



Extrato de *Mentha suaveolens* (EHRH) possui atividade antioxidante e ausência de toxicidade oral aguda

T. M. Saúgo; U. A. Bones*; K. A. Flach; C. Batassini; F. F. Gonçalves;
C. E. B. Linhares; S. R. Giacomelli

Mentha suaveolens (EHRH) extract has antioxidant activity and lack of acute oral toxicity

* ubiratanbones@unochapeco.edu.br

(Recebido em 18 de novembro de 2024; aceito em 03 de março de 2025)

O artigo discute a composição química e o potencial farmacológico antioxidante de *Mentha suaveolens*, também conhecida como hortelã-maçã. A planta é uma Magnoliopsidea pertencente à família Lamiacea e é nativa da Holanda, África, Europa Ocidental e Sul, encontrada tipicamente ao longo das margens de riachos, rios e pântanos. O constituinte de maior demanda comercial encontrado nesta espécie é o monoterpeno mentol, que é amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Nesse sentido, o artigo tem como objetivo determinar a influência das estações do ano na composição química e no potencial farmacológico de extratos das folhas de *M. suaveolens*, determinando as concentrações de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante, citotoxicidade contra *Artemia salina* Leach e análise de toxicidade oral aguda em ratos Wistar. O estudo coletou amostras de plantas durante três estações: verão, primavera e outono. Os resultados mostraram que a maior concentração de fenóis totais, flavonoides, maior atividade antioxidante e menor toxicidade, foram obtidas da planta colhida no verão. Dessa forma, esse extrato foi submetido aos testes *in vivo*, apresentando ausência de toxicidade para o peso do animal, peso do fígado, parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados. Ademais, os resultados indicaram a melhor época de coleta para extratos da planta, quando aplicada à finalidade dessa pesquisa. Além disso, o estudo revelou informações importantes sobre o potencial antioxidante e sobre a segurança para ingestão de extratos dessa planta, nas concentrações testadas.

Palavras-chave: hortelã, antioxidante, atóxico.

The article discusses the chemical composition and antioxidant pharmacological potential of *Mentha suaveolens*, also known as apple mint. The plant is a Magnoliopsidea belonging to the Lamiacea family and is native to the Netherlands, Africa, Western and Southern Europe, typically found along the banks of streams, rivers and swamps. The constituent species with the greatest commercial demand found is the monoterpene menthol, which is widely used in the pharmaceutical and food industries. In this sense, the article aims to determine the influence of the seasons on the chemical composition and pharmacological potential of extracts from *M. suaveolens* leaves, determining the concentrations of total phenols, flavonoids, antioxidant activity, cytotoxicity against *Artemia salina* Leach and analysis of acute oral toxicity in Wistar rats. The study collected plant samples during three seasons: summer, spring and autumn. The results demonstrated that a higher concentration of total phenols, flavonoids, greater antioxidant activity and lower toxicity were obtained from the plant harvested in the summer. Therefore, this extract was subjected to *in vivo* tests, showing no toxicity for the animal's weight, liver weight, and comparative biochemical and hematological parameters. Furthermore, the results indicated the best collection time for plant extracts, when applied specifically from this research. Furthermore, the study revealed important information about the antioxidant potential and safety of ingesting extracts from this plant, at the concentrations tested.

Keywords: mint, antioxidant, non-toxic.

1. INTRODUÇÃO

Mentha suaveolens Ehrh (*M. suaveolens*), é uma Magnoliopsidea pertencente à família Lamiacea [1]. Esta espécie é nativa da Holanda, África, ocidente e sul da Europa, sendo geralmente encontrada as margens de riachos, rios e pântanos (locais de grande umidade) [2]. A medicina tradicional de áreas mediterrâneas tem utilizado essa planta devido aos seus diversos efeitos benéficos à saúde humana. Extratos de *M. suaveolens*, tem sido usada para amenizar casos de tosse, bronquite, náuseas e anorexia, além de poder ser empregada em doenças de pele e reumatismo [1, 2]. Além disso, destaca-se, a partir de sua composição, a atividade antioxidante que é de grande importância para o consumo humano, uma vez que a estrutura desses compostos

apresenta grupos hidroxilas (OH), responsáveis pela neutralização de radicais livres no organismo [3].

Mentha suaveolens, assim como outras plantas, possui metabólitos secundários que são responsáveis por seu mecanismo de defesa contra raios ultravioleta e fungos, além de atrair insetos polinizadores [4]. Os metabólitos presentes na planta podem apresentar concentrações variáveis, dependendo das condições de cultivo. Dentre os metabólitos secundários de *M. suaveolens*, tem-se o grupo de compostos fenólicos e o subgrupo de flavonoides. Estes atuam no crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas [5].

Nas últimas décadas, a pesquisa em plantas medicinais, têm se tornado mais crítica e aprimorada, encontrando fitoquímicos bioativos abundantes. Esses fitoquímicos têm revelado um papel fundamental na prevenção de doenças crônicas, como o câncer, doença cardíaca coronária e diabetes [6-8]. Além disso, existem fortes evidências de que o estresse oxidativo causado por radicais livres ou espécies reativas de oxigênio são a principal causa de várias doenças neurológicas humanas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas (doenças de Alzheimer e Parkinson, síndrome de Down, doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica), doenças psiquiátricas (depressão, esquizofrenia, transtorno bipolar), doença renal, doença pulmonar (obstrução pulmonar crônica, câncer de pulmão) e envelhecimento. Nesse sentido, compostos antioxidantes encontrados em alimentos e plantas medicinais podem ser usados como agentes quimiopreventivos [3, 9, 10].

Nesse contexto, devido ao grau complexidade das doenças, é necessário que haja sobretudo mais benefícios do que efeitos adversos para ingestão de medicamentos. Assim, análises de toxicidade com modelos *in vivo* são importantes porque permitem avaliar os efeitos de substâncias químicas em organismos vivos, como animais de laboratório, que são usados como modelos para prever o comportamento dessas substâncias em humanos. Isso é essencial para a segurança de produtos químicos, medicamentos e alimentos, pois ajuda a identificar e avaliar os riscos potenciais associados ao uso dessas substâncias [11-12].

Além disso, estudos envolvendo a composição química e o potencial farmacológico de plantas medicinais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos [12-13]. Entre as espécies de interesse, a *Mentha suaveolens* se destaca por suas propriedades antioxidantes e medicinais, amplamente atribuídas à presença de compostos fenólicos e flavonoides em suas folhas [14]. Esses metabólitos secundários desempenham um papel crucial no combate ao estresse oxidativo, o que os torna potenciais candidatos no desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas.

No entanto, as concentrações destes metabólitos sofrem a influência da sazonalidade, sendo um fator determinante na variabilidade química de espécies vegetais, influenciando diretamente suas propriedades bioativas [15]. Desse modo, compreender essas flutuações é fundamental para identificar o melhor período de coleta, garantir a padronização de extratos e potencializar sua eficácia em aplicações terapêuticas. Apesar da relevância desse aspecto, poucos estudos investigaram como a sazonalidade afeta a composição química e a atividade farmacológica de *M. suaveolens*.

O objetivo deste estudo foi investigar como as estações do ano influenciam a composição química e o potencial farmacológico dos extratos das folhas de *M. suaveolens*. Para isso, foram determinadas as concentrações de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante e o perfil de citotoxicidade contra *Artemia salina* Leach, com o objetivo de identificar variações sazonais significativas nesses parâmetros. Com base nesses resultados, selecionou-se o extrato mais eficiente, aquele que apresentou os melhores resultados antioxidantes e de menor toxicidade sob *A. salina*, para a realização de testes *in vivo* de toxicidade oral aguda em ratos Wistar, avaliando o impacto do composto no organismo e sua viabilidade para aplicações futuras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas para as análises foram coletadas em uma propriedade privada, localizada na Linha Faguense, ao norte do município de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul (-27°21'38''S; -53°24'52''O, altitude 550 m). A espécie coletada foi identificada como *Mentha suaveolens*, sendo a identificação da planta conduzida por comparação com o banco de dados Tropicos (<https://www.tropicos.org/home>), projeto registrado no SISGEN sob

Nº A33EBDC. Considerando a diferença na composição química de *M. suaveolens* nas diferentes estações de crescimento da planta [16], a coleta das plantas de *M. suaveolens* foi realizada durante três estações do ano: verão, primavera e outono. Não houve coleta no inverno, uma vez que a planta não se desenvolve nessa estação devido à ocorrência de geadas na região de Frederico Westphalen.

Após a coleta, o material vegetal foi submetido a secagem em estufa de circulação de ar forçada a temperatura de 50 ± 2 °C. Posteriormente, a planta foi triturada em moinho de facas e tamisadas, obtendo a amostra com tamanho de partícula inferior a 300 µm. O processo de preparação do extrato bruto se deu a partir da adição de 10 g de planta previamente seca e tamisada a 100 mL de MeOH, sob refluxo. A amostra foi introduzida em um balão de fundo redondo junto ao solvente extrator e conectado ao condensador de bola, durante 4 h. Finalmente, o extrato foi seco em evaporador rotativo obtendo-se assim o extrato bruto.

2.1 Determinação de fenóis e flavonoides totais

A quantificação do teor de fenóis totais foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu, contando com adaptações [17]. Nesse método, utiliza-se ácido gálico como padrão de referência. Uma solução de concentração 250 mg L⁻¹ de extrato bruto foi preparada, usando como diluente metanol. Em seguida, 1 mL dessa solução foi adicionada a 0,5 mL de Folin-Ciocalteu a 20% e a mistura permaneceu em repouso por 5 minutos.

Após o período de repouso, a solução foi adicionada à 5 mL de Na₂CO₃ a 7,5% e agitada por 1 minuto em um vórtex. A mistura foi deixada em repouso novamente por 40 minutos e após esse período, as soluções foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS 1800 Shimadzu®, São Paulo, Brasil, em comprimento de onda 750 nm.

A curva de calibração ($y = 0,0056x + 0,0436$; $R^2 = 0,9993$) seguiu o mesmo procedimento e as mesmas condições da amostra. As concentrações utilizadas na curva variaram de 10 a 250 mg.L⁻¹. O branco foi preparado utilizando o solvente extrator e os demais reagentes utilizados. Todas soluções as soluções foram preparadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por g⁻¹ de extrato bruto (mg EAG/g de extrato bruto) [18-19].

A quantificação de flavonoides totais foi realizada a partir do método do cloreto de alumínio como descrito por Fatiha et al. (2015) [20], contando com adaptações. Nesse método utiliza-se rutina como padrão de referência. Uma solução com concentração de 1000 mg L⁻¹ de extrato bruto foi preparada. Em seguida, 2 mL dessa solução foram transferidos para um tubo de 15 mL e adicionados 2 mL de metanol e 1 mL de AlCl₃ a 10%. A solução foi agitada em vórtex por 1 minuto e deixada em repouso por 30 minutos.

Posteriormente, as soluções foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 430 nm. Para a construção da curva de calibração procedeu-se da mesma maneira, seguindo as condições da amostra. As concentrações utilizadas para a curva ($y = 0,0054x - 0,0057$; $R^2 = 0,9991$) foram de 10 a 150 mg L⁻¹. Para o branco utilizou-se do solvente extrator e os demais reagentes utilizados, sendo que as amostras foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por g⁻¹ de extrato bruto (mg ER/g extrato bruto).

2.2 Determinação da atividade antioxidante (DPPH•)

A quantificação da atividade antioxidante seguiu o método de sequestro de radicais livres DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), descrito por Rufino et al. (2007) [21], com adaptações. O padrão de referência utilizado foi o ácido ascórbico, para cada amostra de extrato bruto foi realizada uma curva de calibração em cinco concentrações de 5 a 1000 mg.L⁻¹.

Em sua forma radical, o DPPH apresenta uma coloração violeta escura, e em sua forma estável, uma coloração violeta clara. Se a absorbância for muito baixa, pode atingir uma coloração amarela [20].

A partir da produção da curva de calibração, 1 mL da solução de cada concentração foi adicionado de 3 mL de solução de DPPH a 0,1 mmol, ficando em repouso durante 30 minutos ao abrigo da luz. Posterior ao repouso as soluções foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS em 517 nm. Para o branco utilizou-se o solvente extrator e os demais reagentes utilizados.

As amostras foram lidas em triplicata e todo o processo ocorreu em ambiente com pouca incidência de luz, bem como todas as soluções permaneceram em abrigo de luz até sua leitura.

2.3 Teste de toxicidade frente *Artemia salina* Leach

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al. (1982) [22]. Para a eclosão dos ovos, foi preparada uma solução salina na concentração $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl, com constante aeração no sistema. O pH foi mantido entre 6,0 e 7,0 e a temperatura entre 26 e 28°C , sob iluminação artificial durante 36 h. Inicialmente foi feita uma solução estoque de extrato na concentração 1000 mg.L^{-1} e a partir dela realizou-se a diluição das amostras nas concentrações de 250, 500, 750 mg.L^{-1} .

Na realização do bioensaio, foram transferidos 10 náuplios para um tubo de ensaio juntamente a 2,5 mL de solução salina e 0,5 mL de amostra. Para o controle positivo utilizou-se 2,5 mL de solução salina e 0,5 mL de K_2CrO_4 a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. No controle negativo utilizou-se somente 3 mL de solução salina. Todas as diluições e controles negativos e positivos foram realizados em triplicata. Os tubos de ensaio foram mantidos nas condições do aquário de eclosão. Após 24 h foi realizada a contagem de animais sobreviventes e mortos. Foram consideradas mortos, os náuplios que se mantiveram imóveis por mais de 10 s.

2.4 Toxicidade oral aguda

A análise de toxicidade oral aguda do extrato de *M. suaveolens* seguiu o método estabelecido pelas diretrizes da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *Guideline* [23], para o ensaio de produtos químicos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA URI), sob o número 77. A diluição do extrato bruto foi feita com água e Tween 80 em uma proporção de 9,99/0,1 mL.

As doses foram administradas de forma única, nas concentrações de 300 mg.kg^{-1} e 2000 mg.kg^{-1} , por gavagem. O teste ocorreu inicialmente com seis ratas Wistar, fêmeas nulíparas e não grávidas, com 8-12 semanas, escolhidas aleatoriamente, provenientes do Laboratório de Modelos Biológicos Experimentais (Lamobex), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), em Frederico Westphalen.

Os animais foram mantidos em grupos de três, divididos entre grupo controle e grupo teste, em caixas de polipropileno, recobertas com maravalha em temperatura constante controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de claro/escuro de 12 h. Além disso, receberam ração padrão e água *ad libitum*, tratados conforme a Lei nº 11.794/2008, que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Antes da administração das doses de extrato, os ratos foram mantidos em jejum durante 12 h, com água *ad libitum*, voltando a receber alimento somente 3 a 4 h após a gavagem, sob observação a cada 24 h, durante 14 dias e o peso foi aferido semanalmente. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados com cetamina (80 mg.kg^{-1}) e xilazina (10 mg.kg^{-1}) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, para avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e observação dos órgãos internos e pesagem do fígado.

Do sangue coletado, realizou-se a quantificação Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), RDW (amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos), Leucócitos, Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos, Linfócitos, Monócitos, Plaquetas e VPM (volume médio de plaquetas). Além disso, foram analisados os valores dos parâmetros bioquímicos: Glicose, Ureia, Creatinina, TGO e TGP.

Os parâmetros hematológicos foram determinados pelo equipamento ABX pentra 60 e os bioquímicos pelo sistema de automação em bioquímica, BS200E (Mindray). As análises ocorreram no Laboratório de Análises Clínicas da URI.

2.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita pelo teste ANOVA (com 95% de confiança) de via única, em *software* Microsoft® Office Excel 2013, seguido pelo teste Tukey realizado no *software* Past® 4.02.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fenóis totais e flavonoides totais

A maior concentração de fenóis totais foi obtida na amostra do verão com $239,2 \pm 3,53$ mg equivalente a ácido gálico (EAG g⁻¹) de extrato bruto, tendo a menor concentração no outono com $171,7 \pm 2,12$ mg (EAG g⁻¹) extrato bruto (Tabela 1). De igual modo, a maior concentração de flavonoides totais foi obtida na amostra do verão com $152,07 \pm 2,74$ mg equivalente de rutina (ER g⁻¹) de extrato bruto, tendo menor concentração no outono com $144,94 \pm 2,61$ mg (ER g⁻¹) extrato bruto.

Tabela 1: Concentração de fenóis e flavonoides totais em mg EAG g⁻¹ de extrato bruto para cada uma das três estações do ano analisadas.

Parâmetro	Verão	Primavera	Outono
*Fenóis	239,20c $\pm$ 3,53	193,50b $\pm$ 4,54	171,70a $\pm$ 2,12
**Flavonoides	152,07a $\pm$ 2,75	150,40a $\pm$ 3,01	144,94a $\pm$ 2,61

Média $\pm$ erro padrão. *Médias seguidas da mesma letra minúsculas para concentração de fenóis e flavonoides apresentados para cada uma das três estações do ano analisadas não diferem estatisticamente com $p < 0,05$; Tukey. Letras iguais para os testes demonstram não haver diferença estatística significativa.

A maior concentração foi encontrada na amostra coletada no verão, enquanto a menor concentração foi encontrada na amostra coletada no outono para ambos os compostos. Essa variação geralmente pode ser explicada pelas diferentes condições ambientais, como temperatura, umidade e intensidade de luz solar, que afetam o metabolismo da planta e, consequentemente, a produção de compostos químicos como os fenóis. Os fenóis são compostos com atividade antioxidante, portanto, a variação na sua concentração pode afetar o potencial farmacológico da planta [23].

As condições ambientais sazonais desempenham um papel crucial na modulação do metabolismo vegetal e na produção de metabólitos secundários, como fenóis e flavonoides [24]. Altas temperaturas, típicas do verão, aceleram o metabolismo vegetal, estimulando vias biossintéticas e aumentando a concentração desses compostos. A intensidade luminosa, especialmente a luz solar direta, também exerce influência significativa, pois a radiação UV estimula a síntese de flavonoides que atuam como agentes protetores contra os danos causados por essa radiação [25]. Além disso, a disponibilidade hídrica é um fator determinante, já que períodos de seca podem induzir a produção de compostos fenólicos como resposta ao estresse ambiental, protegendo a planta contra condições adversas [26]. Essas respostas adaptativas envolvem, em nível bioquímico, a ativação ou inibição de enzimas chave que participam da biossíntese desses compostos, além da regulação da expressão de genes específicos que ajustam o perfil químico da planta de acordo com as condições sazonais [27]. Assim, o ambiente atua como um modulador direto do metabolismo secundário, ajustando a composição química da planta para atender às demandas de proteção e sobrevivência [28].

As diferenças observadas nos valores obtidos nos extratos das estações sugerem que a concentração desses compostos pode alterar de acordo com a época do ano em que a planta é coletada. No entanto, foi observado que os valores de flavonoides totais não apresentaram diferença estatística significativa entre as três estações. Isso significa que a concentração de flavonoides totais e fenóis totais não está necessariamente relacionada e que outros fatores podem estar afetando a presença ou concentração desses compostos nas plantas. Isso pode ser explicado

pelo fato de que os flavonoides estão mais associados à defesa da planta que, por ser necessária para a sobrevivência das espécies, pode manter suas concentrações menos variáveis [29-30]. O conjunto dos resultados traz implicações importantes para a colheita e uso de plantas com propriedades antioxidantes, pois sugerem que a época do ano em que as plantas são colhidas ou coletadas pode afetar a concentração de fenóis totais, o que pode influenciar sua atividade antioxidante e potencial terapêutico.

Comparando os resultados obtidos com outras análises já feitas com essa espécie [31], foram encontrados valores superiores para flavonoides e inferiores para fenóis, nas quais os autores apresentaram o teor de fenóis totais de $350 \pm 0,96$ mg EAG/g de extrato bruto e o teor de flavonoides totais igual a $79,44 \pm 0,76$ mg ER/g de extrato bruto. Comparando os valores da literatura com os do presente trabalho, observou-se que a quantidade de flavonoides encontrados no extrato produzido a partir da planta coletada no verão foi aproximadamente 1,9 vezes maior que o apresentado por Boussof et al. (2017) [31]. Entretanto o valor obtido de compostos fenólicos foi aproximadamente 1,4 vezes menor que o encontrado pelo autor citado anteriormente.

Essa variação pode decorrer por fatores como local de crescimento da planta, índice pluviométrico, radiação solar e metodologia de extração. Essa comparação pode ajudar a entender as diferenças na concentração de compostos antioxidantes em diferentes amostras da mesma espécie de planta e pode ser útil para orientar o uso dessas plantas em diferentes contextos, como na produção de medicamentos ou produtos naturais [32].

3.2 Atividade antioxidante

Dentre as estações analisadas, a amostra do verão obteve a maior atividade antioxidante com concentração de $44,81 \mu\text{g mL}^{-1}$, que em relação ao EC_{50} (quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da quantidade inicial do radical livre) do padrão ácido ascórbico ($9,62 \mu\text{g mL}^{-1}$) demonstrando uma alta atividade antioxidante (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações de extratos relativos ao valor de EC_{50} , em diferentes estações do ano.

Amostra	EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Outono	$441,7c \pm 24,16$
Primavera	$314,4b \pm 5,89$
Verão	$45,25a \pm 1,17$

Média $\pm$ erro padrão. *Médias seguidas da mesma letra minúsculas para concentração de extratos relativos ao valor de EC_{50} apresentados para cada uma das três estações do ano analisadas não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, Tukey.

Observando os valores obtidos para o EC_{50} nota-se uma grande variação entre as estações, sendo que o maior potencial antioxidante foi encontrado na planta colhida no verão, enquanto o menor potencial antioxidante foi encontrado na planta colhida no outono. Aplicado o teste estatístico de Tukey, no qual demonstrou-se que existe uma diferença significativa nas concentrações de extratos relativos ao valor de EC_{50} , em diferentes estações do ano.

Esses resultados indicam que a amostra coletada no verão possui uma concentração significativa de compostos antioxidantes que podem ter potencial aplicação em diferentes contextos, como na produção de medicamentos, suplementos e aditivos alimentares, produção de combustíveis e cosméticos [33].

Ao comparar os resultados quantitativos de flavonoides, fenóis e atividade antioxidante (medida pela eficiência do extrato em capturar radicais livres) EC_{50} , pode-se observar a relação da sazonalidade como fator influência na variação destes parâmetros (Figura 1).

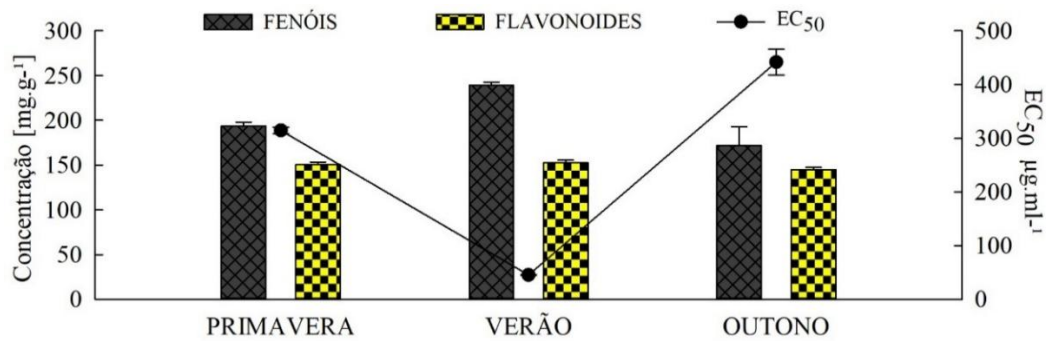


Figura 1: Atividade antioxidante em relação ao teor de fenóis e flavonoides totais, nas diferentes estações do ano. Quanto menor o valor de EC₅₀, maior a atividade antioxidante.

A maior concentração de fenóis, de acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa, também indicou uma maior atividade antioxidante, ou seja, uma menor concentração do extrato da planta colhida no verão foi necessária para atingir os valores de EC₅₀.

No caso dos flavonoides, não houve diferença significativa de concentração nas diferentes estações em que as plantas foram coletadas. Isso indica que, no contexto desta pesquisa, a presença de flavonoides não influenciou diretamente a variação na atividade antioxidante. Esses resultados reforçam a importância de avaliar diferentes compostos presentes nas plantas e seus efeitos no organismo, já que cada composto pode ter uma função e uma interação distinta.

Em estudos realizados por Benabdallah et al. (2016) [34] com a espécie, o valor do EC₅₀ em extrato metanólico foi de 31,66 µg mL⁻¹, sendo esse valor próximo ao obtido para o extrato da planta coletada no verão de 44,81 µg mL⁻¹. Além disso, conforme Fatiha et al. (2015) [20], o valor de EC₅₀ encontrado em extrato etanólico foi de 71,3 µg mL⁻¹, sendo superior ao encontrado no presente trabalho. No caso dos valores obtidos para os extratos de outono e primavera, foi observado um potencial antioxidante inferior aos encontrados na literatura, que possivelmente podem ser explicados devido a um menor teor de compostos fenólicos. Diante do exposto, o conjunto de pesquisas com resultados compatíveis ressalta e confirma o alto potencial antioxidante da espécie *Mentha suaveolens*, que pode proporcionar benefícios à saúde humana pelo fato de neutralizar radicais livres acumulados no organismo devido ao metabolismo celular e fatores exógenos [3].

3.3 Toxicidade frente a *Artemia salina*

A classificação das faixas de toxicidade, conforme Amarante et al. (2011) [35], são: alta toxicidade com valor de DL₅₀ (dose letal para 50% da população exposta) em concentrações menores de 100 µg.mL⁻¹; moderada toxicidade entre 100 µg.mL⁻¹ e 500 µg.mL⁻¹; baixa toxicidade acima de 500 µg.mL⁻¹. O percentual de mortos foi menor no verão para as concentrações de estudo (Tabela 3).

Tabela 3: Número de náuplios mortos, média de mortos, desvio padrão e porcentagem de mortos.

Concentração µg/mL	Número de mortos			Média de mortos	Desvio padrão	Percentual de mortos (%)
VERÃO	Amostra1	Amostra2	Amostra3			
250	6	2	3	3,66	2,08	36,6
500	5	5	9	6,33	2,31	63,3
750	6	6	10	7,33	2,31	73,3
PRIMAVERA	Amostra1	Amostra2	Amostra3			
250	5	3	7	5,00	2,00	50,0
500	7	8	6	7,00	1,00	70,0
750	8	9	8	8,30	0,58	83,3
OUTONO	Amostra1	Amostra2	Amostra3			
250	5	6	7	6,00	1,00	60,0
500	7	8	9	8,00	10,00	80,0
750	9	9	10	9,30	0,58	93,3

Com base nas equações de retas obtidas (Verão – $y = 0,0733x + 21,1$; Primavera – $y = 0,0667x + 34,4$; Outono – $y = 0,0667x + 44,4$), foram calculadas as CL_{50} para cada amostra, refletindo os resultados para o Teste de Toxicidade frente a *A. salina* (Tabela 4).

Tabela 4: Teste de toxicidade dos extratos produzidos nas diferentes estações do ano, frente a *A. salina* em suas respectivas concentrações de CL_{50} .

Amostra	CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Toxicidade
Outono	83,35a	Alta
Primavera	233,28b	Moderada
Verão	394,13c	Moderada

Média $\pm$ erro padrão. *Médias seguidas da mesma letra minúsculas para concentração de CL_{50} apresentados para cada uma das três estações do ano analisadas não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, Tukey.

Todos os extratos de *M. suaveolens* testados apresentaram valores de CL_{50} inferiores a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando que mesmo com variações, a planta é tóxica para as larvas de *A. salina*, de acordo com a classificação das faixas de toxicidade [35]. O extrato produzido com a planta colhida no verão e na primavera apresentou necessidade de maiores doses para atingir a CL_{50} , indicando uma toxicidade moderada, porém diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). Por outro lado, o extrato produzido com a planta colhida no outono, apresentou menores doses para atingir a CL_{50} , indicando alta toxicidade em comparação com os demais, que de igual modo diferiu estatisticamente das demais estações ($p < 0,05$).

Em relação a toxicidade da espécie *M. suaveolens*, frente a *A. salina*, não foram encontrados estudos na literatura. Entretanto Bussmann et al. (2011) [36], traz a toxicidade do extrato etanólico de *Mentha spicata* L. frente a *A. salina*, apresentando um valor de CL_{50} de $345 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O valor apresentado pelo autor citado anteriormente é semelhante ao obtido no extrato produzido com a planta coletada no verão, por outro lado os valores obtidos para o extrato das coletas da primavera e outono possuem valores mais discordantes, que podem ser justificados pela influência dos fatores ambientais de acordo com a sazonalidade, objeto de discussão deste trabalho.

Os resultados ainda sugerem que compostos presentes na planta podem ter diferentes efeitos em diferentes sistemas biológicos, e que a escolha da melhor época de colheita para a obtenção de extratos pode depender do objetivo específico do estudo. Por exemplo, se o objetivo for obter um extrato com alta atividade antioxidante e baixa toxicidade, a colheita no verão pode ser mais indicada, enquanto se o objetivo for obter um extrato com alta toxicidade para uso como inseticida, a colheita no outono pode ser mais indicada, pois pode conter majoritariamente outros grupos de compostos que lhe atribuam esta atividade [37].

3.4 Toxicidade oral aguda

Considerando os resultados obtidos nos demais testes, para esse foi utilizado apenas o extrato coletado no verão. Possivelmente em função dos teores de fenóis, nessa estação obteve-se os melhores resultados antioxidantes e de menor toxicidade sob *A. salina*. Além disso, buscou-se minimizar o uso desnecessário de animais neste experimento.

Em testes de toxicidade oral aguda, alguns parâmetros são mais evidentes acerca dos efeitos da droga testada. Conforme Hayes (2001) [38], o peso corporal do animal é uma referência significativa para avaliar a toxicidade, pois é um indicador do tamanho e da capacidade metabólica do animal. Nesse sentido, essa foi uma variável analisada no presente estudo e a pesagem dos animais (submetidos às doses de 300 e 2000 mg.kg^{-1}) foi realizada na primeira e segunda semana de experimento (Figura 2), além da pesagem do fígado realizada ao final o experimento.

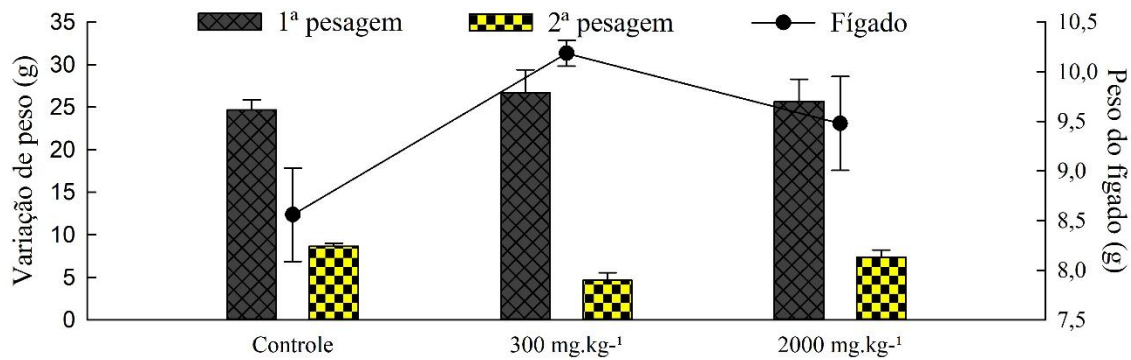


Figura 2: peso do fígado e diferença de peso dos animais submetidos ao teste com diferentes dosagens, ao longo das duas semanas de experimento. *Peso do fígado: pesagem única - $p = 0,2348$ ($p > 0,05$ - não houve diferença significativa entre o peso do fígado dos animais e as concentrações de teste e o controle). *Peso dos animais: 1ª pesagem - $p = 0,8358$; 2ª pesagem - $p = 0,4456$ ($p > 0,05$ - não houve diferença significativa entre o peso dos animais nas concentrações de teste e o controle).

Modificações em órgãos como fígado, rins, e intestinos são importantes em estudos toxicológicos por serem relevantes na atuação do metabolismo e excreção de xenobióticos [38]. O fígado desempenha um papel fundamental na metabolização de substâncias químicas no organismo. Por exemplo, se o fígado do animal apresentar um aumento significativo de peso após a administração da substância, isso pode indicar que a substância causou danos ao órgão, como inflamação ou acúmulo de gordura, sugerindo uma possível toxicidade hepática. Por outro lado, se o peso do fígado diminuir, pode ser um sinal de necrose ou degeneração do tecido hepático [38].

Em relação à pesagem, conforme a figura 2, na primeira semana houve maior ganho de peso em todos os grupos e na segunda semana o ganho foi significativamente menor. Tanto o peso do fígado, quanto o peso dos animais teste seguiu o mesmo padrão do controle, o que evidencia a ausência de toxicidade do extrato nesses parâmetros. Nesse sentido, a análise histológica é capaz de explicar a relevância clínica e a determinação dos efeitos xenobióticos em órgãos. Essa avaliação é considerada importante em estudos toxicológicos. Os exames são feitos de forma macroscópica, utilizando a determinação qualitativa e o peso dos órgãos, juntamente com exames histopatológicos de tecido [39].

Além disso, não houve registro de morte seguida à administração e nem durante o período do ensaio. Por isso, não foi efetuado o cálculo da DL_{50} . Sendo assim, de acordo com Silva et al. (2024) [37], com a interpretação dos resultados, evidencia-se que não sucedeu sinais de toxicidade como perda de massa corporal, inibição do crescimento, alterações comportamentais e clínicas graves quando comparados aos grupos controle. Dessa forma, o sangue dos animais que receberam a dose de 2000 mg.kg⁻¹ foi utilizado para avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos, e os resultados bioquímicos das análises estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos do sangue coletado de ratas Wistar submetidas ao extrato de *Mentha suaveolens*, comparado a outras referências.

Parâmetro	*Controle	*Mentha	Referências [40-42]
Glicose (mg.dL ⁻¹)	265,63 ± 15,94	252,33 ± 30,39	77,87-259,50
Ureia (mg.dL ⁻¹)	34,67 ± 1,45	37 ± 1,00	25,41-123,20
Creatina (mg.dL ⁻¹)	0,64 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,02-0,77
**AST (U/L)	123,67 ± 14,75	102 ± 17,62	75,66-177,90
**ALT (U/L)	44,33 ± 8,87	33,33 ± 4,67	32-63

Média ± erro padrão ** Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).

Os resultados de testes bioquímicos demonstraram que no intervalo de erro calculado entre os animais do experimento, não houve discrepância dos valores de referência entre o controle e o teste com extrato de *M. suaveolens*.

No caso dos parâmetros hematológicos, os dados coletados pós análise, estão dispostos na tabela 6, expressos de acordo com as unidades padrão para comparação com outros dados obtidos na literatura.

Tabela 6. parâmetros hematológicos do sangue de ratos Wistar, submetidos ao teste com o extrato de *Mentha suaveolens*, comparados com a literatura.

Parâmetro	Controle	<i>Mentha</i>	Referências [41, 43, 44]
Hemácias ($10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$)	$4,45 \pm 1,60$	$6,19 \pm 0,18$	5,66-9,16
Hemoglobina ($\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$)	$8,63 \pm 2,73$	$11,63 \pm 0,26$	11-18
Hematócrito (%)	$24,60 \pm 8,70$	$34,60 \pm 0,91$	36-48
VCM (fL)	$55,67 \pm 0,67$	$56,00 \pm 0,00$	50,7-66
HCM (pg)	$19,93 \pm 1,03$	$18,80 \pm 0,10$	16-21
CHCM ($\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$)	$35,90 \pm 1,51$	$33,67 \pm 0,15$	28-36,86
RDW (%)	$11,00 \pm 0,26$	$11,33 \pm 0,23$	9,4-14,06
Leucócitos ($10^3 \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	$8,33 \pm 2,67$	$6,33 \pm 2,37$	2,3 – 9,9
Neutrófilos (%)	$12,30 \pm 0,15$	$9,82 \pm 4,92$	8-30
Eosinófilos (%)	$0,30 \pm 0,15$	$0,44 \pm 0,23$	0-4
Basófilos (%)	$2,20 \pm 1,15$	$0,67 \pm 0,37$	0-1,66
Linfócitos (%)	$82,13 \pm 0,62$	$54,05 \pm 26,90$	42,09-95,69
Monócitos (%)	$3,07 \pm 0,38$	$1,80 \pm 1,10$	0,3-17,86
Plaquetas (ml^{-1})	$103000,00 \pm 53106,8$	$174000,00 \pm 45923,8$	150000-796000
VPM (fL)	$7,70 \pm 0,67$	$7,10 \pm 0,50$	6,11-7,87
PCT (%)	$0,08 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,03$	0,13-0,41
PDW (fL)	$17,15 \pm 1,35$	$14,00 \pm 0,00$	7,62-16,27

Média $\pm$ erro padrão. VCM: volume corpuscular médio. HCM: hemoglobina corpuscular média. CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. RDW: amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos. VPM: volume médio de plaquetas.

Em relação aos exames hematológicos, de modo geral, não houve discrepância dos valores de referência entre os grupos controle e teste, sendo que apenas o parâmetro hematócrito ficou abaixo das faixas limite encontradas nas literaturas citadas. Neste parâmetro, o grupo controle apresentou valores abaixo das referências citadas na tabela, já o grupo teste apresentou um valor de 35,51%, estando muito próximo ao limite inferior de 36% das referências. Apesar disso, não foram encontradas mais informações na literatura sobre a possibilidade desses valores representarem toxicidade.

As concentrações de fenóis e flavonoides corroboram com outras pesquisas [3, 45], que também encontraram grande quantidade desses compostos em extratos da parte aérea da planta. Nesse sentido, segundo os pesquisadores citados, a capacidade antioxidante dos extratos vegetais está intimamente associada aos componentes fenólicos, que podem interagir com os radicais livres por meio da doação de elétrons ou hidrogênio.

Além disso, outro fator importante para o emprego desses extratos ou compostos na indústria é a baixa toxicidade celular, visando a segurança do consumidor. Desse modo, além dos testes *in vitro*, os testes *in vivo* ainda são de suma importância para que seja compreendida a interação sistemática dos extratos com o organismo [46]. Assim, conforme os resultados apresentados nesse trabalho, além de alta capacidade antioxidante do extrato de *M. suaveolens* coletada no verão,

também foi observada baixa toxicidade. Apesar de o grupo controle e o teste estarem dentro dos padrões, considerando o erro das triplicatas, os animais do teste tenderam a um melhor enquadramento dentro dos valores padrão encontrados na literatura para animais saudáveis dessa espécie. Isso pode ser observado principalmente nos parâmetros hematológicos, como os valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, eosinófilos, basófilos, plaquetas e PCT.

Ademais, este trabalho contribui com a literatura científica ao elucidar a influência da sazonalidade na concentração de flavonoides e fenóis em extratos produzidos a partir da espécie vegetal *Mentha suaveolens*. Os achados reforçam a eficiência do extrato produzido com potencial antioxidante, além de servir como evidência reforçando sua baixa toxicidade.

Devido ao objetivo de quantificação das famílias químicas citadas, houve limitação para que se realizassem análises mais específicas da composição química destes extratos e testes de toxicidade crônica. Desse modo, é importante que esta informação seja elucidada, demonstrando a variação da concentração de cada composto de acordo com a sazonalidade. Além disso, outro fator a ser explorado é o isolamento dos compostos majoritários para testes pré-clínicos, visando compreender outros efeitos biológicos que a espécie estudada pode apresentar. Por fim, novos estudos também são necessários para que seja analisada a segurança na ingestão de extratos ou compostos provenientes da planta, visando elevar o grau de evidência científica sobre este assunto.

4. CONCLUSÃO

O estudo analisou extratos de *M. suaveolens* coletadas em três estações diferentes (verão, primavera e outono) e constatou que a maior concentração de fenóis totais foi obtida no extrato produzido a partir da planta colhida no verão. Por outro lado, para flavonoides totais, não houve diferença significativa entre as médias das três estações. O extrato da planta coletada no verão também apresentou a maior atividade antioxidante e menor atividade citotóxica.

Portanto, a variação das estações afetou a concentração dos constituintes químicos da espécie, bem como seu potencial antioxidante e citotóxico. Além disso, nos testes de toxicidade oral aguda com diferentes dosagens do extrato de *M. suaveolens*, em relação ao grupo controle, não houve alterações nos parâmetros analisados, sugerindo a não toxicidade do extrato. Desse modo, esta pesquisa aborda requisitos importantes para o uso futuro na produção de formulações naturais, apresentando a influência da sazonalidade no potencial antioxidante da planta e dados sobre sua toxicidade. Nesse contexto, também é importante que mais estudos sejam feitos para avaliar outros potenciais farmacológicos da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El-Kashoury ESA, El-Askary HI, Kandil ZA, Salem MA. Botanical and genetic characterization of *Mentha suaveolens* Ehrh. cultivated in Egypt. *Pharmacogn Mag.* 2013 Sep;5(5):228-37. doi: 10.1016/j.phcgj.2013.10.002
2. Božović M, Pirolli A, Ragno R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. *Mol.* 2015 May;20(5):8605-33. doi: 10.3390/molecules20058605
3. Bouymajane A, Filali FR, El Majdoub YO, Ouadik M, Abdelilah R, Cavò E, et al. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of extracts from aerial parts of *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, *Mentha suaveolens* and *Sideritis incana* from Morocco. *Chem Biodivers.* 2024 Jan;19(3):e202101018. doi: 10.3390/molecules29030596
4. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Mol.* 2019 Apr; 24(8):1583. doi: 10.3390/molecules24081583
5. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol.* 2023 Oct;97(10):2499-574. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9
6. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007 Jul;66(1):1-9. doi: 10.53393/rial.2007.66.32841
7. Dornas WCA, Oliveira TTD, Dores RGRD, Santos AFD, Nagem TJ. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007 Sep;28(3):241-9.

8. Bouyahya A, Chamkhi I, Guaouguaou FE, Benali T, Balahbib A, El Omari N, et al. Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. J Ethnopharmacol. 2020 Sep;259:112925. doi: 10.1016/j.jep.2020.112925
9. Abdelaali B, El Menyiy N, El Omari N, Benali T, Guaouguaou FE, Salhi N, et al. Phytochemistry, toxicology, and pharmacological properties of *Origanum elongatum*. Evid Based Complementary Altern Med. 2021 Jun;17:6658593. doi: 10.1155/2021/6658593
10. Bouyahya A, Mechchate H, Benali T, Ghchime R, Charfi S, Balahbib A, et al. Health benefits and pharmacological properties of carvone. Biomol. 2021 Dec;11(12):1803. doi: 10.3390/biom11121803
11. Iñesta VF, Ferro F, McMahon M, Henderson CJ, Wolf CR. Potential of in vivo stress reporter models to reduce animal use and provide mechanistic insights in toxicity studies. F1000Res. 2023 Aug;10(11):1164. doi: 10.12688/f1000research.123077.1
12. Taškova K, Fontaine JF, Mrowka R, Andrade-Navarro MA. Evaluation of in vivo and in vitro models of toxicity by comparison of toxicogenomics data with the literature. Methods. 2018 Jan;1(132):57-65. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.07.010
13. Rao S, Kurakula M, Mamidipalli N, Tiyyagura P, Patel B, Manne R. pharmacological exploration of phenolic compound: Raspberry Ketone—Update 2020. Plan. 2021 Jun;10(7):1323. doi: 10.3390/plants10071323
14. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants-natural health products for human health. Mol. 2023 Feb;28(4):1845. doi: 10.3390/molecules28041845
15. Nunes R, Pasko P, Tyszka-Czochara M, Szewczyk A, Szlosarczyk M, Carvalho IS. Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. Pharm. Biol. 2017 Sep;55(1):114-23. doi: 10.1080/13880209.2016.1230636
16. Costa WK, Oliveira AM, Santos IBS, Silva VBG, Aguiar JCROF, Navarro DMAF, et al. Influence of seasonal variation on the chemical composition and biological activities of essential oil from *Eugenia pohliana* DC leaves. Chem Biodivers. 2022 Jul;19:e202200034. doi: 10.1002/cbdv.202200034
17. El-Kashoury ESA, El-Askary HI, Kandil ZA, Salem MA, Sleem AA. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Mentha suaveolens* Ehrh. Z Naturforsch C J Biosci. 2012 Dec;67(11-12):571-9. doi: 10.1515/znc-2012-11-1207
18. Chandra S, Gonzalez ME. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. J Agric Food Chem. 2004 Jun;52(11):3583-9. doi: 10.1021/jf0352632
19. Salhi A, Bouyanzer A, Chetouani A, El Ouariachi E, Zarrouk A, Hammouti B, et al. Chemical composition, antioxidant and anticorrosion activities of *Mentha suaveolens*. J Mater Environ Sci. JMES. 2017 Feb;8(5):1718-28.
20. Fatiha B, Didier H, Naima G, Khodir M, Martin K, Léocadie K, et al. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). Ind Crops Prod. 2015 Nov;74:722-30. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.04.038
21. Rufino MSM. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza (CE): Embrapa Agroindústria Tropical; 2007. (Comunicado Técnico on line, 127). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>
22. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DJ, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982 Jan;45(5):31-4. doi: 10.1055/s-2007-971236
23. Guideline PBT. OECD guideline for the testing of chemicals. The Hershberger. (OECD/OCDE).
24. Alfieri ML, Panzella L, Amorati R, Cariola A, Valgimigli I, Napolitano A. Role of sulphur and heavier chalcogens on the antioxidant power and bioactivity of natural phenolic compounds. Biomol. 2022 Jan;12(1):1-24 doi: 10.3390/biom12010090
25. Coutinho ID, Kataoka VMF, Honda NK, Coelho RG, Vieira MC, Cardoso CAL. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. Rev Bras Farmacog. 2010 Jul;20(3):322-7. doi: 10.1590/S0102-695X2010000300006
26. Jing Y, Lin R. Transcriptional regulatory network of the light signaling pathways. New Phytol. 2020 Apr;227(3):683-97. doi: 10.1111/nph.16602
27. Selmar D, Kleinwachter M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Ind Crops Prod. 2013 Jun;14(42):558-66. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.020
28. Murthy HN, Joseph KS, Paek KY, Park SY. Light as an elicitor for enhanced production of secondary metabolites in plant cell, tissue, and organ cultures. Plant Growth Regul. 2024 Mar;29(104):31-49. doi: 10.1007/s10725-024-01139-9

29. Zhang S, Zhang L, Zou H, Qiu L, Zheng Y, Yang D, et al. Effects of light on secondary metabolite biosynthesis in medicinal plants. *Front Plant Sci.* 2021 Dec;09(12):781236. doi: 10.3389/fpls.2021.781236
30. Vinson JÁ, Dabbagh YA. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutr Res.* 1998 Jun;18(6):1067-75.
31. Boussof L, Boutennoune H, Kebieche M, Adjeroud N, Al-Qaoud K, Madani K. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects of phenolic compound from Algerian *Mentha rotundifolia* L. leaves on experimental animals. *S Afr J Bot.* 2017 Nov;113:77-83. doi: 10.1016/j.sajb.2017.07.003
32. Cavalcante MA, Borges WL, Souza TM. Compostos fenólicos a partir de vegetais: uma revisão sobre os métodos de quantificação e avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana. *Peer Rev.* 2024 Aug;6(10):67-89. doi: 10.53660/PRW-2183-4024
33. Pedroso RDS, Andrade G, Pires RH. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Rev Saúde Colet.* 2021 Mai;31(02):e310218. doi: 10.1590/S0103-73312021310218
34. Benabdallah A, Rahmoune C, Boumendjel M, Aissi O, Messaoud C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016 Sep;6(9):760-6. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.06.016
35. Amarante CBD, Müller AH, Póvoa MM, Dolabela MF. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmodica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica.* 2011;41:431-4. doi: 10.1590/S0044-59672011000300015
36. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol.* 2011 Sep;137(1):121-40. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.071
37. Silva R, Silva RNC, Silva RLC, Silva NC, Coêlho ML, Costa JV. Uso tópico do óleo essencial de *Mentha piperita* Linnaeus: Potencial terapêutico e segurança. *Res Soc Dev.* 2024 Sep;13(8):e14913846677. doi: 10.33448/rsd-v13i8.46677
38. Hayes AW. Principles and methods of toxicology. New York (US): CRC Press; 2001.
39. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. *Vet Pathol.* 2013 Apr;50(6):1007-15. doi: 10.1177/0300985813485099
40. Silva SLD, Nascimento AAD, Ribeiro EFB, Ribeiro RB, Alves CM, Santos AMD, et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Acta Amazônica.* 2016 Mar;46:73-80. doi: 10.1590/1809-4392201501746
41. Branco ACSC, Diniz MFFM, Almeida RD, Santos HB, Oliveira KMD, Ramalho JDA, et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. *Rev Bras Ciênc Saúde.* 2011 Jun;15(2):209-14. doi: 10.4034/RBCS.2011.15.02.11
42. Barril N, Storino N, Severino IR. Valores de referência do perfil bioquímico de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem wistar) provenientes do biotério de um centro universitário do interior paulista. *CuidArte, Enferm.* 2019 Dez;13(2):143-6.
43. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Albuquerque-Júnior RLC, et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Sci Plena.* 2014 Mar;10(3):1-9.
44. Saheed S, Oladipipo AE, Abdulazeez AA, Olarewaju SA, Ismaila NO, Emmanuel IA, et al. Toxicological evaluations of *Stigma maydis* (corn silk) aqueous extract on hematological and lipid parameters in Wistar rats. *Toxicol Rep.* 2015 Apr;2:638-44. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.04.001
45. Menković N, Godevac D, Savikin K, Zdunić G, Milosavljević S, Bojadzi A, et al. Bioactive compounds of endemic species *Sideritis raeseri* subsp *raeseri* grown in National Park Galicica. *Rec Nat Prod.* 2013 Mar;7(3):161-8.
46. Fielden MR, Kolaja KL. The role of early in vivo toxicity testing in drug discovery toxicology. *Expert Opin Drug Saf.* 2008 Mar;7(2):107-10. doi: 10.1517/14740338.7.2.107