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina e a formação dos respectivos compostos derivados que são corados (2,4-

dinitrofenil-hidrazonas). A determinação é feita por espectrofotometria.

### Dosagem dos compostos voláteis

Os compostos voláteis, hidrocarbonetos (pentano, hexano, etano), aldeídos (pentanal, hexanal, 2-octenal, 2-nonenal) ou cetonas (1,5-octadieno-3-ona, 1-octeno-3-ona) resultam da decomposição dos peróxidos. Estes compostos são determinados por cromatografia em fase gasosa, usando "head-space". O pentano é o hidrocarboneto que geralmente se determina e provém da degradação do ácido linoleico. O hexanal é outra espécie também determinada por este método.

Quanto à determinação dos ácidos voláteis, o método utilizado não é a cromatografia mas antes um método condutivimétrico. Neste caso, registam-se as variações da condutividade de uma água destilada na qual se recolhem os ácidos de baixa massa molecular, como por exemplo, o ácido fórmico, produzido a uma temperatura de 110-130 °C sob acção de ar ou de oxigénio. Os aparelhos Rancimat (Suíça) e OSI (Estados-Unidos) são baseados neste princípio. Este método tem inconvenientes porque só dá bons resultados para valores de índice de peróxidos superiores a 100, isto é, quando há já uma degradação significativa do lípido. Para além disso, as condições térmicas do ensaio originam produtos da decomposição que não são da mesma natureza que os que se formam numa situação de armazenamento normal (Berset e Cuvelier, 1996).

### **Outros métodos (Teste do $\beta$ -caroteno-ácido linoleico)**

Neste método há uma co-oxidação do  $\beta$ -caroteno pelo ácido linoleico submetido a uma oxidação intensa. O sistema é constituído por uma emulsão de  $\beta$ -caroteno, ácido linoleico, Tween 40 e água destilada, para além das amostras. A capacidade antioxidante destas é revelada espectrofotometricamente a 470-490 nm, ao longo do tempo. Quanto maior a descoloração do  $\beta$ -caroteno e, conseqüentemente, quanto menor forem os valores de absorvância observados, menor é a capacidade antioxidante da amostra. Os carotenóides puros são susceptíveis à oxidação que, após cisões, levam à formação de uma mistura complexa de compostos. Esta reacção de oxidação é responsável pela descoloração característica dos carotenóides (Berset e Cuvelier, 1996; Halliwell e Gutteridge, 1999).

### **Influência do meio no comportamento dos antioxidantes**

A eficácia dos antioxidantes é função da sua natureza química, das interacções que desenvolvem com o meio, do pH, da temperatura, dos surfactantes e do tipo de substrato lipídico. Assim, a actividade dos diferentes tipos de antioxidantes pode variar significativamente dependendo do tipo de lípido: triacilgliceróis, metil ésteres, ácidos gordos livres ou lípidos incorporados em várias partículas biológicas tais como lipoproteínas ou microssomas hepáticos. Os compostos fenólicos podem ter quer uma acção antioxidante quer uma acção pró-oxidante dependendo do substrato lipídico utilizado e das condições do ensaio. A catequina pura e os galhatos de catequina do chá-verde são eficazes na inibição da oxidação das LDL e dos lipossomas de lecitina, contudo, apresentavam uma acção pró-oxidante em emulsões de óleo em água (Teissedre *et al.*, 1996; Frankel *et al.*, 1997; Huang e Frankel., 1997).

A actividade antioxidante é fortemente afectada pela composição do sistema, e a actividade relativa dos antioxidantes de diferentes polaridades varia significativamente em diferentes sistemas multifásicos. Assim se explica o "paradoxo polar": os antioxidantes polares, como o Trolox (derivado carboxílico do  $\alpha$ -tocoferol), o ácido ascórbico, ácido carnósico e ácido rosmarínico são melhores antioxidantes em lípidos do que os correspondentes antioxidantes lipofílicos  $\alpha$ -tocoferol e palmitato de ascorbilo. A ordem de reactividade é contrária a esta se o sistema for uma emulsão de óleo em água. Este fenómeno interfacial foi explicado pelas diferenças na afinidade dos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos para o ar, óleo e água. Num lípido, os antioxidantes hidrofílicos podem ser mais eficazes por estarem orientados na interface óleo-ar, ao passo que os lipofílicos estão dissolvidos na gordura, longe do ar, elemento responsável pela oxidação lipídica. Numa emulsão óleo em água, os antioxidantes hidrofóbicos

estão localizados no óleo e na interface óleo-água onde protegem melhor do que os antioxidantes hidrofílicos. Estes ficam na fase aquosa, não sendo, portanto, capazes de proteger de uma forma adequada os lípidos na interface água-óleo (Frankel e Meyer, 2000).

Mas os sistemas lipídicos podem ser mais complexos do que as situações atrás referidas. Por exemplo, uma mistura de ácido ascórbico/lecitina de soja e tocoferóis tem um efeito antioxidante sinérgico num sistema constituído por óleo de peixe refinado. A lecitina não só funciona como um emulsionante para melhorar o contacto entre o ácido ascórbico e o tocoferol, como também participa no ciclo de oxidação-redução mediando a recuperação do tocoferol a partir do radical tocoferoxilo e do ácido ascórbico. Contudo, a mistura antioxidante ternária não era eficaz em maioneses enriquecidas com óleo de peixe. Neste caso, o ácido ascórbico encontrava-se na fase aquosa sem possibilidade, portanto, de poder regenerar o tocoferol.

Em conclusão, a eficácia de um antioxidante em sistemas multifásicos ou biológicos é afectada por factores determinados pelo fenómeno interfacial, porque são responsáveis pela localização e orientação dos antioxidantes por partição entre a fase aquosa e a fase lipofílica e por interacção com o emulsionante na interface (Frankel e Meyer, 2000).

## ANTIOXIDANTES NATURAIS

É cada vez maior a procura de compostos de origem natural por serem considerados pelo grande público menos prejudiciais para a saúde. Contudo, os antioxidantes de origem natural não têm só vantagens. Por exemplo, estes compostos têm de ser purificados para terem uma maior actividade o que encarece o processo. Quase sempre é necessária esta purificação, não só para obter uma maior actividade como ainda para garantir as propriedades do antioxidante que, caso esteja sob a forma não purificada, podem surgir interacções entre os componentes do extracto que não são desejadas. É ainda de referir que em muitos casos a segurança destes antioxidantes de origem natural não é, ainda, totalmente conhecida. Estes antioxidantes podem alterar a cor, o sabor e o aroma do produto alimentar (Rajalakshmi e Narasimhan, 1995).

A maioria dos antioxidantes naturais é constituída por compostos fenólicos que, com a excepção dos tocoferóis, contêm grupos activos em posição *o*-, enquanto os antioxidantes sintéticos têm tais grupos em posição *p*-. Os grupos de compostos de origem natural mais importantes são os flavonóides e seus derivados em extractos de plantas, os compostos fenólicos em plantas aromáticas e especiarias, proteínas e hidrolisados de proteínas, péptidos, aminoácidos e produtos da reacção de Maillard.

## Plantas aromáticas

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos presentes nas plantas aromáticas, o que dificulta determinar qual ou quais os componentes responsáveis pela actividade antioxidante de alguns destes óleos. Muitas são as referências que descrevem a actividade antioxidante dos óleos essenciais extraídos de várias plantas pertencentes a diversas espécies, colhidas em diferentes locais e épocas de desenvolvimento (Ruberto *et al.*, 2000; Dorman *et al.*, 2000; Candan *et al.*, 2003; Mau *et al.*, 2003; Miguel *et al.*, 2003a, Miguel *et al.*, 2003b; Dorman e Deans, 2004; Miguel *et al.*, 2004; Miliauskas *et al.*, 2004; Mensah *et al.*, 2004; Şahin *et al.*, 2004; Agnani *et al.*, 2005; Faleiro *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2005; Ricci *et al.*, 2005; Sacchetti *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Tepe *et al.*, 2005a; Tepe *et al.*, 2005b). Estes são apenas alguns exemplos a partir do ano 2000. Sabendo que a composição química destes óleos, constituída por dezenas ou mesmo centenas de compostos, varia em função de vários factores: idade da planta, parte da planta, estágio de desenvolvimento, local de crescimento, época de colheita, quimiotipo, entre outros, torna difícil obter um produto com características bem definidas de modo a ser usado em qualquer indústria que necessite de utilizar antioxidantes. Para além destes factores, há a acrescentar ainda as diversas formas de determinar a capacidade antioxidante que tem originado resultados, por vezes, díspares (Ruberto e Baratta, 2000; Puertas-Mejía *et al.*, 2002; Pizzale *et al.*, 2002). A Tabela 4 refere os testes geralmente utilizados para a determinação da actividade antioxidante dos óleos essenciais de várias espécies de *Thymus*.

Tabela 4. Testes utilizados na determinação da actividade antioxidante dos óleos essenciais de várias espécies de *Thymus* e *Thymbra*.

Espécie de <i>Thymus</i> e <i>Thymbra</i>	Teste	Referências
<i>T. albicans</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. caespititius</i>	TBARS	Miguel <i>et al.</i> (2004)
<i>T. camphoratus</i>	TBARS	Miguel <i>et al.</i> (2004)
	Índice de acidez e índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2005)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. capitatus</i>	TABRS, DPPH	Bounatirou <i>et al.</i> ( <i>in press</i> )
<i>T. carnosus</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. eigi</i>	Fenóis totais, DPPH, DPPH em TLC, $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Tepe <i>et al.</i> (2004)
<i>T. guyonii</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. mastichina</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	TBARS	Miguel <i>et al.</i> (2004)
	Índice de acidez e índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2005)
	TBARS, sistema micelar	Miguel <i>et al.</i> (2007)
<i>T. munbyanus</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. numiticus</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. pallescens</i>	TBARS, DPPH	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
<i>T. serpyllum</i>	Rancimat, DPPH, TBARS e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Kulisc <i>et al.</i> (2005a,b)
<i>T. spathulifolius</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico) e fenóis totais	Sokmen <i>et al.</i> (2004)
<i>T. sypyleus</i> subsp. <i>sypyleus</i> var. <i>sypyleus</i> e <i>T. sypyleus</i> subsp. <i>sypyleus</i> var. <i>rosulans</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Tepe <i>et al.</i> (2005b)
<i>T. vulgarae</i> L	DPPH, FRAP	Julić e Miloš (2005)
<i>T. vulgaris</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico) e em agar, por difusão	Dapkevicius <i>et al.</i> (1998)
	Índice de peróxidos, Rancimat	Simandi <i>et al.</i> (2001)
	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Sacchetti <i>et al.</i> (2004)
	Rancimat, DPPH, TBARS e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Kulisc <i>et al.</i> (2005a,b)
	$\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico), DPPH, quimioluminiscência (luminol) para superóxido	Sacchetti <i>et al.</i> (2005)
<i>T. x-citriodorus</i>	DPPH, DPPH em TLC, radicais hidroxilo, TBA	Bonzi <i>et al.</i> (2006)
<i>T. x-citriodorus</i>	$\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico), DPPH, quimioluminiscência (luminol) para superóxido	Sacchetti <i>et al.</i> (2005)
<i>T. x-porlock</i>	DPPH e $\beta$ -caroteno-ácido linoleico (espectrofotométrico)	Gachkar <i>et al.</i> (2007)
<i>Thymbra capitata</i>	Índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2003a,b)
	Índice de acidez e índice de peróxidos	Miguel <i>et al.</i> (2005)
	TBARS	Faleiro <i>et al.</i> (2005)

Todos os factores atrás referidos mais os aromas que, geralmente, os óleos essenciais possuem, tornam, por vezes, complicado a sua aplicação na Indústria Alimentar, ou mesmo noutras indústrias como sejam a indústria farmacêutica e a da cosmética. Ruberto e Baratta (2000) estudaram a capacidade antioxidante de cada um dos vários constituintes possíveis dos

óleos essenciais utilizando dois métodos de quantificação: método que mede a formação dos componentes primários da oxidação (hidroperoxidienos) e os componentes secundários da oxidação (malonaldeído) de uma matriz lipídica. Estes autores testaram 98 componentes puros, constituintes naturais presentes em muitos óleos essenciais e que se dividem em 6 grandes subgrupos: monoterpenos não oxigenados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos não oxigenados, sesquiterpenos oxigenados, derivados do benzeno e componentes não isoprenóides. Geralmente os monoterpenos não oxigenados são considerados possuir fraca ou nenhuma actividade antioxidante, contudo, estes autores verificaram que os monoterpenos monocíclicos terpinoleno,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno e o bicíclico sabineno possuíam actividade antioxidante considerável em ambos os testes ensaiados. Dos monoterpenos oxigenados testados (34), o timol e o carvacrol foram os que, de longe, apresentaram a melhor actividade antioxidante, o que não foi estranho uma vez que são compostos fenólicos. Outros componentes do mesmo grupo também apresentaram actividade, mas geralmente com uma capacidade menor quando comparado com estes dois isómeros fenólicos. Tais compostos foram os álcoois alílicos (álcool perilílico, nerol, *cis*-verbenol e geraniol). O linalol possuía actividade pro-oxidante.

Nos sesquiterpenos, só alguns oxigenados apresentavam alguma actividade apreciável, segundo os mesmos autores, sendo mais uma vez os álcoois alílicos os que apresentavam uma maior actividade. O nerolidol possuía actividade pro-oxidante.

Entre os derivados do benzeno, os fenólicos foram os que apresentaram melhor actividade, como por exemplo, o eugenol. Contudo, estes compostos pareceram ser mais eficazes na prevenção da formação dos produtos primários de oxidação do que na prevenção da formação dos produtos secundários da oxidação.

Nos componentes não isoprenóides, a *cis*-jasmona foi a que apresentou melhor actividade antioxidante. Os resultados destes autores pareceram indicar que os componentes dos óleos que possuam átomos de hidrogénio disponíveis, como acontece nos compostos fenólicos ou nos álcoois alílicos, são bons no impedimento da formação de hidroperoxidienos.

Contudo, estes dados não devem excluir o estudo do óleo essencial no seu todo, porque é assim que ele é geralmente usado, tendo, portanto, sempre em atenção os efeitos de antagonismo, de adição, de potenciação ou de sinergismo.

## REFERÊNCIAS

- Agnaniet H., T. Makani, A. Akagah, C. Menut, J. M. Bessière (2005) Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 34-38.
- Bartosz G., A Janaszewska., D Ertel, M Bartosz (1998) Simple determination of peroxy radical-trapping capacity. *Biochemical Molecular Biology International* 46: 519-528.
- Beaudeau JL, MP Vasson (2005) Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In: Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (eds. J. Delattre, J.-L. Beaudeau, D. Bonnefont-Rousselot, Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Becker, EM, LR Nissen, LH Skibsted (2004) Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology* 219: 561-571.
- Berset C, ME Cuvelier (1996) Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Science des aliments* 16: 219-245.
- Boonstra J, JA Post (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
- Bounatirou S, S Smiti, MG Miguel, L Faleiro, MN Rejeb, M Neffati, MM Costa, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils Isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry* (2007, *in press*).
- Bozin B, N Mimica-Dukic, N Simin, G Anackov (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1822-1828.
- Candan F, M Unlu, B Tepe, D Daferera, M Polissiou, A Sökmen, HA Akpulat (2003) Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 87: 215-220.

- Costa D, A Gomes, S Reis, JLFC Lima, E Fernandes (2005) Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Sciences* 76: 2841-2848.
- Dapkevicius A, R Venskutonis, TA van Beek, JPH Linssen (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 140-146.
- Deshpande SS, US Deshpande, DK Salunkhe (1995) Nutritional and health aspects of food antioxidants. . In: Food Antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives. (eds. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong.
- Dorman, HJD, AC Figueiredo, JG Barroso, SG Deans (2000) *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 12-16.
- Dorman, HJD, SG Deans (2004) Chemical composition, antimicrobial and in vitro antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Pelargonium* sp. and *Thymus zygis* oils. *Journal of Essential Oil Research* 16: 145-150.
- Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.
- Faleiro L, G Miguel, S Gomes, L Costa, F Venâncio, A Teixeira, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2005) Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8162-8168.
- Fernandes E, SA Toste, JLFC Lima, S Reis (2003) The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology & Medicine* 35: 1008-1017.
- Fogliano V, V Verde, G Randazzo, A Ritieni (1999) Method for measuring antioxidant activity and its application to monitorino the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1035-1040.
- Frankel E, S Huang, J Kanner, B German (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1054-1059.
- Frankel EN (1993) In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology* 4: 220-225.
- Frankel EN, AS Meyer (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1941.
- Frankel EN, SW Huang, R Aeschbach (1997) Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *Journal of Americal Oil Chemistry Society* 74: 1309-1315.
- Gachkar L, D Yadegari, MB Rezaei, M Taghizadeh, SA Astaneh, I Rasooli (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 102: 898-894.
- Gardès-Albert M, D Jore (2005) Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In: Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (eds. J. Delattre, J.-L. Beaudeau, D. Bonnefont-Rousselot, Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Ghiselli A, M Nardini, A Baldi, C Scaccini (1998) Antioxidant activity of different phenolic feactions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 361-367.
- Ghiselli A, M Serafini, F Patella, C Scaccini (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine* 29: 1106-1114.
- Ghiselli A, M Serafini, G Maiani, E Azzimi, A Ferro-Luzzi (1995) A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 29-36.
- Gil MI, FA Tomás-Barberán, B Hess-Pierce, DM Holcroft, AA Kader (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4581-4589.
- Hagerman AE, KM Riedl, GA Jones, KN Sovik, NT Ritchard, PW Hartzfeld, TL Richel (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1887-1892.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97: 1634-1658.
- Halliwell B.; JMC Gutteridge (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.
- Hazzit M, A Baaliouamer, AL Faleiro, MG Miguel (2006) Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6314-6321;
- Hu FB. (2003) Plant-based food and prevention of cardiovascular diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 544-552.
- Huang D, B Ou, MO Hampsch-Woodill, JA Flanagan, EK Deemer (2002) Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -

- cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1815-1821.
- Huang D, B Ou, RL Prior (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856.
- Huang S W; EN Frankel (1997) Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3033-3038.
- Katsube N, K Iwashita, T Tsushida, K Yamaki, M Kobori (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 68-75.
- Kooy NW, JA Royall, H Ischiropoulos, JS Beckman (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dehydrorhodamine 123. *Free Radical Biological & Medicine* 16: 149-156.
- Kruedener S, H Schemepp, EF Elstner (1995) Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and Fenton-type oxidants. *Free Radical Biology & Medicine* 19: 141-146.
- Kulisic T, A Radonic, M Milos (2005) Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Italian Journal of Food Science* 17: 315-324.
- Kulisic T, A Radonic, M Milos (2005) Inhibition of lard oxidation by fractions of different essential oils. *Grasas y Aceites* 56: 284-291.
- Kweon MH, HJ Hwang, HCH Sung (2001) Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4646-4655.
- Lavelli V, C Peri, A. Rizzolo (1999) Evaluation of radical scavenging activity of fresh and air-dried tomatoes by three model reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3826-3831.
- Lavelli V, C Peri, A. Rizzolo (2000) Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1442-1448.
- Lemańska K., H Szymusiak, B Tyrakowska, R Zieliński, AEM Soffers, MCM Rietjens (2001) The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 869-881.
- MacDonald-Wicks LK, LG Wood, ML Garg (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of Science of Food Agriculture* 86: 2046-2056.
- Maranz S; Z Wiesman, N Garti,(2003) Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6268-6273.
- Martínez-Tomé M, F Garcia-Carmona, MA Murcia (2001) Comparison of the antioxidants and pro-oxidants activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1019-1026.
- Mattila P, J Kumpulainen (2002) Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3660-3667.
- Mau JL, EYC Lai, NP Wang, CC Chen, CH Chang, CC Chyau (2003) Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chemistry* 82: 583-591.
- Mensah AY, PJ Houghtou, GNA Akyirem, TC Fleischer, MLK Mensah, K Sarpong, R Adosraku (2004) Evaluation of the antioxidant and free radical scavenging properties of *Secamone afzeli* Rhoem. *Phytotherapy Research* 18: 1031-1032.
- Merken HM, GR Beecher (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 577-599.
- Miguel G, M Simões, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, L Carvalho (2004) Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86: 183-188.
- Miguel MG, AC Figueiredo, MM Costa, DS Martins, JG Barroso, L Pedro, (2003b) Antioxidant activity of the essential oils isolated from *Thymbra capitata* (L.) Cav. on olive and sunflower oils. *Grasas Y Aceites* 54: 219-225.
- Miguel MG, AC Figueiredo, MM Costa, DS Martins, JG Barroso, L Pedro (2003a) Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. *Nahrung/Food* 30: 397-401.
- Miguel MG, M Falcato-Simões, AC Figueiredo, JM Barroso, LG Pedro, LM Carvalho (2005) Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal Food Lipids* 12: 181-197.
- Miguel MG, LA Costa, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2007) Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *Th. mastichina*, *Th. camphoratus* and *Th. carnosus* essential oils by TBARS and Micellar Model systems, *Natural Product Communications* (Special Edition), 2: 399-406.
- Miliauskas GP, R Venskutonis, TA van Beek (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237.

- Mingfu W, JE Simon, IF Aviles, K He, Q Zheng, Y Tadmor (2003) Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 601-608.
- Nagata N, K Momose, Y Ishida (1999) Inhibitory effects of catecholamines and antioxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *Journal of Biochemistry* 125: 658-661.
- Naguib YMA (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1150-1154.
- Nakamura Y, S Tsuji, Y Tonogai (2003) Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 331-339.
- Nohl L, AV Kozlov, L Gille, K Staniek (2005) Endogenous oxidant-generating systems. In: Oxidants and Antioxidant Defense Systems. The Handbook of Environmental Chemistry (ed. Tilman Grune), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ou B, M Hampsch-Woodill, J Flanagan, EK Deemer, RL Prior, D Huang (2002) Novel fluorimetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2772-2777.
- Pannala AS, R Razaq, B Halliwell, S Singh, CA Rice-Evans (1998) Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Biology & Medicine* 24: 594-606.
- Pellegrini N, P Rizo, M Porcini (1999) Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. *Nutrition* 16: 268-271.
- Pietta P, P Simonetti, P Mauri (1998) Antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4487-4490.
- Pizzale L, R Bortolomeazzi, S Vichi, E Überegger, LS Conte (2002) Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1645-1651.
- Prior RL (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 570-579.
- Prior RL, X Wu, K Schaich (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Puertas-Mejía M, S Hillebrand, E Stashenko, P Winterhalter (2002) *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from orégano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 17: 380-384.
- Pulido R, L Bravo, F Saura-Calixto (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3396-3402.
- Rajalakshmi D, S Narasimhan (1995) Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: Food Antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives. (eds. D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong.
- Re R, N Pellegrini, A Proteggente, A Pannala, M Yang, C Rice-Evans (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological & Medicine* 26: 1231-1237.
- Riboli E, T Norat (2003) Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 559-570.
- Ricci D, D Fraternali, L Giamperi, A Bucchini, F Epifano, G Burini, M Curini (2005) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 98: 195-200.
- Roussel AM, J Nève, I Hininger (2005) Antioxydants et nutrition. In Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (Eds.: Jacques Delattre, Jean-Louis Beaudeau, Dominique Bonnefont-Rousselot). Editions TEC & DOC. Lavoisier, Paris.
- Ruberto G, MT Baratta, SG. Deans, HJD. Dorman (2000) Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica* 66: 687-693.
- Ruberto, G.; Baratta, M. T. (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167-174.
- Sacchetti G, A Medici, S Maietti, M Radice, M Muzzoli, S Manfredini, E Braccioli, R Bruni (2004) Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd, Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3486-3491.
- Sacchetti G, S Maietti, M Muzzoli, M Scaglianti, S Manfredini, M Radice, R Bruni (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.

- Şahin F, M Güllüce, D Daferera, A Sokmen, M Sokmen, M Polissiou, G Agar, H Özer (2004) Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. *Food Chemistry* 15: 549-557.
- Sánchez-Moreno C (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8: 121-137.
- Sánchez-Moreno C, JA Larrauri, F Saura-Calixto (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 270-276.
- Sartor V, PT Henderson, GB Schuster (1999) Radical cation transport and reaction in RNA/DANN hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *Journal of American Chemical Society* 121: 11027-11033.
- Schröder P, J Krutman (2005) Environmental oxidative stress – Environmental sources of ROS. In: Oxidants and Antioxidant Defense Systems. The Handbook of Environmental Chemistry (ed. Tilman Grune), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Serafini M, A Ghiselli, A Ferro-Luzzi (1996) *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 28-32.
- Serafini M, G Maiani, A Ferro-Luzzi (1997) Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3148-3151.
- Serafini M, G Maiani, A Ferro-Luzzi (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition* 128: 1003-1007.
- Shibamoto T (2006) Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 12-25.
- Silva FAM, MFM Borges, MA Ferreira (1999) Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* 22: 94-103.
- Simandi B, V Hajdu, K Peredi, B Czukur, A Nobik-Kovacs, A Kery (2001) Antioxidant activity of pilot-plant alcoholic and supercritical carbon dioxide extracts of thyme. *European Journal of Lipid Science Technology* 103: 355-358.
- Singh G, S Maurya, C Catalan, MP Lampasona (2005) Studies on essential oils, Part 42: chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 1-6.
- Sokmen A, M Gulluce, HA Akpulat, D Daferera, B Tepe, M Polissiou, M Sokmen, F Sahin (2004) The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Chemistry*, 15: 627-634.
- Teissedre PL, EN Frankel, AL Waterhouse, H Peleg, JB German (1996) Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of Science of Food Agriculture* 70: 55-61.
- Temple MD, GG Perrone, IW Dawes (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *TRENDS in Cell Biology* 15: 319-326.
- Tepe B, D Daferera, A Sokmen, M Sokmen, M Polissiou (2005a) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90: 333-340.
- Tepe B, D Daferera, M Sokmen, M Polissiou, A Sokmen (2004) In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eiggsi* M. Zohary et P. H. Davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1132-1137.
- Tepe B, M Sokmen, HA Akpulat, D Dafarera, M Polissiou, A Sokmen (2005b) Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering* 66: 447-454.
- Thérond P, D Bonnefont-Rousselot (2005) Systèmes antioxydants endogènes. In Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. (Eds.: Jacques Delattre, Jean-Louis Beaudeux, Dominique Bonnefont-Rousselot). Editions TEC & DOC. Lavoisier, Paris.
- Unno T, A Sugimoto, T Kakuda (2000) Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine and xanthine oxidase system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 601-606.
- Vinson JA, XH Su, L Zubik, P Bose (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5315-5321.
- Wang SY, H Jiao (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5677-5684.
- Wright JS, ER Johnson, GA DiLabio (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of American Chemical Society* 123: 1173-1185.
- Zhu BZ, N Kitrosky, M Chevion (2000) Evidence of production of hydroxyl radicals by pentachlorophenol metabolites and hydrogen peroxide. A metal-independent organic Fenton reaction. *Biochemical Biophysical*

*Research Communications* 270: 942-946.

Zwart LL, JHN Meerman, JNM Commandeur, NPE Vermeulen (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 202-226.

---

## ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA\*

*L. Faleiro*

Universidade do Algarve, FERN, Campus de Gambelas 8005-139 Faro, Portugal

### AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

A quantificação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais é indispensável na exploração da sua aplicação. Os óleos essenciais, tal como outros agentes antimicrobianos podem exercer os mais variados efeitos sobre a célula microbiana, quer na sua estrutura quer no seu funcionamento e, sempre que possível, a identificação dos alvos celulares deve constituir uma meta. No presente capítulo abordam-se os métodos de avaliação da actividade antimicrobiana utilizados com maior frequência (Bloomfield 1991, Burt 2004, Lahlou 2004).

### Efeito microbiostático ou microbiocida

Dado que não só a acção dos agentes antimicrobianos ocorre contra as células bacterianas, mas igualmente contra as células de fungos, algas, protozoários, entre outras estabelece-se a utilização de termos que englobem a acção sobre todos os tipos de células (mais generalista) ou seja microbiostático e microbiocida. Estes termos indicam pois a divisão da acção dos agentes biocidas em dois níveis. É de salientar que, sempre que se trabalha apenas com um tipo de células então a acção reporta-se a esse grupo, por exemplo se a acção é avaliada contra bactérias, nesse caso os níveis serão bacteriostático e bactericida, se for sobre fungos então os termos a utilizar correspondem a fungistático e fungicida.

O termo microbiostático é o termo utilizado para indicar o nível de acção do agente que provoca uma inibição do crescimento microbiano em condições que permitem o normal desenvolvimento. Este efeito tem carácter reversível uma vez que após a neutralização do agente as células microbianas recuperam a sua capacidade de reprodução (Bloomfield 1991). O efeito microbiocida ocorre no calas após a eso em que as céluxposição ao agente não são recuperadas, ou seja não ultrapassam a lesão provocada pelo agente e, por isso, o crescimento não acontece mesmo após a neutralização do agente (Bloomfield 1991).

A avaliação antimicrobiana é geralmente realizada sob populações microbianas e não sobre células individualizadas e assim pode-se encontrar algumas células em reprodução, enquanto que outras estão mortas ou seja existe uma situação dinâmica e por isso as diferenças entre os valores microbiostáticos e microbiocidas é, por vezes, difícil.

### Cinética da acção antimicrobiana

De modo a estabelecer o efeito microbiostático ou microbiocida de um agente é primordial a análise do crescimento microbiano em condições normais (na ausência do agente e sob condições de nutrição, temperatura e atmosfera favoráveis). O crescimento em sistema descontínuo é o adoptado na generalidade. A Fig. 1 representa as curvas típicas para os efeitos microbiostático e microbiocida. A Fig. 1a) representa a curva de crescimento em condições normais e pode ser dividida em:

- fase exponencial durante a qual ocorre a divisão celular segundo uma relação exponencial (a fase lag foi suprimida pela utilização de um pré-inóculo).
- ..... fase de desaceleração em que o crescimento se atenua no fim da fase exponencial.
- ... fase estacionária o número de total de células viáveis mantêm-se constante. Esta fase ocorre devido a alguns factores tais como o esgotamento de nutrientes ou oxigénio, mudança no valor de pH e a acumulação de produtos tóxicos.

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 137-146, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

... O efeito microbiostático pode ser assumido como um aumento na fase lag em conjunto com uma diminuição da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) que pode ser parcial (como na Fig. 1b) ou total (como na Fig. 1c).

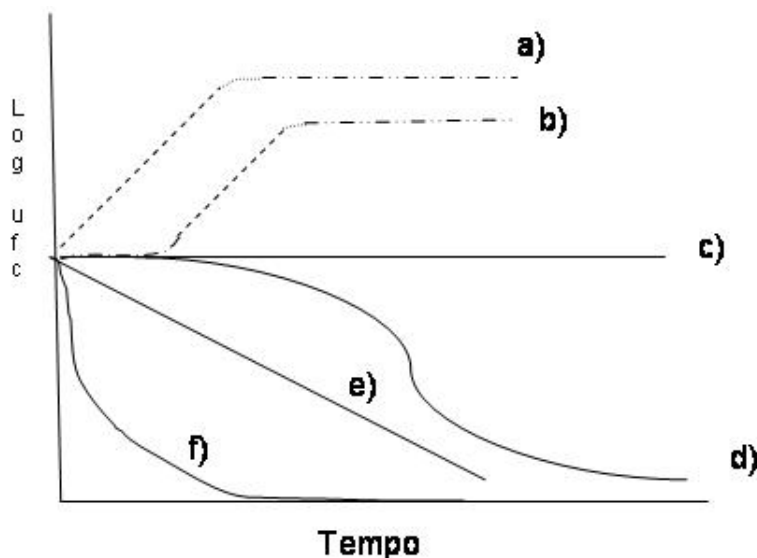


Fig. 1. Curvas de crescimento. Curva normal, a) ---- fase exponencial, ..... fase de desaceleração, - - - - fase estacionária, b) e c) curvas que correspondem ao efeito microbiostático, d) e) e f) curvas de sobrevivência, efeito microbiciocida.

A cinética do efeito microbiciocida é geralmente avaliada através de curvas de sobrevivência. A curva típica de morte está representada na Fig. 1d. As curvas do tipo e) e f) da Fig. 1 estão associadas a taxas de morte elevadas.

A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ou o tempo de duplicação ( $t_d$ ) são dois parâmetros que podem ser utilizados na quantificação da actividade antimicrobiana.

Quando são utilizados métodos turbidimétricos na avaliação do crescimento microbiano o valor de  $\mu$  corresponde ao gradiente do sector da curva que pertence à fase exponencial da curva de crescimento (Koch, 1994). O valor do tempo de duplicação iguala a:

$$\text{Tempo de duplicação} = \ln 2 / \mu$$

No caso de serem utilizados métodos de contagem de células viáveis aplica-se a dois pontos da fase exponencial a seguinte equação (Brock, 1971):

$$K = \log X_t - \log X_0 / (0.301) t$$

Onde  $X_0$  = o valor da população no início da fase log;  $X_t$  = o valor da população no ponto mais elevado da fase log;  $t$  = tempo decorrido entre  $X_0$  a  $X_t$ ; e  $1/K$  = tempo de geração.

### Factores que influenciam a avaliação da actividade antimicrobiana

A avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais é uma tarefa difícil devido à volatilidade destes, bem como à sua insolubilidade em água. É, de particular importância a natureza hidrofóbica e a elevada viscosidade dos óleos essenciais que podem provocar uma irregular distribuição pelo meio de cultura e igualmente uma diluição não homogénea.

De acordo com vários estudos (Janssen *et al.* 1987, Rios *et al.* 1988, Bloomfield 1991) evidenciam-se alguns factores especialmente importantes no estudo da actividade de óleos essenciais: i) a técnica de ensaio, ii) a composição do meio de crescimento, iii) os microrganismos usados, iv) o método de extracção do óleo essencial, v) o valor de pH, vi) a solubilidade do óleo no meio de cultura e vii) temperatura, entre outros. Alguns destes factores são seguidamente abordados.

### A técnica de ensaio

As técnicas frequentemente utilizadas na avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais são geralmente adaptadas dos métodos aplicados aos antibióticos (Hammer *et al.* 1999, Santos *et al.* 1997, NCCLS 2000). Estas técnicas podem ser classificadas de acordo com a necessidade ou não uma dispersão homogénea em água. A técnica que não requer uma dispersão homogénea em água é o método de difusão em agar na qual são utilizados discos, orifícios, cilindros como reservatórios ou discos como fonte de vapor (Janssen *et al.* 1987, Kalemba e Kunicka 2003).

O reservatório contendo o óleo essencial a ser avaliado é colocado em contacto com o meio inoculado, e após incubação, o diâmetro da zona transparente à volta do reservatório (diâmetro de inibição) é medido. Este método foi originalmente desenhado para calcular as quantidades de antibiótico produzidas em extractos crus.

Diferentes tipos de reservatórios podem ser utilizados: discos de papel de filtro ou reservatórios colocados na superfície do meio ou ainda orifícios feitos no próprio no meio de cultura. Em qualquer dos casos a quantidade de óleo e o diâmetro do reservatório são parâmetros cruciais.

Técnicas que requerem uma dispersão homogénea em água (método de diluição; agar ou meio de cultura líquido) são aplicadas para a determinação dos valores de CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CMB (Concentração Mínima Bactericida) através da análise das curvas de crescimento por comparação com a cultura de controlo (sem a adição do óleo essencial).

O método de difusão em agar é o mais utilizado na determinação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais e é considerado bastante preciso, apesar de alguns aspectos menos favoráveis puderem ser apontados, tais como devido à volatilidade dos componentes dos óleos essenciais estes desaparecerem conjuntamente com o solvente durante a incubação, enquanto que os componentes menos solúveis podem não se difundir de modo apropriado no meio de cultura (Janssen *et al.* 1987, Kalemba e Kunicka 2003, Burt 2004). Quando se aplica este método são utilizadas placas de Petri, geralmente de 9 cm que são preenchidas com cerca de 10 a 20 ml de meio de cultura e posteriormente inoculadas com o microrganismo teste. A colocação do óleo essencial é realizada usualmente de duas maneiras: através da disposição de discos de papel (Kim *et al.* 1995, Senatore *et al.* 2000, Burt e Reindres 2003, Wilkinson *et al.* 2003, Faleiro *et al.* 2003, 2005) ou no interior de um poço (orifício) feito no agar (Baratta *et al.* 1998, Lis-Balchin *et al.* 1998, Dorman e Deans 2000).

Os parâmetros a ter em atenção são o diâmetro do disco ou do poço, a quantidade do óleo e do solvente ou emulsionante utilizado. Este último factor parece variar consideravelmente e são várias as substâncias utilizadas, nomeadamente tem sido referida a utilização do álcool (Deans e Svoboda 1989, Sivropoulou *et al.* 1996, Ouattara *et al.* 1997, Marino *et al.* 2001), do composto Tween-20 (Man e Markham 1998, Hammer *et al.* 1999, Pol e Smid 1999, Griffin *et al.* 2000), do composto Tween-80 (Cosentino *et al.* 1999, Mourey e Canillac 2002, Hood *et al.* 2003, Wilkinson *et al.* 2003), do metanol (Niu e Gilbert 2004) e do sulfoxido de dimetilo (Hili *et al.* 1997, Firouzi *et al.* 1998). É, de particular importância que se verifique que as concentrações do agente emulsionante ou o solvente utilizado não prejudicam o crescimento dos microrganismos utilizados. Outro aspecto a ter em conta é o seguimento dos ensaios através da inserção de culturas controlo negativas, ou seja a adição do óleo essencial é substituída por água estéril ou o solvente. Do mesmo modo a inserção de culturas positivas que são constituídas pela adição de um antibiótico padrão em vez do óleo essencial é, igualmente crucial na metodologia de avaliação da actividade dos óleos essenciais.

A eficácia do óleo essencial é revelada pelo tamanho da zona de inibição do crescimento do microrganismo utilizado no teste e o grau de actividade é expresso como o diâmetro da referida zona (em mm ou cm) e, geralmente é incluído o diâmetro do disco.

Em virtude da facilidade de execução e da necessidade de reduzidas quantidades do óleo a testar este método é recomendado na pré-avaliação de um número considerável de óleos essenciais e posteriormente os que apresentam maior actividade são sujeitos a estudos mais aprofundados. Este método é ainda aplicado na verificação da susceptibilidade de um elevado número de microrganismos a determinado óleo essencial.

O método de diluição em agar ou em meio líquido é utilizado, quer em bactérias quer em

fungos. Neste método são utilizados tubos ou frascos de volumes que podem variar de 100ml a 2-5ml de meio de cultura suplementado com diferentes concentrações do óleo essencial a testar. A utilização de métodos baseados em microdiluições tem tido uma crescente aceitação (Shapiro *et al.* 1994, Avato *et al.* 1997, Mann e Markham 1998, Lambert *et al.* 2001, Burt e Reinders 2003, Faleiro *et al.* 2005) e mostra-se um método bastante expedito na determinação dos valores CMI e CMB.

A eficácia da actividade dos óleos essenciais quando se aplica este método, quer se utilize tubos ou microplacas, é verificada por turbidimetria (Faleiro *et al.* 2005), colorimetria (Burt e Reinders 2003) ou ainda por contagem de viáveis (Sivropoulou *et al.* 1997). É forçoso destacar o elevado esforço requerido por este último método em contrapartida com a medição por turbidimetria que é um método muito mais expedito. Os valores CMI e CMB são retirados das curvas de crescimento ou morte como descrito no ponto “Cinética da acção antimicrobiana”.

A aplicação de métodos baseados em microdiluições na avaliação da actividade dos óleos essenciais que são bastante expeditos e com forte aplicação na determinação da susceptibilidade a antibióticos (Chapin e Musnug 2004) podem fornecer um volume de informação incalculável nos nossos dias onde a procura de novos agentes antimicrobianos tem crescido exponencialmente e em particular a de produtos naturais, como os óleos essenciais. A acrescentar a possibilidade destes métodos realizarem um rápida discriminação das estirpes resistentes que actualmente constituem um sério perigo para a saúde pública.

Existem ainda outros métodos menos referidos e que são considerados não-convencionais como, por exemplo, os métodos denominados por microatmosfera, bioautografia e bioimpedimétrico (Burt 2004, Kalemba e Kunicka 2003).

O método denominado por microatmosfera resultou fundamentalmente de uma ligeira modificação do método de difusão em agar e é mais apropriado na determinação da actividade do óleo essencial na fase de vapor. Este método aplica-se a óleos que se destinam a ser utilizados como conservantes de atmosferas. Assim neste método o disco com o óleo essencial é colocado na tampa da placa de Petri que é posteriormente invertida e colocada a incubar. A actividade é expressa do mesmo modo que no método por difusão em agar, ou seja é indicada a zona de inibição do crescimento microbiano (Amvam *et al.* 1998, Bishop *et al.* 1997).

Na avaliação de extractos de plantas é utilizado o método denominado por bioautografia (Rios *et al.* 1988, Tellez *et al.* 2000, Kobaisy *et al.* 2001). Este método é raramente aplicado na avaliação dos óleos essenciais (Rios *et al.* 1988, Sridhar *et al.* 2003). Os extractos são constituídos por diversos componentes que se podem separar através de cromatografia em papel ou por camada fina. Quando o solvente se evapora pode-se colocar o meio de cultura líquido inoculado no papel ou nas placas de cromatografia. Após o período de incubação adequado o crescimento microbiano é avaliado. No caso de actividade o crescimento é nulo e, então os componentes do extracto são eluídos e posteriormente identificados.

O método de avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais não-convencional designado por bioimpedimétrico é caracterizado por ser muito expedito e possuir as vantagens dos métodos rápidos. O método baseia-se na correlação entre a alteração dos parâmetros eléctricos do crescimento microbiano que estão ligados de modo restrito com a actividade metabólica do microrganismo em teste e igualmente ao número de células viáveis. Os resultados desta avaliação são expressos por tempo de detecção (TD). Este parâmetro é definido como o tempo necessário para que a cultura microbiana alcance a quantidade limiar que geralmente é igual a  $10^6$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Deste modo a actividade antimicrobiana do óleo essencial pode ser expressa, quer pelo tempo que a cultura na presença do óleo leva a atingir o tempo de detecção em comparação com a cultura microbiana negativa ou ainda pela taxa de decréscimo do número de células (Lachowicz *et al.* 1998; Wan *et al.* 1998; Marino *et al.* 1999; Marino *et al.* 2001)

### O microrganismo teste

A actividade dos óleos essenciais sobre as células microbianas do mesmo género e espécie determinada nas mesmas condições, de modo geral aparenta ser similar (Faleiro *et al.* 2005, Mourey e Canillac 2002). Ressalve-se a importância de se utilizar um número significativo de

estirpes nesta determinação.

É reconhecido que a actividade antimicrobiana aumenta com o decréscimo do tamanho do inóculo e por isso é crucial que a densidade da população microbiana seja padronizada nestes ensaios.

#### O meio de cultura e o valor do pH

A utilização de determinados meios de cultura na determinação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos como os antibióticos está padronizado e a utilização do meio Mueller-Hinton é a recomendada (NCCLS 2000) e também já foi adoptado na determinação da susceptibilidade aos óleos essenciais (Hammer *et al.* 1999). O meio de cultura pode não só activar ou decrescer a actividade do óleo essencial como pode proteger as células microbianas dos agentes, como os meios de cultura mais ricos. É pois necessário que os vários trabalhos sejam homogéneos, pois tem uma importância vital na comparação da acção antimicrobiana.

Relativamente ao efeito do valor de pH na actividade dos óleos essenciais, é reconhecido que os fenóis e ácidos carboxílicos só podem atravessar a célula microbiana quando estão na forma não carregada e para os compostos dos óleos essenciais eugenol, l-carvone, d-carvone, e mentol a sua actividade é superior quando o valor de pH do meio de cultura sobe de 6 para 8 (Janssen *et al.* 1987, Bloomfield 1991).

O valor de pH pode ainda intervir ao nível de modificações na distribuição da carga na superfície da célula microbiana e por isso a ligação do composto do óleo carregado à célula microbiana pode ser comprometida.

#### **Interacções entre os componentes dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais são misturas complexas de uma enorme diversidade de compostos e a actividade antimicrobiana dos óleos essenciais é pois relacionada com a sua composição, configuração, o seu teor e ainda as possíveis interacções entre eles (Lis-Balchin *et al.* 1998). Três efeitos podem ser destacados: adição, antagonismo e sinergismo. O efeito adicional ocorre quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo ocorre quando o efeito da combinação dos compostos é inferior ao efeito quando são aplicados individualmente. Por outro lado, quando o efeito da combinação dos compostos é maior que a soma dos efeitos individuais está-se na presença de um fenómeno de sinergismo.

Para efeitos quantitativos é utilizado o conceito de concentrações inibitórias fraccionadas (CIF, *fractional inhibitory concentrations*). O valor CIF para cada composto numa combinação é, geralmente, calculado utilizando os valores de CMI. O valor CIF é expresso pela relação entre o valor de CMI do composto na combinação em relação ao valor de CMI quando se aplica a substância individualmente. A soma dos valores CIF (o índice CIF) para os componentes da combinação mais eficaz é o indicador da natureza da sua interacção. O valor do índice CIF aceite como indicador de sinergia é 0,5, e para a adição é 1,0. Se o valor CIF excede este último, então considera-se que ocorre antagonismo (Hodges e Hanlon 1991).

Algumas misturas de óleos essenciais podem resultar ineficazes e o elevado potencial de um óleo pode ficar diluído na combinação e daí a importância da determinação da interacção dos óleos/componentes (Lis-Balchin e Deans 1998).

É importante referir o estudo conduzido por Delaquis e colaboradores (2002) onde testaram misturas de fracções dos óleos essenciais de coentros (sementes e folhas), aneto e eucalipto contra bactérias gram positivas e gram negativas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e foi-lhes possível discriminar os efeitos aditivo, antagonista e de sinergismo.

Em alimentos a actividade antibacteriana resultante da combinação de diferentes óleos essenciais em conjunto com outros agentes antibacterianos (ex: ácidos orgânicos) pode resultar em sinergismo e ao se associarem outras técnicas de conservação (ex: utilização de temperaturas baixas) a inibição bacteriana é bastante mais eficaz (Lin *et al.* 2004).

### Alvos celulares

Em comparação com o número de estudos sobre as características dos óleos essenciais e dos seus componentes o número de estudos sobre os mecanismos de acção é bastante inferior (Lambert *et al.* 2001, Dorman e Deans 2000). De acordo com o elevado número de tipos de compostos químicos que são constituídos os óleos essenciais é de esperar que vários alvos celulares sejam atingidos durante a sua acção (Carson *et al.* 2002). Os alvos celulares referidos como locais de actividade dos óleos essenciais estão representados na Fig 2 e são: a degradação da parede celular (Helander *et al.* 1998), o distúrbio da membrana citoplasmática, alteração da força motriz protónica, fluxo de electrões, transporte activo, coagulação dos constituintes celulares, perda de constituintes celulares (Cox *et al.* 2000, Dorman e Deans 2000, Lambert *et al.* 2001, Ultee *et al.* 2000, 2002). Estas acções estão ligadas a uma das mais importantes características dos óleos essenciais que é serem hidrofóbicos o que lhes permite a distribuição pelos lípidos da membrana celular e mitocôndrias com a consequente alteração da sua estrutura e torná-las mais permeáveis. Nesta altura é pois possível que ocorra a perda de iões e algum teor celular (Lambert *et al.* 2001, Carson *et al.* 2002, Ultee *et al.* 2002)

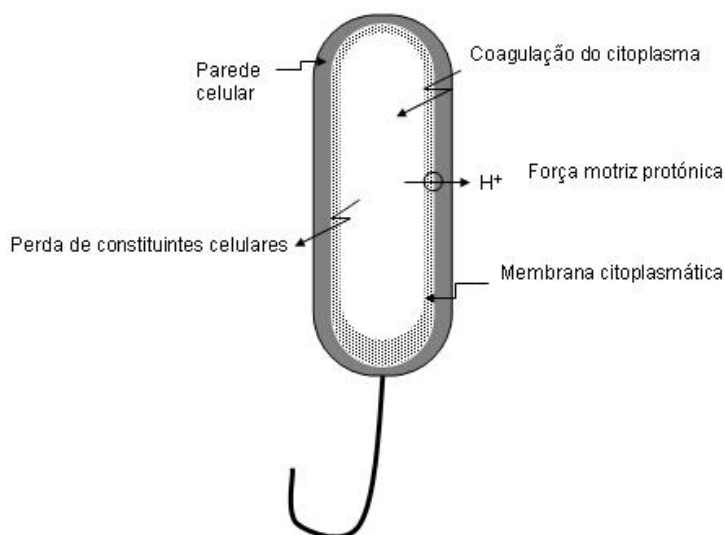


Fig. 2. Principais alvos celulares dos óleos essenciais.

### Avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais em sistemas alimentares

Nos últimos anos tem-se assistido a uma crescente procura de produtos naturais por parte dos consumidores que são actualmente mais intervenientes e exigentes. Este tipo de comportamento direccionou, quer os investigadores quer as indústrias agro-alimentares na pesquisa de aditivos alimentares naturais, em especial os de origem vegetal que possam assegurar um tempo de conservação adequado às novas realidades do mercado global, bem como às preocupações do novo tipo de consumidor (Gould 2001). Deste modo, na última década assistiu-se ao aparecimento de um número significativo de trabalhos científicos sobre a actividade dos óleos essenciais em sistemas alimentares, em particular em carnes e produtos cárneos (Burt 2004).

Muitos dos compostos alvo de estudos recentes já são utilizados à séculos, quer como substâncias aromatizantes, quer como conservantes. No entanto, com a alteração das técnicas de produção face à necessidade de uma vida de prateleira mais prolongada surgiram os designados microrganismos emergentes e, conseqüentemente surgiu a procura de substâncias para o seu controlo. Outro facto preocupante é o aparecimento de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos e a aquisição de resistência pelas bactérias patogénicas de origem alimentar (White *et al.* 2002) que pode constituir um enorme problema para a terapêutica. A utilização de compostos naturais como os óleos essenciais pode ser considerada uma potencial ferramenta no entrave ao desenvolvimento de resistências.

Da análise da avaliação da actividade antimicrobiana dos óleos essenciais *in vitro* e em

alimentos é referida a necessidade de aumentar a concentração do óleo essencial nos alimentos para atingir níveis semelhantes ao dos atingidos *in vitro* (Burt 2004, Holey e Patel 2005). As diferenças nas concentrações utilizadas em alimentos vão desde 2 a 100 vezes à concentração utilizada *in vitro* (Burt 2004). Algumas causas apontadas estão, geralmente ligadas à protecção dos microrganismos nos alimentos, nomeadamente a influência dos factores intrínsecos do alimento onde estão incluídos os teores de gordura, proteína, actividade da água, disponibilidade de nutriente, valor de pH, concentração de sais, a própria estrutura do alimento e ainda os factores extrínsecos que englobam a temperatura de conservação do alimento, a atmosfera e a exposição à flora microbiana. É, de particular importância o facto de existir uma maior quantidade e diversidade de nutriente disponível no alimento, em comparação com os nutrientes disponíveis no meio de cultura que permitem aos microrganismos a reparação mais rápida dos danos causados (Jay 1996, Skandamis *et al.* 2000, Gill *et al.* 2002).

A adição do óleo essencial ao alimento é geralmente directa (Tsigarida *et al.* 2000, Skandamis e Nychas 2001, Singh *et al.* 2003;) ou ainda o óleo essencial ou um dos seus componentes podem ser incorporados em películas que são depois aplicadas no alimento (Ouattara *et al.* 2000, Oussalah *et al.* 2004).

As bactérias patogénicas de origem alimentar que são alvo maioritário nos estudos da actividade dos óleos essenciais em alimentos são *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Aeromonas hydrophyla*, *E. coli* O157:H7 e em menor número as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Burt 2004).

As leveduras e os fungos filamentosos são igualmente importantes, quer em termos de segurança alimentar quer em termos de assegurar uma boa qualidade dos alimentos durante um período mais prolongado. Estes microrganismos têm a capacidade de crescer na maioria dos produtos alimentares produzindo maus odores, descoloração e proteólise através da produção de enzimas como as proteases e lipases (Jay 1996). O mais importante, em termos de segurança alimentar é que podem produzir toxinas que presentes nos alimentos em pequenas quantidades podem causar quadros patológicos muito graves com o comprometimento da vida do consumidor.

A eficácia dos óleos essenciais no controlo de leveduras e fungos filamentosos em alimentos é, igualmente registada com a necessidade da utilização de concentrações mais elevadas do que aquelas utilizadas *in vitro* (Lopez-Malo 2002).

## REFERÊNCIAS

- Amvam ZPH, L Biyiti, F Tchoumboungang, C Menut, G Lamaty, P Bouchet, (1998) Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 107-114.
- Avato P, C Vitali, P Mongonelli, A Tava, (1997) Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives *Planta medica* 63:503-507.
- Bloomfield, S. F. (1991) Methods for Assessing Antimicrobial Activity. In: Denyer, S. P. ; Hugo, W. B. (Eds), *Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation*. Technical series of the Society for Applied Bacteriology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Baratta MT, HJD Dorman, SG Deans, AC Figueiredo, JG Barroso, G Ruberto (1998) Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 235-244.
- Brock TD (1971) Microbial growth rates in nature. *Bacteriology Reviews* 35:39-58.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Burt SA, R.D. Reinders (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36 (3), 162-167.
- Carson CF, BJ Mee, TV Riley (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6): 1914-1920.
- Chapin KC, MC Musgnug (2004) Evaluation of sensititre automated reading and incubation system for automated reading of sensititre broth microdilution susceptibility plates. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (2): 909-911.
- Cosentino S, CIG Tuberoso, B Pisano, M Satta, V Mascia, E Arzedi, F Palmas (1999) In vitro antimicrobial

- activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29: 130-135.
- Cox SD, CM Mann, JL Markham, HC Bell, JE Gustafson, JR Warmington, SG Wyllie (2000) The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88:170-175.
- Deans SG, KP Svoboda (1989) Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science* 64 (2): 205-210.
- Delaquis PJ, K Stanich, B Girard, G Mazza (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptos essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74:101-109.
- Dorman HJD, SG Deans (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.
- Faleiro L, G Miguel, S Gomes, L Costa, F Venâncio, A Teixeira, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2005) Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53:8162-8168.
- Faleiro, ML, MG Miguel, F Ladeiro, F Venâncio, R Tavares, JC Brito, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro (2003) Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology* 36 (1): 35-40.
- Firouzi R, M Azadbakht, A Nabinedjad (1998) Anti-listerial activity of essential oils of some plants. *Journal of Applied Animal Research* 14:75-80.
- Gould, GW (2001) New processing technologies: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society* 60 (4): 463-474.
- Griffin SG, Markham JL, DN Leach (2000) An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 12: 249-255.
- Hammer KA, CF Carson, TV Riley (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86:985-990.
- Helander IM, H-L Alakomi, K Latva-Kala, T Mattila-Sandholm, I Pol, EJ Smid, LGM Gorris (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 3590-3595.
- Hili P, CS Evans, RG Veness (1997) Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology* 24:269-275.
- Hodges NA, GW Hanlon (1991) Detection and measurement of combined biocide action. In: Denyer SP, Hugo WB (Eds), *Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation*. Technical series of the Society for Applied Bacteriology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Holey RA, D Patel (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22:273-292.
- Hood JR, Wilkinson JM, HMA Cavanagh (2003) Evaluation of Common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research* 15: 428-433.
- Janssen, AM; JJ Scheffer, AB Svendsen (1987) Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica* 53: 395-398.
- Jay, JM (1996) Modern Food Microbiology. Heldman DR (Ed) Food Science Text Series. Chapman & Hall, NY, USA.
- Kalembe D, A Kunicka (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813-829.
- Kobaisy M, MR Tellez, CL Webber, FE Dayan, KK Schader, DE Wedge (2001) Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Leaves and its composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:3768-3771.
- Koch AL (1994) Growth measurement. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N. R. (Eds), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lachowicz KJ, GP Jones, DR, Briggs, FE, Bienvenue, J Wan, A Wilcock, MJ Coventry (1998) The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in Applied Microbiology* 26: 209-214.
- Lahlou M (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448.
- Lambert RJW, PN Skandamis, PJ Coote, GJE Nychas (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
- Lin YT, RG Labbe, K Shetty (2004) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5672-5678.

- Lis-Balchin M, SG Deans (1998) Studies on the potential usage of mixtures of plant essential oils as synergistic antibacterial agents in foods. *Phytotherapy Research* 12: 472-475.
- Lis-Balchin M, SG Deans, E Eaglesham (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 98-104.
- Lopez-Malo A, SM Alzamora, E Palou (2002) *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology* 73: 213-218.
- Mann CM, JL Markham (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology* 84: 538-544.
- Marino M, C Bersani, G Comi (1999) Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedimetric method. *Journal of Food Protection* 62 (9): 1017-1023.
- Marino M, C Bersani, G Comi (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67: 187-195.
- Mourey A, N Canillac (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289-292.
- NCCLS (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard - Fifth edition. NCCLS document M7-A5, Wayne, USA.
- Niu C, ES Gilbert (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12): 6951-6956.
- Ouattara B, RE Simard, GJ-P Piette, A Bégin, RA Holley (2000) Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 62:139- 148.
- Ouattara B, RE Simard, RA Holley, GJ-P Piette, A Bégin (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37: 155-162.
- Oussalah M, S caillet, S Salmiéri, L Saucier, M Lacroix (2004) Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52:5598-5605.
- Pol IE, EJ Smid (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29:166-170.
- Rios JL, MC Recio, A Villar (1988) Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23:127-149.
- Santos FA, GMA Cunha, GSB Viana, VSN Rao, AN Manoel, ER Silveira (1997) Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. *Phytotherapy Research* 11: 67-69.
- Senatore F, F Napolitano, M Ozcan (2000) Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 15:186-189.
- Shapiro S, A Meier A, B Guggenheim (1994) The antimicrobial activity of essential oils and essential oils components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 9:202-208.
- Singh A, RK Singh, AK Bhunia, N Singh (2003) Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology* 36:787-794.
- Sivropoulou A, C Nikolaou, E Papanikolaou, S Kokkini, T Lanaras, M Arsenakis (1997) Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 3197-3201.
- Sivropoulou A, E Papanikolaou, C Nikolaou, S Kokkini, (1996) Antimicrobial and citotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44:1202-1205.
- Sridhar SR, RV Rajagopal, R Rajavel, S Masilamani, S Narasimhan (2003) Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:75-96-7599.
- Skandamis P, GJE Nychas (2001) Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced beef stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91:1011-1022.
- Skandamis P, E Tsigarida, GJE Nychas (2000) Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatine gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:31-35.
- Tellez MR, FE Dayan, KK Schrader, DE Wedge, SO Duke (2000) Composition and some biological activities of the essential oil of *Callicarpa americana* (L.) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48:3008-3012.
- Tsigarida E, Skandamis P, GJE Nychas (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology* 89: 901-909.
- Ultee A, MHJ Bennink, R Moezelaar (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1561-

1568.

Ultee A, EPW Kets, M Alberda, FA Hoekstra, EJ Smid (2000) Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174 (4):233-238.

Wan J, A Wilcock, MJ Coventry (1998) The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophyla* and *Pseudomonas fluorescences*. *Journal of Applied Microbiology* 84: 152-158.

White DG, S Zhao, S Simjee, DD Wagner, PF McDermonntt (2002) Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infection* 4:405-412.

Wilkinson JM, M Hipwell, T Ryan, HMA Cavanagh (2003) Bioactivity of *Backhousia citrodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 76-81.

---

## WINE AROMATISATION\*

*I. Tonutti*

TRADALL S.A. (Bacardi Group), 267, Route de Meyrin, 1217-MEYRIN, Switzerland

### SOME OFFICIAL DEFINITIONS AND LEGISLATIVE NOTES ABOUT WINE AROMATISATION

When we talk about aromatised wine we should refer the European Council Regulation 1601/91 and subsequent amendments.

This regulation applies to the “definition, description and presentation of aromatised wines, aromatised wine-based drinks and aromatised wine-product cocktails”.

Article 2 (1) of the regulation states:

Aromatised wine shall mean a drink:

- Obtained from wines defined in points 12 to 18 of Annex I to Regulation (EEC) No. 822/87, as last amended by Regulation (EEC) No. 1325/90 (12), with the exception of retsina table wine, and possible with added grape must, grape must in fermentation and/or fresh grape must with fermentation arrested by the addition of alcohol, as defined by Community legislation,
- To which alcohol has been added as defined in Art. 3 (d), and
- Which has been flavoured with the aid of:

Natural flavouring substances and/or natural flavouring preparations as defined in Art, 1 (2) (b)(i) and (c) of Directive 88/388/EEC,

Aromatic herbs and/or spices and or flavouring food/stuffs,

Which has a minimum actual alcoholic strength by vol. of 14.5% or more and a maximum actual alcoholic strength by volume of less than 22%.

The wine used in the preparation of an aromatised wine must conform to the relevant EU wine legislation (in particular as far as the minimum alcohol content is concerned), and be present in the finished product in a proportion of not less than 75%.

Vermouth itself is further defined in Article 2 (2) (a) as an:

*Aromatised wine ...the characteristic taste of which is obtained by the use of appropriate derived substances, in particular of the Artemisia species, which have must always be used; this drink may be sweetened only by means of caramelised sugar, sucrose, grape must, rectified concentrated grapes must and concentrated grape must.*

Denomination relating to the sugar contents, e.g. sweet, extra-dry, are defined in Article 2 (5). In addition, EU regulation 1122/94 allows for the use of the pure flavouring substance vanillin, identical to that found in natural sources.

Definitions in other parts of the world are broadly similar, with slight variations of the minimum wine content (e.g. 70% in Brazil), and minimum/maximum alcohol contents. In all cases, the base wine and botanicals used must comply with the relevant local legislation concerning these ingredients.

Finally, contrary to some popular beliefs, vermouth is not a “vin cuit” (cooked wine), and, to put to rest another long-standing rumour, it is not a particularly acidic product-in fact; the acidity is often less than that of the average table wine.

## VERMOUTHS

Vermouths could be considered as the most important expression of aromatised wines. What follows describes the history, the ingredients employed and the processes used for the preparation

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 147-154, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

of the finished product.

## History

The origins of vermouths date back to the ancient Mediterranean history. The maceration of herbs and spices in wine was common practice in antiquity, and the invention of aromatised wine, the ancestor of vermouth. Has been attributed to Hippocrates.

Greece abounds of aromatic plants and Crete in particular provided the plants:

Dittany and Wormwood, both of which possess tonic and digestive properties.

It is reported that Hippocrates macerated the flowers of these plants in strong, sweet Greek wine, thereby obtaining a satisfying and digestive beverage, which throughout antiquity and Middle Ages was called *Hippocratic wine or vinum absinthianum*.

Later, the Romans elaborated on the production of such wines by introducing other herbs such as thyme, rosemary, myrtle and celery.

In the Middle Ages the Venetians, who had the monopoly of the spice trade, introduced aromatic plants into Italy, which until then were unknown in that country, and they were used in the preparation of Hippocratic wine. These plants (cardamom, cinnamon, myrrh, clove, rhubarb, ginger and sandalwood) came from East Africa, China, India and Indonesia.

Turin, along with Florence and Venice, was one of the major Italian center of production of Hippocratic wine s and liqueurs from the late eighteenth century.

Piedmont in particular possesses two assets: aromatic plants abounded in Piedmont Alps and their foot-hills, and the bouquet of Piedmont dry and sweet white wines combined very well with the fragrance of herbs.

These two factors doubtless explain why this area became the major center of the vermouth industry in the nineteenth century, when leading names in that sector emerged.

The term “vermouth” derives etymologically from Wermut, the German name of wormwood. While the latter English terms refer to the use of the plant as a vermifuge, the German name is supposedly derived from Wer (man) and Mut (courage, spirit).

When it was introduced into Bavarian the first half of seventeenth century by the Piedmont produces Alessio, *vinum absinthianum* was probably translated literally as Wermutwein, which when it reached France became vermouth.

Today, most of the world’s vermouth is produced in Europe (essentially in Italy, France and Spain) and to a lesser extent in South America, but local varieties are always to be found in all wine-producing countries.

## Vermouth definitions

In basic terms, vermouth is a combination of wine, aromatic plants (hereafter referred to as “botanicals”), sugar, and sometimes grape must in limited quantities and alcohol. Caramel is the only coloring substance authorised, and is used for red vermouths.

The difference between the various types of vermouth lies essentially in the presence or absence of certain botanicals in their formulas.

Broadly speaking, there are two main families – sweet and dry –, which differ in their sugar content. Sweet vermouths contain around 150 grams of sugar per liter, while dry varieties contain less than 50.

Dry vermouths are all white and serve mainly as a base for well-known cocktails, although they may also be drunk straight.

## Ingredients

### Wine

Quantitatively, wine is the most important ingredient of vermouth, since in the EU accounts for at least 75% of its volume. The quality of the final product therefore depends on the quality of the wine employed.

---

Generally speaking, only neutral white wines that do not oxidize are employed; they must be low in tanning and they are not to maderize with age, and turn to a darker color.

### Alcohol

Ethyl alcohol also enters into the composition of vermouths, both to fortify the wine and as a means of extracting the flavouring substances from the botanicals.

It must be from agricultural origin, very pure, extra-neutral and conform to standards laid down by legislation (e.g. max level of methanol or other natural fermentation by-products).

### Sugars

In order to give vermouth its required sugar content, mistelle (muted grape must) or a good dessert wine may be added to the base wine, as well as the necessary amount of good-quality white sugar.

The sugars slightly attenuate the bitterness of certain substances that would otherwise be too strong on the palate.

They give the vermouth body, firmness, and smoothness and thus play a very important role in the preparation. As mentioned above, sweet vermouths contain about  $150\text{g l}^{-1}$ , and dry vermouths less than  $50\text{g l}^{-1}$ .

### Caramel

Red vermouth generally owes its amber hue to caramel, which in Europe is the only coloring matter authorized under Regulation 1601/91. Apart from imparting color, it also confers a special flavour specific to red vermouth, contributing to the body and smoothness.

### Botanicals

As previously mentioned, the botanicals are the natural sources of flavor, which characterize aromatized wines. Several parts of then botanicals are used, e.g.: leaves, flowers, and fruits.

There are so many of these that it would be impossible to list them exhaustively and, of course, the composition of these mixtures is a closely guarded secret of each producer. Anyway some examples are given in Table 1, together with their respective Latin/English/Portuguese botanical names.

Geographical origin of botanicals is very varied, we can mention as examples: Europe, Mediterranean African countries, Madagascar, India, Sri Lanka, China, Nepal, Caribbean islands, Ecuador and many other.

Botanicals employed in wine aromatisation may have aromatic, bitter or both characteristics.

They are normally used in a dry form, which guarantees a better storage without a notable modification of their content of aromatic compounds.

Botanicals are natural sources of flavours and consequently their quality is related, in addition to good cultivation/harvesting practices, to the seasons.

This means that a strict control of the quality of the botanicals is mandatory to guarantee that the aromatisation of the finished product is constant.

### The quality control of botanicals

Complete quality control of botanicals covers many aspects:

- Macroscopic/microscopic, e.g.: respecting of a pre-determinate size, absence of foreign botanical parts, heart, etc.
- Hygiene, e.g.: absence of moulds, absence of insects or part of them, absence of micotoxins
- Analytical: moisture level, water activity, content of a certain amount of essential oils, quality and quantity of characteristic flavour compounds (volatile or not)
- Sensory: presence of the typical sensory character of the botanical in question

Table 1. Some of the botanicals employed as flavouring sources for aromatised wines. (CoE nr. Number of European Council).

CoE nr.	Botanical name	English name	Portuguese name	Botanical family
00056	<i>Angelica archangelica</i> L.	Angelica (roots)	Raízes de angélica, erva do Espírito-Santo	Umbelliferae / Apiaceae
00048	<i>Anthemis nobilis</i> L. (= <i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All.	Roman chamomille	Camomila, macela	Compositae / Asteraceae
00157	<i>Artemisia</i> species	Artemisia	Losna, absinto,	Compositae / Asteraceae
00128	<i>Crocus sativus</i> L.	Saffron	Açafrão	Iridaceae
00128	<i>Cinchona calysaia</i> Wedd.	Cinchona bark	Quineira-amarela	Rubiaceae
00136	<i>Citrus aurantium</i> L. subsp. <i>amara</i>	Bitter orange	Laranjeira azeda	Rutaceae
00139	<i>Citrus limon</i> Risso	Lemon peel	Cascas de limão	Rutaceae
00144	<i>Cnicus benedictus</i> L.	Holy thistle	Cardo-santo, cardo-bento	Compositae / Asteraceae
00154	<i>Coriandrum sativum</i> L.	CorianderR	Coentro	Umbelliferae / Apiaceae
00188	<i>Eugenia caryophyllata</i> [= <i>Syzygium aromaticum</i> (L.)]	Clove	Cravinho, cravinho-da-Índia	Myrtaceae
00214	<i>Gentiana lutea</i> L.	Gentian root	Genciana-das-boticas	Gentianaceae
00218	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Licorice (wood)	Alcaçuz	Leguminosae / Fabaceae
00001	<i>Hibiscus abelmoschus</i> L. (= <i>Abelmoschus moschatus</i> )	Ambrette		Malvaceae
00235	<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Hyssop	Hissopo, hissopo-das-boticas	Labiatae / Lamiaceae
00241	<i>Iris florentina</i> L. (= <i>Iris x germanica</i> L.)	Orris	Lírio, iris	Iridaceae
00249	<i>Juniperus communis</i> L.	Juniper	Zimbro comum	Cupressaceae
00257	<i>Lavandula officinalis</i> L.	Lavender	Lavanda	Labiatae / Lamiaceae
00273	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (= <i>Chamomilla recutita</i> ; <i>Matricaria recutita</i> L.)	Camomile	Camomila, camomila- da-Alemanha, margaca-das-boticas	Compositae / Asteraceae
00280	<i>Melissa officinalis</i> L.	Melissa balm	Melissa, erva-cidreira	Labiatae / Lamiaceae
00296	<i>Myristica fragans</i> (= <i>Myristica officinalis</i> .) (Aril)	Mace		Myristicaceae
00296	<i>Myristica fragans</i> Houtt	Nutmeg	Noz-moscada, moscadeira	Myristicaceae
00316	<i>Origanum majorana</i> L.	Marjoram	Mangerona	Labiatae / Lamiaceae
00316	<i>Origanum vulgare</i> L.	Origanum	Orégão	Labiatae / Lamiaceae
00332	<i>Quassia amara</i> L. F.	Quassia wood	Madeira de quássia	Simarubaceae
00396	<i>Rheum palmatum</i> L.	Chinese Rhubarb	Ruibarbo-da-China	Polygonaceae
00405	<i>Rosa gallica</i> L.	Red rose (buds)	Rosa	Rosaceae
00409	<i>Rubus idaeus</i> L.	Raspeberry	Framboesa	Rosaceae
00414	<i>Salvia officinalis</i> L.	Sage	Salva, salva-das-boticas	Labiatae / Lamiaceae
00425	<i>Satureja hortensis</i> L.	Summer savory	Segurelha	Labiatae / Lamiaceae
00447	<i>Taraxacum officinale</i> L.	Dandelion	Taráxaco, dente-de-leão	Compositae / Apiaceae
00454	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Thyme	Tomilho	Labiatae / Lamiaceae
00474	<i>Vanilla planifolia</i> Jacks. (= <i>Vanilla fragrans</i> )	Vanilla	Baunilha	Orchidaceae
00489	<i>Zingiber officinale</i> R.	Ginger	Gengibre	Zingiberaceae

To complete the above-mentioned controls, it is necessary to apply a series of different

analytical technologies and instrumentations:

- Microscopy: to look for part of insects, specific adulterations (e.g. foreign filaments in saffron pistils)
- ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), e.g.: qualitative/quantitative determination of aflatoxin residues
- Microbiology, e.g.: determination of mould contents
- HPLC, e.g. qualitative/quantitative determination of non-volatile compounds, typically bitter compounds in Cinchona barks, Quassia amara
- GC, e.g. profile of characteristic volatile compounds typical of the botanical under control. When necessary, the amount of certain active principles for which a limit exists in the finished product (as established by the EU Directive 88/388/EEC) is determined
- GC/MS, e.g. identification of foreign compounds/contaminants which may be found during the GC profile evaluation
- Sensory tests: this could be considered as the most important control of the botanicals characteristics. A trained sensory panel performs this control, which consists in evaluating the aroma of the botanical as such, and of an alcoholic extract prepared for this purpose.

A good “picture” of the botanical quality allows us to define the correct use of a specific batch of this botanical, or if necessary its “dilution” with another batch having better characteristics. The maintenance of quality to ensure consistency of the finished product is the main goal.

#### The botanicals mixtures (recipes)

The botanical recipes will determine the final characteristics of finished products, e.g. we can mention “carvacrol” vermouths or “thymol” vermouths related to a typical aroma and the more or less pronounced bitter taste (having normally the vermouths a certain bitter taste).

For the above reason recipes are the “secret” of each brand of vermouth/aromatised wine. Recipes qualitative/quantitative composition of the recipe could be defined as complex (from a few to up to more than twenty botanicals and in a wide range of weights) and for the preparation of the finished product two or more recipes are employed.

The mixtures are prepared using weighing machines allowing the non-disclosure of recipes to the weighing operators but nevertheless keeping the traceability of this important process.

#### The botanical extracts

The botanicals are usually incorporated into the vermouth/aromatized wine in the form of an extract (strictly speaking a “tincture”) that could be produced by macerating them in aqueous alcohol in several ways and/or a distillate obtained by distilling them in the presence of aqueous alcohol.

#### *Techniques applied for extracts/distillates production*

##### *Infusion*

Traditional extraction technique, which is little used by the industry. The extraction is obtained by introducing the botanical into a hot liquid (mainly water).

##### *Maceration*

This is one of the oldest and most employed techniques for botanical extraction. Botanicals are placed in a tank, covered with a mixture of water/alcohol, and are agitated periodically so that they remain constantly covered by the liquid.

The operation is frequently performed in rotating tanks and may last for several weeks (particularly when the botanicals are woody roots, needing in this form a longer time to be completely wetted).

Once the maceration time is completed, the extract is drawn off and the residual botanicals are pressed to collect the required amount of extract.

Some old vermouths/aromatized wines keep the traditional maceration process: botanicals are introduced into a wooden barrel and covered by wine (which is used as solvent instead of the alcohol/water mixture). An operator agitates the botanical mass periodically with a special tool in order to improve the extraction.

Today, thanks to the improvement in the grape process technology, it has been possible to “adapt” some modern wine presses for the maceration of botanicals.

The advantage of this simple technology is that no intervention is required during the maceration process, which can be exhaustive.

Some disadvantages are: the long process, extraction conditions are not consistent (or a special macerator needed) in particular in respect of temperature (classic macerators).

#### *Percolation*

This is another example of an old extraction technique based on diffusion and osmosis phenomena. The botanicals are placed in a conical container and the extraction “solvent” is added from the top.

Slow speed allows a fairly good extraction, as the solvent is recycled from the percolator bottom to the top, the resulting process is speeded up (dynamic extraction) if compared with maceration

Advantages: no specialised operators, short extraction times

Disadvantages: non exhaustive process

#### *Ultrasounds extraction*

An ultrasound source is introduced into a liquid previously added to the botanical that is to be extracted. The botanical cells containing essential oils and other flavour compounds are disrupted, and this modification increases the solvent extraction power and speeds up the process.

Qualitative results are related to the possible thermal degradation of some aromatic active principles. This technology is not used frequently in the industry.

#### *Distillation*

Botanicals are introduced into a pot still and water and/or alcohol is added. The distillation process is started by direct heating or by water vapour.

Volatile compounds are distilled and collected in a separate container by a simple air condenser or by a dedicated water condensing system.

The distillates obtained are composed only of volatile compounds and have a limited stability. In vermouth/aromatized wine distillates are frequently used for “dry” products.

#### *VMHD (Vacuum Microwave Hydro Distillation)*

The extraction is carried out in a reactor under reduced pressure where the botanical is heated by microwaves. Under the combined effect of selective heating by microwaves and vacuum applied in a sequential manner, the contents of the botanical cells are transferred more easily to the outer surface of the tissue.

In addition temperatures inferior to 80°C during short periods protect labile substances from thermal degradation. This technology offers the advantage of obtaining an extract without residual solvents.

As with the distillation process, the product obtained is also in this case composed mainly of volatile compounds.

#### *Supercritical Fluid Extraction*

One of the latest extraction technologies. It was born in the sixties from an industrial point of view and although plants are still very expensive, this technology is becoming more and more employed in the food, flavour, fragrance and pharmaceutical industries.

Supercritical fluids are produced by heating a gas above its critical temperature or compressing a liquid above its critical pressure. Under these conditions, the molar volume is the same whether the original form was a liquid or a gas. The supercritical fluids have solvent power similar to a light hydrocarbon for most solutes.

---

The most widely used SCF for all industries is carbon dioxide; it is non-toxic, non-flammable, readily available at high purity, and has near ambient critical temperature of 31°C (CO<sub>2</sub>; T<sub>c</sub> = 31.1°C, P<sub>c</sub> = 73.8bar)

## VERMOUTH PRODUCTION PROCESS

Prior to the marriage of the ingredients of vermouth, the base wine blend and the botanical extracts/distillates must be prepared.

### Base-wine blend

The preparation of the base-wine blend is performed using traditional processing aids common to all wines and wine-based products, e.g. gelatine, bentonite, charcoal, etc.

### Blending the ingredients

The sugar required in the product is generally incorporated into the base-wine blend, which is then mixed with alcohol, water and the botanical extracts, together with caramel if required, in blending tanks, which often have a capacity of up to 200 000L.

After careful homogenisation of the liquid, the vermouth is then allowed to mature for up to several weeks, in order to achieve a proper harmony and balance of its ingredients.

### Stabilisation

At the end of this maturation time, the vermouth undergoes cold stabilisation treatment. It refrigerated, and is held for several days at around -8°C, close to its freezing point. This precipitates substances (mainly potassium bitartrate), which may form a natural deposit later if vermouth is subjected to low temperature during storage and transport, or to contact with ice when served. The precipitate is removed by a low temperature filtration, guaranteeing the physical stability of the product under all conditions.

Finally, to insure perfect clarity and brilliance, and also biological stability in the case of products with alcohol strength of less than 16% vol., the vermouth is generally subjected to a very fine sterilising filtration immediately before bottling. The latter is carried out using the modern techniques common to other sectors of the beverage industry.

### Analysis

Most of the routine analyses of vermouth are of necessity those used for the analysis of wines, since wines form the basis of all vermouths. In addition modern techniques of gas and liquid chromatography are used to analyse for the volatile and non-volatile compounds which are derived from the botanicals used, and which contribute to the specific aroma and taste of vermouth. In common with the rest of the food industry, great care is also taken today to monitor and limit any low levels of contaminants, using the same techniques, which may potentially be introduced by contact with processing or transport equipment, or packaging materials.

## REFERENCES

- Amerine MA (1973) A multi language dictionary of vermouth ingredients. *Rivista Italiana EPPOS* 15: 504-516.
- Anonymous (1974) From wine of Hyppocrates to vermouth. *Revue Vinicole Internationale* 1-2: 33-36.
- Commiss. Regulation (EC) No 12/94 of 25 January 1994. *Official Journal of the European Communities* L 21, 26/01/94, p. 7.
- Council Directive (EEC) No 1601/91 of 10 June 1991. *Official Journal of the European Communities* L 149, 14/96/91, pp. 1-9.
- Council Directive 88/388/EEC of 22 June 1988. *Official Journal of the European Communities* L 184, 15/07/88, pp. 61-66.

Liddle P, L Boero, Martini & Rossi, Pessione-Torino Italy. In: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2nd Edition, pp. 5980 – 5984. Caballero B, L Trugo, P Finglas (Eds), Academic Press Norwich, U.K.

---

## PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS (PAM'S). Produção, Transformação e comercialização\*

A. S. Joaquim

SOCIDESTILDA – Soc. Portuguesa de Destilação de Óleos Essenciais, Lda. Quinta da Galega, 2840-126 Aldeia de Paio Pires

SEGREDO DA PLANTA – Produtos Naturais e Biológicos, Lda. / GREEN PLANET – Produtos Biológicos, Lda. Praceta Emídio Santana, lote 11 B, Zona Industrial do Casal do Marco, 2840-588 Aldeia de Paio Pires – Seixal

### INTRODUÇÃO HISTÓRICA

As PAM's têm vindo a ser usadas para fins medicinais, desde tempos imemoriais. Já o homem primitivo as utilizava na prevenção e tratamento de várias enfermidades, tendo por base, instintos de nutrição e dedução lógica. Isto é, de forma inconsciente, já seleccionava quais os melhores alimentos e plantas a usar, para cada fim terapêutico. Mais tarde, Hipócrates – o “Pai da Medicina”, estudou e ensinou a utilização das plantas na medicina. Teofrasto e Dioscórides agruparam 500 plantas em várias classes. Galeno elaborou fórmulas que são ainda hoje usadas, embora melhoradas ou modificadas. O seu nome está na origem das fórmulas galénicas.

Até então, todos os médicos e botânicos defendiam o uso da planta como um todo e que os benefícios totais eram superiores à soma das partes.

Paracelso possuía uma posição de ser contra o uso da planta como um todo e a favor dos princípios activos delas extraídos, isoladamente. Da era dos boticários passou-se à era dos farmacêuticos de síntese, época essa que durou até ao início do século XIX.

No entanto, nos últimos 50 anos, verificou-se um novo incremento no uso das PAM's e começou-se a valorizar novamente a Fitoterapia e a Naturopatia, agora, já com bases científicas. Esta valorização deve-se ao facto dos novos medicamentos de síntese produzirem efeitos secundários e dependência e, pelo facto de que, quando se usam as plantas medicinais no seu todo, usamo-las de forma praticamente atóxica.

Garcia d'Orta, Dr Amato Lusitano, Dr João Vigier, Dr Félix de Avelar Brotero, Dr Rui Teles Palhinhas, Dr Raul de Oliveira Feijão, Dr Viveiros de Bettencourt, José Lyon de Castro, Dr Aloísio Fernandes Costa e Prof. Dr Américo Pires de Lima, são alguns dos nomes de renome que prestaram grande contributo no desenvolvimento desta área, em Portugal.

### PRODUÇÃO DE PAM'S

Somos produtores de PAM's há vários anos, seguindo as normas do modo de produção biológico. Somos certificados pela SOCERT-Portugal.

Como produtores, seleccionamos sementes e plantas certificadas para a produção de PAM's, sendo possível garantirmos a conservação do material genético das nossas culturas.

Temo-nos vindo a dedicar à produção de lúcia-lima (*Lippia citriodora*), perpétua roxa (*Gomphrena globosa* L.), alcachofra (*Cynara scolymus* L.), erva cidreira (*Melissa officinalis* L.), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), hipericão do Gerês (*Hypericum androsaenum* L.), flor de fava (*Vicia faba* L.), helicrisium (*Helicrisum italicum*), equinácea (*Echinacea angustifolia*), erva príncipe (*Cymbopogon citratus*), estrela do Egipto (*Coreopsis tinctoria*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), entre outras.

Quando os nossos colectores de plantas recorrem à colheita em locais não poluídos, temos a preocupação de dar-lhes formação para a conservação das espécies, através da reprodução de estacas das plantas colectadas no ambiente, mas nos seus campos de cultivo. Para além de colherem PAM's na natureza, são também produtores de algumas espécies que tenham interesse comercial para a nossa empresa; neste caso, fornecemos as sementes ou estacas das nossas

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 155-157, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

plantas, para garantirmos a conservação do material genético.

### TRANSFORMAÇÃO DE PAM'S

As etapas da secagem e conservação das PAM's são muito críticas. A secagem das PAM's deve ser feita o mais rapidamente possível, à sombra e num local bem arejado e ventilado, para que melhores sejam a qualidade e cor da planta seca. Fazemos também secagem das PAM's num secador eléctrico, com excelentes resultados.

Os piores inimigos das PAM's são o pó, o calor e a humidade. São estes os principais pontos críticos a controlar num Sistema de Autocontrolo HACCP, que está a ser de momento implementado no nosso grupo de empresas.

Dispomos de equipamento em inox, apropriado à transformação de PAM's: secador eléctrico, tamisadora, peneiras manuais, máquinas com vários tipos de corte, moinho de martelos, crivadora com detecção de metais, misturadora, embaladora automática,...

Somos uma equipa empenhada em melhorar o trabalho que desenvolvemos, dia após dia, para que possamos oferecer ao mercado nacional e internacional, chás e tisanas de qualidade!

### COMERCIALIZAÇÃO DE PAM'S

As PAM's são comercializadas em celofanes com um cabeçote identificativo, onde estão discriminadas as seguintes informações:

- Nome da planta
- Parte da planta utilizada
- Nome botânico
- Peso aproximado
- Modo de usar/preparar
- Precauções de uso (quando existam)
- Lote
- Consumir de preferência antes do fim de (2 anos após embalamento)
- Código de barras
- Ponto verde
- Nome e morada da nossa empresa
- Conservar em local seco e fresco ao abrigo da luz e da humidade

As nossas PAM's obtidas segundo o modo de produção biológico, são comercializadas em pacotes de papel reciclado com uma pequena abertura para visualização do conteúdo e um rótulo informativo com as informações acima discriminadas.

Para além das plantas comercializadas individualmente, comercializamos também tisanas compostas, ou seja, 4-5 PAM's misturadas entre si de acordo com fins terapêuticos específicos. Neste caso, para além das informações acima discriminadas, informamos também a percentagem com que cada planta entra em cada composição, para que possamos disponibilizar não só a composição qualitativa como também a quantitativa.

Dentre os vários modos de preparação das PAM's, destacam-se:

- **Infusão:** usada para folhas, flores e plantas delicadas. Colocar uma colher de sopa de plantas em meio litro de água fervente e deixar em infusão durante 5-10 minutos, tapando o recipiente e mexendo várias vezes. Coar e beber quente.
- **Decocção ou Cozimento:** usada para raízes, cascas, caules e sementes de plantas. Este aquecimento prolongado vai permitir a extração dos princípios activos das partes mais lenhosas das plantas. Colocar uma colher de sopa de plantas em meio litro de água. Ao fim de 15-30 minutos, aquecer até levantar fervura e deixar ferver durante 5 minutos. Coar e beber quente.
- **Maceração a Frio:** usada para plantas específicas cujo uso tradicional esteja baseado nesta forma de preparação ou para plantas com algumas contra-indicações. Colocar uma colher de sopa de plantas em meio litro de água fria e deixar em maceração

durante 6-12 horas, mexendo de hora a hora. Coar e beber frio ou morno.

Dispomos de uma equipa de 4 vendedores que cobrem as lojas da especialidade (ervanárias, centros dietéticos, clínicas, para-farmácias, supermercados,...) de todo o país, 2 lojas para venda directa (Seixal e Cotovia) e um restaurante vegetariano (Seixal). Fechamos portanto o ciclo desde a produção à venda directa dos produtos que produzimos.

## **AROMATERAPIA**

### **Definição de Aromaterapia**

A aromaterapia possui as suas raízes nas mais antigas práticas curativas da humanidade. Consiste numa terapia natural que deve ser utilizada em sinergia com outras terapias naturais, para a prevenção e tratamento de várias doenças e sintomas, com o uso de óleos essenciais puros concentrados. O uso frequente dos óleos essenciais contribui para a promoção e manutenção de um estado de saúde e vitalidade.

### **Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são substâncias voláteis aromáticas altamente concentradas, que podem ser obtidos por várias técnicas de extracção: destilação indirecta por arrastamento de vapor de água, pressão a frio das cascas de citrinos e por extracção com solventes orgânicos. De entre estas técnicas, apenas nos dedicamos à destilação indirecta por arrastamento de vapor de água, para a obtenção de óleos essenciais de origem biológica.

Nesta técnica de extracção industrial, uma caldeira com água fervente injecta vapor de água num recipiente contíguo no qual se encontram as PAM's a destilar. Deste recipiente sai o vapor de água misturado com os óleos essenciais obtidos no estado gasoso. Seguidamente, estes vapores sofrem condensação aquando da sua passagem por serpentinas que são arrefecidas com água fria, obtendo-se no final do processo de destilação, uma mistura líquida de óleos essenciais e água de destilação (água floral ou hidrolato), num vaso florentino. Após algumas horas de repouso, os óleos essenciais separam-se da água de destilação, pela diferença de densidades, formando-se duas fases.

A pressão a frio é exclusivamente utilizada para a extracção de óleo essencial das cascas de citrinos, em tabuleiros perfurados por agulhas em toda a sua extensão.

A extracção por solventes orgânicos não é muito utilizada, dado que se trata de um processo muito caro e dispendioso. É particularmente aplicada à obtenção dos óleos essenciais de jasmim e rosa.

### **Principais Aplicações dos Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais podem ser utilizados como matérias-primas nas áreas da cosmética, farmacologia e perfumaria ou usados puros na área da Aromaterapia. As águas florais ou hidrolatos podem ser eficazmente utilizados como tónicos faciais de limpeza.

De entre as principais aplicações dos óleos essenciais em Aromaterapia, destacam-se:

- Inalações de óleos essenciais
- Massagens aromáticas
- Banhos aromáticos
- Compressas aromáticas
- Desodorizantes e Purificadores do Ar
- Perfumes e Colónias

Para mais informações, consultar o nosso Manual de Utilização de Aromaterapia (1).

(1) Manual de Utilização de Aromaterapia (2006), 7ª Edição, Segredo da Planta, Produtos Naturais e Biológicos, Lda.

## O ECOTURISMO E AS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS\*

C. Meireles

Rua Fernão Lopes, 10

6420-062 Trancoso

Desde o século XIX, quando o turismo aparece como actividade organizada, que a indústria turística tem crescido de forma surpreendente, sendo hoje um dos sectores económicos com maior crescimento a nível mundial e uma das maiores indústrias do mundo. Pelo número de pessoas que movimenta, pelos empregos que cria e pelas receitas que envolve é, actualmente, um dos principais impulsionadores económicos de vários países e regiões do mundo.

Contudo, a actividade turística tem quase sempre múltiplos impactos negativos sobre o meio, pelo facto dos valores naturais serem, muitas vezes, o recurso base sob o qual o turismo depende. Estes impactos resultam, sobretudo, da alteração da paisagem natural, pela pressão excessiva sobre os recursos naturais. As consequências ambientais daí resultantes são inúmeras, complexas e difíceis de estimar, sendo frequentes: a deterioração dos habitats e das espécies locais, com a conseqüente diminuição da biodiversidade; o aumento da poluição e da contaminação marinha e costeira; a diminuição da qualidade da água; e a própria deterioração cultural das populações locais.

Nas últimas décadas do sec. XX, quando se verificou uma intensificação turística com diversas consequências ambientais, sociais e mesmo económicas, os impactos negativos da actividade turística começaram a tornar-se preocupantes. Este facto, juntamente com o acréscimo do interesse turístico por ambientes naturais, tem aumentado a preocupação pelos danos que esta actividade pode causar nos ecossistemas locais. Esta preocupação assumiu grande repercussão a partir dos anos setenta, quando se intensificou o debate sobre as questões ambientais a nível global e sobre o modelo de desenvolvimento não sustentável, assente essencialmente no crescimento económico.

Começa-se nesta altura a delinear um novo modelo de desenvolvimento que permita conciliar as diversas lógicas económico-sociais com os processos de sustentabilidade ecológica, objectivando a conservação e preservação dos recursos naturais renováveis e não-renováveis e a melhoria da qualidade de vida da população mundial (Anónimo 1992). O reconhecimento internacional desta problemática ocorreu durante a Cimeira do Rio de Janeiro (realizada em Junho de 1992), na qual 179 países, assinaram o mais ambicioso programa de acções conjuntas com o objectivo de promover, em escala planetária, um novo estilo de desenvolvimento: o desenvolvimento sustentável. Sob esta denominação, pretendia-se um desenvolvimento que atendesse às necessidades do presente, sem comprometer a possibilidade das gerações futuras atenderem às suas próprias necessidades.

Como grande indústria mundial, o turismo é, conseqüentemente, considerado um sector estratégico para alcançar os objectivos do desenvolvimento sustentável. A necessidade de harmonizar esta actividade com o ambiente é enorme, uma vez que a sua sustentabilidade económica se encontra frequentemente dependente da sustentabilidade social e ambiental.

A partir do momento em que a sociedade começa a debater as questões ambientais e a necessidade de um desenvolvimento sustentável, dá-se uma segmentação do mercado turístico, onde aparecem novos produtos com designações próprias. É neste contexto que surge o ecoturismo, como uma alternativa turística que vai de encontro ao desenvolvimento sustentável, e que constitui uma forte alternativa ao turismo tradicional. Apesar desta actividade ser já antiga, a sua importância como grande alternativa económica e agente de desenvolvimento, é relativamente recente. Ainda assim, é já visto como forma de alcançar altos lucros, sobretudo em áreas de grande valor natural.

Segundo a definição de Caballos-Lascurais (1988), apontada como a primeira, o ecoturismo é

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 158-162, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

o viajar para áreas onde a natureza se encontra relativamente bem preservada, com o objectivo específico de a estudar, admirar, ou desfrutar das suas paisagens, da sua flora e fauna, bem como de qualquer manifestação cultural aí existente.

Contudo, muitas têm sido as definições sugeridas para caracterizar o conceito de ecoturismo. Por exemplo, segundo a definição da TIES (The International Ecotourism Society; <http://ecotourism.org>), ecoturismo é o viajar responsavelmente para áreas naturais de forma a conservar o ambiente e melhorar o bem-estar da população local.

Ainda que os detalhes variem com a definição, todas elas têm em comum os seguintes princípios: compreendem o contacto com a natureza e/ou cultura locais, tendo em conta a conservação do património natural e cultura do local de acolhimento; incluem a participação e beneficiação das populações locais; e têm em conta a sustentabilidade da biodiversidade. De forma geral, é um turismo ecológico sustentável, onde ecológico tem a conotação quer ambiental, quer social. Nele é fomentada a contemplação, compreensão e conservação dos valores naturais e culturais do território, assim como a melhoria das condições de vida da população local.

Esta definição implica que o verdadeiro ecoturismo tenha que seguir determinados critérios como sejam: os valores naturais e culturais são a principal atracção turística; a conservação da diversidade biológica e cultural; a promoção do uso sustentável da biodiversidade, através da criação de empregos para a população local; a partilha dos rendimentos sócio-económicos com a população; o aumento do conhecimento ambiental e cultural; e a minimização dos impactos turísticos.

A grande diferença entre o ecoturismo e o turismo tradicional, é que o primeiro tem como principal preocupação, não só o desenvolvimento económico de um dado local, como a protecção e conservação dos valores naturais e culturais nele existentes, sob os princípios do desenvolvimento sustentável.

Consciente da sua importância mundial, as Nações Unidas, designou o ano 2002, como o Ano Internacional do Ecoturismo e promoveu uma série de actividades, das quais se destaca a Cimeira Mundial de Turismo, que teve lugar de 19 a 22 de Maio de 2002 no Quebec (Canadá). Nela participaram 1200 delegados, em representação de 126 países, que adoptaram uma declaração final definindo as principais características do ecoturismo e abordando diversas temáticas com ele relacionadas: política e planificação do ecoturismo; regulamentação; desenvolvimento de produtos, marketing e promoção; e cálculo de custos/benefícios associados ao ecoturismo.

Para além das questões que se prendem com a sua definição, código de ética e parâmetros de certificação, que continuam ainda em debate aceso, o ecoturismo é hoje um mercado muito promissor. De acordo com os dados da Organização Mundial de Turismo (WTO: <http://www.world-tourism.org/>), o ecoturismo já representa na actualidade cerca de 5% do turismo mundial. As perspectivas de futuro são muito animadoras, esperando-se um crescimento acima da média do esperado para o turismo convencional e a triplicação do seu fluxo económico, no prazo de uma geração. Representa assim um mercado muito promissor, especialmente para os países com significativos valores naturais.

Em Portugal, ainda que o património natural e cultural seja muito rico, o desenvolvimento do ecoturismo é recente, tendo sido, de certo modo, impulsionado pela tendência mundial e pelo Programa Nacional de Turismo da Natureza (PNTN), criado em 1998 através de uma Resolução do Conselho de Ministros (n. 112/98 de 25 de Agosto de 1998). Este programa foi especialmente dirigido para as Áreas Protegidas (AP's) nacionais, uma vez que são depositárias de valores naturais importantes e singulares, que podem ser seriamente afectados pela crescente procura turística por áreas naturais. Desta forma, pretendia-se criar um modelo de desenvolvimento turístico sustentável para as AP's, procurando conciliar a preservação dos valores naturais e culturais com uma actividade turística sustentável. Este documento resultou numa ferramenta importante para as AP's, uma vez que define um quadro regulamentar para as actividades recreativas e turísticas que aí se desenvolvem.

Dada a perspectiva de crescimento do ecoturismo e o benefício social e natural que lhe está associado, é uma oportunidade de investimento muito importante, sobretudo em áreas naturais e/ou em AP's.

Um dos vectores estratégicos do PNTN é a diversificação da actividade turística. Embora a

Região mediterrânica seja extremamente rica em valores naturais, a sua exuberância, diversidade e estado de conservação, não é comparável à de outras regiões do mundo, nomeadamente as tropicais (onde vive uma grande parte das espécies identificadas). Neste sentido, o ecoturismo nacional tem que apostar naquilo que o torna verdadeiramente distinto e único, isto é, a sua diversidade de ecossistemas e uma cultura ancestral, muitas vezes associada aos valores naturais do território.

Neste sentido, as plantas aromáticas e medicinais (PAM) podem ser um recurso importante para o ecoturismo, uma vez que conseguem conjugar simultaneamente o interesse de um recurso biológico com a sabedoria popular, que remonta há vários séculos.

Desde tempos remotos que as plantas proporcionaram ao homem os mais variados recursos. Como medicamentos, fibras para protecção, cosméticos ou elementos presentes em rituais religiosos, a importância das plantas ao longo dos séculos ultrapassou em muito o seu papel vital como fonte de alimento.

A utilização das propriedades terapêuticas e aromáticas das plantas remonta a tempos longínquos, como evidenciam registos chineses, egípcios, mesopotâmicos, gregos e romanos (Juscáfresa 1975, Gründ 1983). Descobrimentos recentes datam mesmo a sua aparição há cerca de 5000 anos (Gründ 1983).

Desde o paleolítico mais antigo que o homem utilizava já um conjunto de espécies na preparação de poções, ainda que acompanhassem sempre o seu poder curativo a significados mágicos e a actos religiosos, principalmente porque as doenças eram associadas à invasão do corpo por espíritos malignos (Baker 1970).

Apesar de, inicialmente, a arte da cura ser essencialmente mágica e a quantidade de plantas utilizadas limitada, com o aparecimento da medicina empírica deu-se início à grande utilização das plantas como forma de combater os mais diversos estados patológicos (Naranjo 1995).

Apesar desta utilização primitiva do mundo vegetal, o seu estudo teve apenas lugar numa época mais recente da história. Embora ocasionalmente tenham surgido desenhos de plantas feitos por artistas paleolíticos e de ter sido encontrado um papiro Egípcio datado de 1600 BC com uma lista de plantas medicinais e dos seus usos, a botânica como ciência aparece muito recentemente, tendo as suas raízes na cultura Grega (Baker 1970).

Durante o renascimento surge no velho mundo uma explosão no interesse pelas plantas e pelas suas utilidades (Balick e Cox 1996), a maioria baseado no famoso trabalho de Dioscórides, *Matéria Médica*, publicado no primeiro século AC, no qual muitas características e propriedades de numerosas drogas de plantas foram descritas.

A medicina científica apareceu assim muito mais tarde, sendo o século XVII o que na realidade abriu a porta para o verdadeiro conhecimento científico e compreensão da medicina (Naranjo 1995).

Apesar do avanço da medicina ao longo dos tempos, a utilização das plantas continuou durante muito tempo como algo de grande importância, à semelhança do que tinha acontecido anteriormente. A grande explicação deve estar no difícil contacto das populações rurais com os médicos e do pouco desenvolvimento terapêutico, que nem sempre dispunha de meios para curar muitas das doenças frequentemente mortais. O recurso às possibilidades curativas das plantas era por isso muito grande.

Contudo, com o aparecimento da era mais moderna, caracterizada pelo enorme avanço científico e tecnológico, apareceram novos produtos sintéticos e o recurso a produtos artificiais. Por este motivo, a utilização directa das plantas aromáticas e medicinais experimentou um declínio circunstancial, permanecendo contudo a sua importância na cosmética e na alimentação.

Apesar deste declínio e da crescente quantidade de medicinas disponíveis, a situação parece ter mudado durante a última década, tendo-se assistido a um novo regresso da procura de produtos naturais e do interesse generalizado pelo conhecimento das particularidades utilitárias das plantas. Este interesse específico deve, por isso, ser aproveitado nacionalmente como uma mais valia no campo do ecoturismo, começando já a reflectir-se nas diversas ofertas turísticas existentes no nosso país.

Existem várias formas de utilizar as PAM como atractivo no ecoturismo, algumas das quais começam já a aparecer em Portugal.

Entre elas salienta-se: a promoção de passeios pedestres para reconhecimento de PAM espontâneas; a criação de jardins didácticos para fins turísticos e educacionais; a promoção de feiras e encontros sob o tema das PAM e de outros produtos biológicos (como é o caso dos cogumelos); e o aumento da divulgação de produtos gastronómicos e regionais ligados às plantas utilitárias.

Os percursos pedestres para reconhecimento de PAM espontâneas são já actividades com alguma importância em alguns países, nomeadamente nos países tropicais e mediterrânicos. Na maioria dos casos são actividades bastante bem promovidas (internet, folhetos de áreas naturais, postais, agências de viagem, etc.) e aparecem sob a forma de vários programas e denominações como: percursos pedagógicos, percursos dos sentidos, percursos das plantas com perfume, percurso dos cheiros, etc. Em Portugal o mercado é ainda pequeno, embora comecem a aparecer algumas ofertas, muitas vezes impulsionadas por turistas estrangeiros.

A criação de jardins didácticos, embora implique um investimento inicial e uma manutenção constante, podem tornar-se um grande atractivo local quando bem localizados, cuidados e divulgados. Este tipo de iniciativa aparece já por vários países europeus, muitas vezes associados a áreas naturais. As formas como são apresentados são diversa, desde jardins mistos de PAM, jardins de cheiros ou jardins de plantas medicinais.

A promoção de eventos, como feiras e encontros, sob o tema das PAM e de outros produtos biológicos (como é o caso dos cogumelos), bem como a valorização de produtos regionais ligados às PAM, são outras formas, cada vez mais frequentes, de atrair turistas a determinados locais.

No sector privado começam já a aparecer ofertas deste tipo, integradas em diversos pacotes de turismo ligado à natureza. Também, em diversas localidades, se começa a apostar em feiras de PAM, como atracção turística. Contudo, como locais privilegiados em termos de conservação e de valores naturais, as AP's têm um papel pioneiro e importante a desenvolver neste âmbito. Na realidade, alguns dos relatórios sobre os enquadramentos estratégicos do turismo da natureza de várias AP's, realizados no âmbito do PNTN, referem já a importância das PAM no contexto turístico, considerando-as mais valias e produtos regionais importantes, nomeadamente nas vertentes educativa e gastronómica. Refira-se que o ICN, agora ICNB, deu início em 1999 a um programa nacional que permitiria estudar as PAM utilizadas em Portugal, tendo como espaço de amostragem as AP's. Este projecto permitiu conhecer o elenco florístico aromático e medicinal utilizado pela população e recolher todo um conjunto de conhecimentos populares em risco de se perder, à medida que a população detentora destes saberes vai envelhecendo e, inevitavelmente, desaparecendo. Os resultados mostraram uma enorme sabedoria popular sobre as PAM e um grande número de plantas utilizadas pela população (de onde se salientam cerca de 600 espécies espontâneas da flora portuguesa). Estas conclusões vêm uma vez mais apoiar a ideia de que as PAM podem ser um valor natural importante para o ecoturismo, que se começa já a utilizar no nosso país, mas cujas potencialidades podem ser ainda melhor aproveitadas. Refira-se que, num território mediterrânico como o nosso, onde a riqueza biológica é muito elevada e a presença Humana secular, o património florístico e todas as práticas e saberes tradicionais a ele associado, podem ser um grande atractivo para um turismo que se quer, cada vez mais, ecologicamente sustentável.

## REFERÊNCIAS

- Anónimo (1992) *Declaração do Rio sobre Ambiente e Desenvolvimento*. Conferencia das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento, Rio de Janeiro (Brasil).
- Baker HG (1970) *Plants and Civilization*. 2ª edição. University of California, Berkeley, Pp. 194.
- Balick MJ, PA Cox (1996) *Plants, People, and Culture. The Science of Ethnobotany*. Scientific American Library, New York. Pp 228.
- Gründ (1983) *Plantes Médicinales*. ED.Ed. Gründ, Paris. Pp. 319.
- Juscafresa B (1975) *Enciclopedia Ilustrada - Flora Medicinal Tóxica Aromática Condimentícia*. Editorial Aedos. Barcelona. Pp. 542.
- Naranjo P (1995) *The Urgent Need for the Study of medicinal Plants*. In Schultes RE, S Reis (eds). Pp. 414.
- Resolução do Concelho de Ministros n. 112/98 de 25 de Agosto de 1998*. Relativa à criação do Programa

Nacional de Turismo de Natureza, aplicável na Rede Nacional de Áreas Protegidas. Presidência do Conselho de Ministros. Diário da República I Série B.  
<http://ecotourism.org>. - The International Ecotourism Society. Versão de Dezembro de 2005.  
<http://www.world-tourism.org/> - World Tourism Organization. Versão de Dezembro de 2005.

---

## ECOTURISMO (OU) OS NOVOS ECOS DO TURISMO\*

*F. Completo*

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril, Av. Condes de Barcelona, 2769-510 Estoril

### PRESSUPOSTOS PARA O ENTENDIMENTO DO PARADIGMA DOMINANTE DO DESENVOLVIMENTO TURÍSTICO

O Turismo é declaradamente a mais importante actividade económica da contemporaneidade. Segundo dados publicados pela Organização Mundial do Turismo (O.M.T.), ao turismo, corresponde actualmente uma taxa de emprego mundial na casa dos 10% e uma taxa de rentabilidade económica global na casa dos 13% em resultado das receitas, a montante e a jusante da realização de 800 milhões de viagens turísticas em 2005.

Um estudo prospectivo sobre a actividade turística para 2020, realizado pelo mesmo organismo aponta para a duplicação deste número no final da próxima década\*, e prevê o crescimento significativo do mercado turístico alternativo, onde despontam as práticas de turismo de natureza com um crescimento anual previsto de 5% ao ano. O mesmo estudo avalia o ecoturismo e o turismo de aventura como os produtos de maior projecção e desenvolvimento na actualidade, com taxas de crescimento na casa dos 7% ao ano.

A aparente democratização\*\* do acto turístico, consequente do crescimento económico pós-industrial da segunda metade do século XX, determinou como destinos privilegiados de procura turística, os territórios de sol e mar, para consumo balnear e, os espaços urbanos de reconhecida valorização histórico-patrimonial, para consumo de produtos culturais.

Este modelo de desenvolvimento turístico, centrado em dois pólos territoriais distintos, gerou ao longo de três décadas\*\*\* uma mecânica progressiva e maximalista de concentração do mercado turístico, promovendo nas dinâmicas de oferta e de procura, uma desenfreada e muita das vezes anárquica, infra estruturação hoteleira e uma elevada massificação turística.

Comparando os dois tipos de territórios, onde o modelo de concentração turística dominante se implantou podemos dizer que a pressão turística exercida sobre os contextos urbanos, foi mais facilmente controlada, não só pelo facto de existirem instrumentos reguladores de ordenamento territorial, mas também porque o *capital* de atractividade turístico-patrimonial era imutável, exclusivo e só por si duradouro, e também porque existia uma eficaz monitorização da sociedade local.

Por oposição, a actividade turística, vista como um pólo fundamental de desenvolvimento económico, por via do efeito multiplicador que gerava\*\*\*\*, exerceu uma enorme pressão nos territórios balneares, provocando profundas alterações de ordem física, ambiental e sócio-cultural.

A pressão decorrente da elevada concentração da procura e da consequente edificabilidade turística, acarretou profundas alterações geo-morfológicas e paisagísticas em determinados territórios.

A ultrapassagem da capacidade de carga turística, reduziu claramente a qualidade do produto turístico oferecido e veio abreviar drasticamente, os limites de durabilidade do ciclo de vidas de muitos destinos.

O desordenamento territorial e a descaracterização urbanística, somados aos impactos de

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 163-167, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

\* 1.600 milhões em 2020

\*\* Aparente, porque muito embora estejamos a falar de aproximadamente 800 milhões de viagens turísticas em 2005, importa referir que esse número reporta somente 10% da população mundial e que mais de 80% desse transito se dá, quer em sede de emissão, quer em sede de recepção, no hemisfério Norte e entre (de/para) os países, mais ricos do mundo.

\*\*\* De 1950 a 1980, no período a que o economista francês Jean Fourastié, designou como “os anos dourados da economia europeia”

\*\*\*\* Ao nível das receitas, do mercado de emprego, e da qualificação infraestrutural

ordem ambiental, provocados pela massificação turística, são factores que gradualmente colocaram em causa um sistema turístico assente numa monocultura económica autofágica para o próprio mercado turístico e depredadora para o contexto territorial.

O efeito material da singularidade e genuinidade de cada território e de cada comunidade nele residente, foi literalmente posto em questão por um paradigma de tendência hegemónica que através de modelos artificiais, procurou recriar ambientes e paisagens que respondessem ao ideal - tipo de territórios sonhados como destino turístico de eleição. A introdução de espécies vegetais exógenas e muitas das vezes infestantes, a chamada *cocoonização* ou *palmeirização* dos territórios marginais às praias, são exemplos manifestos de uma desvalorização das paisagens autóctones.

A própria construção hoteleira, em muitos casos, ignorou as especificidades da arquitectura tradicional local, evocando princípios maximalistas de gestão de recursos financeiros para edificar segundo um padrão totalmente descontextualizado para a região.

As comunidades locais, se inicialmente, numa perspectiva económica, beneficiaram do efeito multiplicador da actividade turística, rapidamente foram suplantadas pelo efeito inflacionista que o turismo provocava, sofrendo também os impactos decorrentes do processo de alteração sócio-cultural.

O modelo turístico dominante está então basicamente alicerçado na oferta de territórios de sol e mar, altamente saturados e onde a representação social do turista se reduz a uma atitude contemplativa e passiva, não havendo, espaço e motivação para outro tipo de intercepções que não aquela que decorre do facto de estar num ambiente cénico, muita das vezes simulado ou construído.

Todos estes factores, que decorrem da massificação turística e dos impactes que ela promove, associados a profundas alterações de ordem climática e a uma manifesta e crescente consciência ecológica, tem vindo, desde a década de 90 a reduzir a procura dos territórios de sol e mar e a ajudar a implementar um sistema diferenciado de procura e de oferta de territórios e de produtos turísticos alternativos.

### **O (DES)ENVOLVIMENTO TURÍSTICO: A EMERGÊNCIA DO MODELO TURÍSTICO ALTERNATIVO. (PRESSUPOSTOS PARA O ENTENDIMENTO DO PARADIGMA EMERGENTE)**

O modelo turístico alternativo, inscreve-se em três princípios que se complementam. Se por um lado, o conceito focaliza o consumo de novos territórios em alternativa ao espaço litoral-balnear, por outro possibilita a emergência de um conjunto perfeitamente inovador de segmentos e de novos produtos turísticos. Em terceiro plano, o modelo alternativo sustenta-se como oposição a um modelo concentrado e massificador e defende como princípio, processos turísticos integradores e responsáveis, onde se valoriza a diversificação de uso dos territórios turísticos e se defende a necessidade de se diferenciar os produtos turísticos oferecidos.

A valorização das potencialidades endógenas e das comunidades locais também é uma das principais características do turismo alternativo. Esta variedade de linhas de acção, conceptualizam o turismo alternativo como um sistema emergente e promotor de uma nova cultura turística.

Esta nova corrente, encontra-se alicerçada no paradigma do turismo sustentável e procura articular a actividade turística como instrumento de desenvolvimento social, económico e cultural das áreas territoriais onde se aplica.

Dentro deste conceito, enquadram-se produtos como o turismo rural, o turismo de aventura e o ecoturismo.

### **ECOTURISMO: DEFINIÇÕES E CONCEITOS**

Não existe, em torno da definição de *ecoturismo*, um singular consenso, no que diz respeito à sua autoria e muito menos quando se trata de encontrar, para ela uma determinante e exclusiva clareza conceptual.

---

A multiplicidade de usos a que a expressão está sujeita, trespassa a natureza ideológico-científica, que lhe serviu de enfoque inicial para assumir um particular destaque de identificação, ao nível do senso comum\*\*\*\*\* e ao nível da operação e do mercado turístico.

Enquadrado no sistema de turismo de natureza e muitas das vezes confundido com ele, o ecoturismo, ainda referenciado com *ecological tourism*, foi pela primeira vez enunciado em 1965, por W. Hetzer, na sua obra “environment, tourism, culture” e centrava a sua tese em quatro permissas:

- Respeito pelas culturas locais
- Minimização dos impactos ambientais
- Maximização da satisfação do turista
- Maximização dos benefícios atribuídos às comunidades locais

Já nas décadas de 70 e 80, no Canadá, surgiu como produto turístico para um mercado restrito um conjunto de iniciativas designadas como *ecotours*, com o objectivo de promover rotas interpretativas de elevada qualidade cénica, desenvolvendo um corredor turístico ao longo da auto-estrada trans-Canadá.

Todavia a primeira definição formal de ecoturismo surge somente em 1987, quando Ceballos-Lascuráin diz que “*ecoturismo é viajar para áreas naturais conservadas e não perturbadas com o objectivo específico de estudar, admirar e desfrutar a paisagem, as plantas e animais, assim como qualquer outras manifestações culturais - passadas e presentes, existentes nessas áreas.*”

Centrada no princípio do *nature-based tourism*, esta definição foi posteriormente complementada pelo primado do desenvolvimento sustentável, que advoga o princípio da responsabilidade social, como processo integrador de acção entre os visitantes, o meio ambiente e a comunidade de acolhimento, na procura do equilíbrio sócio-ambiental.

Esta clara interacção entre os agentes interventores na cadeia de desenvolvimento do turismo de base natural, encontra-se na definição proposta pela International Ecotourism Society, referindo ser o ecoturismo um segmento especializado do amplo turismo baseado na natureza e que enquadra “*viagens responsáveis para áreas naturais que ajudam a conservar o meio ambiente e promovem o bem estar das populações locais*”

Esta definição assenta, claramente num triângulo funcional, cujos vértices são:

- A base do território natural de acção,
- O sistema de envolvimento com a comunidade no processo de gestão e operacionalização do produto turístico
- A matriz documental, informativa e pedagógica que envolve a própria motivação de procura deste produto.

Estas três dimensões são consideradas para permitir ao ecoturismo absorver ao mesmo tempo questões ambientais e culturais, enquadrando as suas funções fundamentais estabelecidas em 1999 por Sheryl Ross e Geoffrey Wall:

- Educação
- Protecção de áreas naturais
- Valorização económica das comunidades locais
- Envolvimento e participação da comunidade local
- Qualidade da experiência turística

A participação das comunidades locais, a valorização da economia local e a qualidade da experiência turística são as bases conceptuais para a gestão sustentável do ecoturismo e são o fundamento para uma definição mais abrangente proposta por Martha Honey em 1999 na sua obra “*Ecotourism and sustainable development: Who owns paradise?*” que refere que o “*ecoturismo envolve viagens de pequenos grupos a áreas conservadas, frágeis e em geral protegidas, com o compromisso e intenção de provocarem o mínimo impacto. O ecoturismo promove a educação do viajante, recursos para a conservação da natureza e direcciona os benefícios para o desenvolvimento económico e para o fortalecimento político das comunidades locais, promovendo o respeito por culturas diferentes e pelos direitos humanos.*”

Esta definição enquadra o ecoturismo no modelo de desenvolvimento sustentável e encontra

---

\*\*\*\*\* erradamente identificada como turismo verde, responsável, sustentado.....

afirmação institucional, quer em 2000, no acordo de Mohonk (USA), quer na Declaração do Québec (Canadá) em 2002. Em ambos os casos se defende que o *“ecoturismo é uma forma de turismo sustentável em áreas naturais, que beneficia o meio ambiente e as comunidades visitadas e que promove a educação ambiental, o respeito e a consciência sobre o ambiente e as culturas locais.”*

## **O ECOTURISMO, O AMBIENTE E AS COMUNIDADES LOCAIS**

O ambiente é uma das principais preocupações do ecoturismo, nomeadamente o ambiente em territórios ecologicamente frágeis. Como o produto turístico neste contexto depende em larga escala do consumo da natureza, os impactos que ele provoca devem ser minimizados. Os estudos realizados em muitos territórios naturais, sobre a questão dos impactos, ficaram muitas das vezes circunscritos à identificação e diagnóstico dos elementos geradores de ultrapassagem da capacidade de carga, encontrando maiores dificuldades quando se trata de encontrar mecanismos técnicos de planeamento que fixem e que limitem essa situação.

Uma outra situação de significativa importância, prende-se com o tipo de benefícios e com o modelo de participação que as comunidades locais desempenham no processo de planificação e de acção de propostas de ecoturismo.

Conceptualmente o ecoturismo atribui uma singular importância à participação das comunidades locais, potenciando a curto e a médio prazo, a capacidade local de planeamento e de decisão sobre o tipo de propostas turísticas que devem ser aplicadas no território de incidência.

O grau de controle e de decisão, funciona como um instrumento regulador e é um significativo elemento de sustentabilidade, dentro da cadeia de promoção e de acção turística, numa lógica de total valorização, não só das potencialidades físico-paisagísticas dos territórios, mas também dos elementos culturais que as comunidades apropriaram na sua relação com o meio ambiente.

Claramente o ecoturismo deverá funcionar, no quadro comunitário de referência territorial, como um instrumento, que produz directamente benefícios económicos, mas que ao mesmo tempo minimiza os impactos ambientais e sócio-culturais decorrentes do uso turístico e destaca a exclusividade e genuinidade dos territórios, dos produtos e do conhecimento e uso que a comunidade local faz de uns e de outros.

## **O ECOTURISMO, AS COMUNIDADES LOCAIS E AS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS (PAM)**

O contexto do turismo alternativo, onde o ecoturismo se inscreve, atribui uma enorme importância ao processo que os produtos turísticos temáticos, desempenham na garantia de diferenciação e de exclusividade dos territórios verdes e das populações que os ocupam. Com efeito, a participação das comunidades locais, não se restringe à criação e aplicação de modelos de gestão turístico-ambiental.

A aplicação e transmissão de conhecimentos sobre o território e o seu ecossistema, recriada na forma de percursos e rotas temáticas, sistematiza um conjunto de saberes sobre a fauna e a flora locais, que associados a formas lúdicas, recreativas e desportivas, (teatralização popular, canto, conto, jogos de estratégia, orientação e aventura) tem vindo a ampliar a procura turística por tipos específicos de territórios que combinam o potencial natural, com as dinâmicas culturais da comunidade local.

Neste caso o profundo conhecimento das endogenias ecossistémicas, ao nível da fauna e flora, que as comunidades locais detêm, é fundamental para, em associação com formas de reprodução cultural local, criar pacotes turísticos específicos que cruzem o conhecimento empírico e ancestral sobre as propriedades medicinais de determinada planta; sobre a importância económica da turfa, ou sobre a perigosidade de determinado cogumelo, com preparação de chás, efusões ou pratos tradicionais, com produtos da floresta. Este tipo de produto turístico, para além de rentável do ponto de vista turístico económico, funciona como um instrumento de promoção e divulgação da cultura e do modo de vida locais.

A formação de guias entre as comunidades de acolhimento, a criação de empresas de

animação ambiental, o surgimento de instrumentos de informação e divulgação e a criação de redes empresarias de produção, embalagem e exportação, têm sido factores de desenvolvimento integrado e complementar à política de implementação de actividades ecoturísticas.

A criação de uma rede nacional de identificação, observação, produção e recolha sustentada de plantas aromáticas e medicinais, encontrará no modelo de animação ambiental e desenvolvimento ecoturístico, um veículo de promoção e divulgação de acrescido valor natural e de reconhecida valorização económica.

## REFERÊNCIAS

- Barkin D. (1996) Ecotourism: A tool for sustainable development. London, Routledge  
Fennell D. (2002) Ecotourism. London, Routledge  
Newsome D. *et al.* (2002) Natural area tourism. Clevedon, channel View  
Honey M. (1999) Ecotourism and sustainable development: Who owns paradise? NY, Island Press  
Wearing S., Neil J. (2001) Ecoturismo. S. Paulo, Manole  
WTO (2003) Sustainable development of ecotourism. Madrid, WTO
-

## ESTUDO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS\*

J. S. Camejo Rodrigues

EN8, Nº 57, Ameal, 2565-641 Ramalhal

A Etnobotânica é uma área científica que estuda a relação que existe entre o Homem e as plantas e o modo como as populações usam os recursos vegetais.

A Etnobotânica é uma área científica multidisciplinar que abrange diversas áreas como a Botânica, a Ecologia, a Antropologia, A Linguística, A Sociologia, a História, a Medicina, a Farmacologia, a Fitoterapia, a Economia, o Comércio, etc.

O termo “etnobotânica” surge pela primeira vez em 1895 com o botânico norte americano John W. Harshberger (Balick e Cox, 1996), para descrever estudos sobre plantas utilizadas pelos povos primitivos e aborígenes. Desde então a etnobotânica como ciência tem-se desenvolvido e várias definições foram surgindo, todas elas focando os modos de utilização das plantas por parte do Homem, nos conhecimentos tradicionais de um povo ou população.

A estrita ligação Homem-Plantas é já bastante antiga. Desde tempos muito remotos que o Homem aprendeu a utilizar as plantas para seu proveito. Muitos povos ou civilizações foram armazenando um vasto conhecimento acerca de como usar muitas e variadas plantas. O Homem aprendeu a usar e manipular diversas plantas que possuem poderes curativos, tendo muitas delas desempenhado um importante papel no desenvolvimento da Medicina ao longo de vários séculos.

Se por um lado o conhecimento sobre as plantas e suas virtudes levaram à sua investigação científica e por conseguinte permitiram o avanço da Medicina, por outro lado foi no seio das comunidades rurais e dos povos indígenas que se estabeleceu a mais íntima relação Homem-Plantas, relação esta muitas vezes fulcral para o desenvolvimento das populações e para a sobrevivência individual. Foi neste último contexto que estes saberes-fazer acumulados, vindos da experiência (e experimentação) humana, se conservaram e foram transmitidos ao longo das gerações por transmissão oral.

Se bem que no passado a medicina caseira fosse muito comum e desempenhasse para muitas populações a única forma de acesso a curas, hoje em dia, nas sociedades ditas mais desenvolvidas, é relativamente fácil o acesso à chamada Medicina Convencional e a muitos e variados fármacos. Assim, a medicina popular tende a representar, cada vez mais, um papel secundário, principalmente nas sociedades mais desenvolvidas e urbanas.

Em Portugal existe ainda um vasto manancial de conhecimentos acerca dos usos populares e tradicionais das plantas. No entanto, a utilização das plantas em remédios caseiros é uma prática que vai diminuindo de intensidade e importância, mesmo nas comunidades rurais. A facilidade com que hoje em dia se tem assistência médica e o progressivo afastamento do modo de vida rural pela maioria da população leva a que as pessoas, e principalmente os mais jovens, não sintam necessidade, interesse e incentivo para aprender os saberes ancestrais dos usos dos recursos vegetais. Assim sendo, estes saberes tornam-se cada vez mais reliquias e persistem quase exclusivamente nas pessoas mais antigas. Deste modo, estes saberes tradicionais, que são parte integrante do património cultural de um povo, tendem a desaparecer com o tempo ou mesmo a extinguir-se a médio prazo caso nada se faça para o impedir. É deste modo urgente fazer o máximo de recolhas etnobotânicas, enquanto ainda é tempo.

Tal como comentam Bonet *et al.* (1999), “a recolha dos saberes-fazer tradicionais é uma verdadeira operação de salvamento de um conhecimento popular sobre plantas, conhecimento esse que pode ser considerado uma herança global já que cada uso fitoterapêutico referido por uma comunidade local pode vir, no futuro, a servir de base a uma cura actuante à escala global”.

Recentemente tem vindo a crescer no nosso país um interesse sobre este assunto e uma preocupação com a extinção destes conhecimentos. Ao contrário de muitas regiões do globo (como por exemplo na nossa vizinha Espanha), no nosso país apenas nos últimos anos se

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Curso Teórico-Prático, pp. 168-174, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

Tabela 1. Resumo dos estudos etnobotânicos sobre PAM feitos em Portugal até à data.

Titulo	Região	Metodologia	NºEspécies	Autor (Ano)
As plantas medicinais e condimentares. Análise das potencialidades de uma região Alentejana	Alentejo	164 entrevistas	150	Borges e Almeida (1996)
Valorização do Património Genético de Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural da Serra da Estrela	Parque Natural da Serra da Estrela	51 inquéritos	113	Dias (1999)
Plantas Aromáticas e/ou Medicinais, Inventariação e Utilização	Reserva Natural da Serra da Malcata	200 inquéritos	73	Mesquita (2000)
As Plantas Aromáticas e Medicinais no Parque Natural do Douro Internacional – Miranda do Douro	Parque Natural do Douro Internacional	198 inquéritos (por confirmar)	104	Santos (2000)
Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas no Parque Natural da Serra de S. Mamede	Parque Natural da Serra de S. Mamede	37 entrevistas	165 (150 medicinais)	Camejo-Rodrigues (2001)
Plantas Aromáticas e Medicinais no Parque Natural do Douro Internacional	Parque Natural do Douro Internacional	22 entrevistas	96	Fernandes (2001)
Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas na Área Protegida da Serra do Açor	Área Protegida da Serra do Açor	35 entrevistas	140 (124 medicinais)	Camejo-Rodrigues (2002)
Estudo Etnobotânico, Parque Natural do Vale do Guadiana	Parque Natural do Vale do Guadiana	83 inquéritos	118	Melo (2002)
Plantas Aromáticas e/ou Medicinais no Parque Natural da Arrábida	Parque Natural da Arrábida	72 entrevistas	176	Novais (2002)
?	Parque Natural do Alvão	?	?	2002?
Um Estudo Sobre a Flora Aromática e Medicinal Utilizada pela População Residentes na Área do Parque Natural de Sintra-Cascais e Zonas Envolventes	Parque Natural de Sintra-Cascais	178 inquéritos em Escolas, 28 entrevistas	203	Sommer (2003)
Estúdio etnobotânico de la Serra do Açor (Portugal)	Serra do Açor	30 entrevistas	120	Argüello (2003)
Inventariação e utilizações locais das plantas aromáticas e medicinais do Parque Natural do Douro Internacional	Parque Natural do Douro Internacional	24 entrevistas	99	Dias (2003)
Plantas Medicinais da Península de Setúbal, Contributo para o Conhecimento da sua Relevância Etnobotânica	Península de Setúbal	102 entrevistas	253	Santos (2004)
Etnobotânica del Parque Natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal	Parque Natural de Montesinho	110 entrevistas, observação-participação	364 (166 medicinais)	Carvalho (2005)
Recolha dos ‘Saber-Fazer’ Tradicionais das Plantas Aromáticas e Medicinais, Concelhos de Aljezur, Lagos e Vila do Bispo	Sudoeste Algarvio	49 entrevistas	173 (164 medicinais)	Camejo-Rodrigues (2006)
Plantas e Usos Tradicionais nas Memórias de Hoje - Freguesia da Ilha	Ilha da Madeira, (concelho de Santana; freguesia da Ilha)	16 entrevistas	77	Sequeira et al. (2006)
Levantamento Etnobotânico na Reserva Natural do Sapal de Castro Marim e Vila Real de Santo António	Reserva Natural do Sapal de Castro Marim e Vila Real de Santo António	19 entrevistas	52 (38 medicinais)	Carapeto (2006)
Estudos de Etnobotânica e Botânica Económica no Alentejo	Região de Beja	150 entrevistas	104 medicinais	Mendonça de Carvalho (2006)

iniciaram estudos etnobotânicos (de metodologia científica, compreenda-se) que visam recolher e preservar por escrito esta quota-parte da nossa tradição. Na Tabela 1 pode-se visualizar informação sobre a maioria dos Estudos Etnobotânicos feitos até à data no território português.

Grande parte destes estudos decorreu no âmbito do Projecto “Plantas Aromáticas e Medicinais da Rede Nacional de Áreas Protegidas”, projecto desenvolvido pelo ICN (Instituto da Conservação da Natureza).

No entanto, apesar do rol de áreas protegidas citadas aqui, grande parte do território português e das populações rurais não foram ainda abrangidos por recolhas etnobotânicas.

## **METODOLOGIA EM ETNOBOTÂNICA**

Os métodos empregues em Etnobotânica são em parte baseados em métodos das ciências sociais e antropológicas.

Em etnobotânica, como o objectivo é maximizar a recolha de saberes-fazer tradicionais, a amostragem não deve ser ao acaso nem aleatória, mas sim dirigida aos elementos da população que à partida poderão saber mais acerca da temática que se pretende abordar. Para localizar pessoas com essas características tem-se então de recorrer à técnica mais antiga – perguntar por pessoas que poderão ter um vasto conhecimento. Além de podermos perguntar por essas pessoas a residentes locais ao acaso ou a residentes (ou trabalhadores) locais que já conheçamos, podemos também obter bons resultados perguntando a individualidades locais ou pessoas influentes. Em paralelo, outra técnica muito útil é a chamada “bola de neve” na qual se pergunta às pessoas entrevistadas se conhecem outras pessoas que poderão saber muito dessa temática, podendo assim obter-se nomes de outras pessoas a envolver no estudo, as quais por sua vez poderão referir umas quantas outras.

Quanto aos métodos de recolha de dados existem dois métodos muito citados e usados na etnobotânica – a “entrevista etnobotânica” e a “observação participação”.

Uma entrevista pode ser:

- “entrevista informal” – total falta de estrutura ou controlo da entrevista, em que o investigador apenas tenta recordar-se das conversações que teve ou ouviu durante o dia;

- “entrevista não estruturada” – em que existe uma entrevista formal, com entrevistador e entrevistado, e em que ambos estão conscientes que estão numa entrevista, no entanto, e apesar de existir um plano claro que o entrevistador mantém, é caracterizada por um mínimo de controlo sobre as respostas do entrevistado (mais usado em situações em que se tem muito tempo para desenvolver a recolha etnobotânica)

- “entrevista semi-estruturada” – existe um guião mental acerca dos tópicos a abarcar na entrevista e existe também algum controlo nesse sentido, mas permitindo-se uma conversação (muito útil em situações em que poderá não haver hipóteses de voltar a entrevistar as mesmas pessoas posteriormente)

- “entrevista estruturada” – a entrevista é totalmente estruturada, como se fosse um questionário, mas utilizado de modo mental pelo entrevistador (e não preenchido pelo entrevistado), podendo-se utilizar técnicas diversas (como técnicas de análise de consenso, as quais têm regras próprias que são explicadas ao entrevistado)

O método “observação participação” (ou “observador participante”) requer uma forte e longa aproximação do investigador com a comunidade que estuda, de modo a adquirir a confiança das pessoas, requerendo uma presença continuada do investigador no seio da comunidade e a “experienciação” e participação na vida social dessa comunidade, como se de um filho da terra ou residente de longa data se tratasse. Este método permite uma observação e um registo da vida dos vários elementos da comunidade, assim como uma descrição dos usos populares das plantas mais exacta, propiciada pela experiência e participação, pelo que pode proporcionar acesso a informação pouco evidente e difícil de adquirir através de entrevistas ou questionários (como por exemplo se a pessoa ainda usa determinadas plantas e a frequência desse uso).

Segundo António Firmino da Costa (Costa, 1987) “a observação participante dá os melhores resultados na obtenção de informações sobre comportamentos, discursos e acontecimentos observáveis mas que passam despercebidos à consciência explícita dos actores sociais”, acrescentando “já onde a entrevista é mais eficiente é na obtenção de normas e *status* institucionalizados, de conhecimentos gerais e facilmente verbáveis. A observação directa participante pode também, obter estas informações, mas de maneira fragmentada e morosa”.

Se bem que o método da “observação participação” pode proporcionar um conjunto de informação que as entrevistas não podem, ele requer muito tempo e continuidade no seio das comunidades, o que muito esporadicamente é possível em estudos etnobotânicos (que geralmente são planeados e financiados para um curto espaço de tempo - meses, ou de 1 a 4 anos. Assim, o método mais difundido é a entrevista etnobotânica, recorrendo-se geralmente a um tipo de entrevista semi-estruturada.

Grande parte dos investigadores consideram uma entrevista como um conjunto de várias sub-entrevistas (“visitas”) ao mesmo “informante” (pessoa entrevistada) ao longo do tempo, durante as quais o investigador vai tentando recolher mais informação do informante (que nunca diz tudo o que sabe só numa visita, quer seja por falta de confiança no investigador que mal conhece, quer seja por não se lembrar de tudo numa só visita) e vai tirando dúvidas das visitas anteriores.

Descrevem-se em seguida as fases básicas e o modo como, na opinião da autora, deverá decorrer um estudo etnobotânico focalizado nos usos tradicionais de plantas aromáticas e medicinais.

Durante as entrevistas o investigador regista (em papel e/ou cassete áudio) os dados pessoais do informante e os conhecimentos transmitidos por este. É importante tentar perceber qual é a origem daqueles conhecimentos, se de experiência própria ou transmissão oral, ou se de livros ou meios audiovisuais, dado os primeiros conhecimentos serem aqueles que se pretendem recolher e registar mantendo o seu carácter genuíno.

Numa primeira visita é aconselhável não sobrecarregar os informantes com demasiadas perguntas, o que poderia levar a um cansaço e falta de interesse por parte do informante. As informações básicas a registar primeiramente deverão ser – o nome comum da planta, o(s) seu(s) uso(s), a parte utilizada, o modo de preparação e o modo de aplicação. Em visitas futuras ao mesmo informante dever-se-á então aprofundar os conhecimentos sobre cada planta (p.e. perguntar pela época de colheita, modo de colheita, local de colheita, quantidade e finalidade da colheita, modo de conservação do preparado quando aplicável, duração do produto conservado quando aplicável, etc.). Apesar do estudo ser focalizado na temática das PAM, nunca é de descartar informações sobre outras temáticas etnobotânicas que os informantes transmitam (p.e. usos veterinários, usos alimentares, benzeduras, rezas, crenças, etc.), visto uma outra oportunidade de pesquisar e registar esses conhecimentos poderá nunca chegar a existir.

Após (ou paralelamente) o registo textual dos nomes das plantas e dos seus usos tradicionais é imprescindível um reconhecimento das plantas e sua identificação científica.

Se bem que hajam nomes vulgares de plantas que não suscitam dúvidas (como por exemplo, o alecrim, o poejo, a erva-cidreira, os agriões, a alface, o castanheiro, a oliveira, o morangueiro, o limoeiro, a salsa, os coentros, a silva, etc.) muitas outras plantas precisam ser confirmadas e identificadas. Pode acontecer dentro de uma mesma região serem dados nomes diferentes para a mesma espécie ou o mesmo nome ser dado a duas ou mais espécies diferentes, daí a importância do reconhecimento e confirmação de todas as plantas referidas por todos os informantes (excepto as óbvias), confirmação esta feita de informante a informante. Para efectuar esse reconhecimento ou confirmação o ideal seria ter a possibilidade de fazer excursões ao campo/hortas/quintais com cada informante de modo a visualizar e recolher todas as plantas referidas por este. No entanto, essa possibilidade é muitas vezes rara, quer por falta de tempo ou vontade do informante quer por dificuldades físico-motoras deste ou por não saberem onde encontrar as plantas. Assim, outros métodos se usam para confirmação das plantas sendo o método preferível a colheita prévia pelo investigador das plantas que suspeita serem as mencionadas e “mostragem” a cada informante que as tenha referido. Por vezes sucede também que o informante apanha ele próprio a planta e a entrega ao investigador, o que poupa o tempo a

este. Quando não existe qualquer indício sobre a identidade de uma planta, o investigador deve pedir ao informante se lhe pode arranjar uma amostra ou que lhe indique algumas características e onde a poderá encontrar, ou ainda se pode indicar alguém a quem o investigador possa perguntar.

Outro método é o recurso a fotografias ou desenhos de plantas. No entanto este método é menos recomendável devendo ser usado apenas em último recurso já que, tal como comenta Martin (1995), muitas pessoas não estão habituadas a reconhecer as plantas sob essa forma e sem o contexto ecológico e, assim, além de poder surgir dificuldades na identificação, podem também surgir interpretações e confirmações erróneas.

De realçar que a fase de reconhecimento e confirmação das plantas é uma oportunidade excelente para recolher mais informações acerca de cada planta referida e esclarecer dúvidas.

A identificação científica das plantas deverá ser o mais exacta e actualizada possível, recomendando-se o uso das Floras mais actualizadas e pormenorizadas que abarquem a região em estudo.

Aquando dúvidas na identificação taxonómica de plantas, é sempre preferível o aconselhamento com outros botânicos ou com taxónomos ou, em último caso, admitir e transmitir textualmente a dúvida ou incerteza.

Sempre que possível e viável é aconselhável a preparação de folhas de herbário e sua deposição num Herbário Oficial, principalmente em estudos de carácter académico.

Paralelamente e posteriormente a todo o trabalho prático ao longo de um estudo etnobotânico é importante o registo computadorizado de todas as informações recolhidas.

A partir do momento em que o investigador começa a recolher dados etnobotânicos ele torna-se responsável pela salvaguarda desses dados, mas também pelo seu bom uso. Na minha opinião o mínimo que se deve fazer após a realização de um estudo etnobotânico é a publicação (não científica) de um livro ou brochura para o grande público. Em complementação, diversas outras acções, ou produtos, se podem desenvolver com os dados recolhidos, podendo estes dar bons contributos em áreas como a investigação terapêutica/ farmacológica, a educação ambiental, a produção e comercialização de PAM, a construção de jardins/ hortos temáticos, a conservação de espécies autóctones, o ecoturismo, o turismo cultural, etc.

Vários podem ser os contributos e as utilizações dos dados recolhidos num estudo etnobotânico, no entanto, é muito importante assegurar e reconhecer publicamente a autoria desses conhecimentos, já para não falar nos direitos de autor e de usufruto de autoridade sobre os conhecimentos transmitidos como eticamente é imprescindível em recolhas feitas em comunidades tribais (p.e. tribos índias da Amazónia).

Além do reconhecimento público da autoria dos conhecimentos etnobotânicos recolhidos, eticamente é também importante retribuir benefícios às pessoas entrevistadas (ou mesmo às comunidades onde se inserem), devendo-se proporcionar preferência de distribuição de benefícios aos informantes e seus familiares (p.e. no caso de publicação de um livro ou brochura, como referido acima, deve-se oferecer um exemplar dessa publicação a cada pessoa que contribuiu para a recolha etnobotânica).

Esta comunicação abarca ainda uma passagem, em jeito de resumo, pelos casos práticos de estudos etnobotânicos e experiência próprios.



Fig. 1. Fel-da-terra (*Centaurium erythraea* Rafn).

### CONTRIBUTO PARA O ESTUDO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS NO PARQUE NATURAL DA SERRA DE S. MAMEDE

- 37 entrevistas etnobotânicas (45 informantes)
- 165 espécies úteis, das quais 150 PAM (com 224 nomes populares referidos)
- 136 usos medicinais diferentes, 10 usos veterinários e ainda 26 outros usos, além das utilidades aromáticas e condimentares
- 51 espécies com usos referidos por 3 ou mais informantes diferentes
- 19 entrevistas com “*informantes estrela*” (que referiram 30 ou mais plantas úteis)

### CONTRIBUTO PARA O ESTUDO ETNOBOTÂNICO DAS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS NA ÁREA PROTEGIDA DA SERRA DO AÇOR

- 35 entrevistas etnobotânicas (40 informantes)
- 140 espécies úteis, 124 das quais com usos medicinais, 15 usadas como aromáticas, 16 condimentares (com 168 nomes populares referidos)
- 97 usos medicinais diferentes, 4 usos veterinários, 13 utilidades aromáticas (incluindo “condimentar”)
- 62 espécies com usos confirmados em 3 ou mais entrevistas diferentes
- 19 entrevistas com “*informantes estrela*”

### RECOLHA DOS “SABER-FAZER” TRADICIONAIS DAS PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS: CONCELHOS DE ALJEZUR, LAGOS E VILA DO BISPO

- 49 entrevistas etnobotânicas (75 informantes)
- 173 espécies úteis, 164 das quais com usos medicinais, 16 condimentares, 31 c/ usos veterinários (com 168 nomes populares referidos)
- 76 espécies com usos confirmados em 3 ou mais entrevistas diferentes
- em 28 das entrevistas (57%) foram referidas 30 ou mais plantas úteis
- 113 novos nomes, 37 com 3 ou mais referências



Fig. 2. Malva (*Lavatera cretica* L.).

### REFERÊNCIAS

- Argüello J (2003) *Estúdio etnobotânico de la Serra do Açor (Portugal)*. Trabajo investigación tutelado, Programa doctorado Biología Evolutiva y Biodiversidad. Madrid, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- Balick M, Cox P (1996) *Plants, People and Culture*. The Science of Ethnobotany, Scientific American Library. USA. 228 pp.
- Bonet MA, Parada M, Selga A & Vallès J (1999) Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 145-168.
- Borges AE, Almeida VC (1996) As plantas medicinais e condimentares. Análise das potencialidades de uma região Alentejana. *Silva Lusitana*, Ano IV, nº especial: 143-169.
- Camejo-Rodrigues JS (2001) *Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas no*

- Parque Natural da Serra de S. Mamede*. Relatório de Estágio para a Licenciatura em Biologia. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Camejo-Rodrigues JS (2002) *Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas na Área Protegida da Serra do Açor*. Relatório de Estágio elaborado no âmbito do Projecto “Plantas Aromáticas e Medicinais da Rede Nacional de Áreas Protegidas”, APPSA, ICN.
- Camejo-Rodrigues JS (2006) *Recolha dos ‘Saber-Fazer’ Tradicionais das Plantas Aromáticas e Medicinais, Concelhos de Aljezur, Lagos e Vila do Bispo*. Associação Aflosul, Bordeira.
- Carapeto A (2006) *Levantamento Etnobotânico na Reserva Natural do Sapal de Castro Marim e Vila Real de Santo António*. Relatório Final, Projecto Agro nº 800 “Rede Nacional para a Conservação e Utilização das Plantas Aromáticas e Medicinais”. Reserva Natural do Sapal de Castro Marim e Vila Real de Santo António. Castro Marim.
- Carvalho AM (2005) *Etnobotânica del Parque Natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal*. Tesis Doctorales. Universidad Autónoma de Madrid. UAM Ediciones.
- Costa AF (1987) *A pesquisa de terreno em sociologia*. In Silva AS, JM Pinto (Eds) *Metodologia das Ciências Sórias*. Porto. Afrontamento. pp. 129-148.
- Dias C (1999) *Valorização do Património Genético de Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural da Serra da Estrela*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Dias C (2003) *Inventariação e utilizações locais das plantas aromáticas e medicinais do Parque Natural do Douro Internacional*. PNDI, Figueira de Castelo Rodrigo.
- Fernandes J (2001) *Plantas Aromáticas e Medicinais no Parque Natural do Douro Internacional*. Relatório de Estágio. Parque Natural do Douro Internacional, ICN.
- Martin G (1995) *Ethnobotany: A Conservation Manual*. Chapman & Hall. Cambridge, 268 pp.
- Melo C (2002) *Estudo Etnobotânico, Parque Natural do Vale do Guadiana*. Relatório de Projecto do Curso de Engenharia Agro-Florestal. Escola Superior Agrária de Beja.
- Mendonça de Carvalho (2006) *Estudos de Etnobotânica e Botânica Económica no Alentejo*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra.
- Mesquita MF (2000) *Plantas Aromáticas e/ou Medicinais, Inventariação e Utilização*. Relatório de Estágio. Reserva Natural da Serra da Malcata, Instituto da Conservação da Natureza (ICN).
- Novais MH (2002) *Plantas Aromáticas e/ou Medicinais no Parque Natural da Arrábida*. Trabalho de Fim de Curso. Universidade de Évora.
- Santos C (2000) *As Plantas Aromáticas e Medicinais no Parque Natural do Douro Internacional – Miranda do Douro*. Mogadouro, Parque Natural do Douro Internacional, ICN.
- Santos S (2004) *Plantas Medicinais da Península de Setúbal, Contributo para o Conhecimento da sua Relevância Etnobotânica*. Relatório de Estágio final de Licenciatura em Biologia. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Sequeira M, Fontinha S, Freitas F, Ramos L, Mateus MG (2006) *Plantas e Usos Tradicionais nas Memórias de Hoje. Freguesia da Ilha*. Casa do Povo da Ilha. Santana.
- Sommer MR (2003) *Um Estudo sobre a Flora Aromática e Medicinal Utilizada pela População Residente na Área do Parque Natural de Sintra-Cascais e Zonas Envolventes*. Relatório de trabalho de fim de curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
-

## PLANTAS MEDICINAIS DA PENÍNSULA DE SETÚBAL. Contribuição para o conhecimento da sua relevância etnobotânica\*

S. Santos<sup>1</sup>, A. I. D. Correia<sup>2</sup>, A. C. Figueiredo<sup>3</sup>, L. S. Dias<sup>4</sup>, A. S. Dias<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, DBV, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, DBV, Centro de Biologia Ambiental, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Unidade de Ecologia Química, Centro de Ecologia e Ambiente, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

### RESUMO

A Península de Setúbal engloba ambientes muito distintos, na medida em que, por um lado, alberga cidades de grande/média e pequena dimensão, intimamente relacionadas com a capital, e por outro, áreas bem preservadas que integram parques naturais ou reservas/zonas protegidas. Assim sendo, os principais objectivos deste estudo prenderam-se com: 1) a caracterização dos remédios vegetais usados por populações distintas (as de áreas urbanas e as de áreas rurais); 2) a comparação e compreensão destas práticas (modo de aquisição e transmissão) e 3) a avaliação da influência da flora envolvente e da disponibilidade das plantas na sua persistência nestas populações.

Os dados foram obtidos através de entrevistas semi-estruturadas a 121 pessoas, maioritariamente idosos, e permitiram recolher informações relativas ao nome vernáculo das plantas, à sua utilização terapêutica, ao seu modo de obtenção, aos procedimentos de colheita, à parte utilizada, ao seu modo de utilização, conservação e administração, a precauções/contraindicações do tratamento e ao modo de avaliação da sua eficácia, à fonte deste conhecimento e a outras utilizações das plantas.

Foram referidos 186 usos medicinais distintos para os 253 *taxa* tentativamente catalogados, correspondendo a [*Lavatera cretica* L., *Malva* spp. (*M. nicaeensis* All.; *M. sylvestris* L.; *M. tournefortiana* L.); *Pelargonium graveolens* L' Her.] ("malvas") o maior número de usos (31), enquanto que o *taxon* mais citado foi *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britt. ("doce-lima") (60 entrevistas). O grupo terapêutico com maior número de usos atribuído foi "Sistema digestivo" e o uso mais citado foi "Estômago" (45 *taxa*).

Para averiguar de que modo as plantas eram caracterizadas pelos usos e os informantes pelas características identitárias (idade, sexo, local de nascimento, local de residência, escolaridade e actividade profissional) e plantas usadas (espécies, modo de aquisição, objectivo e regularidade do uso), recorreu-se à Análise das Correspondências seguida de Classificação Automática. Verificou-se que apesar de muitas das plantas terem várias aplicações terapêuticas, eram frequentemente utilizadas em afecções fisiologicamente relacionáveis. Constatou-se também que os informantes residentes em áreas mais urbanas apresentavam características distintas daqueles que residiam em áreas mais rurais, sendo que a sua área de residência tinha influência nas plantas que usavam.

Para muitos dos parâmetros analisados a percentagem de esquecimento/desconhecimento foi importante, revelando que muitos dos informantes já não têm bem presentes os conhecimentos da medicina tradicional, o que confere urgência a uma recolha mais exaustiva destes conhecimentos, antes que desapareçam por completo.

### INTRODUÇÃO

O termo "Etnobotânica", foi primeiramente utilizado por Harshberger em 1895, tendo a sua origem etimológica nos prefixos *etno*, do grego para raça ou povo, e *botânica*, do grego para

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 175-182, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

ciência ou conhecimento das plantas (Dias 2003). Na actualidade, a Etnobotânica é tida como uma ciência interdisciplinar que se encontra no cruzamento entre as ciências naturais e as ciências humanas (1)\* e que se ocupa das inter-relações Homem-Planta, pretendendo compilar todos os conhecimentos populares sobre as plantas e seus usos tradicionais para posteriormente interpretar o significado cultural de tais relações (2).

A aculturação “moderna” e industrial recente dos “países desenvolvidos”, a desertificação das áreas rurais e o facto de que estes saberes são tradicionalmente passados por via oral, prevalecendo na actualidade maioritariamente na posse dos idosos, tem-se vindo a traduzir numa crescente erosão dos conhecimentos tradicionais (Ember & Ember 1997 *in* Bonet *et al.* 1999). Assim, a realização de estudos etnobotânicos reveste-se de uma particular importância fundamentalmente por contribuir para a inventariação e difusão de parte de uma dada cultura e portanto para a preservação da herança cultural local que é também, em última análise, mundial (Bonet *et al.* 1999).

Estudos recentes levados a cabo em Portugal mostram que o conhecimento e a prática da utilização de plantas com fins medicinais ainda permanece viva, particularmente em áreas de vegetação relativamente preservada como sejam a Serra de S. Mamede (Camejo-Rodrigues 2001) ou a Serra da Arrábida (Novais 2002), embora essa prática aparente uma expressão residual. É neste enquadramento que surge o presente estudo, realizado na Península de Setúbal, no âmbito dos estágios de final de licenciatura do Dep. de BVA da FCUL, tendo-se pretendido: 1) Averiguar se a utilização de plantas com fins medicinais se mantém entre as populações residentes na Península de Setúbal, principalmente em áreas de vegetação floristicamente mais pobre e/ou degradada ou em áreas urbanas vizinhas de manchas florestais preservadas; 2) Registrar e compreender os processos e o pensamento subjacente a estas práticas e cadeias de transmissão destes saberes; 3) Contribuir para o conhecimento da flora medicinal utilizada na região-alvo e para a sua preservação.

## ENQUADRAMENTO GEOGRÁFICO

A Península de Setúbal compreende 158 100 ha (INE, Censos 2001) e está incluída na Área Metropolitana de Lisboa. É delimitada a norte pelo rio Tejo, a este por território alentejano, a sul pelo rio Sado e pelo Oceano Atlântico e a oeste pelo Oceano Atlântico. Dela fazem parte 9 municípios, correspondentes aos concelhos de Alcochete, Almada, Barreiro, Moita, Montijo, Palmela, Seixal, Sesimbra e Setúbal (Fig. 1).

## METODOLOGIA

A realização do presente estudo decorreu em 4 fases. A 1ª fase (Outubro de 2003 a Fevereiro de 2004), foi dedicada à recolha de dados e conduziu, numa 2ª fase (Fevereiro a Julho de 2004), à construção de uma base de dados e à atribuição de correspondências entre as designações populares locais das plantas e a nomenclatura botânica. Com a conclusão da 3ª fase (Fevereiro a Julho de 2004), que consistiu na colheita, identificação e herborização das espécies indicadas por informantes seleccionados, deu-se início à 4ª e última fase do trabalho (Julho a Outubro de 2004), correspondente ao tratamento da informação recolhida.

### Recolha de dados (entrevistas)

Realização de 102 entrevistas semi-estruturadas a 121 informantes, em 5 dos 9 concelhos da península, em 3 sub-zonas criadas *a priori* no âmbito do estudo (Fig. 1).

As entrevistas foram realizadas maioritariamente em instituições e associações de e para idosos. A informação recolhida foi organizada em fichas-guião.

---

\* As páginas da Internet são referenciadas numericamente nas Referências



Fig. 1. Localização das localidades onde decorreram as entrevistas. Assinaladas a azul estão as integradas na Zona de Costa, a verde as integradas na Zona de Serra/ Rural e a vermelho as integradas na Zona Urbana (Cidade). O número que surge dentro do círculo que assinala a localidade refere-se ao número de informantes entrevistados: Almada – 16 informantes; Sesimbra (Zambujal) – 13 informantes; Barreiro e Setúbal – 12 informantes; Charneca da Caparica e Quinta do Anjo – 10 informantes; Costa da Caparica e Palmela – 9 informantes; Coina, Lagameças e Monte da Caparica – 7 informantes; Trafaria – 4 informantes; Vale da Rasca – 2 informantes; Aldeia da Piedade, Baixa de Palmela e Casais da Serra – 1 informante.

### Construção de uma base de dados

A informação recolhida foi organizada numa base de dados em EXCEL. Posteriormente, serviu para a elaboração de um catálogo florístico complementado com informação proveniente de 10 referências bibliográficas (ELADIET sem data, Millanvoye 1991, Polunin & Robbins 1993, Pedro & Santos 1998, Roger 1998, Ody 2000, Camejo-Rodrigues 2001, Lieutaghi 2002, Monjardino 2002, Novais 2002).

### Atribuição de correspondências entre as designações populares locais das plantas e a nomenclatura botânica

A identificação das plantas referidas como úteis foi efectuada de dois modos:

**1. Se não foi possível ver as plantas.** Com base nos nomes vernáculos referidos nas entrevistas e recorrendo a bibliografia (Coutinho 1939, Feijão 1960, Rocha 1996, Caixinhas *et al.* 2000, Carvalho & Fernandes 2003) e a ervanárias e empresas de venda de produtos naturais da região (Calêndula/ Natiris, Celeiro, Ervanária da Anunciada e Provida/ Soria Natural);

**2. Se foram efectuadas colheitas.** Exemplares para identificação. A identificação fez-se recorrendo a Floras [*Flora Vascular de Andalucía Occidental* (Valdés *et al.* 1987), *Flora Ibérica* (Castroviejo *et al.* 1986, 1990, 1993, 1997, 1998, 1999, 2000 e 2003) e *Nova Flora de Portugal* (Franco 1971, 1984, 1994 e 1998)] e por comparação com material herborizado do Herbário do Jardim Botânico de Lisboa.

### Colheita, identificação e herborização das plantas indicadas por informantes seleccionados

Seleccionaram-se 4 informantes (Fig. 2) com base nos conhecimentos evidenciados e disponibilidade para nos acompanhar aos locais de recolha, havendo o cuidado de representar cada uma das três sub-zonas definidas acima – 2 informantes da Zona Urbana (cidade), 1 da Zona de Costa e 1 da Zona de Serra/ Rural.

As plantas recolhidas e identificadas foram herborizadas segundo as linhas gerais da metodologia de Pinto da Silva (1986), passando a funcionar como *voucher specimens* do presente estudo, depositadas no Herbário do Jardim Botânico de Lisboa. Adicionalmente, procedeu-se a uma recolha iconográfica quer das plantas colhidas, quer dos informantes.

### Tratamento dos dados recolhidos

Numa primeira fase foram feitas análises descritivas e quantitativas básicas com o intuito de obter uma caracterização geral da região segundo os parâmetros em estudo. Numa segunda fase procedeu-se ao estudo quantitativo de parte dos dados recolhidos recorrendo à análise das correspondências e classificação automática mista (Lebart *et al.* 1996) e à análise discriminante

não paramétrica por árvore de decisão binária (Guegen *et al.* 1996).



Fig. 2. Três dos quatro informantes seleccionados D. Adelina, D. Deonilde e D. Madalena (da esquerda para a direita).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises descritivas e quantitativas

#### Perfil dos Informantes

1. Verificou-se que eram principalmente mulheres (86%), com idades compreendidas entre os 71 e os 80 anos (47%), maioritariamente naturais do distrito de Setúbal (46%), com escolaridade básica (61%) e com actividades profissionais integradas no sector terciário (36%). Na sua maioria fazem uso regular de plantas medicinais (69%), predominantemente obtidas por colheita na natureza (83%), fundamentalmente para suprimento das necessidades domésticas (100%).

2. O número máximo de taxa por entrevista foi de 77, o mínimo de 1 e o número médio de 12.

3. Apenas 6 entrevistas contaram com a participação de “informantes-estrela” (aqueles que referem 30 ou mais plantas).

#### Plantas

1. Foram referidos 253 taxa e obteve-se um índice de Muntané (nomes não documentados/ nº total de plantas) de 0.53. Apenas 10 taxa são referidos em 30 ou mais entrevistas, sendo que 80% deles são indicados em menos de 5.

2. Das 66 famílias botânicas mencionadas, as 6 dominantes (*Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae* e *Apiaceae*) englobam mais de 40% dos taxa.

3. A *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britt. (“doce-lima”) (Fig. 3) foi a planta mais mencionada (60 entrevistas), seguida de *Citrus limon* (L.) Burm. fil. (“limoeiro”), *Melissa officinalis* L. (“ervacidreira”) e [*Lavatera cretica* L.; *Malva* spp. (*M. nicaeensis* All.; *M. sylvestris* L.; *M. tournefortiana* L.); *Pelargonium graveolens* L' Her.] (“malvas”) (51, 51 e 50 entrevistas, respectivamente).

4. Dos 186 usos medicinais referidos, os mais mencionados foram “estômago”, “constipações e gripes” e “digestões difíceis/digestiva” (45, 41 e 34 taxa, respectivamente).

5. Às plantas conhecidas como “malvas” [*Lavatera cretica* L.; *Malva* spp. (*M. nicaeensis* All.; *M. sylvestris* L.; *M. tournefortiana* L.); *Pelargonium graveolens* L' Her.] (Fig. 3) foi atribuído o maior número de usos medicinais (31 usos), seguidas das “marcelas” [*Achillea ageratum* L.; *Chamaemelum nobile* (L.) All. (*C. nobile* (L.) All. var. *discoideum* (Boiss.) P. Silva); *Matricaria* spp. (*M. chamomilla* L.; *M. recutita* L.)], do “eucalipto” [*Eucalyptus* spp. (*E. globulus* Labill.)] e da “ervacidreira” *Melissa officinalis* L. (27, 25 e 25 usos, respectivamente).

De acordo com o critério de Le Grand & Wondergem (1987) e Johns *et al.* (1990) (*in* Selga 1998), a referência da mesma utilização medicinal em pelo menos 3 entrevistas, 51 taxa deverão ser estudados futuramente no âmbito da investigação farmacológica.

6. As plantas são maioritariamente colhidas na Primavera e no Verão, em habitats com actividade humana reduzida e/ou espaços cultivados, sendo usualmente consideradas como

frequentes nestes locais.

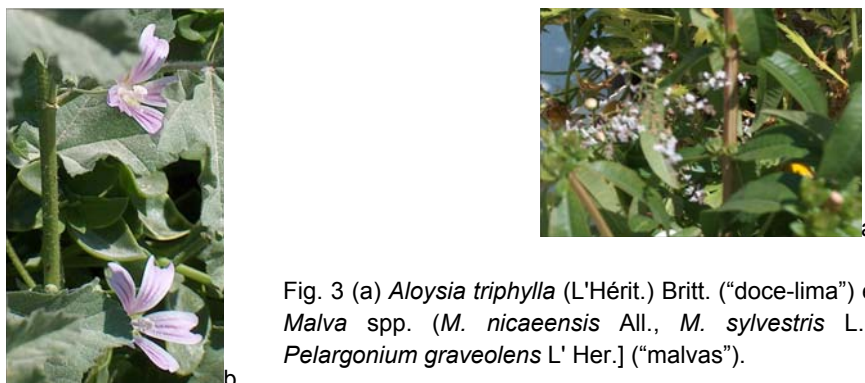


Fig. 3 (a) *Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britt. ("doce-lima") e (b) [*Lavatera cretica* L., *Malva* spp. (*M. nicaeensis* All., *M. sylvestris* L., *M. tournefortiana* L., *Pelargonium graveolens* L' Her.)] ("malvas").

7. As plantas são maioritariamente usadas em verde ou após secagem à sombra e consideradas boas para consumo por períodos superiores a 1 ano até alguns anos, desde que na ausência de humidade.

8. A parte aérea é a mais utilizada (134 taxa), seguida das folhas e das estruturas florais (87 e 45 taxa, respectivamente).

9. Foram descritos 35 usos medicinais diferentes, 13 internos e 22 de aplicação externa, sendo que a grande maioria das plantas usadas como "chá" (infusão/decoção).

10. O uso das plantas é geralmente pontual e sintomático, sem horários definidos e até ao desaparecimento dos sintomas.

11. Estes conhecimentos são maioritariamente passados pela família, com prevalência clara das mulheres e destas da mãe. Foi, no entanto, notória a sua perda acentuada no seio da população entrevistada.

### Análise das correspondências e classificação automática

#### Informantes

1. Os informantes que residem em áreas mais rurais (maioritariamente o grupo 3) têm características distintas daqueles que residem em áreas mais urbanas (maioritariamente os grupos 1 e 2); o grupo 1 integra principalmente as domésticas, Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos informantes pelas suas características identitárias e uso das plantas, de acordo com os resultados da análise das correspondências e classificação automática.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Naturalidade externa ao distrito	Naturalidade externa ao distrito	Naturais do distrito;
Escolaridade primária	Grau de escolaridade mais elevado	Sem escolaridade básica;
Domésticas	Sectores 2ário ou 3ário	Sector 1ário
Compra, colheita, oferta	Uso menos regular de plantas medicinais	Uso regular de plantas medicinais
		Colheita ou cultivo

2. A grande maioria da população entrevistada possui um baixo nível de conhecimentos acerca de plantas medicinais (quer em número, quer em variedade).

3. Existe uma dependência entre as plantas indicadas e a zona de residência do informante (urbana, rural ou costeira).

#### Plantas

1. Muitas plantas são usadas em afecções distintas mas relacionadas fisiologicamente, Tabela

## 2. As restantes afecções constituem grupos por si, Tabela 3.

Tabela 2. Caracterização das plantas pelos seus usos, de acordo com os resultados da análise das correspondências e classificação automática. Plantas usadas em afecções distintas mas relacionadas fisiologicamente. Nota: as espécies representadas em cada agrupamento são exemplificativas, não correspondendo à totalidade das espécies de cada agrupamento.

<b>Afecções respiratórias e purificação geral do organismo</b>	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm fil., <i>Foeniculum vulgare</i> Miller, <i>Pinus pinaster</i> Soland, <i>Nasturtium officinale</i> R. Br., <i>Pinus pinea</i> L., <i>Sambucus nigra</i> L.
<b>Afecções cutâneas/ das mucosas, afecções intestinais e purificação geral do organismo</b>	<i>Petroselinum crispum</i> (Miller) A. W. Hill, <i>Gallium aparine</i> L.
<b>Afecções cardio-vasculares e endócrinas derivadas de desequilíbrios alimentares</b>	<i>Olea europaea</i> L., <i>Cydonia oblonga</i> Miller
<b>Afecções circulatórias e purificação geral do organismo</b>	<i>Allium sativum</i> L., <i>Urtica dioica</i> L.
<b>Afecções digestivas e afecções nervosas comuns</b>	<i>Melissa officinalis</i> L., <i>Alloysia triphylla</i> (L'Hérit.) Britt., <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf.
<b>Processos inflamatórios e infecciosos localizados</b>	<i>Tuberaria lignosa</i> (Sweet) Samp., <i>Lavatera cretica</i> L., <i>Lavatera trimestris</i> L.

Tabela 3. Caracterização das plantas pelos seus usos, de acordo com os resultados da análise das correspondências e classificação automática. Plantas usadas em afecções que surgem isoladamente. Nota: as espécies representadas em cada agrupamento são exemplificativas, não correspondendo à totalidade das espécies de cada agrupamento.

<b>Tratamento da diarreia</b>	<i>Rubus</i> spp. ( <i>R. fruticosus</i> L.; <i>R. ulmifolius</i> Schott.), <i>Triticum aestivum</i> L., <i>Mallus domestica</i> Borkh.
<b>Regularização do sistema nervoso (acção relaxante/ sedativa)</b>	<i>Coffea arabica</i> L., <i>Papaver somniferum</i> L., <i>Papaver</i> spp. ( <i>P. dubium</i> L.; <i>P. rhoeas</i> L.; <i>P. somniferum</i> L.)
<b>Afecções hepáticas</b>	<i>Peumus boldus</i> Molina, <i>Asphodelus aestivus</i> Brot., <i>Populus</i> spp. ( <i>P. alba</i> L.; <i>P. nigra</i> L.), <i>Asphodelus</i> spp. ( <i>A. albus</i> Mill.; <i>A. lusitanicus</i> P. Cout.; <i>A. ramosus</i> L.)
<b>Manutenção da saúde capilar</b>	<i>Coronilla valentina</i> L. ssp. <i>Glauca</i> , [ <i>Lavandula luisieri</i> (Rozeira) Rivas-Martinez; <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Thymus zygis</i> L.]
<b>Afecções Urinárias</b>	<i>Zea mays</i> L., <i>Prunus</i> spp. ( <i>P. avium</i> L.; <i>P. cerasus</i> L.), <i>Juglans regia</i> L.
<b>Plantas com utilidade medicinal desconhecida</b>	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L., <i>Santolina rosmarinifolia</i> L., <i>Scabiosa atropurpurea</i> L., <i>Seseli tortuosum</i> L.
<b>Tratamento de furúnculos e de hepatite</b>	<i>Plantago coronopus</i> L., <i>Rubia peregrina</i> L.
<b>Menstruação irregular</b>	<i>Ruta chalepensis</i> L., <i>Capsella rubella</i> Reuter, <i>Illicium</i> spp. ( <i>I. verum</i> Hook; <i>I. anisatum</i> L.)
	<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.
	[ <i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffmanns; <i>Conium maculatum</i> L.]
	<i>Vicia faba</i> L. var <i>faba</i>
	<i>Hedera</i> spp. ( <i>H. helix</i> L.)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do presente estudo verificou-se que, mesmo na actualidade, muitos dos entrevistados consideram fazer uso regular de plantas medicinais, ainda que para alguns sejam conhecimentos e hábitos apenas associados a outras épocas e vivências, aquando da sua infância e juventude. Observou-se também que as plantas usadas são fundamentalmente para suprir necessidades domésticas, frequentemente em conjugação com a medicação dita

“convencional”.

Finalmente, não queríamos deixar de salientar a elevada percentagem de esquecimento / desconhecimento destes saberes por grande parte da população entrevistada. Embora tenhamos consciência que tal facto está certamente relacionado com a idade avançada de muitos dos informantes, a inserção da Península de Setúbal na Área Metropolitana de Lisboa também nos parece um factor determinante – são populações com características tendencialmente urbanas, no seio das quais o descrédito nas medicinas populares é mais sentido, recorrendo-se predominantemente ao regime de saúde institucional. Reveste-se assim de particular urgência a recolha exaustiva destes saberes, antes que desapareçam por completo, na Península de Setúbal e em muitas outras regiões de Portugal.

## REFERÊNCIAS

- Bonet M, Parada M, Selga A, Vallés J (1999) Studies on Pharmaceutical Ethnobotany in the Regions of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*. 68: 145-168.
- Caixinhas D, Espírito-Santo D, Moreira I, Vasconcelos T (2000) *Ervas daninhas das vinhas e pomares*. Departamento de Protecção das Plantas e de Fitoecologia, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Direcção Geral da Protecção das Culturas. 2ª edição revista e ampliada. Oeiras.
- Camejo-Rodrigues J (2001) *Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais e Aromáticas no Parque Natural da Serra de S. Mamede*. Relatório de Estágio de Licenciatura em Biologia pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Carvalho L, Fernandes F (2003) *Portugal Botânico de A a Z – Plantas Portuguesas e Exóticas*. Lidel. Lisboa.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (1986) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. I*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (1990) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. II*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (1993) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. III e IV*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (1997) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. V e VIII*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (1998) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. VI*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (1999) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. VII (fasc. I)*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (2000) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. VII (fasc. II)*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Castroviejo S, Laínz M, López González G, Montserrat P, Muñoz Garmendia F, Paiva J, Villar L – eds (2003) *Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares – Vol. X*. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Coutinho A. (1939) *Flora de Portugal – Plantas Vasculares*. Bertrand (Irmãos) Ltd.. Lisboa.
- Dias A. (2003) *Etnobotânica – Perspectivas, História e Utilizações*. Publicações Universidade de Évora – *Ciências da Natureza e do Ambiente 4*.
- ELADIET – Elaborados dietéticos. *Guía de productos* (información técnica para el profesional). Barcelona, España.
- Feijão R (1960) *Elucidário Fitológico: Plantas vulgares de Portugal Continental, Insular e Ultramarino – Vol. I, II e III*. Instituto Botânico de Lisboa.
- Franco J (1971) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) – Vol. I*. Sociedade Astória Lda. Lisboa.
- Franco J (1984) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) – Vol. II*. Sociedade Astória Lda. Lisboa.
- Franco J (1994) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) – Vol. III (fasc. I)*. Escolar Editora. Lisboa.
- Franco J (1998) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) – Vol. III (fasc. II)*. Escolar Editora. Lisboa.

- INE (Instituto Nacional de Estatística) – *Censos 1991 e Censos 2001*.
- Lebart L, Lambert T, Pleuvret P (1996) *SPAD® Version 3. Manuel de Référence*. Saint-Mandé: CISIA.
- Lieutaghi P (2002) *O Grande Livro das Ervas*. Temas e Debates. Actividades Editoriais Lda.. 1ª edição. Lisboa.
- Millanvoye G (1991) *Mini-Enciclopédia das Medicinas Naturais – Resumo Histórico dos Remédios da Avozinha*. Publicações Dom Quixote. 1ª edição. Lisboa.
- Monjardino JR (2002) *Plantas Medicinais e Aromáticas do Parque Natural de Sintra-Cascais*. Instituto da Conservação da Natureza – Parque Natural de Sintra-Cascais. Ministério do Ambiente, Programa Ambiente.
- Novais M (2002) *Plantas Aromáticas e/ou Medicinais no Parque Natural da Arrábida*. Trabalho de fim de curso da Licenciatura em Biologia pela Universidade de Évora. Évora.
- Ody P (2000) *O Guia Completo das Plantas Medicinais*. Livraria Civilização Editora. Porto.
- Pedro JG, Santos IS (1998) *Flores da Arrábida – Guia de Campo*. Instituto da Conservação da Natureza – Parque Natural da Arrábida. Ministério do Ambiente, Programa Ambiente. Pinto da Silva A (1986) *Notas sobre a Colheita e Preparação de Exemplares para Herbário*. Estação Agronómica Nacional. Lisboa.
- Polunin M, Robbins C (1993) *A Farmácia Natural – Guia de Medicamentos Naturais*. Livraria Civilização Editora. Alemanha.
- Rocha F (1996) *Nomes Vulgares das Plantas Existentes em Portugal*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas – Protecção da Produção Agrícola. Direcção-Geral da Protecção das Culturas. Edição especial. Lisboa.
- Roger J (1998) *A Saúde pelas Plantas Medicinais – Vol. I e II*. Planeta De Agostini, Editores Reunidos, S. A.. Lisboa.
- Santos S (2004) *Plantas Medicinais da Península de Setúbal – Contribuição para o Conhecimento da sua Relevância Etnobotânica*. Relatório de Estágio de Licenciatura em Biologia Vegetal Aplicada pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Selga A (1998) *Estudis Etnobotànics a les Guilleris*. Tesi de Licenciatura. Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Barcelona.
- Valdés B, Talavera S, Fernández-Galiano E – Eds (1987) *Flora Vascular de Andalucía Occidental – Vol. I, II, III*. Ketres Editora S.A. Barcelona.
- <sup>1</sup>Recerca en Etnobotànica. UBWeb. <http://www.ub.es/botanica/etnobot.htm>.
- <sup>2</sup>Pando F, Etnobotànica. Real Jardín Botánico de Madrid. [http://www.rjb.csic.es/investigacion/investigacion\\_y\\_proyectos\\_del\\_rj.htm](http://www.rjb.csic.es/investigacion/investigacion_y_proyectos_del_rj.htm)
-

## FORMADORES



**Prof. Dr Ascensão, Lia**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500381 / Fax: +351217500048  
lia.ascensao@fc.ul.pt

**Prof. Dr Barroso, José Manuel**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500000 / Fax: +351217500048  
jgbarroso@fc.ul.pt

**Mes. Camejo Rodrigues, Joana S.**

EN8, N° 57, Ameal  
2565-641 Ramalhal  
Portugal  
Telefone: +351282973348  
jana\_camejo@yahoo.com

**Prof. Dr Cavaleiro, Carlos**

Universidade de Coimbra  
Faculdade de Farmácia  
Laboratório de Farmacognosia  
Rua do Norte  
3004-534 Coimbra  
Portugal  
Telefone: +351239859995 / Fax: +351239827126  
cavaleir@ff.uc.pt

**Dr Completo, Fernando**

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril  
Av. Condes de Barcelona  
2769-510 Estoril  
Telefone: +351210040700  
fernando.completo@eshte.pt  
fernando.completo@gmail.com

**Mes. Costa, Monya**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500257 / Fax: +351217500048  
mmcosta@fc.ul.pt

**Prof. Dr Faleiro, Leonor**

Universidade do Algarve, FERN  
Campus de Gambelas  
8005-139 Faro  
Portugal  
Telefone: +351289800900 / Fax: +351289818419  
mfaleiro@ualg.pt

**Prof. Dr Figueiredo, Ana Cristina**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500257 / Fax: +351217500048  
acsf@fc.ul.pt

**Eng. Joaquim, Ana Sofia**

Segredo da Planta, Lda.  
Produtos Naturais e Biológicos, Lda.  
Praceta Emídio Santana, lote 11 B  
Zona Industrial do Casal do Marco,  
2840-588 Aldeia de Paio Pires, Seixal  
Portugal  
Telefone: +351212268400 / Fax: +351212268409  
segredo@segredodaplanta.com

**Eng. Lourenço, João**

INETI  
Departamento de Tecnologia de Indústrias  
Químicas  
Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F  
1649-038 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217165141 / Fax: +351217168100  
joao.lourenco@netcabo.pt

**Dr Martins, Ana Paula**

INFARMED  
Parque de Saúde de Lisboa  
Av. Do Brasil n° 53  
1749-004 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +217987100 / Fax: +351217987316  
anapaula.martins@infarmed.pt

**Dr Meireles, Ana Catarina**

Rua Fernão Lopes, 10  
6420-062 Trancoso  
Telefone: +351 271811457  
cmeireles@portugalmail.pt

**Prof. Dr Miguel, Graça**

Universidade do Algarve, FERN  
Campus de Gambelas  
8005-139 Faro  
Portugal  
Telefone: +351289800900 / Fax: +351289818419  
mgmiguel@ualg.pt

**Dr Nogueira, Maria Teresa**

INETI  
Departamento de Tecnologia de Indústrias  
Químicas  
Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F  
1649-038 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217165141 / Fax: +351217168100  
teresa.nogueira@mail.ineti.pt

**Prof. Dr Pedro, Luís Manuel G.**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500181 / Fax: +351217500048  
luis.pedro@fc.ul.pt

**Prof. Dr Salgueiro, Lígia**

Universidade de Coimbra  
Faculdade de Farmácia  
Laboratório de Farmacognosia  
Rua do Norte  
3004-534 Coimbra  
Portugal  
Telefone: +351239859995 / Fax: +351239827126  
ligia@ff.uc.pt

**Lic. Santos, Sara**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500257 / Fax: +351217500048  
saraisantos@netcabo.pt

**Prof. Dr Trindade, Helena**

Faculdade de Ciências de Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa  
Portugal  
Telefone: +351217500199 / Fax: +351217500048  
htrindade@fc.ul.pt

**Eng. Tonutti, Ivano**

TRADALL S.A. (Bacardi Group), 267  
Route de Meyrin  
1217-MEYRIN  
Switzerland  
Telefone: +41227193496 / Fax: +41227193498  
itonutti@bacardi.com

---



## ÍNDICE REMISSIVO



$\beta$ -Caroteno-ácido linoleico .....	129	<i>Arnica montana</i> .....	56
<i>Abelmoschus moschatus</i> .....	148	Aromas .....	1
Absinto .....	2, 56, 60, 148	Aromaterapia .....	55, 59, 154
<i>Acacia</i> .....	2	<i>Artemisia</i> .....	12, 26, 56, 58, 60, 61, 145, 148
Açafrão .....	148	<i>Artemisia absinthium</i> .....	56
<i>Achillea ageratum</i> .....	175	<i>Aspergillus</i> .....	52, 53, 61, 143
<i>Achillea millefolium</i> .....	4, 5, 8, 10, 17, 130	<i>Asphodelus aestivus</i> .....	177
<i>Achillea ptarmica</i> .....	7, 17	<i>Asphodelus</i> spp. ....	177
Ácido gordo poli-insaturado .....	106	<i>Astragalus</i> .....	2
Atividade antimicrobiana .....	59, 135, 136, 137, 138, 139, 140	<i>Atropa belladonna</i> .....	2
Atividade turística .....	155, 156, 160, 161	Auditorias .....	66
Atividade biológica .....	55, 57	Auto-oxidação .....	122, 123
Adulterações .....	71	<i>Bacillus cereus</i> .....	141, 143, 144
<i>Aeromonas hydrophyla</i> .....	141, 144	Bactericida .....	59, 135
AFLPs .....	99, 100	Bacteriostática .....	59
Agência Europeia de Substâncias Químicas .....	73	Bálsamo de copaia .....	15
Agentes antimicrobianos .....	1, 135, 138, 139, 140	Banhos .....	154
Agriões .....	168	Baunilha .....	10, 12, 15, 148
Alcachofra .....	152	Benjoim .....	15
Alçaçuz .....	148	Bergamota .....	16
Alcalóides .....	1, 2, 12	<i>Beta vulgaris</i> .....	2
Alcarávia .....	56	Bioautografia .....	138
Alecrim .....	56, 57, 80, 94, 152, 168	Biodisponibilidade .....	57
Alentejo .....	52, 166, 171	Bioimpedimétrico .....	138
Alface .....	168	<i>Bixa orellana</i> .....	2
Alfazema .....	56	Blending .....	151
<i>Alium sativum</i> .....	58	Boas práticas agrícolas de plantas medicinais .....	62
Aljezur .....	166, 170, 171	Boldo .....	60
<i>Allium sativum</i> .....	177	Bolsas .....	8
<i>Aloysia triphylla</i> .....	172, 175, 176, 177	Borracha .....	26
Alvos celulares .....	135, 140	<i>Boswellia carteri</i> .....	15
<i>Amplified fragments length polymorphisms</i> .....	99	<i>Boswellia thurifera</i> .....	16
Análise das Correspondências .....	172	Botanical recipes .....	149
Análise de peróxidos .....	124	Cabeça glandular .....	20
Análise em Componentes Principais .....	38	Cálamo .....	60
Análise multivariada .....	38	Camazuleno .....	4, 5
<i>Andrena nigroaenea</i> .....	5, 6	Camomila .....	56, 148
<i>Anethum graveolens</i> .....	11, 12, 16	Camomila-romana .....	56
Aneto .....	60, 139	Canais .....	8
Angélica .....	148	<i>Cananga odorata</i> .....	11, 16
<i>Angelica archangelica</i> .....	148	<i>Candidas</i> .....	52
<i>Aniba rosae odora</i> .....	16	Canela da china .....	56
Anis .....	56	Canela de Ceilão .....	56
Anis estrelado .....	56	<i>Cannabis sativa</i> .....	2
<i>Anthemis nobilis</i> .....	148	Capacidade antioxidante .....	105, 111, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 122, 127, 128, 129, 134
<i>Anthriscus sylvestris</i> .....	177	<i>Capsella rubella</i> .....	177
Antifúngicos .....	52, 53	<i>Capsicum annum</i> .....	2
Antioxidantes .....	1, 105, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 118, 119, 122, 123, 127, 128	Características poligénicas .....	96
Antioxidantes naturais .....	128	Cardo-bento .....	148
<i>Arachis hypogaea</i> .....	2	Cardo-santo .....	148
Área Protegida da Serra do Açor .....	166, 170, 171	<i>Carica</i> .....	2, 26
Áreas Protegidas .....	156, 158, 167, 171	<i>Carum carvi</i> .....	11, 56
Armazenamento .....	4, 11, 29, 64, 66, 90, 92, 93, 94, 122, 123, 127	Casca de laranja amarga .....	56
Arnica .....	56	<i>Cassia fistulosa</i> .....	4
		Castanheiro .....	168
		<i>Catharanthus roseus</i> .....	2
		Cavidades .....	22, 24

<i>Cedrus deodara</i> .....	58, 61	Cozimento.....	153
<i>Centaurium erythraea</i> .....	169	Cravinho .....	56, 148
Certificado fitossanitário.....	64	Cravinho-da-Índia .....	148
<i>Chamaemelum nobile</i> .....	56, 58, 148, 175	<i>Crithmum maritimum</i> .....	8, 9, 12, 17, 18, 143
<i>Chamomilla recutita</i> .....	11, 58, 148	Crivadora .....	153
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> .....	2	<i>Crocus sativus</i> .....	2, 148
<i>Cichorium intibus</i> .....	2	<i>Croton cajucara</i> .....	58, 61
Ciclo de actividade do polinizador.....	4	CT 5.....	71
CIF .....	139	Cultivo.....	63, 89
Cinchona.....	2, 148, 149	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> .....	56
<i>Cinchona ledgeriana</i> .....	2	Curcuma-de-Java .....	56
<i>Cinnamomum camphora</i> .....	14	<i>Cydonia oblonga</i> .....	177
<i>Cinnamomum cassia</i> .....	56	<i>Cymbopogon citratus</i> .....	16, 152, 177
<i>Cinnamomum ceylanicum</i> .....	16	<i>Cynara scolymus</i> .....	132, 152
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> .....	56	<i>Datura stramonium</i> .....	2
<i>Citrus aurantium</i> .....	16, 148	<i>Daucus carota</i> .....	2
<i>Citrus aurantium</i> .....	56, 57	<i>Daucus dorsalis</i> .....	4
<i>Citrus decumana</i> .....	16	Decocção.....	153, 176
<i>Citrus limon</i> .....	16, 24, 27, 57, 148, 175, 177	Dente-de-leão.....	148
<i>Citrus mandurensis</i> .....	16	Dermatófitos .....	52, 59
<i>Citrus paradisi</i> .....	16	Desenvolvimento do órgão .....	4
Classificação Automática .....	172	Desodorizantes.....	154
Clevenger.....	37, 79	Destilação .....	1, 37, 56, 57, 79, 90, 152
Clima.....	4, 63	Destilação com vapor de água .....	71, 80
CMB.....	137, 138	Destilação industrial.....	83
CMI .....	137, 138, 139	Destiladores portáteis .....	91
<i>Cnicus benedictus</i> .....	148	Deteção da captação de radicais livres.....	118
<i>Cochlospermum tinctorium</i> .....	59, 61	Deteção de metais .....	153
Cocoonização .....	161	Determinação da actividade antioxidante ..	112, 128
Código comunitário .....	30, 31	Difusão em agar .....	137, 138
Coentro .....	56, 139, 148, 168	Digestões difíceis/digestiva.....	175
coentros .....	139, 168	<i>Digitalis lanata</i> .....	2
<i>Coffea arabica</i> .....	177	<i>Dioscorea deltoidea</i> .....	2
Colheita.....	8, 9, 10, 14, 15, 16, 37, 49, 51, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 76, 89, 90, 91, 128, 152, 168, 172, 173, 175, 176	Directiva.....	30, 31, 32, 33, 35, 73, 74
Colónias .....	154	Diterpenos .....	1
Comercialização de PAM's .....	153	Documentação de apoio .....	77
Comissão Técnica de Óleos Essenciais .....	71	DPPH.....	115, 117, 118, 129
<i>Commiphora myrrha</i> .....	15	<i>Duboisia myoporoides</i> .....	2
Comparação de genomas.....	96	<i>E. coli</i> .....	141
Complexo ferro .....	106	<i>Ecballium elaterium</i> .....	177
Compressas.....	154	ECHA.....	73
Comunidades locais.....	161, 162, 163	<i>Echinacea angustifolia</i> .....	152
Concentração Mínima Bactericida .....	137	<i>Ecological tourism</i> .....	162
Concentração Mínima Inibitória .....	137	<i>Ecotours</i> .....	162
Concentrações inibitórias fraccionadas.....	139	Ecoturismo.....	155, 156, 157, 158, 160, 161, 162, 163, 169
Concreto .....	15	Efeitos adversos .....	34, 55, 60, 62
Condensador .....	86, 93	EINECS .....	74, 75, 76
Condições ambientais.....	4, 10, 64	ELINCS.....	74, 75, 76
Condições de referência .....	87	ELISA .....	149
Condições político / sociais .....	4	Embalagens.....	37, 66, 93
<i>Conium maculatum</i> .....	177	Emergências.....	I, 19
Constipações e gripes.....	175	Empacotamento.....	66
<i>Copaifera officinalis</i> .....	15	Endemismo.....	51, 52
<i>Corchorus</i> .....	2	Entrevista estruturada.....	167
<i>Coreopsis tinctoria</i> .....	152	Entrevista informal .....	167
<i>Coriandrum sativum</i> .....	12, 56, 148	Entrevista não estruturada.....	167
		Entrevista semi-estruturada .....	167, 168, 172, 173

Entrevistas etnobotânicas.....	170	<i>Glycyrrhiza glabra</i> .....	148
Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.....	149	Goma.....	2, 15
Equinácea.....	152	<i>Gomphrena globosa</i> .....	152
Erva príncipe.....	152	<i>Gossypium</i> .....	2, 27
Erva-cidreira.....	148, 152, 168, 175	<i>Hedera</i> spp.....	177
Espécies autóctones.....	169	<i>Helianthus tuberosus</i> .....	2
Espécies reactivas oxigenadas.....	106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 118, 119	<i>Helicrisium</i> .....	152
Esquizogenia.....	24	<i>Helicrisium italicum</i> .....	152
Esquizolisigenia.....	24	<i>Herbal drug preparations</i> .....	67
Essência.....	1	<i>Herbal drugs</i> .....	67
Estabilidade.....	11, 15, 71, 73, 122, 123	<i>Herbal materials</i> .....	67
Estímulo mecânico ou químico.....	4	<i>Herbal medicines</i> .....	67
Estômago.....	172	<i>Herbal preparations</i> .....	67
Estrela do Egípto.....	152	<i>Herbal substances</i> .....	67
Estruturas secretoras externas.....	8	<i>Herbs</i> .....	61, 67
Estruturas secretoras internas.....	8	<i>Herpes simplex</i> .....	60, 61
Etnobotânica.....	165, 166, 167, 171, 173, 178, 179	<i>Hevea brasiliensis</i> .....	2, 26
Eucalipto.....	56	<i>Hevea</i> .....	2, 26
<i>Eucalyptus globulus</i> .....	16, 56	<i>Hibiscus abelmoschus</i> .....	148
<i>Eucalyptus</i> spp.....	175	<i>Hibiscus</i> .....	2, 142
<i>Eugenia caryophyllata</i> .....	148	Hipericão do Gerês.....	152
Experienciação.....	167	Hissopo.....	60, 148
Exportação.....	64, 164	Hortelã-pimenta.....	14, 56, 57, 152
Extracção com fluidos supercríticos.....	79	Humidade... ..	9, 11, 20, 63, 65, 66, 69, 91, 153, 176
Extracção por solventes.....	1	<i>Hypericum androsaemum</i> .....	36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 65, 152
Factores edáficos.....	4	<i>Hypericum calycinum</i> .....	36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45
Factores genéticos e evolução.....	4, 13	<i>Hypericum elodes</i> .....	36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44
Factores que limitam uma produção homogénea.....	3	<i>Hypericum hircinum</i> .....	36, 37, 40, 41, 42, 43, 44
Farmácia.....	55	<i>Hypericum humifusum</i> .....	37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45
Farmacocinética.....	55, 58	<i>Hypericum linarifolium</i> .....	37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45
Fármacos.....	45, 55, 58, 62, 121, 165	<i>Hypericum montanum</i> ....	37, 38, 39, 41, 42, 43, 44
Fase de vapor.....	80, 81, 82, 83, 138	<i>Hypericum perforatum</i> .....	36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45
Fenilpropanóides.....	1	<i>Hypericum perforatum</i> .....	36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46
Fenóis.....	2, 129	<i>Hypericum pubescens</i> ...37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	
<i>Fingerprinting</i> .....	99	<i>Hypericum pulchrum</i> ...37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	
<i>Finished herbal products</i> .....	67	<i>Hypericum tomentosum</i> ...36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	
Fitoterapia.....	29	<i>Hypericum undulatum</i> ...36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	
Flor de fava.....	152	<i>Hyssopus officinalis</i> .....	61, 148
Flor de laranjeira amarga.....	56	ICN.....	158, 167, 171
<i>Foeniculum vulgare</i> .....	56, 57, 58, 133, 177	ICNB.....	158
Folheto informativo.....	32, 33, 34	Identificação taxonómica.....	63, 65, 169
Food Chemicals Codex – FCC.....	71	Idioblastos.....	8, 22
<i>Fractional inhibitory concentrations</i> .....	139	Ilha da Madeira.....	166
Framboesa.....	148	<i>Illicium</i> spp.....	177
Funcho amargo.....	56	<i>Illicium verum</i> .....	56
Funcho-doce.....	56	Inalações.....	154
Fungicida.....	53, 59, 135	Índice de acidez.....	129
Fungistática.....	59	Índice de peróxidos.....	128, 129
<i>Gallium aparine</i> .....	177		
<i>Gaultheria procumbens</i> .....	58		
Gel de agarose.....	103, 104		
Genciana-das-boticas.....	148		
Gengibre.....	148		
<i>Gentiana lutea</i> .....	148		
Genuinidade.....	71, 74, 161, 163		
<i>Giardia lamblia</i> .....	60		
Glutatioo oxidado.....	106		

Informante.....	168, 174, 176	Manjeriço .....	60
Informantes-estrela .....	175	Mapas de <i>linkage</i> .....	95
Infusão .....	153, 176	Mapeamento genético .....	95
Infusion .....	149	Marcadores bioquímicos.....	95
Instalação industrial .....	79, 85	Marcadores moleculares.....	95, 96, 100
<i>Inter-simple sequence repeat</i> .....	99	Marcadores morfológicos.....	95, 100
<i>Inula helenium</i> .....	2	Marcelas .....	175
Inventário .....	66	<i>Marker assisted selection</i> .....	96
Iris .....	148	MAS.....	96
<i>Iris florentina</i> .....	148	Massagens .....	154
ISO/TC.....	71, 72, 78	Material de propagação .....	63
Isoenzimas.....	95, 96, 97, 100	<i>Matricaria chamomilla</i> .....	148, 175
ISSR .....	99, 101	<i>Matricaria crispa</i> .....	59
Jardins de cheiros.....	158	<i>Matricaria nicaeensis</i> .....	172, 175, 176
Jardins de plantas medicinais .....	158	<i>Matricaria recutita</i> .....	56, 148, 175
Jardins didáticos .....	158	<i>Matricaria sylvestris</i> .....	172, 175, 176
<i>Jasminum</i> .....	2, 11	<i>Matricaria tournefortiana</i> .....	172, 175, 176
<i>Jasminum officinalis</i> .....	16	<i>Matricaria sp.</i> .....	56, 148, 175
<i>Juglans regia</i> .....	177	Medicamentos à Base de Plantas .....	33, 34, 35
<i>Juniperus communis</i> .....	57, 58, 148	Medicamentos tradicionais .....	30, 31, 32, 33, 34
<i>Juniperus virginiana</i> .....	16	Medicina....1, 29, 36, 55, 58, 59, 63, 64, 152, 157, 165, 172	
Lagos .....	166, 170, 171	<i>Medicinal plant materials</i> .....	67
Laranja .....	8, 10, 16, 57	<i>Melaleuca cajeputi</i> .....	58
Laranjeira azeda .....	148	Melissa .....	56, 58, 59, 148, 152, 175, 177
Látex .....	19, 26	<i>Melissa officinalis</i> .....	56
Laticíferos .....	19, 24, 26	Mentas.....	80
Lavanda .....	80, 148	<i>Mentha piperita</i> .....4, 9, 11, 16, 57, 56, 58, 152	
<i>Lavandula angustifolia</i> .....	16, 56	Mmetabolitos secundários....9, 10, 11, 12, 17, 19, 49, 100	
<i>Lavandula officinalis</i> .....	148	Método “observação participação”.....	167
<i>Lavandula pinnata</i> .....	7, 17	Metodologia em Etnobotânica .....	167
<i>Lavandula viridis</i> .....	22	Métodos de avaliação da actividade antimicrobiana.....	135
<i>Lavatera cretica</i> .....	170, 172, 175, 176, 177	Microatmosfera .....	138
Legislação.....	30, 31, 35, 63, 71, 73, 77	Microbiocida.....	135, 136
<i>Leonotis leonurus</i> .....	8, 20, 22, 27	Microbiostático .....	135, 136
Likens-Nickerson .....	79	Microsatélites.....	97, 99
Lima .....	16, 152, 172, 175, 176	Mirra .....	15
Limão .....	10, 16, 57, 148	<i>Monarda</i> .....	48, 131
Limoeiro .....	168, 175	Moscadeira .....	148
<i>Linum usitatissimum</i> .....	2	Mostarda.....	60
Lípidos .....	2	Mostragem.....	168
<i>Lippia alba</i> .....	58, 61	<i>Musa</i> .....	26
<i>Lippia citriodora</i> .....	152	<i>Myristica fragans</i> .....	56, 57, 148
Líquidos imiscíveis.....	81	<i>Narcissus poeticus</i> .....	11, 15
Lírio .....	148	<i>Nasturtium officinale</i> .....	177
Lisigenia.....	24	Natural flavouring.....	145
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	141, 142, 143	NLP.....	76
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> .....	2	Nomenclatura .....	48, 71, 75, 173, 174
<i>Lobelia inflata</i> .....	2	Norma Portuguesa.....	71
<i>Lonicera japonica</i> .....	6, 17	Normalização de Óleos Essenciais .....	71
Losna .....	148	Noz-moscada.....	56, 148
Lúmen.....	10, 24, 26	Número CAS.....	75, 76
<i>Lycopersicum</i> .....	2	Número EINECS.....	75
Maceração .....	153	Observador participante.....	167
Maceration .....	149	<i>Ocimum sp.</i> .....	3, 16, 17, 101, 102, 133, 142
Madeira de quássia.....	148	<i>Ocimum basilicum</i> .....	11, 12
Madressilva.....	6, 7		
<i>Malva spp.</i> .....	172, 175, 176		
Mangerona.....	148		

<i>Ocotea cymbarum</i> .....	14	<i>Pinus ponderosa</i> .....	13
<i>Olea europaea</i> .....	177	<i>Pinus sylvestris</i> .....	11
Oleoresinas .....	15	<i>Plantago coronopus</i> L.....	177
Óleos essenciais .....	1, 60, 71, 78	<i>Plasmodium falciparum</i> .....	59
Olíbano .....	15	<i>Plectranthus laxiflorus</i> .....	22
<i>Ophrys lutea</i> .....	20	<i>Plectranthus madagascariensis</i> .....	8, 22
<i>Ophrys sphegodes</i> .....	5, 6, 18	<i>Plectranthus madagascariensis</i> .....	8, 16, 22, 27
Orégão .....	148	<i>Plectranthus ornatus</i> .....	8, 16, 27
Organização Internacional de Normalização de Óleos Essenciais.....	71	Poejo .....	60, 168
Organização Mundial do Turismo .....	160	<i>Pogostemon patchouli</i> .....	16
<i>Origanum</i> .....	48, 131, 133, 142, 143, 148	<i>Polimerase Chain Reaction</i> .....	97
Orquídea aranha .....	5	Polimorfismo.....	48, 49, 50, 51, 95, 96, 97, 99, 100
<i>Oryza sativa</i> .....	2	Polinizadores .....	4, 6, 7, 9
Osmóforos .....	8	Polissacáridos .....	2
<i>Osteospermum ecklonis</i> .....	22	<i>Populus</i> spp.....	177
Oxidação lipídica.....	112, 118, 122, 123, 127, 134	Preparação.....	29, 33, 55, 58, 74, 153, 157, 163, 168, 169
Oxidantes .....	105, 109	Preparações à base de plantas .....	32
Palmeirização .....	161	Pré-registo .....	74, 75, 77
<i>Panax ginseng</i> .....	2	Pressão .....	1, 16
<i>Papaver somniferum</i> .....	2, 177	Pressão de vapor .....	80, 81, 82, 83
<i>Papaver</i> spp. ....	177	<i>Primers</i> .....	97, 99
Parque Natural da Arrábida .....	166, 171, 179	Produção de PAM's.....	152
Parque Natural da Serra da Estrela.....	166, 171	Produtos biológicos .....	152, 153, 158
Parque Natural da Serra de S. Mamede.....	166, 170, 171, 178	Produtos regionais .....	158
Parque Natural de Montesinho .....	166, 171	Programa Nacional de Turismo da Natureza ...	156
Parque Natural de Sintra-Cascais ....	166, 171, 179	Proteínas .....	2
Parque Natural do Alvão.....	166	Protocolo de extracção e isolamento de DNA ..	103
Parque Natural do Douro Internacional ....	166, 171	<i>Prunus amygdalus</i> .....	2
Parque Natural do Vale do Guadiana .....	166, 171	<i>Prunus</i> spp. ....	177
Património florístico .....	158	Publicidade .....	32, 34
PCR.....	96, 97, 98, 99, 100, 103, 104	Purificadores do Ar .....	154
<i>Pelargonium graveolens</i> .....	172, 175, 176	QTLs .....	96
<i>Pelargonium odorantissimum</i> .....	16	Quantidade de material / Necessidade de espaço e mão-de-obra .....	4
Peneiras manuais .....	153	Quantificação do DNA .....	103
Península de Setúbal... 166, 171, 172, 173, 178, 179		quantitative trait loci.....	96
Percolation.....	150	<i>Quassia amara</i> .....	148, 149
Percurso dos cheiros .....	158	Quenopódio .....	60
Percursos das plantas com perfume .....	158	Quimiotaxonómico.....	37, 45, 46, 67
Percursos dos sentidos .....	158	Quineira-amarela.....	148
Percursos pedagógicos .....	158	Radiação ionizante .....	106
Percursos pedestres.....	158	Radicais livres . .	107, 109, 110, 111, 112, 118, 122
Perfumes .....	154	Radical alcoxilo alifático .....	106
Peroxidação lipídica.....	105, 111, 114, 118	Radical glutationilo .....	106
Peróxido de hidrogénio.....	107, 108, 118, 119, 120, 121	Radical hidroxilo .....	106
Perpétua roxa .....	152	Radical peroxilo alquílico.....	106
Pestes .....	4	Random amplified polymorphic DNA.....	97
Petigrain .....	16	RAPDs .....	97, 98, 99, 100, 101, 103, 104
<i>Petroselinum crispum</i> .....	177	Reacção de RAPDs .....	103
<i>Peumus boldus</i> .....	177	REACH.....	71, 73, 74, 75, 76, 77, 78
<i>Picea</i> .....	10, 11	Redução do oxigénio.....	107, 108
<i>Pimpinella anisum</i> .....	56	Região de Beja.....	166
<i>Pinus elliotii</i> .....	11	Registo de utilização tradicional .....	32, 33, 34
<i>Pinus pinaster</i> .....	10, 57, 74, 177	Regulamento .....	30, 31, 35, 73, 74, 75, 77, 78
<i>Pinus pinea</i> .....	177	Regulamento REACH.....	71
		Regulation .....	78, 145, 147, 151
		Rendimento.....	1, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 37, 40,

79, 89, 125	Stabilisation .....	151
Reserva Natural da Serra da Malcata .....	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	141
Reserva Natural do Sapal de Castro Marim e Vila Real de Santo António .....	<i>Sterculia</i> .....	2
166, 171	STMS .....	99
Resolução do Concelho de Ministros .....	Stress hídrico e método de irrigação .....	4
156, 158	<i>Styrax benzoin</i> .....	15
<i>Restriction fragment length polymorphisms</i> .....	Substância .....	33, 34, 35, 73, 74, 75, 76, 77, 105, 113, 118, 120, 139
97	Substratos de oxidação .....	122, 124
RFPLs .....	Sudoeste Algarvio .....	166
97, 99	Supercritical Fluid Extraction .....	150
<i>Rheum palmatum</i> .....	Superóxido .....	106
148	<i>Syzygium aromaticum</i> .....	56, 59, 148
Rosa .....	Tamisadora .....	153
16, 148	Tangerina .....	16
<i>Rosa canina</i> .....	<i>Tapirira guianensis</i> .....	20
16	Taráxaco .....	148
<i>Rosa gallica</i> .....	<i>Taraxacum officinale</i> .....	148
148	Taxonómico .....	19, 22, 24, 26, 101
Rosa Turca .....	TBARS .....	128, 129, 132
16	Technical Guidance Documents .....	77
<i>Rosmarinus officinalis</i> .....	Tempo de detecção .....	138
10, 11, 16, 18, 56, 57, 58, 94, 131, 152, 177	Terpenos .....	1, 2
Rotas temáticas .....	Testes histoquímicos .....	22
163	<i>Thaumatococcus danielli</i> .....	2
Rotulagem .....	<i>Thymbra capitata</i> .....	48, 50, 51, 53, 54, 129, 131, 132, 142
32, 33, 34, 66, 71, 75, 76	<i>Thymi aetheroleum</i> .....	48
<i>Rubia peregrina</i> .....	<i>Thymi herba</i> .....	48
177	<i>Thymus albicans</i> .....	49, 128
<i>Rubus idaeus</i> .....	<i>Thymus caespititius</i> .....	12, 13, 17, 18, 49, 50, 53, 54, 128, 132
148	<i>Thymus camphoratus</i> .....	49, 52, 129
<i>Rubus spp.</i> .....	<i>Thymus capitatus</i> .....	129
177	<i>Thymus capitellatus</i> .....	49, 52, 53
Ruibarbo-da-China .....	<i>Thymus carnosus</i> .....	12, 17, 49, 52, 54, 129, 132
148	<i>Thymus eigi</i> .....	129
<i>Ruta chalepensis</i> .....	<i>Thymus guyonii</i> .....	129
177	<i>Thymus lotocephalus</i> .....	49, 52
Sabedoria popular .....	<i>Thymus mastichina</i> .....	49, 51, 52, 129, 132
157, 158	<i>Thymus munbyanus</i> .....	129
Saberes-fazer .....	<i>Thymus numiticus</i> .....	129
165, 167	<i>Thymus pallescens</i> .....	129
<i>Salmonella enteritidis</i> .....	<i>Thymus praecox</i> .....	49
141	<i>Thymus pulegioides</i> .....	49, 53
Salsa .....	<i>Thymus serpyllum</i> .....	57, 129, 132
60, 168	<i>Thymus spathulifolius</i> .....	129
Salva .....	<i>Thymus sypyleus</i> .....	129
57, 148	<i>Thymus villosus</i> .....	49, 52
Salva-das-boticas .....	<i>Thymus vulgarae</i> .....	129
148	<i>Thymus vulgaris</i> .....	48, 57, 59, 101, 129, 132, 143, 148
<i>Salvia fructicosa</i> .....	<i>Thymus x citriodorus</i> .....	129
57, 61, 143	<i>Thymus x-porlock</i> .....	129
<i>Salvia fruticosa</i> .....	<i>Thymus zygis</i> .....	48, 49, 50, 51, 53, 54, 57, 131, 177
60, 101, 102	<i>Thymus</i> .....	12, 17, 18, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 59, 101, 128, 130, 131, 132, 134, 142, 143, 148, 177
<i>Salvia officinalis</i> .....		
4, 10, 57, 133, 148		
<i>Salvia officinallis</i> .....		
58		
<i>Salvia sclarea</i> .....		
16		
<i>Sambucus nigra</i> .....		
177		
<i>Santalum album</i> .....		
16, 60		
<i>Santolina chamaecyparissus</i> .....		
177		
<i>Santolina rosmarinifolia</i> .....		
177		
<i>Sassafras albidum</i> .....		
11		
<i>Satureja</i> .....		
48, 59, 142, 148		
<i>Scabiosa atropurpurea</i> .....		
177		
Secador eléctrico .....		
153		
Secagem .....		
11, 36, 37, 62, 65, 66, 153, 176		
Secreções .....		
19, 48, 58		
Segurelha .....		
148		
Seleção assistida por marcadores .....		
96, 101		
<i>Sequence-tagged microsatellite sites</i> .....		
99		
Serpão .....		
57		
Serra do Açor .....		
166, 170		
<i>Seseli tortuosum</i> .....		
177		
<i>Sideritis mugronensis</i> .....		
7, 17		
SIEF .....		
75, 77		
Silva .....		
168		
<i>Ssingle sequence length polymorphism</i> .....		
99		
Sistema digestivo .....		
172		
Sistema micelar .....		
128, 129		
<i>Solanum tuberosum</i> .....		
2		
Sondas de hibridização de DNA .....		
96		
SSLP .....		
99		
SSR .....		
99, 101		

Tinturas .....	15, 32, 67
Tipo de estrutura secretora.....	4
Tipo de material.....	4
Tomilhos.....	48, 49, 51, 52, 53, 57, 59, 148
Tomilhos fenólicos.....	49, 52
Toranjás .....	10
Transporte .....	20, 66, 71, 111, 140
Transposição nacional.....	32, 35
Tricomas.....	8, 19, 20, 22, 24
<i>Triticum aestivum</i> .....	2
<i>Triticum aestivus</i> .....	177
<i>Tuberaria lignosa</i> .....	177
Turismo cultural .....	169
turismo tradicional .....	155, 156
Ultrasounds extraction.....	150
<i>Urtica dioica</i> .....	177
UVCB .....	76
Vacuum Microwave Hydro Distillation.....	150
<i>Valeriana officinalis</i> .....	2
<i>Vanilla planifolia</i> .....	11, 16, 148
<i>Variable number tandem repeats</i> .....	97
Variação natural .....	95, 96, 100
Variação sazonal .....	4, 9
Variações fisiológicas .....	I, 3, 4
Variações geográficas .....	I, 4, 12
Vermouth.....	145, 146, 147, 149, 150, 151
<i>Vetiveria zizanooides</i> .....	16
<i>Vicia faba</i> .....	152, 177
Vila do Bispo.....	V, 166, 170, 171
Vitamina C.....	106
Vitamina E .....	106
VNTR.....	97
<i>Voucher specimens</i> .....	174
Wine aromatisation.....	145
Ylang-ylang.....	16
<i>Zea mays</i> .....	2, 177
<i>Zieria smithii</i> .....	4
Zimbro .....	57, 60, 148
<i>Zingiber officinale</i> .....	11, 12, 13, 58, 148

---

COM O APOIO DE



BACARDI-MARTINI PORTUGAL



*Ach Brito*

**ESTÉTICA DIVA**  
Revista de Estética Profissional

**Avianense**





FACULDADE DE CIÊNCIAS UNIVERSIDADE DE LISBOA

Centro de Biotecnologia Vegetal  
Faculdade Ciências Lisboa  
Departamento de Biologia Vegetal  
C2, Piso 1, Campo Grande  
1749-016 Lisboa

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL



BACARDI-MARTINI PORTUGAL



Ach Bruto Avianense



ESTÉTICA CIVIA  
Revista de Estética Profissional

