

ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE EXTRACTOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *MENTHA X PIPERITA*

José Manuel Neves

Professor Auxiliar
CIAGEB, Faculdade de Ciências de Saúde – UFP
IBB – U Minho
jneves@ufp.edu.pt

Carla M. Matos

Professora Auxiliar
CIAGEB, Faculdade de Ciências de Saúde – UFP
cmatos@ufp.edu.pt

Carla G. Moutinho

Professora Auxiliar
CIAGEB, Faculdade de Ciências de Saúde – UFP
IBB – U Minho
carlamo@ufp.edu.pt

Lígia Rebelo Gomes

Professora Auxiliar
CIAGEB, Faculdade de Ciências de Saúde – UFP
lrgomes@ufp.edu.pt

Tânia Teixeira

Açores

RESUMO

Neste estudo apresentam-se os resultados referentes à avaliação do potencial anti-oxidante de extractos aquosos de *Menta x piperita* recolhida da região de Trás-os-Montes. A capacidade anti-oxidante foi testada pelo método DPPH; tendo sido também feita a quantificação dos compostos fenólicos totais nos extractos pelo método de Folin-Ciocalteu, apontados como os responsáveis pelas propriedades antioxidantes da planta. Adicionalmente, apresentam-se os resultados relativos à avaliação citotoxicidade dos mesmos extractos através de testes de citotoxicidade *in vitro*, utilizando como organismo modelo *Tetrahymena pyriformis* (com viabilidade avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT).

PALAVRAS-CHAVE

Menta x piperita; citotoxicidade; actividade antioxidante; compostos fenólicos

ABSTRACT

The aim of the present study is to investigate the antioxidant potential of aqueous extracts of *Menta x piperita* from Trás-os-Montes by the DPPH[•] method, as well as to quantify the total phenolic compounds in the extracts by the Folin-Ciocalteu method, probably responsible for the plant antioxidant properties. Additionally, the research work presented herein seeks to assess the effects of *Menta x piperita* through a series of *in vitro* cytotoxicity tests, using *Tetrahymena pyriformis* as model organism. Viability will be evaluated by the colorimetric MTT assay.

KEYWORDS

Menta x piperita; cytotoxicity; antioxidant activity; phenolic compounds

1. INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo metabólico que permite ao sistema celular converter potencial energético de partículas assimiláveis em energia utilizável e necessária para as actividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigénio molecular nas células também origina o aparecimento de intermediários resultantes da sua redução parcial denominadas por espécies reactivas de oxigénio (EROs) (Tepe *et al.*, 2005). O desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de detoxificação destas espécies no organismo humano, com um consequente aumento da concentração de radicais livres nas células, acarreta o desenvolvimento de um quadro de stresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2006). Assim o controlo entrópico dos processos biológicos a nível celular requer um ambiente redutor que precisa de ser mantido com recurso a inúmeras estruturas enzimáticas anti-oxidantes.

Diversos trabalhos científicos têm sugerido o envolvimento do stresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças crónicas e degenerativas, tais como arteriosclerose, cancro, doenças cardíacas, Alzheimer, bem como no processo de envelhecimento (Oktay *et al.*, 2003), pelo que o modelo que propõe que o stresse oxidativo é o factor mais responsável pela degeneração celular tem sido bem aceite pela comunidade científica. Apesar disso, tanto a fonte como a natureza das EROs são questões ainda prementes. Estudos muito recentes, indicam, ao contrário do estipulado anteriormente, para a existência de uma cadeia metabólica específica de sinalização e regulação que descreve como é que o stresse oxidativo é reconhecido no seio do sistema e traduzido em degeneração celular (Seiler *et al.* 2008). Esta descoberta dá um novo impulso à procura de substâncias ou mistura delas que possibilitem a interrupção da cascata de reacções metabólicas ligadas ao stresse oxidativo.

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado que os antioxidantes fenólicos presentes em cereais, frutas e vegetais são os principais constituintes que contribuem para a redução significativa da incidência de doenças crónicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos (Luthria *et al.*, 2006). Como compostos naturais típicos que possuem actividade antioxidante destacam-se o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes incluem o hidroxianisol de butil (BHA) e o hidroxitolueno de butil (BHT). Os compostos fenólicos também são, como já foi salientado, potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigénio singleto, actuando nas reacções de oxidação lipídica, assim como na quelatação de metais.

Existem disponíveis diversas formulações de suplementos alimentares com actividade anti-oxidante, todavia, diversos ensaios clínicos feitos em larga escala não demonstram de forma clara o benefício de tais formulações. Pelo contrário, o excesso de suplemento pode contribuir para o aparecimento de efeitos nocivos. De facto, os suplementos de dieta possuem na sua constituição somente alguns dos anti-oxidantes comparativamente com o largo espectro de constituintes com essa acção que se encontram em matérias de origem vegetal.

Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo quanto a própria espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente. Nas últimas décadas observou-se um enorme crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extractos brutos, de fracções purificadas ou de componentes isolados.

As plantas pertencentes à família Lamiaceae (Labiatae) são as mais representativas (34%) da vegetação na zona nordeste de Portugal, designadamente, da região transmontana do Larouco e do Brunheiro, área pertencente aos concelhos de Montalegre e Chaves (Neves *et al.*, 2008). Algumas plantas endémicas são usadas como recurso alternativo em termos de cuidados médicos, curativos ou preventivos. As infusões de *Mentha x piperita*, por exemplo, são tradicionalmente usadas no tratamento de doenças do sistema gastrointestinal e renal, seja como anti-espasmódico, anti-séptico ou estomáquico, possuindo ainda propriedades analgésicas, anti-asténicas, anti-neurálgicas, entre outras (Neves *et al.*, 2009).

Neste trabalho pretendeu-se estudar as propriedades antioxidantes e citotóxicas de extractos de *Mentha x piperita* da flora portuguesa transmontana de modo a avaliar em estudos posteriores as doses correspondentes à máxima razão benefício (efeito anti-oxidante) / efeito adverso (citotoxicidade).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

Todos os reagentes (MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio; DMSO (dimetil sulfóxido), DPPH* - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, BHT; BHA; ácido gálico (AG); carbonato de sódio e reagente de Folin-Ciocalteu; solução NBF (Neutral Buffered Formalin) contendo formalina a 10 % em PBS, a pH 7,0 e azul toluidina a 0,01 %) foram usados sem qualquer purificação adicional e obtidos da Sigma.

O meio de cultura utilizado para o ensaio de citotoxicidade foi o PPY (Protease Peptone Yeast Extract Medium; CCAP, Aberdeen, UK) constituído por Proteose Peptona (20,0 g/L) e Extracto de Levedura (2,5 g/L).

2.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS AQUOSOS

Mentha x piperita foi colhida na região transmontana do Larouco e do Brunheiro, área pertencente aos concelhos de Montalegre e Chaves (June, 2007) e identificada no Departamento de Biologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, o qual forneceu o *voucher* respectivo.

A planta foi seca à sombra, à temperatura ambiente durante o tempo necessário. Para a preparação do extracto aquoso utilizaram-se cem gramas de material vegetal seco e triturado de forma grosseira que foram macerados durante 48 h à temperatura ambiente em 1000 mL de água. A fracção aquosa foi obtida por filtração sucessiva até à obtenção de um filtrado límpido. O extracto límpido foi sujeito a uma filtração esterilizante através de filtros de carbono de 45 µm, liofilizado e armazenado a 4° C até ser utilizado.

As soluções mais concentradas de extracto foram obtidas por pesagem rigorosa do liofilizado, seguida de dissolução. As soluções mais diluídas foram preparadas a partir das anteriores por diluição rigorosa com água bidesionizada, apresentando condutividade inferior a 0,1 µS cm⁻¹.

2.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQUESTRAR RADICAIS LIVRES COM DPPH*

A actividade antirradical dos extractos foi determinada segundo Silva *et al.* (2004) e Wei e Shibamoto (2007). Num leitor de microplacas ao monitorizou-se a concentração de DPPH* a 515 nm. Uma série de diluições (0,278 mg/mL e 0,003 mg/mL) foi preparada em microplacas de 96 poços, contendo, cada um, 25 µL de extracto e 200 µL de DPPH* a 150 µM. O controlo (diluição sem extracto) foi sujeito às mesmas condições experimentais.

Os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente, com leitura ao comprimento de onda especificado, após o tempo suficiente para a reacção total entre a amostra e o DPPH* (ausência de alteração de absorvância - 30 minutos).

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de redução do DPPH* relativamente ao controlo e calculado através da seguinte equação:

$$I\% = [(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controlo}}] \times 100$$

onde A_{controlo} e A_{amostra} são as absorvâncias do controlo e da amostra, respectivamente. A execução dos ensaios com diversas concentrações para cada amostra permitiu determinar graficamente a concentração que causa 50% de inibição (CI_{50}). O valor de CI_{50} foi obtido por análise de regressão linear e/ou não linear. Recorrendo à análise de regressão linear, o valor de CI_{50} foi obtido por interpolação gráfica da % de Inibição em função da concentração do extracto da planta em estudo. Pela análise de regressão não linear, foi utilizado o programa Solver.

Foram realizadas quatro experiências em triplicado. Os padrões BHT e BHA foram usados como termo de comparação. O intervalo de concentrações dos padrões (controlos positivos) foi igual ao das amostras.

A solução metanólica de DPPH* foi sempre preparada diariamente.

2.4. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A metodologia adoptada para fazer a quantificação dos compostos fenólicos baseia-se na capacidade destes para sofrer oxidação e quelatar metais na absorção na zona do UV-Vis. Esta técnica assenta na quantificação dos grupos hidroxilo fenólicos presentes num extracto, realizada recorrendo ao reagente de Folin-Ciocalteu. Este método envolve uma reacção de oxidação-redução, em meio alcalino, na qual o ião fenolato é oxidado e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no reagente é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e de molibdéneo, de cor azul. A coloração desenvolvida (absorção máxima entre 725 e 750 nm) é proporcional ao teor de compostos fenólicos. Adicionaram-se a 300 µL de cada solução aquosa de liofilizado de menta (1,04 mg/mL), em balão volumétrico de 10 ml, sucessivamente as seguintes substâncias (i) 2 mL de água (ii) 1 ml de reagente de Folin-Ciocalteu, (iii) 5 ml de solução de carbonato de sódio a 20 % (w/v) e completou-se o volume com água. Agitou-se vigorosamente a solução reaccional à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 735 nm, após 30 minutos de incubação. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálgico (0,33 - 0,11 mg/mL).

As determinações foram realizadas em duplicado e os resultados foram apresentados em miligrama de fenóis totais, expressos em equivalente de ácido gálico por miligrama de liofilizado.

2.5. PESQUISA DE ACTIVIDADE CITOTÓXICA

Em todos os ensaios de citotoxicidade partiu-se de culturas axénicas de *T. pyriformis* com 18-24 horas de incubação. A densidade das culturas de *T. pyriformis* em PPY foi ajustada, de forma a obter, pelo menos, 10^4 células/mL. As soluções de *Mentha x piperita* adicionadas às células possuíam as seguintes concentrações: 45,2 mg/mL; 4,52 mg/mL; 0,452 mg/mL; 0,226 mg/mL; 0,0452 mg/mL. As células não expostas ao extracto foram usadas como controlo.

2.5.1. ENSAIO DE CRESCIMENTO E MORTALIDADE

Nestes ensaios, *T. pyriformis* foi incubada nas, concentrações de extracto a testar, durante 48 horas, em microplacas de 96 poços, cada poço contendo 200 μ L de PPY com ou sem extracto (este no caso dos controlos) e 100 μ L de inóculo de *T. pyriformis*. Para cada concentração de extracto testada, para cada controlo (sem extracto) e para cada tempo de amostragem, foram feitas 3 réplicas, sempre de poços diferentes. Cada parâmetro foi estudado em dois ensaios independentes. A densidade das culturas foi estimada com base na contagem ao microscópio de três amostras de 25 μ L, extraídas com uma micropipeta automática. As três amostras foram recolhidas após 0; 24 e 48 horas de exposição ao extracto, sempre de poços diferentes, e observadas ao microscópio óptico de inversão, com uma ampliação de 40 X. As células imóveis foram consideradas mortas. Depois, uma gota de 5 μ L de formalina (4% v/v) foi adicionada e o número total de células (mortas + vivas) foi contado. A mortalidade foi determinada em termos de percentagem do número total de células. O tempo de geração (g) foi calculado a partir das seguintes equações:

$$g = \text{tempo de crescimento} / n \quad (\text{eq. 1})$$

onde o tempo de crescimento adoptado foi de 24 h e n é o número de gerações calculado a partir da seguinte expressão:

$$n = (\log N_{(24)} - \log N_{(0)}) / \log 2 \quad (\text{eq. 2})$$

onde $N_{(24)}$ é o número de células às 24 horas, $N_{(0)}$ é o número de células no tempo inicial;

2.5.2. ENSAIO DO MTT

Este método, sugerido pela primeira vez por Mossman (1983), e posteriormente modificado especificamente para células em suspensão, nomeadamente *T. pyriformis*, por Dias *et al.*, 1999, avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria.

Em cada poço de uma microplaca de 96 poços colocaram-se 140 µL de suspensão de *T. pyriformis*. Adicionou-se a partir de uma solução stock (10 mg/mL em água destilada) 10 µL de MTT). Incubou-se a 25 °C durante 4 h. De seguida adicionou-se 150 µL de DMSO e, após 30 minutos, foi feita a leitura a 550 nm, num leitor de placas ELISA. Para cada concentração testada foram retiradas três amostras após 1; 24 e 48 horas de exposição.

2.5.3. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Procedeu-se, durante 1 hora em solução NBF, à fixação das amostras expostas ao extracto de *Mentha x piperita* (0,452 e 0,226 mg/mL) durante 24 horas e das amostras não expostas. De seguida foram lavadas e coradas com azul toluidina a 0,01 %. Sub-amostras de 50 µl de cultura suspensa foram colocadas em lâminas e observada a sua morfologia em microscópio óptico invertido a uma ampliação de 40 X.

2.5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Depois da realização dos ensaios procedeu-se à análise estatística dos dados. Em cada ensaio, os dados experimentais representam a média de 2 ensaios independentes. Utilizou-se o teste ANOVA para os cálculos de significância de testes de crescimento, mortalidade e MTT ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo para avaliação da actividade antioxidante utilizando DPPH* é baseado na capacidade do radical livre estável em reagir com substâncias doadoras de H ($\text{DPPH}^* + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}^*]_n$), incluindo compostos fenólicos, sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas.

O consumo de DPPH* é um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio.

A capacidade de redução de radicais DPPH* (I%) foi determinada pela diminuição na sua absorvância, a qual é induzida pelos antioxidantes presentes na planta estudada. Os valores de Cl_{50} da menta e dos padrões diminuem na seguinte ordem: BHA > BHT > *Mentha x piperita*. Estes resultados indicam que o extracto aquoso possui um efeito moderado no sequestro de radicais livres.

A actividade antioxidante da planta analisada pode ser atribuída ao seu conteúdo fenólico, conforme demonstrado na Tabela 1.

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, pelo menos, um anel benzénico, que está ligado directamente a, pelo menos, um grupo hidroxilo livre ou envolvido numa outra função, nomeadamente, éter, éster ou heterósido (Capecka *et al.* 2005; Wojdylo *et al.* 2007). São produtos do metabolismo secundário, estando presentes em todos os tecidos vegetais. As substâncias de natureza fenólica, mais abundantes nas plantas, pertencem às classes dos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Outras classes têm uma distribuição mais discreta, tais como isoflavonóides, antraquinonas e xantonas.

Os principais compostos polifenólicos presentes em diferentes extractos de menta incluem, entre outros, a narirutina, o eriodictiol, a eriocitrina, a hesperidina, a luteolina, a diosmina e os ácidos rosmarínico e cafeico (Fecka e Turek, 2007). Os resultados deste estudo mostram que o extracto aquoso de *Mentha x piperita* pode ser facilmente utilizado como fonte de antioxidantes naturais e estão de acordo com os obtidos por Dorman e colaboradores (2003).

Tabela 1. Dados estatísticos relativos aos valores de Cl_{50} (mg mL⁻¹) e compostos fenólicos (mg AG/mg liofilizado) dos extractos aquosos das folhas de *Mentha x piperita*. DP - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação

Análise		<i>M. piperita</i>	BHT	BHA
DPPH (Linear)	Cl_{50}	0,0490 ($R^2 = 0,9958$)	0,0210 ($R^2 = 0,9961$)	-
	DP	0,0003	0,0006	-
	CV (%)	0,704	2,939	-
DPPH (Não Linear)	Cl_{50}	0,0480	0,0181	0,0053
	DP	0,0007	0,0008	0,0001
	CV (%)	1,458	1,884	1,541
Teor em Compostos Fenólicos	Média	0,467	-	-
	DP	0,014	-	-
	CV (%)	3,084	-	-

A utilização de plantas como alternativa ao uso de medicamentos é por demais conhecida. São diversas as razões para tal mas, uma delas tem a ver seguramente, com a ideia feita de que as plantas são menos tóxicas, logo menos prejudiciais, do que os fármacos manufacturados. A questão é que não se sabe se de facto assim é, uma vez que há uma grande falta de informação no que respeita à toxicidade de muitas das plantas usadas como alternativa aos fármacos.

É amplamente conhecido que os compostos bioactivos são quase sempre tóxicos em altas doses (Lhullier *et al.*, 2006).

Desta maneira, faz todo o sentido a avaliação da toxicidade destas plantas fazendo, desde logo, uma monitorização simples e rápida e de baixo custo. Para tal os organismos a usar devem possuir um número de características importantes, designadamente: i) têm de ser eucarióticos, ii) a sua biologia e respostas fisiológicas gerais têm de ser perfeitamente conhecidas, iii) o seu manuseamento laboratorial tem de ser fácil e iv) têm que possuir um tempo de geração curto. O protozoário ciliado *T. pyriformis*, reúne todas estas condições e tem sido um organismo de eleição na determinação da citotoxicidade de muitas substâncias (Sauvant *et al.*, 1999).

A actividade citotóxica de *Mentha x piperita* foi determinada sobre *T. pyriformis* verificando os efeitos das várias concentrações do extracto na viabilidade, inibição de crescimento e efeitos morfométricos sobre o protozoário.

A exposição ao extracto de *Mentha x piperita* afecta claramente e duma forma dose-dependente o crescimento e o tempo de geração de *T. pyriformis*.

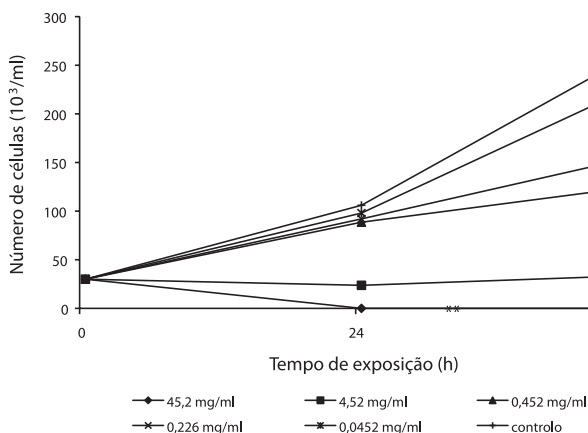


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações do extracto de *Menta x piperita* no crescimento de *T. pyriformis*. Os dados representam a médias de dois ensaios independentes. ** indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,05$).

Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações do extracto de *Menta x piperita* no tempo de geração de *T. pyriformis* após 0, 24 e 48 horas. Os dados representam a médias de dois ensaios independentes. ** indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,05$).

Concentração do extracto (mg/mL)	Tempo de geração (h)
Controlo	9,7
45,2	—**
4,52	—**
0,452	12,3**
0,226	11,6**
0,0452	10,6**

Num e noutro caso verifica-se que, após 24 horas de exposição aos extractos mais concentrados (45,2 mg/mL e 4,52 mg/mL), *T. pyriformis* morre, e para concentrações inferiores (0,452 mg/L a 0,0452 mg/L) verifica-se que o protozoário cresce menos e tem tempos de geração significativamente diferentes relativamente ao controlo ($P < 0,01$).

Estes resultados, estão de acordo com as características morfológicas que se observam em *T. pyriformis*. Quando o protozoário é afectado pelo extracto, isto é, quando há toxicidade para a célula verifica-se um aumento da razão entre o eixo mais curto (W) e o eixo maior (L) da célula tornando-a mais arredondada.

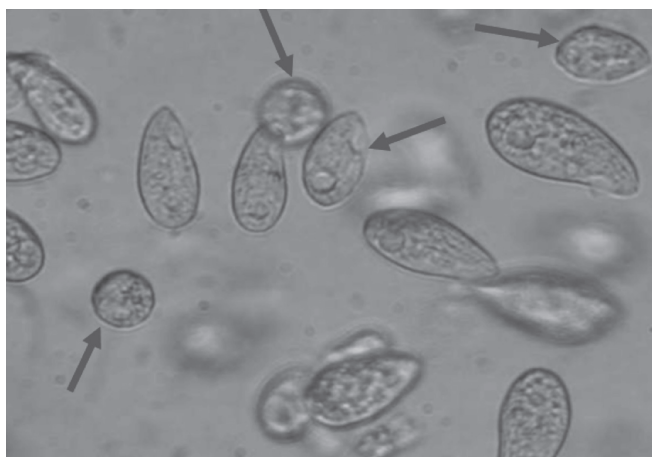


Figura 2. Alterações morfológicas de *Tetrhymena pyriformis* após 24 horas de exposição ao extracto de *Mentha x piperita* na concentração de 0,452 mg/ mL.

Também a exposição de *T. pyriformis* ao extracto de menta para concentrações superiores a 0,452 mg/mL provocou um decréscimo muito significativo na redução do MTT às 48 horas.

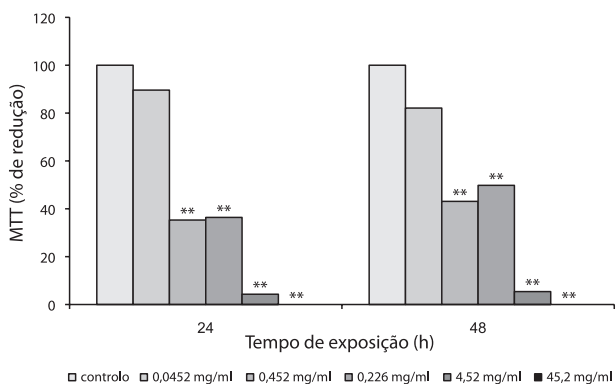


Figura 3. Efeito das diferentes concentrações do extracto de *Mentha x piperita* na redução do MTT às 24 e 48 horas. Os dados representam a médias de dois ensaios independentes. ** indica diferenças significativas dos valores do controlo ($P < 0,05$).

Neste trabalho, usou-se uma bateria de testes toxicológicos por forma a ter um quadro o mais representativo possível dos efeitos tóxicos que eventualmente o extracto de menta pudesse ter. Testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos deram-nos uma informação global acerca da toxicidade do extracto de menta. Do conjunto de bioensaios realizados podemos concluir que o extracto de menta apesar dos efeitos benéficos que pode ter, a fazer fé nas crenças populares, não está isento de toxicidade. Isso mesmo é demonstrado pelo conjunto de resultados obtidos. De facto, mesmo em concentrações baixas (0,452 mg/mL e 0,226 mg/mL) verifica-se que *T. pyriformis* sofre alterações morfológicas significativas reveladoras de toxicidade.

- CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. (2005) Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *In: Food Chemistry*, 93, pp. 223-226.
- DIAS, N., NICOLAU, A., CARVALHO, G. S., MOTA, M. E LIMA, N. (1999). Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *J. Basic Microbiol.*, 39, pp. 103-108.
- DORMAN, H. J. D.; KOŞAR, M., KAHLOS, K., HOLM, Y., HILTUNEN, R. (2003). Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 4563-4569.
- FECKA, I.; TUREK, S. (2007) Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 10908-10917.
- FERREIRA, A., SERRALHEIRO, M., ARAÚJO, M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *In: Journal of Ethnopharmacology*, 108, pp. 31-37.
- LHULLIER C., HORTA, P.A., FALKENBERG, M. (2006). Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(2), pp. 158-163
- LUTHRIA, D., MUKHOPADHYAY, S., KRIZEK, D. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *In: Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 771-777.
- MOSSMAN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *In: Journal of Immunological Methods*, 65, pp. 55-63.
- NEVES, J. M., MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; GOMES, L. R. (2008). Usos Populares de Plantas Medicinais da Flora Transmontana. *In: Revista da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa*, 5, pp. 226-235.
- NEVES, J. M., MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; GOMES, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes, (northern of Portugal), *In: Journal of Ethnopharmacology* (doi:10.1016/j.jep.2009.04.041).
- OKTAY, M., GÜLÇİN, İ., KÜFREVIÖĞLU, İ. (2003). Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *In: Swiss Society of Food Science and Technology*, 36, pp. 263-271.
- SAUVANT, M.P., PEPIN, D., PICCINNI, E., (1999). *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere* 38, 1631-1669.
- SEILER, A., SCHNEIDER, M., FÖRSTER H., ROTH, S., WIRTH, E.K., CULMSEE, C., PLESNILA, N., KREMMER, E., RADMARK, O., WURST, W., BORNKAMM, G. W., SCHWEIZER, U., CONRAD, M. (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translate Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent-and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metabolism*. 8, 237-248.
- SILVA, B. M; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; FERREIRAS, M.A. (2004) Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 4705-4712.
- TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *In: Food Chemistry*, 90, pp. 333-340.
- WEI, A.; SHIBAMOTO, T. (2007) Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 1737-1742.
- WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI, O.; CZEMERYS, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *In: Food Chemistry*, 105, pp. 940-949.