

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Inês da Silva Rocha

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO
ESSENCIAL E DA ÁGUA RESIDUAL DE
HIDRODESTILAÇÃO DE *ARTEMISIA*
CAMPESTRIS L. SUBSP. *MARITIMA* (DC)
ARCANG.

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal
orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha
e pelo Professor Doutor António Xavier De Barros E Cunha Pereira
Coutinho, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Caraterização fitoquímica e atividades biológicas do óleo essencial e da água residual de hidrodestilação de *Artemisia campestris* L. subsp. *maritima* (DC) Arcang.

Maria Inês da Silva Rocha

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pelo Professor Doutor António Xavier De Barros E Cunha Pereira Coutinho, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

"A ciência nunca resolve um problema sem criar mais 10"
George Bernard Shaw

Agradecimentos

Ao concluir esta etapa não poderia deixar de agradecer a todos, que de uma forma ou outra, contribuíram para que chegasse ao fim de mais um ciclo.

Em primeiro lugar, ao Dr. Artur Figueirinha, pela orientação, prontidão, disponibilidade constante, por todos os esclarecimentos e por todo o apoio científico.

À Dra. Lígia Salgueiro, por me ter aceitado enquanto aluna, por toda a orientação, exigência, acompanhamento e pela oportunidade de desenvolver este trabalho com rigor.

Ao Dr. Xavier Coutinho, pela compreensão e ajuda apresentadas.

À Dra. Maria José Gonçalves, pela disponibilidade, partilha de conhecimento e pela ajuda no desenvolvimento do trabalho laboratorial relacionado com a atividade antifúngica.

À Dra. Teresa Cruz, e a todos os elementos da equipa do IBILI por terem proporcionado as condições para realizar os ensaios de atividade anti-inflamatória.

À Dra. Cláudia Pereira, pelo apoio na realização dos ensaios da cicatrização.

À Dra. Fátima Nunes e ao Laboratório de Espectroscopia de Massa da Universidade de Coimbra, integrado na Rede Nacional de Espectrometria de Massa, pelo seu apoio na aquisição e análise dos espectros de massa.

Não poderia deixar de agradecer à Sónia Pedreiro, Patrícia Matos e Patrícia Moreira por todo o companheirismo, espírito de entreatajuda, conselhos, amizade e, em especial, pela preciosa ajuda no apoio laboratorial.

A todos os elementos do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela forma como me receberam e ajudaram.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado, pela força e apoio.

Ao Rodrigo por todo o amor, apoio e paciência.

Por último, quero agradecer à minha família por todo o apoio incondicional.

Índice

ABSTRACT	VIII
RESUMO	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
I. INTRODUÇÃO.....	I
I.1. Género <i>Artemisia</i>	3
I.1.1. <i>Artemisia campestris</i> L. subsp. <i>maritima</i> (DC) Arcangeli.....	9
I.1.1.1. Etnobotânica.....	11
I.1.1.2. Compostos bioativos.....	13
I.1.1.2.1. Compostos voláteis.....	14
I.1.1.2.2. Compostos fenólicos.....	15
I.1.1.3. Bioatividades	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	20
3.1. Material e métodos.....	21
3.1.1. Material vegetal e preparação dos extratos.....	21
3.1.2. Óleo essencial (OE).....	21
3.1.3. Água residual de hidrodestilação (ARH).....	21
3.1.3.1. Determinação do teor de fenóis totais.....	22
3.1.3.2. Cromatografia em camada fina (TLC)	22
3.1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fotodíodos (HPLC-PDA).....	23
3.1.3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por electrospray (HPLC-PDA-ESI/MS ⁿ)	25
3.2. Resultados e discussão.....	26
3.2.1. Composição do OE	26
3.2.2. Composição da ARH	26
3.2.2.1. Determinação do teor de fenóis totais.....	26
3.2.2.2. Pesquisa de fitoconstituintes por TLC.....	27
3.2.2.3. HPLC-PDA e HPLC-PDA-ESI/MS ⁿ	28
3.2.2.4. Quantificação por HPLC-PDA	33
4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
4.1. Introdução.....	36
4.2. Material e métodos.....	37
4.2.1. Ensaio do DPPH	37
4.2.2. Ensaio do ABTS	38

4.2.3.	Ensaio do NO.....	38
4.2.4.	Ensaio do FRAP	39
4.2.5.	Ensaio do β -caroteno.....	40
4.3.	Resultados e discussão.....	40
5.	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	43
5.1.	Introdução.....	44
5.1.1.	Candidíase	45
5.1.2.	Criptococose.....	45
5.1.3.	Aspergilose.....	45
5.1.4.	Dermatofitoses.....	46
5.2.	Material e métodos.....	46
5.3.	Resultados e discussão.....	48
6.	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	51
6.1.	Introdução.....	52
6.2.	Material e métodos.....	52
6.2.1.	Cultura celular	53
6.2.2.	Ensaio de Griess	53
6.2.3.	Determinação da viabilidade celular	54
6.2.4.	Análise estatística.....	54
6.3.	Resultados e discussão.....	54
7.	ATIVIDADE CICATRIZANTE	57
7.1.	Introdução.....	58
7.2.	Material e métodos.....	59
7.2.1.	Cultura celular	59
7.2.2.	<i>Scratch assay</i>	59
7.2.3.	Determinação da viabilidade celular	59
7.2.4.	Análise estatística.....	60
7.3.	Resultados e discussão.....	60
8.	CONCLUSÃO	63
9.	BIBLIOGRAFIA.....	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies do género <i>Artemisia</i>	3
Figura 2 - Fotografias de <i>Artemisia campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	10
Figura 3 - Distribuição da <i>Artemisia campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	11
Figura 4 - Perfil da TLC da ARH, usando o sistema S1, a) revelada com NP-PEG à luz UV, b) com FeCl ₃ e c) revelada com DPPH; sistema S2 d) por observação a 366 nm antes de ser revelada e e) após ser revelada com DMACA à luz visível.....	28
Figura 5 - Perfil cromatográfico HPLC-PDA da ARH de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i> , registado a 280 nm e a 320 nm.	29
Figura 6 - Espectros UV dos compostos fenólicos presentes na ARH de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i> , obtidos por HPLC-PDA.....	30
Figura 7 - Reação de neutralização do radical DPPH.....	37
Figura 8 - Formação do complexo (Fe ²⁺ –TPTZ) a partir do complexo (Fe ³⁺ –TPTZ) por antioxidantes.	39
Figura 9 - Gráficos representativos do efeito da ARH de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i> na produção de nitritos por macrófagos estimulados com LPS (a) e viabilidade celular (b).....	55
Figura 10 - Gráfico da viabilidade celular para as diferentes concentrações de óleo essencial de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	56
Figura 11 – Imagens representativas da migração celular de um controlo, às 0 horas (a), e às 12 horas (b).....	61
Figura 12 - Efeito do OE e da ARH de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i> na migração de fibroblastos NIH/3T3.....	61
Figura 13 - Efeito do OE e da ARH de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i> na viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3.....	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Síntese descritiva de algumas espécies do género <i>Artemisia</i> , utilizações etnomedicinais e propriedades medicinais.....	4
Tabela 2 - Produtos atualmente comercializados com <i>Artemisia spp</i>	8
Tabela 3 - Classificação taxonómica de acordo com a checklist da Flora de Portugal.....	9
Tabela 4 - Utilização etno-medicinal da <i>A. campestris</i> L. em várias regiões do mundo.....	12
Tabela 5 - Compostos maioritários presentes no óleo essencial de <i>A. campestris</i> L. de várias localizações geográficas.	14
Tabela 6 - Condições utilizadas na análise da ARH por HPLC-PDA.....	24
Tabela 7 - Linearidade, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do padrão utilizado como referência.....	24
Tabela 8 - Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MS ⁿ	25
Tabela 9 - Tentativa de identificação das classes de compostos presentes na ARH de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i> por HPLC-PDA-ESI/MS ⁿ	31
Tabela 10 - Quantificação dos compostos fenólicos da ARH por HPLC-PDA.....	34
Tabela 11 - Atividade antioxidante (IC ₅₀ , TEAC e %I) da ARH e do OE.....	41
Tabela 12 - Estirpes de leveduras e fungos filamentosos e respetivas referências utilizadas nos ensaios.	47
Tabela 13 - Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de <i>Artemisia campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	49

Abstract

The hydrodistillation process for the extraction of essential oils originates high amounts of residual water, a by-product which is frequently discarded. However, it is conceivable that this water might be rich in biologically relevant non-volatile compounds due to the characteristics of the process. Considering this, the aim of this study is to chemically characterize the hydrodistillation residual water (HRW) of *Artemisia campestris* L. subsp. *maritima* (DC) Arcang. (dune wormwood), a native medicinal halophyte plant from Portugal. In addition, the bioactive potential of both extracts will be disclosed.

HRW is characterized by the presence of hydroxycinnamic acids as shown by high performance liquid chromatography-photodiode array detector-mass spectrometry (HPLC-PDA/MSⁿ) analysis. β -Pinene (54.5%), cadin-4-en-7-ol (9.5%), Z- β -ocimene (6.0%) and γ -terpinene (4.6%) are the major compounds of the essential oil (EO) as revealed by gas chromatography coupled by mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant, antifungal, anti-inflammatory and wound healing activities of both extracts were disclosed. In addition, aiming a potential pharmaceutical application, the cytotoxicity towards macrophages and fibroblasts was determined.

Both extracts have antioxidant potential as shown by several antioxidant assays. Additionally, only the HRW showed anti-inflammatory potential (IC₅₀ = 330 μ g/mL). On the other hand, only the EO showed antifungal activity, particularly against *Epidermophyton floccosum* (MIC and MLC values of 0.16 μ L/mL), and wound healing activity.

None of the extracts were cytotoxic to macrophages, whereas only the phenolic extract showed to be non-cytotoxic to fibroblasts. In conclusion, the HRW contains safe bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory potential thus promoting its industrial interest and economic value. Regarding the EO of *A. campestris* subsp. *maritima*, our results show that it possesses antioxidant activity, antifungal activity against dermatophytes and wound healing potential. Overall, our results promote the industrial potential of two extracts obtained from a Portuguese native species and validate some of its traditional uses.

Keywords: *Artemisia campestris* subsp. *maritima*; Antioxidant; Anti-inflammatory; Antifungal; Phenolic compounds

Resumo

A obtenção de óleo essencial por hidrodestilação produz geralmente grandes quantidades de água residual, um subproduto frequentemente descartado. No entanto, é possível que esta água seja rica em compostos não voláteis biologicamente relevantes. Perante isto, o objetivo deste estudo é caracterizar fitoquimicamente a água residual da hidrodestilação de *Artemisia campestris* L. subsp. *maritima* (DC) Arcang. (“dune wormwood”), uma planta medicinal halófita autóctone. Adicionalmente, a determinação do potencial bioativo da água residual da hidrodestilação (ARH) e do óleo essencial (OE) de *A. campestris* subsp. *maritima* constitui outro dos objetivos deste trabalho.

A partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fotodíodos e detetor de espectroscopia de massa (HPLC-PDA-ESI/MSⁿ) foi possível verificar que a ARH é composta maioritariamente por ácidos hidroxicinâmicos.

O β -pineno (54,5 %), cadin-4-en-7-ol (9,5 %), Z- β -ocimeno (6,0 %) e o γ -terpineno (4,6 %) são os principais compostos presentes no OE, conforme revelado por cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massa (GC-MS). As atividades antioxidante, antifúngica, anti-inflamatória e cicatrizante de ambos os extratos foram determinadas, assim como a citotoxicidade (em macrófagos e fibroblastos), com o objetivo de avaliar uma potencial aplicação farmacêutica.

Ambos os extratos mostraram potencial antioxidante em vários ensaios. Apenas a ARH apresentou potencial anti-inflamatório (IC₅₀ = 330 μ g/mL). Por outro lado, o OE apresentou atividade antifúngica, principalmente contra *Epidermophyton floccosum* (MIC e MLC de 0,16 μ L/mL) e atividade cicatrizante. Nenhum dos extratos foi citotóxico para macrófagos, enquanto apenas a ARH não mostrou citotoxicidade nos fibroblastos.

Deste modo, foi possível concluir que a ARH contém compostos bioativos seguros com potencial antioxidante e anti-inflamatório, e o OE possui atividade antioxidante, antifúngica contra dermatófitos e potencial cicatrizante. No geral, os resultados promovem o potencial industrial de dois produtos obtidos a partir da hidrodestilação de uma espécie autóctone, e validam algumas das suas utilizações tradicionais.

Palavras-chave: *Artemisia campestris* subsp. *maritima*; Antioxidante; Anti-inflamatório; Antifúngico; Compostos fenólicos

Lista de abreviaturas

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfónico
ARH: Água residual de hidrodestilação
ATCC: American Type Culture Collection
CECT: Colección Española de Culturas Tipo
CLSI: Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FBS: Soro fetal bovino não-inativado
FID: Detetor de ionização de chama
FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro
EAG: Equivalentes de ácido gálico
GC: Cromatografia gasosa
GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
HRW: Hydrodistillation residual water
HPLC-PDA: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detetor de fotodíodos
HPLC-PDA-ESI/MSⁿ: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detetor de fotodíodos e a um espectrómetro de massa com ionizador electrospray.
iNOS: Isoforma indutível da enzima sintase do óxido nítrico
LPS: Lipopolissacarídeo
MIC: Concentração Mínima Inibitória
MLC: Concentração Letal Mínima
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)-propanossufónico
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO: Óxido nítrico
OE: Óleo essencial
PBS: Tampão fosfato-salino
PDA: Potato Dextrose Agar
ROS: Espécies reativas de oxigénio
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SDA: Sabouraud Dextrose Agar
TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
UV: Ultravioleta

I. Introdução

O uso de produtos naturais na área alimentar, cosmética e medicinal é cada vez maior, uma vez que existe uma procura crescente de estilos de vida mais saudáveis assim como uma maior preocupação ambiental, que levou a um aumento do consumo de produtos com baixo impacto sobre o meio ambiente.

A opção pelo natural como mais saudável, a preferência por um processamento mínimo dos alimentos e o aumento do consumo de suplementos alimentares à base de plantas, a par da maior preocupação em evitar o uso de aditivos sintéticos tem conduzido, nos últimos anos, a um aumento da utilização de plantas aromáticas e medicinais (Nieto, 2017).

Neste contexto, produtos derivados de plantas, tais como extratos não voláteis e óleos essenciais poderão ter um papel fundamental. As plantas são uma fonte inesgotável de compostos bioativos, sendo que muitos deles são metabolitos secundários utilizados pelo Homem nas mais diversas indústrias.

As plantas aromáticas e medicinais são amplamente utilizadas diretamente como remédios populares ou indiretamente como preparações farmacêuticas. Estas plantas têm sido sujeitas a diversos estudos que confirmaram e deram a conhecer algumas das suas propriedades (Cunha, Roque & Nogueira, 2012), revelando potenciais usos comerciais de produtos derivados das mesmas. A versatilidade destes compostos permite serem usados nas mais variadas vertentes, tais como na indústria alimentar, como aditivos ou conservantes, assim como na indústria farmacêutica e cosmética.

Halófitas são plantas que vivem em ambientes com elevado teor de salinidade. De maneira a lidar com condições tão desfavoráveis, desenvolvem respostas adaptativas, tais como a síntese de moléculas bioativas com elevado poder antioxidante, nomeadamente, compostos fenólicos, terpenos e vitaminas. Estas moléculas bioativas possuem importantes atividades biológicas, por exemplo, captação de radicais livres, inibição de enzimas e quelação de metais. Estas propriedades são muitas vezes benéficas e justificam o uso de plantas halófitas na medicina tradicional (Pereira et al., 2018).

Além de seu uso tradicional como alimento e remédios populares, os halófitos podem ser produzidos em solos salinos não cultiváveis e ambientes marinhos e servir como culturas alternativas de rendimento na agricultura salina. Na verdade, estas plantas podem ser exploradas em diversas vertentes, desde da nutrição humana e animal às indústrias farmacêutica e cosmética (Pereira et al., 2018).

A Flora Portuguesa é, neste contexto, particularmente importante pela sua riqueza em plantas aromáticas, medicinais e condimentares (PAM). Das 3800 espécies identificadas na flora do Continente, Açores e Madeira, cerca de 500 são aromáticas e medicinais (Figueiredo, Barroso & Pedro, 2007).

Este estudo tem como objetivo valorizar uma planta halófita autóctone, *Artemisia campestris* subsp. *maritima*, através da avaliação de várias atividades biológicas que possam

demonstrar o potencial medicinal assim como rentabilizar um subproduto obtido na produção do seu óleo essencial.

I.1. Género *Artemisia*

O género *Artemisia* pertence à família Asteraceae (Compositae), tribo das Heliantheae e subtribo das Ambrosiinae. As Asteraceae são a maior família de plantas vasculares, possuindo mais de 32868 espécies (Bora & Sharma, 2011; Compositae Working Group (CWG),2020).

As espécies deste género são ricas em fitoconstituintes bioativos voláteis e não voláteis que fornecem potencial terapêutico a estas plantas. Várias atividades biológicas de interesse já foram relatadas e relacionadas com espécies do género *Artemisia*. Algumas espécies deste género são usadas como infusões, bebidas alcoólicas e medicamentos (Abad et al., 2012).



Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies do género *Artemisia*, representada pelas zonas a verde (adaptado de Koul et al., 2017).

As espécies do género *Artemisia* estão distribuídas por regiões temperadas da América do Norte, Mediterrâneo, Ásia, África e Austrália (Koul et al., 2017), como é possível ver na Figura 1.

Este género possui uma grande variabilidade morfológica e fitoquímica, apresentando uma grande plasticidade ecológica, com espécies que surgem em zonas costeiras, em montanhas e em zonas áridas (Abad et al., 2012).

Um elevado número de metabolitos bioativos já foram identificados no género *Artemisia* nomeadamente, óleos essenciais, terpenos, flavonóides, ácidos fenólicos e cumarinas (Obistoiu et al., 2014; Bora & Sharma, 2011).

Foram identificados cerca de 839 fitoquímicos em 14 espécies de *Artemisia*, sendo que os terpenos oxigenados e hidrocarbonetos são os fitoconstituintes mais abundantes deste género. A artemisina é um dos compostos mais importantes, isolado de duas espécies do género *Artemisia*, *A. annua* L. e *A. abrotanum* L. (Koul & Khatri, 2020).

Diversas espécies deste género que possuem potencial terapêutico têm sido usadas desde os tempos antigos na culinária e em medicina tradicional, no tratamento de diversas doenças, tais como a malária, hepatite, cancro, inflamação e infeções por fungos, bactérias e vírus (Abad et al., 2012). Estudos prévios revelaram que várias espécies do género *Artemisia* possuem atividades antioxidante, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antimalárica, antiparasitária, hepatoprotetora, antinociceptiva, anti-ulcerogénica, anticancerígena, antidiabética, antidepressiva, anticonvulsiva e atividade contra leishmaniose (Abad et al., 2012; Megdiche-Ksouri et al., 2014; Bora & Sharma, 2010; Koul & Khatri, 2020).

Na Tabela 1 estão descritas algumas espécies do género *Artemisia* com os respetivos usos tradicionais e as propriedades medicinais estudadas.

Tabela 1 - Síntese descritiva de algumas espécies do género *Artemisia*, utilizações etnomedicinais e propriedades medicinais.

Espécie	Usos tradicionais	Atividades farmacológicas	Referências
<i>A. abrotanum</i> L.	Tratamento de infeções intestinais, diabetes e doenças nas vias aéreas superiores; Diurético e emenagogo	Tratamento de rinite alérgica e problemas respiratórios; Antiespasmódica e antimicrobiana	Mendiola et al., 1991; Radulovic et al., 2009; Remberg et al., 2004
<i>A. absinthium</i> L.	Tratamento da anorexia, inflamação do fígado, dor de ouvidos, icterícia, hemorroidas e melhoria de memória; Antiespasmódico, estimulante cardíaco, antipirético, laxante, adstringente, diurético e antiparasitário	Tratamento da hipercolesterolemia; Analgésica, antiparasitária, citotóxica, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, antimicrobiana, hepatoprotetora, antimalárica	Ahmad et al., 1992; Yildiz et al., 2011; Taherkhani, 2014; Erel et al., 2012; Wani, Shah & Banday, 2014; Msaada et al., 2015; Mohammadian et al., 2016; Juteau et al., 2003; Moslemi 2012; Zafar, Hamdard & Hameed, 1990

Espécie	Usos tradicionais	Atividades farmacológicas	Referências
<i>A. afra</i> Jacq.	Alívio da tosse, tratamento de distúrbios renais e da bexiga, indigestão, constipações, cólicas, dores de cabeça e diabetes; Laxante e antimalárico	Antimicrobiana	Thring & Weitz 2006; Muyima et al., 2002; Abad et al., 2012; Alwathnani, 2017; Gundidiza, 1993 Graven, Gardner &Tutt, 1986; Rabe & Staden, 1997
<i>A. annua</i> L.	Tratamento de febre e malária	Tratamento da coccidiose; Antiespasmódica, antiviral, repelente de insetos, inseticida, antiulcerogénica, pesticida, antiparasitária, antimalárica, antioxidante, antimicrobiana, anti-leishmaniose	Abad et al., 2012; Tawfiq et al., 1989; Khan et al., 1991; Allen et al., 1997; Tripathi et al., 2000; Dias et al., 2001; Juteau et al., 2003; Rasooli et al., 2003; Maggi et al., 2005; Zhang et al., 2008; Chagas, Georgetti & Carvalho (2011), Carvalho, Cavaco & Brodelius, 2011; Liu et al., 1992; Ogwang et al., 2011; Iqbal et al., 2012; Cavar et al., 2012; Mesa et al., 2017
<i>A. arboresces</i> L.	Anti-inflamatório	Antiviral, antibacteriana, antioxidante, hepatoprotetora, fitotóxica	Ballero et al., 2001; Saddi et al., 2007; Erel et al., 2012; Younes et al., 2012; Sinico et al., 2005; Saddi et al., 2007; Araniti et al., 2013; Carvalho, Cavaco & Brodelius, 2011; Dhibi et al., 2015

Espécie	Usos tradicionais	Atividades farmacológicas	Referências
<i>A. argyi</i> Levl.et Vent	Tratamento de distúrbios a nível do fígado, baço e rins	Atividade anticancerígena contra glioma e anti proliferativa	Khan et al., 2011; Kim et al., 2007; Otsuka et al., 1992
<i>A. capillaris</i> Thunb.	Tratamento da hepatite e infecções microbianas; Anti-inflamatório e antimalárico.	Antioxidante, anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, anti metastática, anti-inflamatória e citoprotetora	Koul et al.,2017; Wu et al., 2007; Kiso et al., 1984; Tanaka., 1981; Kim et al., 2008; Hong et al., 2007; Cha et al., 2005; Tsui et al., 2017; Kim et al., 2018; Lee et al., 2014
<i>A. campestris</i> L.	Tratamento de febre, de problemas digestivos, dores menstruais; Antioxidante, antiveneno, anti-inflamatório, antirreumático e antimicrobiano	Hepatoprotetora, antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória, anti-hipertensiva e anticancerígena	Bakchiche et al., 2019; Megdiche-Ksouri et al., 2014; Akrouit et al., 2011; Naili et al., 2010; Al-Snaffi, 2015
<i>A. douglasiana</i> Besser	Tratamento de distúrbios nervosos e cólicas menstruais; Diurético	Redução da síndrome pré-menstrual e sintomas de dismenorreia; Antimicrobiana	Setzer et al., 2004; Meepagala et al. 2003; Setzer et al. 2004

Espécie	Usos tradicionais	Atividades farmacológicas	Referências
<i>A. dracunculul</i> L.	Tratamento de aftas e dor de garganta; Antidiabético, anticoagulante, desinfetante do ar e intensificador da libido	Controlo da glicémia em pacientes com tolerância diminuída à glicose e inibição das atividades de adesão de plaquetas no sangue; Antimicrobiana, anticoagulante, antidiabética, anticonvulsiva, antioxidante e anti-inflamatória	Schmidt et al., 2007; Obolskiy et al., 2011; Villar et al., 2016; Behbahani et al., 2017; Reza, Hamideh & Zahra, 2015; Sayyaha, Nadjafnia & Kamalinejad, 2004
<i>A. iwayomogi</i> Kitamura	Tratamento de várias doenças hepáticas	Inibição de fibrose hepática e antibacteriana	Park et al 2000; Erel et al. 2012
<i>A. scoparia</i> Waldst. & Kit.	Tratamento de inflamações, febre e diminuição da dor	Antioxidante, inseticida, antipirética, antisséptica, antibacteriana, antifúngica, citotóxica, diurética, purgativa, vasodilatadora, anti-inflamatória	Habid & Waheed 2013; Bora & Sharma 2011; Negahban, Moharramipour & Sefidkon, 2006; Singh et al., 2008; Erel et al., 2012; Erel et al., 2011
<i>A. vestita</i> Wall	Anti-inflamatório	Imunossupressora e anti-inflamatória	Lv et al., 2008; Yin et al., 2008
<i>A. vulgaris</i> L.	Emenagogo, antihelmíntico, antisséptico e antiespasmódico	Tratamento da hipercolesterolemia; Antioxidante, antibacteriana, antifúngica, citotóxica, larvicida, e antimalárica	Gilani et al., 2005; Bhatt et al., 2007; Erel et al., 2012; Hiremath, Kolumbe & Muddapur, 2011; Karabegovic et al., 2011; Erel et al. 2011; Bamunuarachchi et al., 2014;

Devido ao facto destas plantas serem um reservatório de moléculas bioativas, este género tem sido vastamente explorado. Tendo em conta o potencial terapêutico já comprovado destas espécies, produtos biofarmacêuticos que contêm extratos ou derivados de compostos presentes nestas plantas já são comercializados (Tabela 2).

Tabela 2 - Produtos atualmente comercializados com *Artemisia spp* (adaptado de Koul & Khatri 2020).

Espécie	Modo de administração	Aplicação
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Cápsulas	Estimula o processo digestivo
	Comprimidos	Promove o sistema imunitário e digestão
	Xarope	Anti-helmíntico
	Óleo	Anti-helmíntico, desodorizante, digestivo, inseticida, narcótico, antipirético
	Creme	Desodorizante
<i>Artemisia annua</i> L.	Comprimidos	Digestivo, antipirético
	Tónico	Promove a função gastrointestinal
	Tónico	Melhora a digestão
	Injeções	Antimalárico
<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	Cápsulas	Melhora a digestão e desintoxicação do corpo
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Comprimidos	Obstipação, indigestão e hiperacidez
<i>Artemisia pallens</i> Wall.	Óleo	Afrodisiáco, anti-infecioso, calmante, mucolítico e emoliente
	Óleo	Melhora a digestão e promove o metabolismo

I.1.1. *Artemisia campestris* L. subsp. *maritima* (DC) Arcangeli

A *Artemisia campestris* L. é uma das espécies mais comuns do género *Artemisia*, que pertence à família das Asteraceae (Compositae), tribo das Heliantheae e subtribo das Ambrosiinae.

A. *campestris* pode ser subdividida em várias subespécies e variedades, sendo que as subespécies que predominam a Europa são as subespécies *glutinosa* (Besser) Batt., subsp. *maritima* Arcangeli, subsp. *alpina* (DC.) Arcangeli, subsp. *bottnica* A. N. Lundström ex Kindb e a subsp. *borealis* (Pallas) Hall & Clements. O que difere nestas subespécies é o aspeto viscoso do capítulo e a textura carnuda das folhas (Dib & Alaoui-Farisb, 2019).

Segundo The Plant List (The Plant List, 2020), a *Artemisia campestris* subsp. *maritima* tem como sinónimos: *Artemisia crithmifolia* L.; *Artemisia gayana* Besser; *Artemisia campestris* subsp. *lloydii* (Rouy) Cout.; *Artemisia campestris* var. *maritima* DC.; *Draconia campestris* subsp. *maritima* (Arcang.) Soják.

A. *campestris* subsp. *maritima* (Figura 2), comumente denominada em Portugal de erva-lombrigueira e madorneira, é uma espécie autóctone, um sub-arbusto ramoso, perene, lenhoso, rizomatoso, ligeiramente aromático, do qual despontam raízes profundas. A classificação botânica está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação taxonómica de acordo com a checklist da Flora de Portugal.

Espécie	<i>Artemisia campestris</i> L.
Subespécie	<i>maritima</i> Arcangeli
Género	<i>Artemisia</i>
Família	Asteraceae
Ordem	Asterales
Subclasse	Asteridae
Classe	Magnoliopsida
Subdivisão	Magnoliophytina (Angiospermae)
Divisão	Spermatophyta

É um sub-arbusto ramoso, perene, lenhoso, glabro, aromático, provido de rizoma do qual despontam raízes profundas. Caules 30-80 cm altos, estriados, eretos, ascendentes,

geralmente vermelho-acastanhados. Folhas sésseis, carnudas, alternas, divididas em segmentos, mucronadas. Capítulos ovoides, ereto-patentes ou inclinados, reunidos em cachos plurilaterais, dispostos em panícula ampla. Flores periféricas femininas, delgadas, compridas, flores centrais masculinas, tubulares e mais curtas; corolas amarelas. Cipselas obovóides, cilíndricas, finamente estriadas, glabras, acastanhadas, sem papilho, com dispersão anemófila (Alarmagem, Biodiversidade a seus pés, 2020).



Figura 2 - Fotografias de *Artemisia campestris* subsp. *maritima*, in <https://flora-on.pt/#/1artemisia+campestris+subsp.+maritima> a 20/11/2019

A subsp. *maritima* Arcang. possui diferenças morfológicas que a distingue das restantes. Na verdade, as folhas (Figura 2) são mais carnudas e convexas, e assumem formas lobuladas. Para esta subespécie, a principal diferença é o número cariológico estimado em $2n = 54$ (Dib & Alaoui-Farish, 2019).

Esta espécie distribui-se por zonas costeiras, é uma planta halófito, sendo, portanto, tolerante á salinidade. As plantas halófitas, devido às condições do meio, desenvolvem respostas adaptativas, como, por exemplo, a síntese de moléculas bioativas com grande

potencial antioxidante, como compostos fenólicos, terpenos, entre outros, (Pereira et al., 2018).

Esta espécie distribui-se por quase todos os areais do litoral português e litoral atlântico temperado europeu (Figura 3).

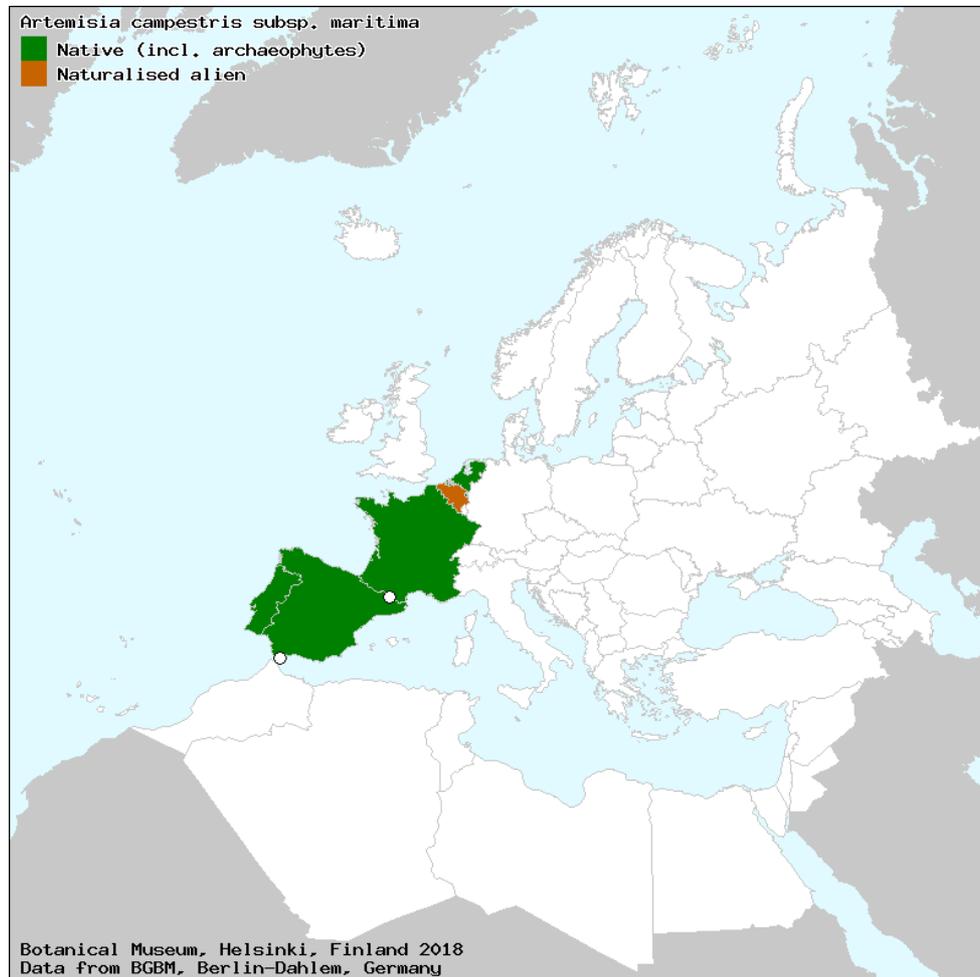


Figura 3 - Distribuição da *Artemisia campestris* subsp. *maritima* (Euro Med plantbase, 2011).

I.I.I.I. Etnobotânica

A etnobotânica é uma área científica que estuda a relação que existe entre o Homem e as plantas e o modo de como as populações usam os recursos vegetais.

Em Portugal existe ainda um vasto conhecimento acerca dos usos populares e tradicionais de plantas. No entanto, a utilização de plantas em remédios caseiros é uma prática que tem vindo a diminuir. Na medicina popular, extratos aquosos (infusões e decocções) e hidro-alcoólicos (tinturas) são usados para transmitir as propriedades curativas das plantas (Pereira et al., 2018).

As plantas halófilas, como a *A. campestris*, possuem uma elevada tolerância ao sal, e para resistirem ao *stress* ambiental, estão equipadas com poderosos mecanismos de defesa que incluem a produção de compostos altamente bioativos, cujas atividades biológicas poderão ajudar a explicar a utilização de algumas destas plantas como remédios populares.

Na Tabela 4 estão descritos alguns dos usos tradicionais de *Artemisia campestris* em vários locais do mundo.

Tabela 4 - Utilização etno-medicinal da *A. campestris* L. em várias regiões do mundo.

País	Parte usada	Modo de preparação	Uso tradicional
Marrocos	Folhas e flores de <i>A. campestris</i>	Decocção	Tratamento da hipoglicemia, obesidade e colesterol; Depurativo, digestivo, colagogo e colerético (Bnouham et al., 2002)
Tunísia	Folhas de <i>A. campestris</i>	Decocção	Antiveneno, anti-inflamatório, antirreumático e antimicrobiano (Akrouit et al., 2011)
Argélia	Parte aérea de <i>A. campestris</i>	Nr*	Tratamento de problemas digestivos, úlceras gástricas e dores menstruais (Dob et al., 2005)
Espanha	Flores de <i>A. campestris</i>	Decocção	Tratamento para a calvície (Dib et al., 2017)
Servia	Folhas de <i>A. campestris</i>	Nr*	Anti-helmíntico, antissético e emenagogo (Dib et al., 2017)
India	Folhas de <i>A. campestris</i>	Nr*	Antiveneno (Bahekar et al., 2012)
Argentina	Folhas e caules de <i>A. campestris</i>	Infusões e maceração	Tratamento para a tosse, bronquite e contusões (Dib et al., 2017)

País	Parte usada	Modo de preparação	Uso tradicional
Portugal	Folhas e caules de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	Infusão	Tratamento de problemas gástricos, hipertensão e reumatismo; Propriedades abortivas e antiemético (Pereira et al., 2018)
EUA e Canada	Folhas e raízes de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	Infusão, emplastro	Propriedades abortivas, tratamento de problemas respiratórios, digestivos e cutâneos (Dib et al., 2017)
Tunísia	Folhas e caules de <i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	Decocção	Antiveneno, anti-inflamatório, antirreumático e antimicrobiano (Megdiche-Ksouri et al., 2014)

*Nr – Não refere

1.1.1.2. Compostos bioativos

Os metabolitos secundários produzidos pelas plantas possuem um papel fundamental na sua sobrevivência, sendo que existem 3 classes principais: terpenos, fenóis e compostos azotados (Taleghani, Emami & Tayarani-Najaran, 2020). Cada família, género e espécie possui frequentemente uma mistura destes metabolitos secundários.

O género *Artemisia* demonstrou ser rica em terpenos, sesquiterpenos, flavonóides e cumarinas (Afshar et al., 2017). Dib e colaboradores (2019, 2017) referem que *Artemisia campestris* é rica em flavonóides, ácidos fenólicos e terpenos. No entanto verificam-se alterações na composição química dos extratos obtidos, de acordo com a época do ano e da zona geográfica da colheita da planta.

Vários extratos de diferentes partes de *A. campestris* mostraram uma ampla gama de atividades biológicas, indicando que as propriedades medicinais destas plantas estão relacionadas com os compostos bioativos presentes na mesma (Dib & Alaoui-Farish, 2019).

I.1.1.2.1. Compostos voláteis

Os óleos essenciais são, normalmente, misturas complexas de inúmeros compostos voláteis, responsáveis pelas propriedades odoríferas e por características farmacológicas relacionadas com a planta.

A organização internacional de normalização (ISO - International Organization for Standardization) (ISO/D1S9235.2) define um óleo essencial como um produto obtido através da destilação com água ou vapor, por processamento mecânico ou por destilação a seco de materiais naturais (Nazarro et al., 2017).

Dib & Alaoui-Farisb (2019) refere que os principais terpenos presentes nestas plantas são os de baixo peso molecular, tais como monoterpenos: β -mirceno, α -pineno, β -pineno, limoneno, terpineno.

Na Tabela 5 estão apresentados os compostos maioritários do óleo essencial da *A. campestris* de variadas zonas geográficas.

Tabela 5 - Compostos maioritários presentes no óleo essencial de *A. campestris* L. de várias localizações geográficas.

Origem	Espécie	Parte da planta	Compostos mais abundantes	Referências
Portugal	<i>A. campestris</i> subsp. <i>maritima</i>	Toda a planta	β -pineno (17,8 %) cadin-4-en-7-ol (16,4 %) γ -terpineno (8,7 %) <i>cis</i> - β -ocimeno (7,4 %)	Silvestre et al., 1999
Tunísia	<i>A. campestris</i>	Folhas e caules	β -pineno (36,4 %) 2-undecanona (14,7 %) limoneno (10,57 %) benzeno (6,3 %)	Abidi et al., 2018
Argélia	<i>A. campestris</i>	Parte aérea (com flores)	(Z,E)-farnesol (10,3 %) cedrol (5,4 %) verbenona (3,8 %) mirceno (3,3 %)	Dob et al., 2005
Argélia	<i>A. campestris</i>	Parte aérea (flor)	α -pineno (18,6 5%) β -pineno (16,78 %)	Houicher, Hechachna, & Ozogul, 2016

Origem	Espécie	Parte da planta	Compostos mais abundantes	Referências
			β -mirceno (17,34 %) germacreno D (10,34 %)	
Servia	<i>A. campestris</i>	Parte aérea	espatulenol (9,2 %) β -pineno (9,1 %) α -pineno (3,4 %) germacreno D (3,3 %)	Chalchat et al., 2003
Turquia	<i>A. campestris</i>	Parte aérea	tremetona (15,83 %) capillina (10,38 %) espatulenol (6,47 %) β -pineno (6,31 %)	Erel et al., 2012
Tunísia (vários locais)	<i>A. campestris</i>	Folhas	β -pineno (24,4 – 27,9 %) <i>p</i> -cimeno (17,4 – 22,3 %) cânfora (0 – 10,3 %) espatulenol (0 – 10 %)	Akrout et al., 2001

1.1.1.2.2. Compostos fenólicos

O perfil fenólico da *A. campestris* já foi vastamente estudado tendo sido identificados vários flavonóides, tais como, canferol e seus derivados, quercetina e seus derivados, e miricetina e seus derivados (Dib et al., 2017). Outros estudos realizados na mesma planta (Dib & Alaoui-Farib, 2019) revelaram que os flavonóides potencialmente envolvidos nos efeitos biológicos são a crisina, apigenina, luteolina, 6-hidroxluteolina, canferol, quercetina, miricetina, eriodictiol, ramnetina, isoramnetina, eupatilina, pinocembrina, sakuranetina, hesperidina e a rutina. Dib e colaboradores (2019) referem também que a quercetina, a miricetina, entre outros flavonóides, possuem atividade protetora contra o *stress* oxidativo.

A flavona hispidulina e a 7,3'-O-dimetiltaxifolina foram isoladas de extratos de clorofórmio das partes aéreas de *A. campestris* subsp. *maritima*. Contudo, extratos de acetona e clorofórmio contêm maioritariamente dihidroflavonas (Dib et al., 2017).

Frações aquosas de partes aéreas de *A. campestris* subsp. *maritima* demonstraram possuir 63,81 \pm 0,52 mg GAE/g extrato seco de flavonóides totais (Megdiche-Ksouri et al. 2014).

Estudos confirmaram que extratos hidroetanólicos das partes aéreas de *A. campestris* da Argélia e extratos metanólicos, aquosos e de acetato de etilo das partes aéreas da planta

colhida na Tunísia são ricos em ácidos hidroxicinâmicos, tais como ácidos clorogénico e cafeico, assim como os ácidos isoclorogénico A, B e C (Djeridane et al., 2007; Megdiche-Ksouri et al., 2015; Sebai et al., 2014).

O ácido clorogénico, os seus derivados, tais como, 3-O-cafeoilquínico e 4-O-cafeoilquínico, e os ácidos isoclorogénicos, como por exemplo, o ácido 1,3-dicafeoilquínico e o ácido 4,5-dicafeoilquínico estão muito presentes no perfil fitoquímico da *A. campestris*. (Bakchiche et al., 2019).

Segundo Naili e colaboradores (2010) bem como Masotti e colaboradores (2012), as folhas de *A. campestris* não têm cumarinas, no entanto, outros estudos mostraram que frações aquosas, extratos metanólicos e de hexano e acetona de *A. campestris* subsp. *maritima* possuem cumarinas e seus derivados (Megdiche-Ksouri et al., 2015; Vasconcelos, Silva & Cavaleiro, 1998).

Frações aquosas das partes aéreas de *A. campestris* subsp. *maritima* demonstraram possuir $10,63 \pm 2,16$ mg GAE/g extrato seco de fenólicos totais.

1.1.1.3. Bioatividades

A. campestris é muito utilizada na medicina tradicional, como já foi demonstrado anteriormente, sendo que alguns estudos sugerem que esta planta possui atividades terapêuticas devido aos seus efeitos: anti-hipertensivo (Ben-Nasr et al., 2014), antidiabético (Sefi et al., 2012), antiveneno (Ben-Nasr et al., 2014; Jaouadi et al., 2016), cicatrizante (Ghliissi et al., 2016), hepatoprotetor (Barkat 2015), anti-leishmaniose (Essid et al., 2015), protetor renal (Saoudi et al., 2017), inseticida (Masotti et al., 2012; Akrouit et al., 2007), anti-helmíntico (Akkari et al., 2014) e anticancerígeno (Akrouit et al., 2011; Erel et al., 2011).

Pereira e colaboradores (2018) avaliaram o poder antioxidante de infusões e decocções das partes aéreas da *A. campestris* subsp. *maritima*, colhida em Portugal. Foram realizados ensaios de DPPH, ABTS e FRAP. Neste estudo o ensaio DPPH obteve um IC₅₀ de 0,33 mg/ml e 0,34 mg/ml (para as infusões e decocções, respetivamente), no ensaio do ABTS obteve-se valores de IC₅₀ de 0,41mg/ml e 0,44 mg/ml (para as infusões e decocções, respetivamente) e, por fim, para o ensaio do FRAP obtiveram-se valores de IC₅₀ de 0,17 mg/ml e 0,27 mg/ml (para as infusões e decocções, respetivamente).

Megdiche-Ksouri e colaboradores (2014) estudaram o potencial antioxidante de frações aquosas a partir de partes aéreas de *A. campestris* subsp. *maritima*, tendo obtido valores de IC₅₀ de $27,5 \pm 0,5$ µg/ml no ensaio do DPPH, e valores de EC₅₀ de $340 \pm 7,51$ µg/ml para o ensaio do FRAP.

Extratos aquosos a partir das raízes e da decocção das partes aéreas de *A. campestris* subsp. *maritima*, revelaram possuir atividade inibidora da α -glucosidase microbiana, enquanto que a tintura da raiz mostrou inibição da α -glucosidase de mamíferos (Pereira et al., 2018).

2. Objetivos

A hidrodestilação de plantas aromáticas tem como principal produto o óleo essencial, no entanto, este processo origina grandes quantidades de água residual. Apesar deste subproduto ser normalmente descartado, é possível que, durante este processo muitos compostos solúveis e não voláteis sejam extraídos, tornando esta água rica em bioativos com potencial valor industrial.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho são: avaliar algumas propriedades do óleo essencial (OE) de *A. campestris* subsp. *maritima*, colhida em Portugal, assim como avaliar se a água residual da hidrodestilação (ARH) possui propriedades de interesse, de modo a reaproveitar o que seria um resíduo.

Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar fitoquimicamente o OE e a ARH, assim como determinar se possuem atividades biológicas de interesse, posto isto procedeu-se:

- Determinação do perfil fenólico da ARH através de TLC, HPLC-PDA e HPLC-PDA-ESI/MSⁿ.
- Determinação da atividade antioxidante do OE através do método do DPPH e β -caroteno.
- Determinação do potencial antioxidante da ARH através do método do DPPH, FRAP, NO e ABTS.
- Determinação da atividade antifúngica do OE e da ARH em fungos filamentosos e leveduras.
- Determinação da atividade anti-inflamatória do OE e da ARH.
- Determinação da atividade cicatrizante do OE e da ARH.
- Determinação da viabilidade celular do OE e da ARH em macrófagos e fibroblastos.

3. Caracterização fitoquímica

3.1. Material e métodos

3.1.1. Material vegetal e preparação dos extratos

Partes aéreas de *Artemisia campestris* subsp. *maritima* foram colhidas na Figueira da Foz, Portugal. Após a recolha, a planta foi mantida em ambiente seco e submetida a um processo extrativo para a obtenção do óleo essencial e respetiva água residual. Um exemplar testemunho foi depositado no Herbário de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O óleo essencial de *A. campestris* subsp. *maritima* foi obtido através de um processo de hidrodestilação, com recurso ao aparelho de Clevenger, em que a planta foi colocada diretamente em contacto com a água a ferver, durante 3 h, de acordo com o procedimento descrito pela Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2010).

Após a extração do óleo essencial, a água residual resultante do processo de hidrodestilação (Água Residual da Hidrodestilação – ARH) foi filtrada sob vácuo, concentrada num evaporador rotativo a pressão reduzida, congelada e liofilizada.

3.1.2. Óleo essencial (OE)

A caracterização química do óleo essencial foi obtida em estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) e por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os compostos foram identificados pelos seus índices de retenção e pelos respetivos espectros de massa.

3.1.3. Água residual de hidrodestilação (ARH)

A caracterização fitoquímica da ARH foi obtida por cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência com deteção de fotodíodos (HPLC-PDA) e cromatografia líquida de alta eficiência com deteção de fotodíodos acoplada à espectrometria de massa sequencial de ionização por electrospray (HPLC-PDA-ESI/MSⁿ).

O cromatógrafo HPLC-PDA foi usado para a análise quantitativa, já a análise por HPLC-PDA-ESI/MSⁿ foi realizada para a identificação dos compostos.

3.1.3.1. Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* foi realizado através de um ensaio colorimétrico usando o reagente de Folin-Ciocalteu, descrito por Wang e colaboradores (1997), com algumas modificações.

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância da amostra contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (Fluka) (0,1 a 1 mg/mL).

O ensaio consistiu em adicionar 100 µL de extrato, diluído em acetona:água (70:30) a 1,9 mL de água miliQ e 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Merck). Após agitar, foi adicionado 5 mL de carbonato de sódio (20 %) e perpez-se o volume com água milliQ até obter um volume final de 10 mL. Ao fim de 20 min ao abrigo da luz, mediu-se as absorvâncias a 700 nm, num espectrofotómetro de duplo feixe (Cintra 101, GBC, Austrália).

Foram realizados três ensaios independentes em triplicado. Os resultados foram expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato.

3.1.3.2. Cromatografia em camada fina (TLC)

Para a pesquisa de fitoquímicos da ARH utilizaram-se dois sistemas de TLC: sistema S1, descrito por Wagner & Bladt (2001), apropriado para separação de flavonóides glicosilados, em que a fase móvel usada foi uma solução de acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-água (100:11:11:26); sistema S2, utilizado para avaliar o grau de polimerização de taninos (Escribano-Bailon et al., 1992) em que a fase móvel consistiu numa solução de tolueno-acetona-ácido acético (3:7,5:1).

Para ambos os sistemas cromatográficos usaram-se placas pré-revestidas de sílica gel 60 F254 (Merck) eluídas em câmaras previamente saturadas. Observação foi feita à luz visível e ultravioleta (254 e 366 nm), antes e após a aplicação dos diversos reveladores.

Os reveladores utilizados foram:

NP-PEG (Natural Products-polyethylene glycol), utilizado para deteção de polifenóis, mais concretamente flavonóides e ácidos fenólicos (Wagner e Bladt, 2001), Este revelador é constituído pelo reagente NP (Sigma-Aldrich), uma solução metanólica do éster aminoetílico do ácido difenilbórico a 1 %, e o reagente PEG, uma solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (Fluka) a 5 %, aplicados sobre as placas, após secagem do primeiro. As placas foram observadas ao visível e à luz UV (366 nm).

Cloreto de ferro, usado para a deteção de alcalóides, compostos fenólicos, ácidos hidroxâmicos, taninos e hipericinas (Bolliger et al., 1965; Senguttuvan, Paulsamy & Arts, 2014;

Waksmundzka-Hajnos, Sherma & Kowalska, 2008). Este reagente consiste numa solução metanólica de cloreto férrico (AcrosOrganics) a 5%. As placas são observadas à luz visível após aplicação.

DMACA (*p*-dimetilaminocinamaldeído), utilizado para detetar taninos condensados, consistindo numa solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído (Merck) a 1% em metanol (Merck) contendo ácido sulfúrico 1,5 M. No momento de utilizar misturam-se 1 g de dimetilaminocinamaldeído a 100 mL de metanol contendo 8 mL de ácido sulfúrico (Panreac). Após pulverização aquecem-se as placas a 100 °C durante 5-10 min, sendo posteriormente observadas sob luz visível.

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), utilizado com frequência para a deteção de substâncias com propriedades antioxidantes, uma vez que é um radical sintético. É usado como revelador para realizar a análise bioautográfica da atividade antioxidante pelo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Na preparação da solução do reagente DPPH, pesaram-se 2 mg de DPPH (Sigma-Aldrich) para um balão de 20 mL que se aferiu com metanol. Para a realização deste ensaio, a placa de TLC é pulverizada com a solução de DPPH, e após a evaporação do solvente, a placa é observada após 30 minutos à luz visível.

3.1.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção de fotodíodos (HPLC-PDA)

De modo a caracterizar e quantificar os compostos fenólicos presentes na ARH, foi realizada uma análise num cromatógrafo HPLC (Gilson), equipado com duas bombas (modelo 305 e 306), misturador (modelo 811 B), módulo manométrico (modelo 805) e um injetor automático (Gilson 234 Autoinjeter), acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) (Gilson, modelo 170) e a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint® 2.10). A separação foi efectuada numa coluna Spherisorb Waters® S5 ODS2, partículas de 5 µm (4,6x250 mm), mantida 35 °C e protegida por uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel (Düren). A fase móvel consistiu de uma solução de ácido fórmico a 5 % (A) e acetonitrilo (B), a um fluxo de 1 mL/min. O gradiente usado foi 5-30 % de B (0-50 min) e 30-100 % de B (50-55 min).

Os solventes utilizados (Merck) foram previamente microfiltrados utilizando-se filtros NL16 (0,2 µm; 50 mm) (Schleicher & Schuell, Germany) e desgaseificados num aparelho de ultrassons (Bransonic, modelo B-2200 E1).~

A amostra foi solubilizada em água e filtrada (filtro PVDF, 0,22 µL, 13 mm, Filter-Lab), o volume injetado foi de 100 µL e os perfis cromatográficos foram registados a 280 e 320 nm. As condições de análise encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições utilizadas na análise da ARH por HPLC-PDA.

Fase móvel	Eluente A: Ácido fórmico 5 % em água (v/v)		
	Eluente B: Acetonitrilo		
Pré-coluna	KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Macherey-Nagel		
Coluna	Coluna analítica de Waters Spherisorb, S5 ODS2, partículas de 5 µm (4,6x250 mm)		
Temperatura da coluna	35 °C		
Fluxo	1 mL/min		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	0	95	5
	50	70	30
	55	0	100

Os ácidos fenólicos presentes na ARH foram quantificados através da comparação das áreas dos picos obtidas no cromatograma contra uma curva padrão de ácido cafeico (Sigma-Aldrich) a 325 nm. Os limites de deteção e quantificação (LOD e LOQ, respetivamente) foram determinados através da curva de calibração representada na Tabela 7.

Foram injetados 100 µL de extrato de ARH e padrões tendo sido realizadas 3 injeções independentes, realizadas em duplicado.

Tabela 7 - Linearidade, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do padrão utilizado como referência.

Padrão	Concentração (µg/mL)	Declive	Ordenada na origem	R²	LOD (µg/mL)	QOD (µg/mL)
Ácido cafeico	2,50 a 150	5,4x10 ⁶	3,23x10 ⁶	0,999963	0,1025 ± 0,2686	1,7387 ± 0,2655

3.1.3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por electrospray (HPLC-PDA-ESI/MSⁿ)

Foram injetados 25 µL de solução de ARH (3 mg liofilizado/mL de água) num cromatógrafo líquido equipado com um detector PDA (Thermo Finnigan SurveyorUSA) acoplado a um espectrómetro de massa (LIT-MS) (LTQ XL, Thermo Scientific, USA) com uma câmara de ionização ESI.

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Spherisorb ODS-2 (150 x 2,1 mm id; tamanho da partícula, 3 µm; Waters Corp., USA) e protegida por uma pré-coluna Spherisorb ODS-2 (10x4.6 mm id; 5 µm; Waters Corp., USA) a 25 °C, usando como fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico a 1 % (A) e acetonitrilo (B). As condições utilizadas encontram-se sumariadas na Tabela 8.

O tratamento de dados foi realizado no software XCALIBUR (Thermo Scientific, USA).

Tabela 8 - Condições utilizadas na análise por HPLC-PDA-ESI/MSⁿ.

	Tempo	A (%)	B (%)
Gradiente	0	95	5
	50	70	30
	55	0	100
Fluxo	200 µL/min		
Deteção no PDA (nm)	200-600		
Modo análise no MS	Modo ião negativo. Varrimentos: "full mass" (m/z 200-1000), MS ² do fragmento mais abundante do primeiro espetro, MS ³ do fragmento mais abundante do espetro MS ² .		
Voltagem da fonte	5.0 kV		
Voltagem do capilar	-35.0 V		
Temperatura	275°C		
Gás nebulizante (ua)*	Azoto (40)		
Gás auxiliar (ua)*	Azoto (5)		
Gás de colisão (energia de colisão)	Hélio (35 %)		

*ua – Unidades arbitrárias

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Composição do OE

O OE obtido por hidrodestilação com um rendimento de 1 % (v/m) foi caracterizado por GC-FID e GC-MS. O OE demonstrou ser rico em hidrocarbonetos monoterpênicos (81,9 %), possuindo também sesquiterpenos (10,5 %) e monoterpênicos oxigenados (2,6 %). Os compostos maioritários do OE são o β -pineno (54,5 %), cadin-4-en-7-ol (9,5 %), Z- β -ocimeno (6,0 %) e o Y-terpineno (4,6 %). Outros óleos obtidos a partir de *A. campestris* subsp. *maritima* colhida em Aveiro (Portugal), anteriormente reportados, revelaram possuir também elevadas quantidades destes compostos (Silvestre et al., 1997).

Outros perfis fitoquímicos de óleos essenciais de *A. campestris*, de outras origens e subespécies, também foram identificados. Óleos essenciais de plantas colhidas em diferentes localizações da Lituânia (subespécie não indicada) demonstraram ser ricos em óxido de cariofileno (8,5 a 38,8 %). Houicher, Hechachna & Ozogul, (2016) reportaram que os compostos maioritários no óleo essencial das partes aéreas de *A. campestris* da Argélia são o α -pineno (18,65 %), β -pineno (16,78 %), β -mirceno (17,34 %) e germacreno D (10,34 %). Abidi e colaboradores (2018) referem que os compostos maioritários do óleo essencial obtido de partes aéreas de *A. campestris* da Tunísia são o β -pineno (36,4 %), 2-undecanona (14,7 %) e limoneno (10,57 %). Óleo essencial de *A. campestris* subsp. *glutinosa* (Ten.) Briq. et Cavill de Itália contem elevadas quantidades de β -pineno (57,2 %), germacreno D (28,6 %), biciclogermacreno (14,5 %) e mirceno (11,2 %) (Bellomaria, Valentini & Biondi, 2001).

Apesar de alguns dos autores não mencionarem a subespécie, pode-se considerar que pertencem a outra subespécie sem ser *A. campestris* subsp. *maritima*. Tendo isto em conta, o sesquiterpeno cadin-4-en-7-ol, pode ser característico desta subespécie em particular, sendo que não foi encontrado noutras subespécies de *A. campestris*, tornando este composto um possível marcador de *A. campestris* subsp. *maritima*.

3.2.2. Composição da ARH

3.2.2.1. Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* foi realizada através de um ensaio colorimétrico usando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método não é específico para grupos de compostos fenólicos, mas serve para quantificar a concentração total de grupos hidroxilo fenólicos em extratos (Hagerman & Butler, 1994). Os polifenóis presentes reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu e formam um complexo azul que pode ser quantificado por espectroscopia no visível (Schofiel, 2001).

A avaliação do extrato da ARH pelo método de Folin-Ciocalteu mostrou que o extrato possui um teor de fenólicos de $191,67 \pm 3,79$ mg de EAG por g de peso seco de extrato.

Embora não exista uma classificação instituída em termos de valores altos/baixos de fenóis totais, alguns autores afirmam que os extratos naturais podem ser considerados ricos em compostos fenólicos quando seu conteúdo de fenólicos é superior a 20 mg de EAG/ g de peso seco (Rodrigues et al., 2015). Tendo isto em conta, pode-se afirmar que a ARH possui um elevado teor de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos estão de acordo com resultados previamente reportados por Pereira e colaboradores (2018), que obtiveram um teor de fenóis totais entre 114 e 134 mg GAE/g de peso seco.

Megdiche-Ksouri e colaboradores (2014), avaliaram o teor de fenóis totais de frações obtidas de *A. campestris* subsp. *maritima* da Tunísia, tendo obtido valores de 10,63 mg GAE/g resíduo seco para as frações aquosas, 158,75 mg GAE/g resíduo seco para as frações metanólicas e 94,17 mg GAE/g resíduo seco para frações de acetato de etilo.

3.2.2.2. Pesquisa de fitoconstituintes por TLC

De modo a identificar os grupos de compostos mais abundantes na ARH foram realizadas TLC usando duas fases móveis (S1 e S2) e diferentes reveladores (NP-PEG, FeCl_3 , DPPH e DMACA). Os perfis cromatográficos obtidos estão representados na Figura 4.

Os reveladores coram as manchas da TLC de diferentes cores, dependendo das características estruturais do composto. As cores exibidas à luz UV dão-nos informações estruturais, sendo que, por exemplo, os fenóis apresentam manchas azuis e os ácidos fenólicos manchas laranjas ou amarelas quando revelados com NP-PEG.

Na TLC revelada com NP-PEG (Figura 4a), por observação à luz UV (366 nm) foi possível observar manchas com cores distintas. As manchas com fluorescência laranja referem-se a flavonóides di-hidroxilados no anel B, manchas com fluorescência amarela esverdeada referem-se a flavonóides mono-hidroxilados no anel B, por fim, manchas com fluorescência azul correspondem a ácidos fenólicos.

Relativamente à TLC revelada com cloreto de ferro (Figura 4b), obtiveram-se manchas azuis características de taninos condensados. Usando o DPPH como revelador (Figura 4c), a TLC apresentou manchas amarelas, sendo possível afirmar que aqueles compostos ou grupos de compostos representados pelas manchas amarelas possuem atividade antioxidante.

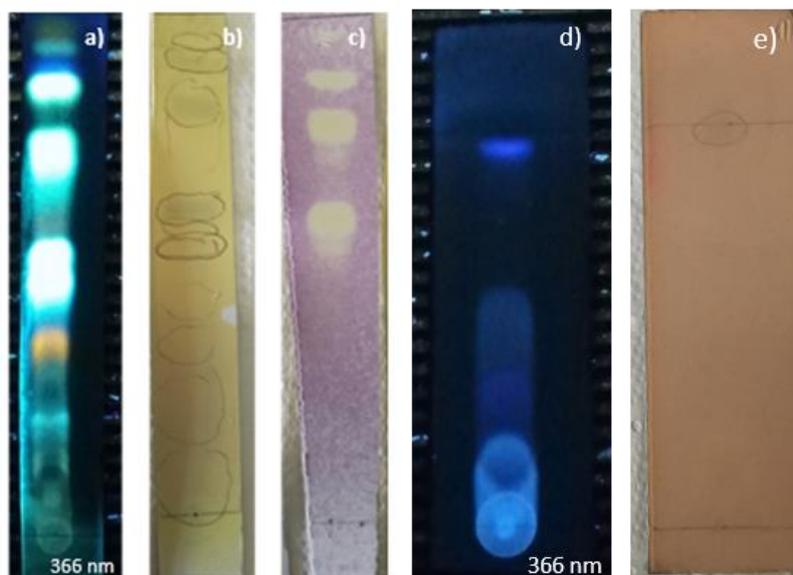


Figura 4 - Perfil da TLC da ARH, usando o sistema S1, a) revelada com NP-PEG à luz UV, b) com FeCl_3 e c) revelada com DPPH; sistema S2 d) por observação a 366 nm antes de ser revelada e e) após ser revelada com DMACA à luz visível

As manchas de TLC reveladas com NP-PEG, Figura 4a), mostraram algum arrastamento, o que poderia significar a presença de taninos, portanto utilizou-se um sistema que permitisse determinar a presença de taninos, o sistema S2 revelado com DMACA (Figura 4d e 4e). A TLC revelou manchas roxas (Figura 4e), confirmando a presença de taninos, no entanto numa concentração muito reduzida. Neste caso taninos de baixo peso molecular, correspondendo às manchas com elevados valores de R_f , e de alto peso molecular, correspondentes a manchas que permaneceram no ponto de aplicação.

3.2.2.3. HPLC-PDA e HPLC-PDA-ESI/MSⁿ

A cromatografia líquida de alta resolução com detecção de díodos, HPLC-PDA, permitiu a obtenção do cromatograma apresentado na Figura 5, assim como dos respetivos espectros apresentados na Figura 6.

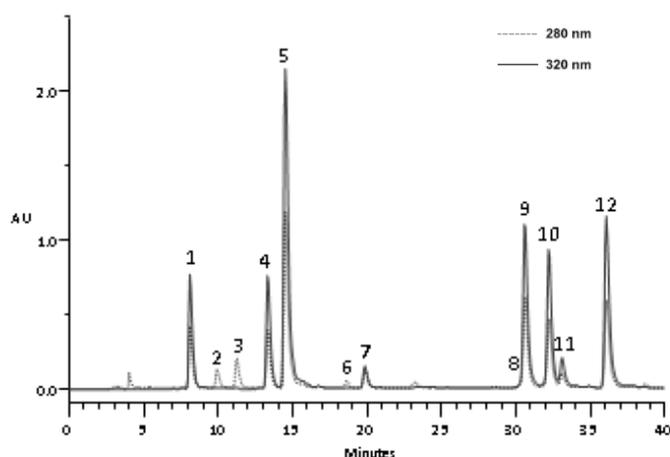


Figura 5 - Perfil cromatográfico HPLC-PDA da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima*, registado a 280 nm e a 320 nm.

A sua análise permitiu uma tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes na ARH (Tabela 9). Os compostos presentes na amostra, dependendo da sua estrutura, vão possuir tempos de retenção e espetros de UV-vis característicos para cada classe de compostos. Na análise realizada por HPLC-PDA, o extrato da ARH é maioritariamente composto por ácidos fenólicos, mais concretamente, ácidos hidroxicinâmicos. Através da análise do seu espetro, os picos 1, 4, 5, 7, 9, 10, 12 (Figura 6) correspondem a derivados do cafeico ou ferúlico, pelo formato característico que apresentam e pelos comprimentos de onda dos máximos que exibem.

A análise por espectrometria de massa permitiu verificar que a ARH é composta principalmente por ácidos hidroxicinâmicos, mais concretamente ácidos cafeoilquínicos (CQA). Foram também detetados outros compostos em menores quantidades tais como flavonóides.

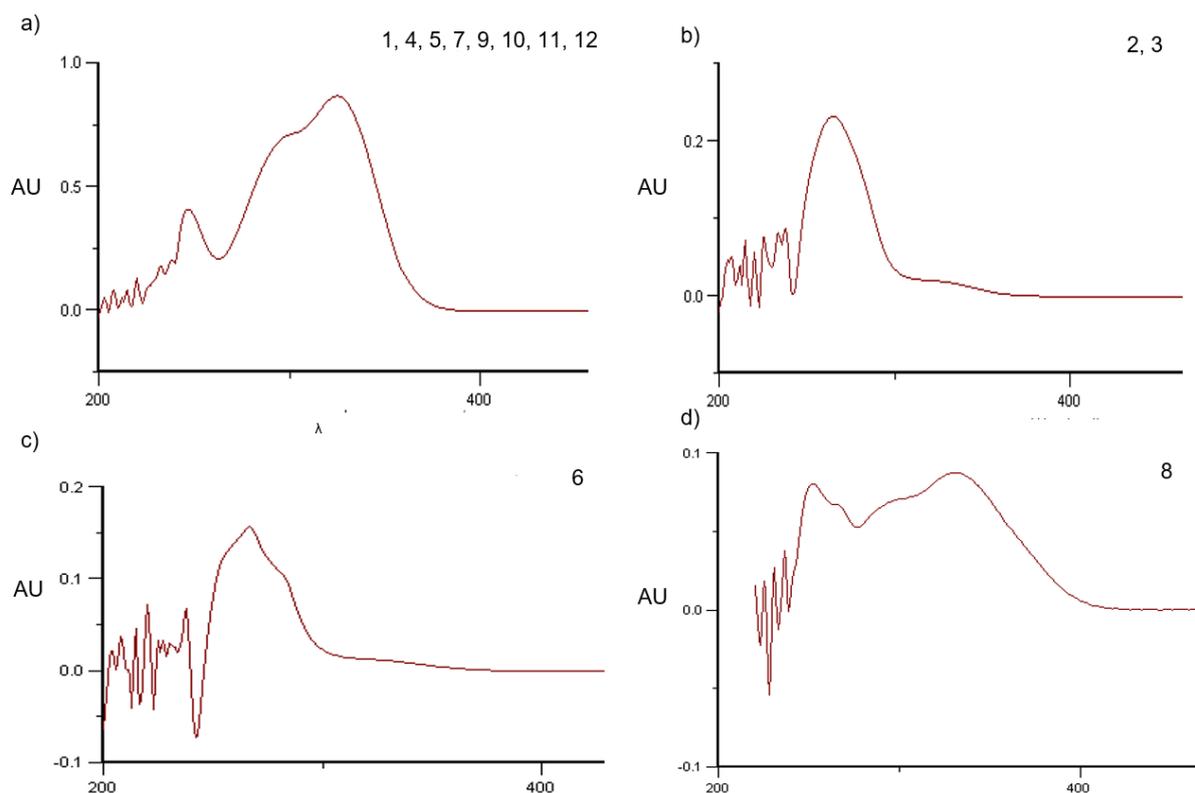


Figura 6 - Espectros UV dos compostos fenólicos presentes na ARH de *A. campestris* subsp. *maritima*, obtidos por HPLC-PDA.

O espectro de massa dos picos 1, 4 e 5 exibiu o mesmo íon pseudomolecular, característico dos isômeros do ácido cafeoilquínico (m/z a 353). Os padrões de fragmentação descritos anteriormente por Clifford, Knight & Kuhnert (2005) foram usados para identificar estes compostos,

No pico 1, a presença de um sinal em m/z 179 com metade da abundância do pico de base em m/z 191 no MS^2 sugere a presença de um isômero de ácido 3-O-cafeoilquínico (3-CQA). Outro isômero do ácido cafeoilquínico, o ácido 4-O-cafeoilquínico (4-CQA) pode ser responsável pelo pico 4, devido à presença de um pico de base característico em m/z 173 no MS^2 . O pico 5 também pode ser identificado como outro isômero, ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) uma vez que o pico de base está presente em m/z 191 e a ausência do fragmento m/z 179 no MS^2 .

O pico 6 exibiu um íon pseudomolecular a m/z 325 (cumaroilhexose) e um pico de base em m/z 163 ([ácido cumárico - H] $-$) no MS^2 devido à perda neutra de 162 (porção hexosil). Este comportamento sugere a presença de um p -cumaroilhexose (Castro-López et al., 2019).

Tabela 9 - Tentativa de identificação das classes de compostos presentes na ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* por HPLC-PDA-ESI/MSⁿ.

Pico	T _R (min)	λ _{max} (nm)	HPLC-ESI/MS ⁿ ^a			Tentativa de identificação
			[m/z (abundância relativa, %)]			
			lão	MS ²	MS ³	
			precursor [M-H] ⁻			
1	9,44	245sh, 296sh, 324	353 (100)	191 (100), 179 (47)	173 (77), 171 (28), 127 (100), 111 (29), 109 (32), 93 (23), 85 (54)	3-CQA ¹
2	11,15	264	387 (100)	341 (48), 285 (32), 197 (18), 179 (100), 161 (82), 143 (23), 119 (28)	161 (99.9), 149 (27), 143 (100), 131 (29), 123 (14), 121 (15), 119 (42), 115 (20), 107 (16), 89 (14), 71 (13)	N.I.
3	11,99	264	475 (100)	429 (100)	293 (100), 135 (67)	N.I.
4	15,23	245sh, 296sh, 325	353	191 (15), 179 (46), 173 (100)	155 (23), 137 (11), 111 (95), 93 (100), 71 (23)	4-CQA ¹
5	16,30	248sh, 296sh, 325	353	191 (100)	173 (75), 171 (24), 127 (100), 111 (27), 109 (33), 93 (48), 87 (11), 85 (70)	5-CQA ¹ (ácido clorogénico)
6	20,33	229, 277, 318sh	325	163 (100), 119 (12)	119 (100)	<i>p</i> -cumaroil hexose ²

Pico	T _R (min)	λ _{max} (nm)	HPLC-ESI/MS ⁿ [m/z (abundância relativa, %)]			Tentativa de identificação
			Ião precursor [M-H] ⁻	MS ²	MS ³	
7	21,95	241, 300sh, 321	515	354 (10), 353 (100), 335 (39), 179 (16)	191 (100), 179 (42)	1,3-diCQA ¹
8	32,56	253, 267sh, 291sh, 300sh, 331	609	302 (13), 301 (100), 300 (16)	273 (12), 179 (100), 151 (82)	Rutina ³
9	33,06	243, 296sh, 324	515	353 (100), 354(14), 335(10)	191 (38), 179 (67), 173 (100)	3,4-diCQA ¹
10	34,82	247, 297sh, 326	515	354 (12), 353 (100), 335(3)	191 (100), 179 (38), 173 (15)	3,5-diCQA ¹
11	37,52	241, 295sh, 325	623	316 (11), 315 (100), 300 (19)	301 (11), 300 (100)	Isoramnetina- 3-O-rutinósido ⁴
12	39,14	243, 297sh, 327	515	354 (14), 353 (100), 203 (11)	191 (31), 179 (55), 173 (100)	4,5-diCQA ¹

Identificação baseada nos espectros UV-Vis, peso molecular e os padrões de fragmentação, de acordo com: (1) Park, 2010; Bakchiche et al. 2019; (2) Castro-López et al., 2019; (3) Ciric et al., 2012; Bakchiche et al. 2019; (4) Chen et al., 2015.

(a) Os picos de base dos espectros MS estão a negrito.

N.I. – Não identificado.

Os picos 7, 9, 10 e 12 têm um espectro de UV semelhante ao dos picos 1, 4 e 5, mas com um íon pseudomolecular diferente (m/z 515). O pico 7 tem um íon molecular em m/z 515, pico de base MS^2 em m/z 353 e picos de base MS^3 em m/z 191, com intensidade relativa do fragmento MS^2 em m/z 335 ($\approx 35\%$), característica de ácido 1,3-dicafeoilquínico (1,3-diCQA). O pico 9 foi identificado como ácido 3,4-dicafeoilquínico devido à presença do pico em m/z 335, detetável no MS^2 , que não é visto no espectro de MS^2 do pico 12, que é característico do ácido 4,5-dicafeoilquínico. A presença do fragmento em m/z 191 em MS^3 exibida pelo pico 10 indica que este composto é um ácido 3,5-dicafeoilquínico.

O pico 8 possui um íon molecular em m/z 609 e um pico de base MS^2 em m/z 301 devido à perda da porção rutosilol (- m/z 308) e equivalente à quercetina. Este pico foi identificado como quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina). O pico 11 mostrou um íon molecular em m/z 623, um pico de base MS^2 em m/z 315 e um pico de base MS^3 em m/z 300 que é uma característica do isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo.

Apesar de ser o primeiro relato sobre a composição fitoquímica da ARH, alguns estudos já caracterizaram os constituintes não voláteis de *A. campestris*. Embora diferindo consideravelmente entre as subespécies, os perfis fenólicos de *A. campestris*, compilados na literatura, incluem compostos como ácidos fenólicos, tais como o ácido cafeico, clorogénico, isoclorogénico e dicafeoilquínico, flavonóides como apigenina, rutina, luteolina, kaempferol e quercetina, ou hidroxycumarinas como aesculetina e escopoletina (Pereira et al., 2018). Até onde sabemos, a *p*-cumaroilhexose e a isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo foram identificados pela primeira vez em *A. campestris*.

Os compostos fenólicos são associados a diversas atividades biológicas benéficas para a saúde, tais como atividades antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória, citotóxica, antiespasmódico, entre outras (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Os efeitos benéficos para a saúde associados aos ácidos fenólicos têm despertado um maior interesse neste tipo de compostos. Esses resultados mostram que a ARH pode ser utilizado como fonte de compostos bioativos, principalmente ácidos fenólicos, como derivados do ácido cafeoilquínico.

3.2.2.4. Quantificação por HPLC-PDA

A ARH é maioritariamente composta por derivados do ácido cafeoilquínico sendo conhecidos por possuir as atividades antioxidante e anti-inflamatória (Park, 2010; Zhao et al., 2006; Motaal et al., 2016). Por essa razão procedeu-se à sua quantificação na ARH no sentido de avaliar o seu potencial bioativo. A concentração dos derivados do ácido cafeico, presentes na ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* está assim apresentado na Tabela 10. O Ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) é o derivado do ácido cafeoilquínico mais abundante na ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* ($2,628 \pm 0,100$ g/ 100 g de extrato), seguido do 3,4-diCAQ ($2,557$

$\pm 0,110$ g/100g de extrato), 4,5-diCQA ($1,793 \pm 0,095$ / 100 g de extrato) e 3,5-diCQA ($1,684 \pm 0,081$ g/ 100 g de extrato).

Tabela 10 - Quantificação dos compostos fenólicos da ARH por HPLC-PDA.

Pico	Composto	g de composto / 100 g de extrato^(a)
1	3-CQA	$1,194 \pm 0,050$
4	4-CQA	$1,200 \pm 0,047$
5	5-CQA (ácido clorogénico)	$2,628 \pm 0,100$
7	1,3-diCQA	$0,232 \pm 0,009$
9	3,4-diCQA	$2,557 \pm 0,110$
10	3,5-diCQA	$1,684 \pm 0,081$
12	4,5-diCQA	$1,793 \pm 0,095$

^(a)Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, em duplicado.

4. Atividade antioxidante

4.1. Introdução

Antioxidantes são definidos como substâncias que, na presença de substratos oxidáveis, atrasam ou inibem significativamente a sua oxidação. Esta propriedade deve-se ao facto de serem substâncias que reagem em diferentes estágios da formação de radicais livres sendo capazes de reduzir sua concentração. Um desequilíbrio entre antioxidantes e radicais livres resulta em *stress* oxidativo, que pode levar a danos celulares (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

A formação de radicais livres *in vivo* podem ocorrer pela ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrões que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos como o tabaco, radiações, pesticidas entre outros. A ocorrência de *stress* oxidativo moderado, é frequentemente acompanhada pelo aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (Anderson, 1996).

O *stress* oxidativo tem sido associado à iniciação e desenvolvimento de várias condições e doenças, tais como, inflamação, doenças autoimunes, cataratas, cancro, aterosclerose, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas e ao processo de envelhecimento (Zima et al., 2001; Astley, 2003; Lukyanova, Storozheva & Proshin, 2007). Os danos no DNA, causados pelos radicais livres, também desempenham um papel importante nos processos de mutagénese e carcinogénese (Poulsen, Prieme & Loft 1998).

Com base no conhecimento de que níveis elevados de *stress* oxidativo são lesivos ao organismo e que existem, na natureza, substâncias com propriedades antioxidantes, o potencial papel de substâncias antioxidantes exógenas em reduzir a reatividade das espécies reativas de oxigénio e, conseqüentemente os danos orgânicos, tem sido alvo de investigação (Catania et al., 2009). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo.

Devido ao aumento da exposição do homem a fatores de risco para a saúde, tem havido uma maior procura de substâncias naturais benéficas, tais como antioxidantes, capazes de reduzir determinados efeitos nocivos.

Uma vez que os antioxidantes estão associados a diversas atividades benéficas e terapêuticas, são substâncias de elevado interesse comercial. Para além de serem amplamente usados no fabrico de suplementos alimentares, também possuem outras aplicações, como por exemplo, conservantes na indústria alimentar e aromatizantes na indústria farmacêutica.

Vários antioxidantes naturais já foram isolados de diferentes tipos de plantas, como é o caso dos compostos fenólicos com atividade antioxidante, uma vez que estes compostos estão vastamente distribuídos no Reino vegetal (Megdiche-Ksouri et al., 2014).

4.2. Material e métodos

A atividade antioxidante da ARH foi determinada a partir de 4 metodologias, o método do DPPH, ABTS, NO e FRAP. Previamente foi realizada uma cromatografia em camada fina (TLC) de modo a perceber se o extrato possuía compostos com poder antioxidante (ver subcapítulo 3.2.2.2.).

A atividade antioxidante do óleo essencial da *A. campestris* subsp. *maritima* também foi avaliada, pelo método do DPPH e do β -caroteno.

4.2.1. Ensaio do DPPH

O método do DPPH é o método que mais se destaca para a determinação da atividade antioxidante em extratos consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorizada pelo decréscimo da absorbância (Figura 7).

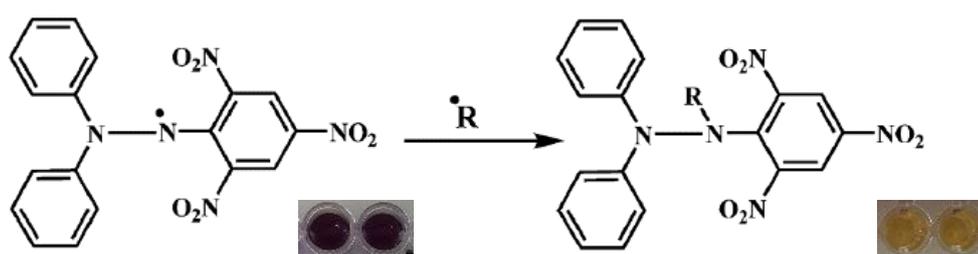


Figura 7 - Reação de neutralização do radical DPPH.

De modo a determinar o potencial antioxidante da ARH e do OE foi realizado o método do DPPH descrito por Joshi (2012), com algumas alterações. O ensaio consistiu em, numa placa 96 poços, adicionar 10 μ L de amostra a diferentes concentrações, 100 μ L de tampão acetato a pH 6.0 e 50 μ L de solução metanólica de DPPH. Por fim, foi adicionado metanol até obter um volume final de 300 μ L. A reação ocorreu ao abrigo da luz e, após 30 min, foi feita a leitura num espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific), a 517 nm contra um

branco. Os resultados foram obtidos pela diferença entre a absorvância do controle e do ensaio, num mínimo de 3 ensaios independentes, realizados em triplicado.

O mesmo processo foi repetido para o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich), para que, por extrapolação os resultados, fossem expressos em valor TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox numa solução de 1 mM).

A atividade antioxidante das amostras foi expressa em concentração da amostra que reduz a absorvância em 50 % (IC₅₀) e capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). Foram realizados pelo menos três ensaios independentes e todas as leituras foram realizadas em triplicado.

4.2.2. Ensaio do ABTS

O ensaio do ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o radical ABTS. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

A capacidade da ARH de captar o radical 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (ABTS) foi determinada pelo método descrito por Re e colaboradores (1999).

O radical ABTS foi produzido através da oxidação de ABTS a 7 Mm (Sigma-Aldrich) com persulfato de potássio (Merck) (2,45 mM, concentração final) em água, e guardado no escuro, à temperatura ambiente por 16 h. A mistura foi diluída em tampão fosfato-salino (PBS) a pH 7.4 até se obter uma absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Para o ensaio, a um volume de 50 µL de diferentes concentrações da amostra, diluída em água, adicionaram-se 2 mL de solução de ABTS, agitou-se e colocou-se ao abrigo da luz durante 4 min. Por fim, mediram-se as absorvâncias num espectrofotómetro de duplo feixe (Cintra 101, GBC, Austrália), a 734 nm.

A atividade antioxidante do extrato foi expressa em valores de IC₅₀ e TEAC. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes e todas as leituras foram realizadas em duplicado.

4.2.3. Ensaio do NO

Este método avalia a capacidade sequestradora do radical NO (óxido nítrico) com recurso ao S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP), que é usado como dador de NO (Field et al., 1987). A adição de um captador de NO à solução SNAP resulta numa diminuição da acumulação de nitritos no sobrenadante.

A capacidade da ARH em sequestrar o radical NO foi avaliada com recurso ao S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP). Neste ensaio, descrito por Matheus e colaboradores (2006), o SNAP é usado como dador de NO (Field et al., 1987). A adição de um captador de NO à solução SNAP resulta numa diminuição da acumulação de nitritos no sobrenadante.

Para este ensaio, 20 μL de diferentes concentrações e ARH (100 a 200 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a 280 μL de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) contendo 0,9 μL de solução de SNAP (Biogen) (100 mM). A solução foi incubada durante 15 h a 37 °C, ao abrigo da luz. Por fim foi realizado o teste de Griess (Green et al., 1982), descrito no sub-capítulo 6.2.2.

4.2.4. Ensaio do FRAP

Este método é baseado na transferência de electrões, utilizando o $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ como um agente oxidante. O FRAP avalia a redução do complexo Fe(III) a Fe(II) , que ocorre devido à presença de agentes redutores (antioxidantes) (Figura 8).

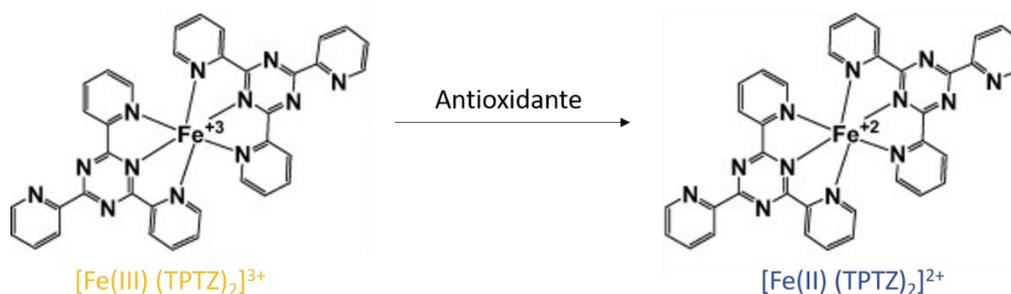


Figura 8 - Formação do complexo $(\text{Fe}^{2+} - \text{TPTZ})$ a partir do complexo $(\text{Fe}^{3+} - \text{TPTZ})$ por antioxidantes.

O poder de redução do íon ferro foi determinada através do método descrito por Benzie & Strain (1996), com algumas alterações (Costa et al., 2015).

O reagente de FRAP foi preparado usando 10 mM de solução TPTZ (Sigma-Aldrich) em 40 mM de HCl, 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) e tampão acetato (300 mM, pH=3,6) (1:1:10). Para o ensaio a 100 μL de amostra, a diferentes concentrações, adicionaram-se 3 mL de reagente FRAP, agitou-se no vortex e colocou-se ao abrigo da luz durante 6 min à temperatura ambiente. Por fim, mediou-se a absorvância a 593 nm, num espectrofotómetro de duplo feixe (Cintra 101, GBC, Austrália). Várias diluições da amostra foram testadas e os resultados foram calculados por interpolação numa curva de calibração obtida com os valores obtidos para a solução Trolox. A atividade antioxidante do extrato foi expressa em TEAC. Foram realizados três ensaios independentes em duplicado.

4.2.5. Ensaio do β -caroteno

Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (Silva, Borges & Ferreira, 1999), ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Duarte-Almeida et al., 2006).

De modo a determinar a atividade antioxidante do OE de *A. campestris* subsp. *maritima* foi realizado o ensaio do β -caroteno descrito por Wang e colaboradores (2008) com algumas modificações.

Aproximadamente 10 mg de β -caroteno (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio (Merck). 200 μ L desta solução foram pipetados para um balão de evaporação contendo 20 mg de ácido linoleico (Sigma-Aldrich) e 200 mg de *Tween* 40 (Sigma-Aldrich).

O clorofórmio foi removido usando um evaporador rotativo a 40 °C durante aproximadamente 5 min. Ao resíduo resultante adicionou-se lentamente 50 mL de água milliQ até formar uma emulsão.

O ensaio consistiu em adicionar 5 mL da emulsão a 200 μ L de amostra. A absorvância foi lida imediatamente a 470 nm, num espectrofotômetro de duplo feixe (Cintra 101, GBC, Austrália), contra um branco, composto por emulsão sem β -caroteno. Os tubos foram colocados em banho a 50 °C e após 60 min as absorvâncias foram lidas de novo. O controle consistiu em β -caroteno e etanol (Merck), uma vez que as diluições da amostra foram realizadas com etanol. O hidroxianisol butilado (BHA) (Sigma-Aldrich) foi usado como antioxidante de referência. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição em relação ao controle, após 60 min de incubação, usando a seguinte equação:

$$AA = 100 \times \frac{DR_C - DR_S}{DR_C}$$
, AA = atividade antioxidante; DR_C = Taxa de degradação do controle = $\left[\frac{\ln \frac{a}{b}}{60} \right]$; DR_S = Taxa de degradação na presença da amostra = $\left[\frac{\ln \frac{a}{b}}{60} \right]$; a = absorvância ao tempo 0; b = absorvância aos 60 min.

4.3. Resultados e discussão

O potencial antioxidante da ARH foi avaliado através de quatro métodos diferentes (DPPH, ABTS, NO e FRAP), e do OE através de dois métodos (DPPH e β -caroteno) (Tabela 11). Os resultados foram expressos em IC_{50} , em TEAC, e em percentagem de inibição.

Tabela 11 - Atividade antioxidante (IC₅₀, TEAC e %) da ARH e do OE.

Amostras	Atividade antioxidante			
	DPPH (µg/mL)	ABTS (µg/ml)	FRAP (µg/ml)	β-caroteno (%) ^(c)
OE	7,2±0,55 ^(a)	N.T.	N.T.	71,87 ± 4,65
ARH	24,6 ± 0,6 ^(a)	14,6 ± 0,8 ^(a)	N.T.	N.T.
	760 ± 10 ^(b)	1,332 ± 0,04 ^(b)	1,12 ± 0,01 × 10 ^{3(b)}	
BHA	N.T.	N.T.	N.T.	60,53 ± 1,77

(a) Valores expressos em IC₅₀ (concentração da amostra que reduz a absorvância em 50%).

(b) Valores expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

(c) % máxima de inibição obtida nas concentrações testadas de OE (0,03-0,26 mg/mL) e BHA (0,38-13,5 µg/mL).

N.T. Não foi testado.

No geral, tanto a ARH como o OE demonstraram possuir atividade antioxidante, sendo o OE demonstrou possuir um maior potencial antioxidante, através do método do DPPH (Tabela 11).

Relativamente ao ensaio do NO, a ARH não demonstrou possuir capacidade sequestradora do NO quando comparado com o controlo.

Os resultados obtidos da ARH através do método do DPPH são semelhantes aos valores obtidos por Megdiche-Ksouri e colaboradores (2014), que avaliaram a atividade antioxidante de frações aquosas de *A. campestris* subsp. *maritima* e obtiveram um IC₅₀ de 27,5 µg/mL através do método do DPPH. Por outro lado, extratos metanólicos exibiram um IC₅₀ mais baixo (IC₅₀ = 6,0 µg/mL). Os autores obtiveram um EC₅₀ de 340 µg/mL através do método de FRAP.

Pereira e colaboradores (2018), avaliaram o potencial antioxidante de infusões, decocções e tinturas de partes aéreas de *A. campestris* subsp. *maritima* colhida em Portugal. Os autores obtiveram valores de IC₅₀ de 0,24 a 0,34 mg/mL no método do DPPH e 0,40 a 0,44 mg/mL no ensaio do ABTS. A discrepância de valores pode ser devido à diferença na composição química dos extratos, os autores revelaram que os extratos eram ricos em cumarinas, ácido dicafeoilquínico e ácido clorogénico. Tendo em conta os resultados obtidos por Pereira e colaboradores (2018) é possível afirmar que este subproduto, a ARH, possui atividade superior que extratos aquosos tradicionais.

A atividade antioxidante da ARH pode ser relacionada com a presença de derivados do ácido cafeoilquínico, uma vez que são conhecidos por possuir atividade antioxidante (Park, 2010; Zhao et al., 2006). Kim & Lee (2005) avaliaram o potencial antioxidante de derivados do ácido cafeoilquínico através do ensaio do DPPH, onde obtiveram valores de IC₅₀ de 5,4 a 12,8 µg/mL.

O potencial antioxidante do OE determinado neste estudo foi superior ao obtido por Akrouf e colaboradores (2011), que obtiveram um IC₅₀ de 94,5 mg/mL no ensaio do DPPH, e 1 mg exibiu 20,9 % no ensaio do β -caroteno. Estes resultados podem ser devidos a diferenças na composição química, por exemplo, a percentagem de β -pineno, um composto conhecido por possuir atividade antioxidante (Farhoudi, 2013), está presente em maiores quantidades no OE deste estudo.

Alguns compostos presentes em óleos essenciais, tais como o β -pineno, α -pineno, α -terpineno, γ -terpineno e sabineno possuem atividade antioxidante (Farhoudi, 2013; Ruperto e Baratta, 2000). Com isto, o potencial antioxidante do OE pode ser atribuído à presença de alguns destes compostos, particularmente ao β -pineno, o composto mais abundante no OE.

Estudos já publicados demonstraram que o óleo essencial de *A. campestris*, tanto da parte aérea como apenas das folhas, apresentam uma baixa atividade na neutralização do radical DPPH (Akrouf et al., 2010; Akrouf et al., 2011), no entanto, extratos aquosos das folhas de *A. campestris* apresentam uma maior atividade na neutralização do radical DPPH (Sebai et al., 2014).

Pode-se dizer que possivelmente são compostos solúveis que fornecem a capacidade antioxidante, por esta razão, há o interesse em avaliar a ARH quanto à presença de substâncias antioxidantes, uma vez que este extrato é rico em compostos solúveis.

5. Atividade antifúngica

5.1. Introdução

Os fungos representam um dos maiores grupos de oportunistas patogénicos que apresentam risco para a saúde. Existem cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas, no entanto apenas 300 são reconhecidas como agentes de doença (Veríssimo et al., 2016). As infeções fúngicas têm-se intensificado, principalmente devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, população de risco (Veríssimo et al., 2016).

As infeções fúngicas podem ser divididas em dois grandes grupos, infeções fúngicas superficiais e infeções fúngicas invasivas.

As infeções fúngicas superficiais são as mais comuns e afetam principalmente a pele e unhas. Cerca de 20 a 25 % da população mundial relata a ocorrência de micoses na pele, fazendo com que esta seja uma das formas mais frequentes de infeção (Havlickova, Czaika & Friedrich, 2008). Os principais agentes etiológicos responsáveis por estas infeções fúngicas superficiais são distribuídos pelos géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Havlickova, Czaika & Friedrich, 2008).

Infeções fúngicas invasivas envolvem a corrente sanguínea, sistema nervoso central e órgãos (pulmão, fígado e rins) (Roemer & Krysan, 2014). Doentes com o sistema imunitário debilitado constituem o grupo de risco mais elevado para desenvolverem infeções fúngicas invasivas. Esta complicação é uma das causas mais frequentes de mortalidade e morbilidade nos doentes imunocomprometidos (Pfaller & Diekema, 2010; Horn et al., 2009).

As infeções mais frequentemente encontradas são causadas por *Candida albicans* e por espécies do fungo filamentoso *Aspergillus* (Richardson & Warnock, 2003). Outros fungos patogénicos que emergiram nos últimos anos são as leveduras *Candida glabrata*, *Candida Krusei* e *Candida tropicalis*, *Cryptococcus spp* e *Trichosporon spp*, e fungos filamentosos como o *Fusarium*, *Rhizopus* e *Rhizomucor* (Richardson & Warnock, 2003).

A candidíase e a aspergilose são as infeções fúngicas invasivas mais frequentes (Sipsas et al., 2009). Em Portugal não existem dados que permitam avaliar a epidemiologia das infeções fúngicas invasivas. Os dados existentes são observados localmente nas várias unidades hospitalares. Estima-se que a incidência de infeção fúngica por *Candida spp* seja de 856 novos casos/ano e de *Aspergillus spp* represente 180 novos casos/ano (Sabino et al., 2015).

As infeções fúngicas mais comuns e severas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, são as aspergiloses, candidíases, criptococoses e dermatofitoses, que serão referidas de seguida.

5.1.1. Candidíase

Os fungos oportunistas estão vastamente presentes, sendo que, muitos deles com resistência a antifúngicos, como é o caso de *Candida krusei*, que é intrinsecamente resistente aos azóis (Veríssimo et al., 2016).

As infecções invasivas por *Candida spp* são a quarta causa principal de infecções nosocomiais da corrente sanguínea, estando associadas a uma mortalidade elevada (> 40 %) (Pfaller et al., 2002). *Candida albicans* é ainda a causa mais frequente de candidíase a nível global, mas a sua frequência relativa tem vindo a diminuir enquanto a frequência das outras espécies “não-albicans” tem aumentado progressivamente (Tortorano et al., 2004; Eggimann, Garbino & Pittet, 2003; Arendrup et al., 2010).

As características dos doentes influenciam diretamente a distribuição das espécies de *Candida*, a infeção por *C. glabrata* é mais comum nos idosos, *C. krusei* nos doentes imunocomprometidos enquanto *C. parapsilosis* é mais frequente nas crianças e recém-nascidos (Oren & Paul, 2014).

Na Europa, até à década de 90, a candidíase era a forma mais frequente de infeções fúngicas invasivas nos doentes imunocomprometidos. Contudo, nas últimas décadas, tem-se observado uma modificação na epidemiologia, evidenciada pelo aumento na incidência da aspergilose invasiva (Pagano et al., 2006).

5.1.2. Criptococose

A criptococose é uma doença infecciosa fúngica, que ataca o sistema respiratório, podendo disseminar-se para o sistema nervoso central, olhos pele e outros órgãos. O estabelecimento e a disseminação desta infeção são altamente dependentes da imunidade do hospedeiro. Doentes imunocomprometidos são mais afetados, embora a doença também ocorra em pacientes saudáveis (Negroni, 2012).

Cryptococcus spp são leveduras de origem ambiental, tipicamente associados a aves, como é o caso de *Cryptococcus neoformans*. *C. neoformans* tem distribuição cosmopolita e está relacionada a fontes ambientais como solos contaminados naturalmente com excreções de aves, principalmente de pombos (Reolon, Perez & Mezzari, 2004).

5.1.3. Aspergilose

A aspergilose é uma doença causada por *Aspergillus spp* que normalmente afeta os pulmões. *Aspergillus spp* são fungos oportunistas ou patógenos com resistência a

antifúngicos por meio de mutações (Veríssimo et al., 2016). O aumento da incidência da aspergilose invasiva coincide com a introdução generalizada da profilaxia com fluconazol para reduzir a morbidade e mortalidade associada com a candidíase invasiva nos doentes com neoplasias hematológicas tratados com quimioterapia e nos recetores de transplante de medula óssea (Perfect, Hachem & Wingard, 2014).

As espécies *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* são as mais frequentemente associadas a infeções. Os conídios de *Aspergillus* são pequenos e facilmente inalados, podendo colonizar as vias aéreas superiores e inferiores (Bem-Ami et al., 2009).

Aspergillus fumigatus é a espécie mais comumente envolvida nos casos de aspergilose, mas há outros representantes que também podem ser responsáveis pelo desenvolvimento das infeções, embora numa frequência menor, tais como o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e o *Aspergillus terreus* (Gavronski, Botelho & Cordova 2016).

A taxa de mortalidade associada à aspergilose invasiva é bastante elevada e pode variar entre 38 % e 94 %, dependendo da patologia associada (Pagano et al., 2006; Pagano et al., 2007; Lass-Flörl et al., 2005; Cornillet et al., 2006).

5.1.4. Dermatofitoses

As dermatofitoses são infeções fúngicas superficiais causadas por dermatófitos, tais como *Microsporum spp*, *Trichophyton spp* e *Epidermophyton spp*.

O dermatófito isolado com maior frequência em cães e gatos é o *Microsporum canis*, seguido pelo *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, embora ocorra variação de espécies em diferentes regiões do mundo (Balda et al., 2004). Os géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* têm grande afinidade por tecido queratinoso (pele, cabelo e unhas), causando as dermatofitoses (Lima et al., 1999).

Devido ao aumento de microrganismos patogénicos e resistentes a antifúngicos sintéticos, a procura de novos agentes naturais capazes de matar ou inibir o desenvolvimento destes agentes patogénicos, tem aumentado. Assim sendo, a pesquisa de plantas usadas na medicina tradicional como possíveis fontes de novos antifúngicos é cada vez mais frequente.

5.2. Material e métodos

De modo a determinar a atividade antifúngica do OE e da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima*, foi determinado a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC) pelo método de macro diluição descrito em protocolos do Instituto de Padrões

Clínicos e Laboratoriais (CLSI), referência M27-A3 para leveduras e M38-A2 para fungos filamentosos (CLSI, 2008).

A atividade antifúngica foi avaliada contra diferentes estirpes de leveduras (*Candida spp* e *Cryptococcus spp*) e fungos filamentosos (Dermatófitos e *Aspergillus spp*) representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Estirpes de leveduras e fungos filamentosos e respectivas referências utilizadas nos ensaios.

Estirpes	Referência
Leveduras	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Candida guilliermondii</i>	MAT23
<i>Candida krusei</i>	LF33
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 90018
<i>Candida tropicalis</i>	LF34
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CECT 1078
Fungos filamentosos: <i>Aspergillus spp</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>	F44
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 46645
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
Fungos filamentosos: Dermatófitos	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	FF9
<i>Microsporum canis</i>	FF1
<i>Microsporum gypseum</i>	CECT 2908
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	FF7
<i>Trichophyton mentagrophytes var interdigitale</i>	CECT 2958
<i>Trichophyton rubrum</i>	CECT 2794
<i>Trichophyton verrucosum</i>	CECT 2992

Para o ensaio foi utilizado meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), sem bicarbonato, com L-glutamina, tamponado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanossufónico)(Sigma-Aldrich), ajustado a pH 7.0. A subcultura das estirpes foi feita em SDA (Sabouraud Dextrose Agar) (Oxoid) ou PDA (Potato Dextrose Agar) (Oxoid), de modo a assegurar a sua pureza e viabilidade.

O desenho experimental consistiu numa serie de tubos de vidro estéreis em duplicado para cada condição a testar. Para cada estirpe foi considerado um controlo negativo com

apenas meio RPMI, funcionando como controlo de esterilidade, um controlo positivo composto por meio inoculado, funcionando como controlo de crescimento e viabilidade, e por fim as respetivas diluições a testar, num intervalo de concentrações previamente definido.

O extrato da ARH foi diluído em meio RPMI (12,5 a 800 µg/mL), e o OE foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) (0,08 a 10 µL/mL). Estas concentrações foram dispensadas em vários tubos de vidro estéreis, e de seguida foi adicionado 990 µL do respetivo inoculo em meio RPMI.

Após a inoculação, os tubos foram incubados aerobicamente, a 35 °C por um período de 48 horas para as estirpes de *Candida spp* e *Aspergillus spp*. e por 72 horas para o *Cryptococcus neoformans*. Relativamente às estirpes de dermatófitos, foram incubadas aerobiamente durante 7 dias, a 30 °C. Após os tempos de incubação, os valores de MIC foram registados, através da verificação visual de crescimento ou não crescimento em comparação com os controlos negativo e positivo.

Para preparação dos inóculos dos fungos filamentosos, procedeu-se a agitação em vórtex com pérolas de vidro estéreis e soro fisiológico para a recolha dos esporos e a densidade da suspensão foi ajustada visualmente de acordo com o tubo 1 da escala de McFarland, de modo a obter uma concentração final no tubo de ensaio de $(1-2) \times 10^4$ células/mL. No caso dos esporos de *Aspergillus spp*, devido à sua hidrofobicidade, foi adicionada uma gota de *Tween 20* estéril, permitindo assim a suspensão e as absorvâncias foram ajustadas espectrofotometricamente: *A. niger* (0,5); *A. fumigatus* (0,18); *A. flavus* (0,43).

A preparação dos inóculos de leveduras envolveu a seleção das colónias mais recentes e o ajuste da densidade das suspensões celulares foi realizado visualmente, de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Foi ainda confirmada espectrofotometricamente, por um valor de absorvância de 0,18, de modo a obter uma concentração final no tubo de ensaio de $(1-2) \times 10^3$ células/mL.

O MIC foi definido pela menor concentração que inibiu o crescimento, detetado visualmente. Para determinar o MLC, foram retirados 20 µL de cada tubo negativo e inoculados em caixas de petri com meio SDA, nas mesmas condições anteriormente descritas. Os resultados foram lidos de modo a verificar se houve crescimento ou não, de modo a determinar a concentração mínima de amostra que é letal para a estirpe.

Os valores de MIC e MLC obtidos foram expressos em µL/mL, correspondendo a três ensaios independentes em duplicado. A concentração de DMSO não excedeu 1 %.

5.3. Resultados e discussão

Extratos e óleos essenciais de várias espécies do género *Artemisia*, como a *A. campestris* têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana (Ghora et al., 2013), contudo, é

pressuposto que fatores climáticos específicos dos locais de onde as plantas vegetam, influenciam a composição dos óleos essenciais (Neffati et al., 2008).

A ARH e o OE de *A. campestris* subsp. *maritima* foram testados, sendo que apenas o OE demonstrou possuir atividade antifúngica. Os resultados da atividade antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos do OE estão apresentados na Tabela 13. A ARH não demonstrou possuir efeito inibitório do crescimento para as estirpes testadas, mesmo a concentrações máximas (800 µg/mL).

Tabela 13 - Atividade antifúngica (MIC e MLC) do óleo essencial de *Artemisia campestris* subsp. *maritima*.

Estirpes	OE	
	MIC ^a	MLC ^a
<u>Fungos filamentosos: Dermatófitos</u>		
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0,16	0,16
<i>Microsporium canis</i> FF1	0,31	0,31
<i>Microsporium gypseum</i> CECT 2908	0,31	0,31
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0,31	0,31
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var <i>interdigitale</i> CECT 2958	0,63	0,63
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0,31	0,63
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	0,63	0,63
<u>Fungos filamentosos: <i>Aspergillus</i> spp</u>		
<i>Aspergillus flavus</i> F44	>10	>10
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	>10	>10
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2,5	>10
<u>Leveduras</u>		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>10	>10
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1,25	1,25
<i>Candida krusei</i> LF33	2,5	5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	>10	>10
<i>Candida tropicalis</i> LF34	>10	>10
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	>10	>10

^aMIC e MLC foram determinados pelo método de macro diluição expresso em µL/mL (v/v).

Epidermophyton floccosum foi a estirpe mais suscetível ao OE com valores de MIC e MLC de 0,16 µL/mL. Relativamente a fungos filamentosos, o OE demonstrou ter uma maior

atividade antifúngica contra dermatófitos, sendo fungicida para quase todas as estirpes de dermatófitos testadas, e ser menos eficiente contra *Aspergillus spp*. O OE demonstrou ser capaz de inibir todas as estirpes de dermatófitos testadas, onde os valores de MIC e MLC variaram entre 0,16 e 0,63 µL/mL.

O OE demonstrou ser menos eficiente contra *Candidas spp* e *Aspergillus spp*, sendo que apenas duas estirpes de *Candidas*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, são suscetíveis ao OE com valores de MIC de 2,5 e 1,25 µL/mL, respectivamente e valores de MLC de 5 e 1,25 µL/mL, respectivamente. Relativamente às estirpes de *Aspergillus*, o OE demonstrou ser ativo contra *A. niger*, com valores de MIC de 2,5 µL/mL.

Houicher, Hechachna & Ozogul (2016), avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *A. campestris* da Argélia contra 10 fungos filamentosos (*Fusarium graminearum*; *Fusarium moniliforme* *Aspergillus parasiticus*; *Aspergillus ochraceus*; *Aspergillus flavus*; *Penicillium expansum*; *Penicillium citrinum*; *Aspergillus niger*; *Fusarium culmorum*; *Penicillium viridicatum*). Os autores referiram que o óleo essencial demonstrou ser ativo contra as estirpes testadas com valores de MIC que variam entre 1,25 e 10 µL/mL.

Extratos metabólicos de *A. campestris* também foram testados relativos à sua atividade antimicrobiana, sendo que demonstraram possuir atividade contra bactérias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com valores de MIC de 12,5 µg/mL (Naili et al., 2010).

A atividade antibacteriana e antifúngica de frações aquosas de *A. campestris* subsp. *maritima* da Tunísia foi avaliada contra bactérias e *Candida spp* (Megdiche-Ksouri et al., 2014). Os autores reportaram que as frações possuíam atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e *Candidas spp*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

6. Atividade anti-inflamatória

6.1. Introdução

A inflamação é uma resposta adaptativa do sistema imunitário após um determinado estímulo, como uma infecção ou lesão de tecidos. Durante o processo ocorre a libertação de compostos inflamatórios que podem ser inibidos por substâncias com propriedades anti-inflamatórias.

As sinalizações que acompanham o processo inflamatório são fundamentais para a sobrevivência das espécies, pois permitem detetar infeções, além de promoverem o processo de reparação tecidual (Abbas et al., 2008). A inflamação envolve igualmente o recrutamento e ativação de determinadas células do sistema imunitário, onde se destacam os macrófagos.

Macrófagos e outras células imunes, ativadas por citocinas, produtos microbianos ou ambos, induzem a transcrição da isoforma indutível da enzima sintase do óxido nítrico (iNOS) e conseqüentemente a produção do mediador pró-inflamatório óxido nítrico (NO) (Bogdan, 2001), que é um importante sinalizador, produzido em grandes quantidades durante um processo inflamatório.

O NO é uma molécula sinalizadora, mas também um neuromodulador e um regulador vasoativo. Durante a inflamação, age mediando mecanismos de citotoxicidade e defesa não específica do hospedeiro. É o principal fator de relaxamento derivado do endotélio, melhorando a vasoconstrição e aumentando o fluxo sanguíneo em tecidos danificados (Samel et al., 2003).

Uma vez que o NO é uma molécula sinalizadora da inflamação, a inibição da sua produção após a ativação com estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeo (LPS), pode ser uma estratégia útil para descobrir novos fármacos anti-inflamatórios (Weinberg, Fermor & Guilak 2007).

6.2. Material e métodos

A atividade anti-inflamatória do OE e da ARH foi analisada experimentalmente num modelo celular, avaliando parâmetros como a produção de nitritos e a determinação da viabilidade celular. Foram usados macrófagos Raw 264.7 (American Type Culture Collection - TIB-71), estimulados com LPS de modo a simular uma condição inflamatória, indutora da formação de NO.

A produção de NO foi determinada com recurso ao método indireto de deteção do NO, que se baseia na quantificação de nitritos que se acumulam no sobrenadante das culturas celulares, através de uma reação colorimétrica utilizando o reagente de Griess (Cruz et al., 2001; Green et al., 1982).

Neste ensaio foi utilizado meio DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Sigma-Aldrich) para as células e para as diluições do extrato.

6.2.1. Cultura celular

Para este estudo, foi utilizada uma linha celular de macrófagos, Raw 264.7 (American Type Culture Collection - TIB-71). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10 % soro fetal bovino não-inativado (FBS) (Gibco) e 1 % de solução antibiótica (Sigma-Aldrich) (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37 °C numa atmosfera humidificada, com 95 % de ar e 5 % de CO₂.

A viabilidade celular foi confirmada por contagem em câmara de Neubauer, com recurso ao corante azul de *Trypan*. Durante os ensaios, as células foram monitorizadas por microscópio ótico, para detetar quaisquer alterações morfológicas.

Para os ensaios as células foram plaqueadas em microplacas de cultura de 96 poços, numa concentração de 6×10^4 células/poço, para um volume final de 200 µL e deixadas a estabilizar *overnight*. Após este período de estabilização, as células foram mantidas em meio de cultura (controlo) ou foi-lhes adicionado diferentes concentrações de ARH (100 a 600 µg/mL) e do OE (0,04 a 0,3 µL/mL). As células foram ainda estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano de *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich) a 1 µg/mL, sendo novamente incubadas por um período de 24 horas.

6.2.2. Ensaio de Griess

De modo a determinar a concentração de nitritos, presente no sobrenadante, utilizou-se o ensaio de Griess. Transferiram-se 100 µL de sobrenadante de cada poço para uma placa de cultura nova. Posteriormente adicionou-se igual volume (100 µL) de solução de Griess (preparada numa proporção 1:1 de 0,1 % (m/v) dicloridrato de N-(1 naftil)-etilenodiamina (Merck) e 1 % (m/v) sulfanilamida (Merck) contendo 5 % (m/v) de H₃PO₄) (Green et al., 1982). Posteriormente, a placa foi mantida ao abrigo da luz durante 30 min à temperatura ambiente. No final efetuou-se a leitura da absorvância a 550 nm, num leitor de placas (SLT, Áustria), usando o meio de cultura como branco.

Realizaram-se três ensaios independentes em duplicado e os resultados foram expressos em percentagem de produção de NO pelas células estimuladas com LPS.

6.2.3. Determinação da viabilidade celular

A toxicidade de novos produtos à base de plantas para consumo/uso humano, como extratos de plantas, deve ser determinada de modo a verificar se o produto é seguro para o consumidor. Nesse sentido, podem ser feitos estudos preliminares de modo a determinar a toxicidade por ensaios *in vitro* com células de mamíferos.

Neste trabalho avaliou-se a influência do óleo essencial e ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* na viabilidade celular de macrófagos (linha celular RAW 246.7), cuja metodologia de cultura foi descrita anteriormente. Utilizou-se para o efeito o ensaio da resazurina, baseado na capacidade de células metabolicamente ativas converterem a resazurina (azul não fluorescente) em resorufina (rosa fluorescente) (Rampersad, 2012). Sendo a quantidade de resorufina produzida diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As células foram plaqueadas conforme o procedimento descrito no sub-capítulo 6.2.1 e, após ter sido retirado o sobrenadante, foram adicionados 150 µL de resazurina (Sigma-Aldrich) (50 µM em DMEM) às células. Posteriormente foram incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada, com 95 % de ar e 5 % de CO₂ durante 2 h. Por fim, mediu-se a absorvância a 570 nm num leitor de placas (SLT, Áustria), usando um filtro de referência a 620 nm (Riss et al., 2004).

Foram realizados pelos menos três ensaios independentes em duplicado, e os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade celular, em relação ao controlo.

6.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo à versão 8.0.2 do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). Os resultados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão da média do número de ensaios independentes realizado (N=3).

Para proceder à comparação entre grupos controlo e os diferentes grupos tratados com ARH, procedeu-se à realização do teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

6.3. Resultados e discussão

A atividade anti-inflamatória da ARH e do OE de *A. campestris* subsp. *maritima* foi avaliada, *in vitro*, tendo em conta a sua capacidade de inibir a produção de NO, sem comprometer a viabilidade celular. A ARH mostrou possuir capacidade de inibir a produção do NO (Figura 9), ao contrário do OE que não exibiu qualquer atividade.

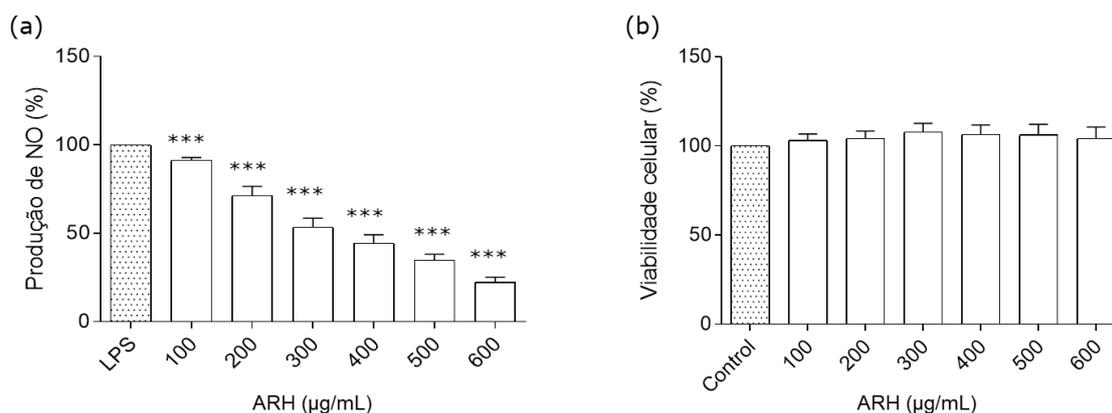


Figura 9 - Gráficos representativos do efeito da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* na produção de nitritos por macrófagos estimulados com LPS (a) e viabilidade celular (b). As células foram mantidas em meio de cultura (controle), incubadas com 1 µg/mL de LPS na presença de diferentes concentrações de ARH (100-600 µg/mL), por 24 horas. Os resultados são expressos como percentagem de produção de nitritos pelas células na presença de LPS (a) e como percentagem de viabilidade celular (ensaio da resazurina) (b). Cada valor corresponde à média ± desvio padrão da média (SEM) de três ensaios independentes, realizados em duplicado (***) $p < 0.001$, comparando com o LPS).

Como é possível observar na Figura 9a) os macrófagos estimulados com LPS produziram quantidades significativas de nitritos. Por outro lado, a produção de nitritos diminuiu na presença de todas as concentrações testadas da ARH de *Artemisia campestris* subsp. *maritima*: 91,27 ± 3,34 % (100 µg/mL), 71,27 ± 11,76 % (200 µg/mL), 53,58 ± 11,02 % (300 µg/mL), 44,26 ± 9,80 % (400 µg/mL), 34,84 ± 7,35 % (500 µg/mL), 22,30 ± 5,67 % (600 µg/mL).

De modo a tentar perceber o mecanismo responsável pelo efeito anti-inflamatório da ARH, realizou-se um ensaio, com diferentes concentrações de ARH, na presença de um dador de NO (sub-capítulo 4.2.3.). Os ensaios realizados revelaram que a ARH não possui capacidade sequestradora do NO (ver sub-capítulo 4.3.). Verifica-se que a ARH inibe a produção de NO, no entanto, esta inibição não está relacionada com o sequestro do radical, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios da atividade antioxidante. Estes resultados indicam que podem estar envolvidas outras vias de sinalização da atividade anti-inflamatória relacionadas com a produção do NO, por exemplo, através da inibição da iNOS ou inibição da síntese da iNOS.

Relativamente aos resultados obtidos na viabilidade celular, é possível afirmar que a inibição da produção do NO foi avaliada em concentrações de ARH que não apresentaram toxicidade nos macrófagos (Figura 9b).

Estes resultados podem ser atribuídos à presença de compostos fenólicos na ARH, particularmente, derivados do ácido cafeoilquínico, uma vez que vários estudos demonstraram o potencial anti-inflamatório destes compostos (Motaal et al., 2016; Zhao et al., 2006). Estudos relatam que derivados de ácidos hidroxicinâmicos possuem atividade anti-

inflamatória através da inibição da produção de NO, da expressão da iNOS e NF-kB (Kim et al., 2012).

Alguns estudos revelam que derivados do ácido cafeoilquínico, tais como o ácido 3,5-O-dicafeoilquínico, 3,4-O-dicafeoilquínico e o 4,5-O-dicafeoilquínico inibem os mediadores TNF- α e IL-1 β (Motaal et al., 2016).

Como referido anteriormente, o OE não demonstrou capacidade inibitória da produção de NO para as concentrações testadas (0,04 a 0,3 μ L/mL) nem comprometeu a viabilidade da linha celular estudada (Figura 10).

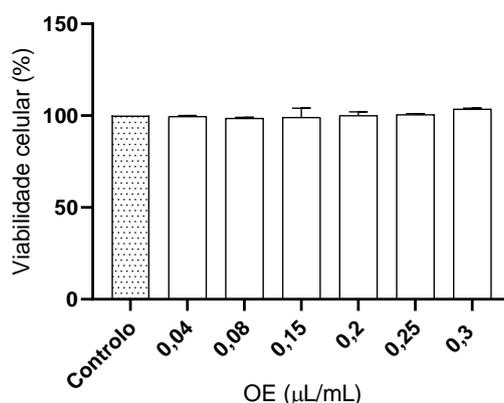


Figura 10 - Gráfico da viabilidade celular para as diferentes concentrações de óleo essencial de *A. campestris* subsp. *maritima*. Os resultados foram expressos como percentagem de viabilidade celular (ensaio da resazurina). Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão da média (SEM) de três ensaios independentes, realizados em duplicado.

A atividade anti-inflamatória do OE, extratos aquosos e etanólicos de *A. campestris* já foi descrita na literatura (Dib & Alaoui-Farisb, 2019). No entanto, os resultados obtidos, demonstraram pela primeira vez que, a ARH, possui atividade anti-inflamatória. Estes resultados são promissores e sugerem uma potencial aplicação deste resíduo da produção de óleo essencial ao permitir o seu reaproveitamento.

7. Atividade cicatrizante

7.1. Introdução

A cicatrização é um processo dinâmico que envolve fenómenos químicos e fisiológicos de modo a garantir a restauração de tecidos danificados (Mandelbaum, Di Santis & Mandelbaum, 2003). Este processo consiste num conjunto de eventos ordenados, composto por várias etapas.

Alguns autores consideram que o processo de cicatrização possui cinco fases principais: coagulação; inflamação; proliferação; contração da ferida e remodelação (Mandelbaum, Santis & Mandelbaum, 2003).

Na fase da **coagulação** ocorre uma complexa liberação de produtos, tais como substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases (Clark, 1985). A formação do coágulo serve não apenas para coaptar as extremidades das feridas, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (Clark et al., 1985).

A **inflamação** depende, além de inúmeros mediadores químicos, de células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. Os leucócitos polimorfonucleares são responsáveis pela fagocitose das bactérias, os macrófagos fagocitam bactérias e corpos estranhos e direcionam o desenvolvimento de tecido de granulação. O papel dos linfócitos não é bem definido, porém sabe-se que, tem importante influência sobre os macrófagos.

A fase da **proliferação** é dividida em três subfases e é responsável pelo fecho da lesão. A primeira das fases é a reepitelização, os queratinócitos não danificados migram das extremidades da ferida. A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação de tecido de granulação (Van Winkle, 1967). A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigénio e nutrientes para a cicatrização.

A **contração** da ferida é o movimento centrípeto das extremidades da ferida.

A **remodelação** é a última das fases, dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema (Doillon et al., 1985).

Uma vez que a cicatrização é um processo biológico complexo é possível realizar testes *in vivo* e *in vitro* de modo a verificar se um determinado composto/extrato possui atividade cicatrizante. O “scratch assay”, um método *in vitro* pouco dispendioso e eficaz, e pode fornecer as primeiras ideias de como compostos ou extratos conseguem influenciar positivamente a formação de tecido novo (Horssen et al., 2006). Este ensaio baseia-se em criar uma rutura artificial na monocamada de fibroblastos e monitorizar o fecho da “ferida”. Para este ensaio é necessário realizar um risco na monocamada de células de modo a haver uma rutura e capturar imagens no início e ao fim de um determinado tempo, durante a

migração das células. Posteriormente comparam-se as imagens de modo a determinar a taxa de migração celular.

7.2. Material e métodos

Para testar o potencial cicatrizante do OE e da ARH foi determinado os efeitos destas amostras na migração celular de fibroblastos através do *Scratch assay*.

7.2.1. Cultura celular

Para este estudo foi utilizado a linha celular de fibroblastos NIH/3T3 (ATCC CRL-1658). As células foram mantidas em DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % FBS, 1 % de solução contendo penicilina e streptomina, e mantidas a 37 °C em atmosfera húmida com 5 % CO₂.

7.2.2. Scratch assay

Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (1,25 x 10⁵ células/mL em meio contendo 10 % de FBS), e deixadas estabilizar durante 24 h a 37 °C, até formar uma monocamada de células. De seguida foi feito um risco, com uma ponta de pipeta de 100 µL, de modo a simular uma ferida na monocamada. As células em suspensão foram removidas lavando os poços com PBS. Por fim, foi adicionado apenas meio DMEM, que será o controlo, alantoína, o controlo positivo e as respetivas concentrações de ARH (100 µg/mL) e do OE (0,04 µL/mL) de *A. campestris* subsp. *maritima*. Imediatamente foram tiradas 4 fotografias de cada risco de cada poço ao microscópio (T = 0 h) e posteriormente, colocados na estufa a 37 °C a uma atmosfera de 5 % CO₂. Após 12 h foram tiradas fotografias novamente para posterior comparação e determinação das áreas das feridas.

7.2.3. Determinação da viabilidade celular

A citotoxicidade do OE e da ARH em fibroblastos (NIH/3T3) foi avaliada através do ensaio do MTT, reportado por Mosmann (1983).

O ensaio do MTT é um ensaio *in vitro* colorimétrico usado para determinar a viabilidade celular, uma vez que avalia a atividade metabólica celular (Chacon, Acosta & Lemasters, 1997). Este ensaio baseia-se na redução do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT), um corante solúvel em água amarelo, em cristais de formazan de cor roxa. O formazan é analisado por espectrometria após ser dissolvido em DMSO (Sigma-Aldrich) (Patravale; Dandekar & Jain, 2012). Uma vez que a transformação é apenas visível em células viáveis, a quantidade de azul formazan é proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983).

Para a realização deste ensaio, fibroblastos foram incubados a uma densidade de 1×10^4 células/poço, em placas de 96 poços com um volume final de 200 μL . Após 24 h na estufa a 37 °C, foram adicionadas diferentes concentrações de OE (0,04 a 1,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e da ARH (3,2 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Passado 24 h foi adicionado 100 μL de MTT (Sigma-Aldrich), e de seguida as células foram colocadas a 37 °C numa atmosfera a 5 % de CO_2 durante 4 horas. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 100 μL de DMSO (Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço e a absorvância lida a 570 nm num espectrofotómetro (SLT spectra II).

Foram realizados três ensaios independentes em triplicado. Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade, em relação ao controlo.

7.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo à versão 8.0.2 do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão da média do número de ensaios independentes realizado (N=3). A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo D'Agostino & Pearson e Testes de normalidade Shapiro-Wilk. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas de forma unilateral análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. Significância era aceite em valores de $p < 0,05$.

7.3. Resultados e discussão

Os efeitos do OE e da ARH na migração celular foram determinados em fibroblastos através do *Scratch assay*. Na figura 11 estão representadas imagens da migração celular relativas ao controlo.

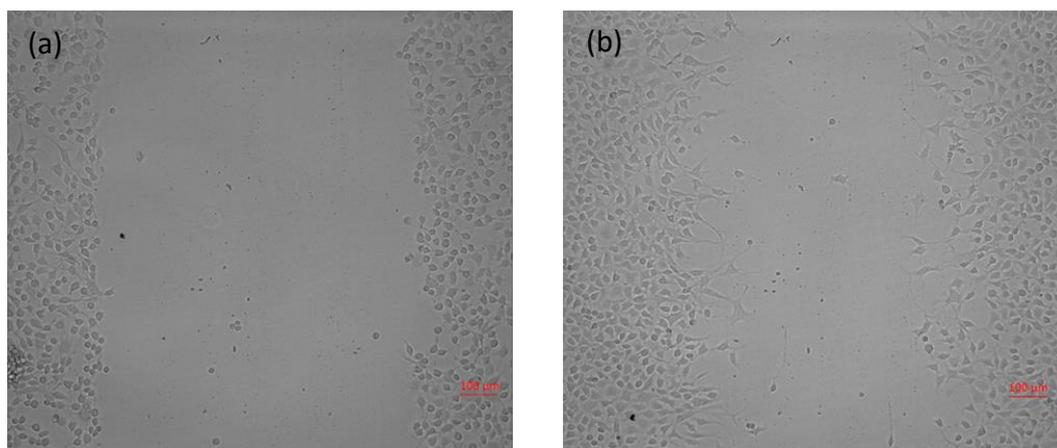


Figura 11 – Imagens representativas da migração celular de um controlo, às 0 horas (a), e ao fim de 12 horas (b).

Na Figura 11 estão representados os resultados, sendo realizados quatro ensaios independente, em duplicado.

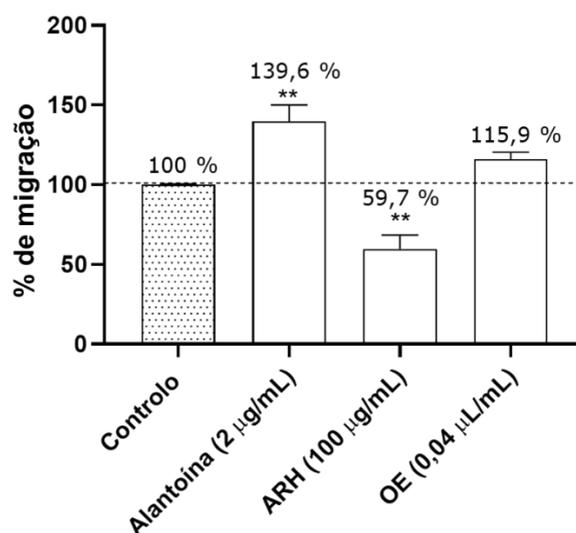


Figura 12 - Efeito do OE e da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* na migração de fibroblastos NIH/3T3. As células foram tratadas durante 24 h com diferentes concentrações de OE e ARH, e a % de migração foi avaliada pelo método do *Scratch assay*. Os resultados estão expressos em percentagem (%) da média \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes em duplicado.

É possível observar que apenas o OE demonstrou possuir uma percentagem de migração superior ao controlo, no entanto inferior à da alantoina, usada como controlo positivo. O OE apresentou atividade cicatrizante numa concentração segura (Figura 12).

A citotoxicidade do OE e da ARH foi avaliada em células da pele, fibroblastos NIH/3T3 (Figura 13). A ARH não afetou a viabilidade celular em todas as concentrações testadas. No entanto, o OE demonstrou ser seguro apenas na concentração mais baixa testada (0,04 µL/mL).

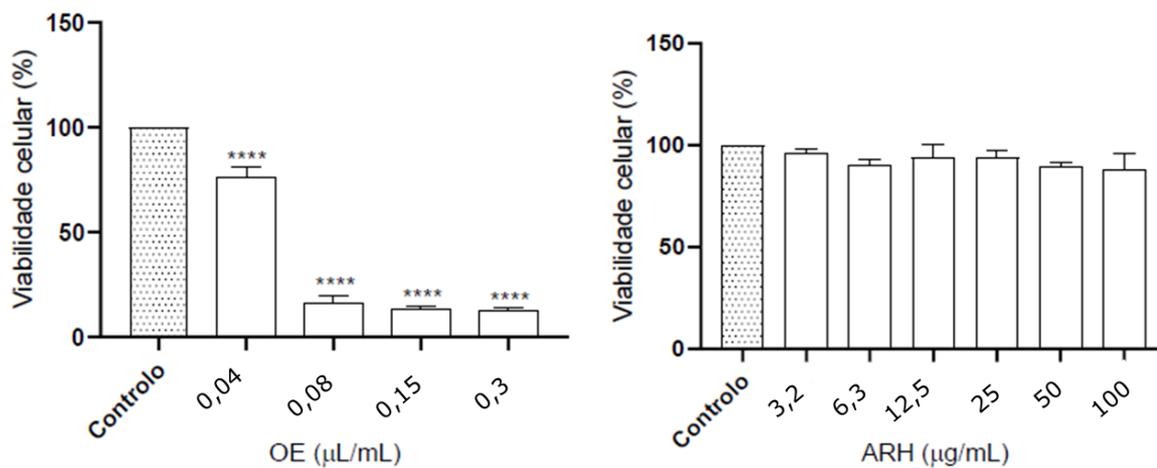


Figura 13 - Efeito do OE e da ARH de *A. campestris* subsp. *maritima* na viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3. As células foram tratadas durante 24 h com diferentes concentrações de OE e ARH, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados estão expressos em percentagem (%) da média \pm SEM de pelo menos três ensaios independentes em triplicado (**** $p < 0,0001$, comparado com o controlo).

Os resultados obtidos para a ARH, mostraram que as concentrações testadas são seguras para uso tópico em formulações farmacêuticas, por exemplo, já que não comprometam a viabilidade de fibroblastos, células da derme.

8. Conclusão

No presente estudo é feita pela primeira vez a caracterização fitoquímica da água residual da hidrodestilação de *A. campestris* subsp. *maritima*, um subproduto da produção de óleo essencial, que geralmente é descartado. Também foi avaliado o perfil químico do óleo essencial assim como o potencial biológico de ambos os extratos.

A água residual da hidrodestilação apresentou potencial antioxidante e atividade anti-inflamatória promissora, sem causar toxicidade em macrófagos e fibroblastos.

O óleo essencial também apresentou uma promissora atividade antioxidante, antifúngica, principalmente contra os dermatófitos, e cicatrizante.

Este estudo revela o potencial biológico da água residual de *A. campestris* subsp. *maritima*, resultante do processo de hidrodestilação, como fonte de compostos bioativos com propriedades terapêuticas e medicinais, podendo ser aplicado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar.

Os resultados obtidos para a *A. campestris* subsp. *maritima*, uma espécie autóctone halófita, poderão contribuir para a validação das suas utilizações tradicionais e aumentar o seu interesse industrial, uma vez que a partir de um único processo extrativo é possível obter dois extratos biologicamente relevantes, o óleo essencial e a água residual da hidrodestilação.

9. Bibliografia

- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L e Bermejo P (2012) The *Artemisia* L Genus: A Review of Bioactive Essential Oils Molecules 17(3), 2542–2566.
- Abbas AK, Lichtman AH e Pillai S (2008) Imunologia celular e molecular Elsevier Brasil.
- Abidi A, Sebai E, Dhibi M, Alimi, D, Rekik M, B'chir F, Maizels RM, Akkari H (2018) Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil Veterinary Parasitology 263:59-65.
- Afshar FH, Delazar A, Nazemiyeh H, et al (2017) Melilotoside derivatives from *Artemisia splendens* (Asteraceae) Rec Nat Prod 11:43.
- Ahmad F, Khan RA e Rasheed S (1992) Study of analgesic and anti-inflammatory activity from plant extracts of *Lactuca scariola* and *Artemisia absinthium* J Islam Acad Sci 5(2):111–114.
- Alarmagem, Biodiversidade a seus pés, *Artemisia campestris* subsp. *maritima*, em: <http://almargem.org/biodiv/especie/artemisia-campestris-subsp.-maritima/> [Acedido a 28 de Janeiro de 2020]
- Alba JDM, Hernández SIM, López GCV e Flores MA (2016) Anti-inflammatory effect of caffeic acid in an experimental model of pulpitis in guinea pigs. Revista ADM 73 (5): 250-254.
- Allen PC, Lydon J, Danforth HD (1997) Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens Poult Sci 79(8):1156–1163.
- Alwathnani, HA (2017) Antibacterial activity of aqueous extracts of *Artemisia* species against some pathogenic bacteria. Biosciences Biotechnology Research Asia 14(2):621-624.
- Al-Snafi AE (2015) The pharmacological importance of *Artemisia campestris* – A review. Asian J. Pharm Res 5(2):88-92.
- Akkari H, Rtibi K, B'chir F, Rekik M, Darghouth MA, Gharbi M (2014) In vitro evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. Vet Res Commun 38:249–255.
- Akrout A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC (2011) Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. Food Chem Toxicol 49:342–347.
- Akrout A, Chemli R, Chreïf I, Hammami M (2001) Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L Flavour Fragr J 16: 337–339.
- Akrout A, Neffati M, Chemli R, Aouni M, Jerraya R, Dammak M, et al (2007) Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. Revue des Régions Arides 1: 231–240.
- Akrout A, El Jani H, Amouri, S, Neffati M (2010) Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L. , *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff: et Link growing wild in the southern of Tunisia. Rec Res Sci Tech 2:29–39.

- Anderson D (1996) Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research* 350(1):103-108.
- Araniti F, Lupini A, Sorgonà A, Conforti F, Marrelli M, Statti GA, Menichini F e Abenavol MR (2013) Allelopathic potential of *Artemisia arborescens*: Isolation, identification and quantification of phytotoxic compounds through fractionation guided bioassays. *Natural Product Research* 27(10):880-887. DOI: 10.1080/14786419.2012.691491
- Arendrup MC (2010) Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16:445-452.
- Astley SB (2003) Dietary antioxidants past, present and future. *Trends Food Sci Technol* 14: 93-98.
- Bahekar S, Kale R, Nagpure S (2012) A review on medicinal plants used in scorpion bite treatment in India. *Int J Pharm Med Sci* 1:1–6.
- Balda AC, Larsson CE, Otsuka M e Gambale W (2004) Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Ballerio M, Poli F, Sacchetti G, Loi, MC (2001) Ethnobotanical research on the territory of Fluminimaggiore (southwestern Sardinia). *Fitoterapia* 72,:788–801.
- Bellomaria B, Valentini G & Biondi E (2001) Chemotaxonomy of *Artemisia variabilis* Ten and *A campestris* L ssp *glutinosa* (Ten) Briq et Cavill (Asteraceae) from Italy. *J Essent Oil Res* 13:90–94.
- Bamunuarachchi GS, Ratnasooriya WD, Premakumara S, Udagama PV (2014) *Artemisia vulgaris* L ethanolic leaf extract reverses thrombocytopenia/thrombocytosis and averts end-stage disease of experimental severe Plasmodium berghei murine malaria. *J Vector Borne Dis* 51:286–293.
- Bakchiche B, Gherib A, Bronze, MR, Ghareeb MA (2019) Identification, quantification, and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Artemisia campestris* from Algeria. *Turk J Pharm Sci* 16(2):234-239.
- Barkat L, Boumendjel A, Saoudi M, El Feki A, Messarah M (2015) *Artemisia campestris* leaf aqueous extract alleviates methidathion-induced nephrotoxicity in rats. *J Pharm Sci Rev and Res* 32: 200–209.
- Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M (2017) Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *J Food Meas Charact* 11(2):847–863.
- Bem-Ami R, Lewis RE, Raad II et al (2009) Phaeohyphomycosis in a tertiary care cancer center. *Clin Infect Dis* 48:1033-1041.
- Ben-Nasr H, Hammami TS, Mahmoudi L, Zeghal K (2014) Aqueous leaves extract of *Artemisia campestris* inhibition of the scorpion venom induced hypertension. *J Med Plant Res* 8: 538–542.

- Benzie IF & Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239(1):70-76.
- Biorede - *Artemisia campestris* L subsp. *maritima*. Disponível em: <http://www.biorede.pt/page.asp?id=1065> Acedido em: 14 de setembro de 2020
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A (2002) Ethnopharmacology forum medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes Metab* 10:33–50.
- Bogdan (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2:907–916.
- Bolliger HR *et al* (2011) *Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. ISBN 978-3-662-01033-4
- Bora KS & Sharma A (2011) The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol* 49:101–109.
- Castro-López C, Bautista-Hernández I, González-Hernández M, Martínez-Ávila G, Rojas R, et al. (2019) Polyphenolic profile and antioxidant activity of leaf purified hydroalcoholic extracts from seven Mexican *Persea americana* cultivars. *Molecules* 24(1):173.
- Catania AS, Barros CR, Ferreira SRG (2009) Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 53(5).
- Carvalho IS, Cavaco T & Brodelius M (2011) Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. *Ind Crop Prod* 33(2):382–388.
- Cavar S, Maksimovica M, Vidica D, Pari CA (2012) Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind Crop Prod* 37:479–485.
- Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, et al (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A capillaris*. *Planta Med* 71:186–190.
- Chacon, Acosta & Lemasters, (1997) Primary cultures of cardiac myocytes as in vitro models for pharmacological and toxicological assessments. *Pharmaceutical Research*, 209-223. ISBN 9780121633905
- Chagas ACS, Georgetti CS & Carvalho CO (2011) In vitro activity of *Artemisia annua* L (Asteraceae) extracts against *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 20(1):31–35.
- Chalchat JC, Cabassu P, Petrovic S, Maksimovic Z, Gorunovic M (2003) Composition of essential oil of *Artemisia campestris* L from Serbia. *J Essent Oil Res* 15:251–253.
- Ćirić A, Prosen H, Jelikić-Stankov M, Đurđević P (2012) Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method. *Talanta* 15(99):780-90.
- Clark RAF (1985) Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol* 13:701.

- Clifford MN, Knight S & Kuhnert N (2005) Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(10).
- CLSI, 2008a - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts , approved standard M27-A3, 3rd ed Clinical and Laboratory Standards Institute 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA
- CLSI, 2008b - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi , approved standard M38-A2, 2nd ed Clinical and Laboratory Standards Institute 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA
- Cornillet A, Camus C, Nimubona S et al (2006) Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and non-neutropenic patients: a 6-year survey. Clin Infect Dis 43:577-584.
- Corrêa-Ferreira M, Ferreira M, Dallazen J, Silva A, Werner M, Petkowicz C (2018) Gastroprotective effects and structural characterization of a pectic fraction isolated from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. International Journal of Biological Macromolecules 107, Part B:2395-2403.
- Costa et al. (2015) Flavan hetero-dimers in the *Cymbopogon citratus* infusion tannin fraction and their contribution to the antioxidant activity. Food & Function 6(3):932-937.
- Council of Europe - European Pharmacopoeia 7th Edition ISBN 978-92-871-6700-2
- Cunha AP, Roque OR & Nogueira MT (2012) Plantas aromáticas e óleos essenciais - Composição e aplicações. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. ISBN: 9789723114508
- Cruz TM, Duarte C, Gonçalo M, Figueiredo A, Carvalho A, Lopes C (2001) Granulocyte - macrophage colony-stimulating factor activates the transcription of nuclear factor kappa B and induces the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. Immunology and Cell Biology 79:590-596.~
- Compositae Working Group (CWG) (2020). Global Compositae Database. Acedido em <http://www.compositae.org> on 2020-10-02. doi:10.14284/411
- Dhibi S, Amani E, Abdelfettah E, Najla H (2015) Protective effects of *Artemisia arborescens* essential oil on oestrogenic treatment induced hepatotoxicity. Nutr Res Pract 9(5):466–471.
- Dias CR, Schwan AV, Ezequiel DP, Sarmiento MC, Ferraz S (2001) Efeito de extractos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incógnita*. Nematologia Brasileira 24:203–210.
- Dib I & Alaoui-Farisb FEE (2019) *Artemisia campestris* L : review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. Biomedicine & Pharmacotherapy 109:1884–1906.

- Dib I, Angenot L, Mihamou A, Ziyat A, Tits M (2017) *Artemisia campestris* L : Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *J Herb Med* 7:1–10.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P (2007) Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 224(6):801–809.
- Dob T, Dahmane D, Berramdane T, Chelghoum C (2005) Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *Pharmaceutical Biology* 43(6):512-514.
- Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, *et al* (1985) Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. *Collagen Rel Res* 5:481.
- Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2):446-452, 2006.
- Eggimann P, Garbino J & Pittet D (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3:685-702.
- Erel SB, Reznicek G, Senol SG, Yavasogulu NUK, Konyalioglu S, Zeybek AU (2012) Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turk J Biol* 36:75–84.
- Erel SB, Senol SG, Kose FA, Ballar P (2011) In vitro cytotoxic properties of six *Artemisia* L. species. *Turk J Pharm Sci* 8(3):247–252.
- Escribano-Bailon T *et al* (1992) Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food* 40:1794–1799.
- Essid R, Rahali FZ, Msaada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, Aoun K, Limam F (2015) Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Ind Crops Prod* 77:795–802.
- Euro Med plantBase, 2011. URL: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameId=7001419&PTRefFk=7000000> [Acedido a 07 de janeiro de 2020]
- Farhoudi R (2013) Chemical constituents and antioxidant properties of *Matricaria recutita* and *Chamaemelum nobile* essential oil growing wild in the South West of Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 16(4):531–537.
- Field L, Dilts RV, Ravichandran R, Lenhert PG, Carnahan GE (1978) An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine: X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetyl-amino)-2-carboxy-1,1-dimethylethylthionitrite. *Journal of the Chemical Society Chemistry Communications* 6(1978):249-250.
- Figueiredo AC, Barroso JG & Pedro, LG (2007) Plantas aromáticas e medicinais. Fatores que afetam a produção Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso Teórico-Prático, pp 1-18, 3ª edição, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa

- Gavronski L, Botelho TKR & Cordova CMM (2016) Diagnóstico laboratorial de aspergilose invasiva: avaliação de métodos moleculares e detecção de antígenos - Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: review of molecular methods and detection of antigens
- Ghasemzadeh A & Ghasemzadeh N (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human – Review. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(31):6697-6703.
- Ghlissi Z, Sayari N, Kallel R, Bougateg A, Sahnoun Z (2016) Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. *Biomed Pharmacother* 84, 115–122.
- Ghora H, Laggoune S, Kabouche A, Semra Z, Kabouche, Z (2013) Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*. 5:189-192.
- Gilani AH, Yaeesh S, Jamal Q, Ghayur MN (2005) Hepatoprotective activity of aqueous–methanol extract of *Artemisia vulgaris* *Phytotherapy Research* 19:170–172.
- González AG, Bermejo J, Estévez F, Velázquez R (1983) Phenolic derivatives from *Artemisia glutinosa*. *Phytochemistry* 22:1515–1516.
- Graven EH, Gardner JB & Tutt CLC (1986) Native South African aromatic plants – a possible vehicle for rural development. *Progress in Essential Oil Research* 465-484.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131-138.
- Gundidiza M (1993) Antifungal activity of the essential oil from *Artemisia afra* Jacq. *Cent Afr J Med* 39:140-142.
- Habid M & Waheed A (2013) Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Artemisia scoparia* hydromethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology* 145(1):18-24.
- Hahn-deinstrop E (2006) *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*. 2nd ed [S I] : Wiley, VCH. ISBN 978-3-527-31553-6
- Hagerman AE & Butler LG (1994). Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Meth Enzymol* 234(1994):429-437.
- Havlickova B, Czaika VA & Friedrich M (2008) Epidemiological trends in skin mycosis worldwide. *Mycosis* 51(4):2–15. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606
- Hiremath SK, Kolume DG & Muddapur UM (2011) Antimicrobial activity of *Artemisia vulgaris* L. *Int J Res Ayurveda Pharm* 2:1674–1675.
- Hong JH, Lee JW, Park JH, Lee IS (2007) Antioxidative and cytoprotective effects of *Artemisia capillaris* fractions. *BioFactors* 31:43–53.

- Horn D, Neofytos D, Anaissie E, Fishman J, Steinbach W, Olyaei A, Marr K, Pfaller M, Chang C, Webster K (2009) Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry, *Clinical Infectious Diseases* 48(12):1695–1703.
- Houicher A, Hechachna H & Ozogul F (2016) *In vitro* determination of the antifungal activity of *Artemisia campestris* essential oil from Algeria. *International journal of food properties* 19: 1749-1756.
- Iqbal S, Younas U, Chan KW, Zia-UI-Haq M, Ismail M (2012) Chemical composition of *Artemisia annua* L leaves and antioxidant potential of extracts as a function of extraction Solvents. *Molecules* 17:6020–6032.
- Jaouadi I, Abdelkafi-Koubaa Z, Riabi-Ayari S, Hassen I, Yakoubi MT, Ayeb, ME, Gazzah, ME, Marrakchi, N (2016) Anti-hemolytic and anti-cytotoxic effect of two *Artemisia* species (*A campestris* and *A herba-alba*) essential oil against snake venom. *Int J Agric Biol* 18:805–812
- Joshi DD (2012) *Herbal Drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs* Springer, India. In: <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0804-4>
- Juteau F, Jerkovic I, Masotti V, Milos M, Mastelic JM, Bessiere JM, Viano J (2003) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med* 69:158–161.
- Karabegovic I, Nikolova M, Velickovic D, Stojicevic S, Veljkovic V, Lazic M (2011) Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia spp* recovered by different extraction techniques. *Chin J Chem Eng* 19(3):504–511.
- Khan MM, Jain DC, Bhakuni RS, Zaim M, Thakur R S (1991) Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. *Plant Sci* 75:161–165.
- Khan M, Yu B, Rasul A, et al (2011) Jaceosidin induces apoptosis in U87 glioblastoma cells through G2/M phase arrest. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012-703034.
- Kim MJ, Kim DH, Lee KW, Yoon DY, Surh YJ (2007) Jaceosidin induces apoptosis in rastransformed human breast epithelial cells through generation of reactive oxygen species. *Ann N Y Acad Sci* 1095:483–495.
- Kim Y, Bahn K, Hah C, Gang H, Ha Y (2008) Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene induced mouse skin carcinogenesis by *Artemisia capillaris*. *J Food Sci* 73:T16–T20.
- Kim J, Jung KH, Yan HH, et al (2018) *Artemisia capillaris* leaves inhibit cell proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Complement Altern Med* 18:147.
- Kim HJ & Lee YS (2005) Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Medica* 71(9):871–876
- Kim E, Min K, Kwon T, Kyu U, Byung-Hun A, Choi S (2012). Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated

- RAW 264.7 macrophages. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 50:1309-16. 10.1016/j.fct.2012.02.011.
- Kiso Y, Ogasawara S, Hirota K, Watanabe N, Oshima Y, Konno C, Hikino H (1984) Antihepatotoxic Principles of *Artemisia capillaris* Buds. *Planta Med* 50(1):81-85.
- Koul B & Khatri T (2020) The *Artemisia* Genus: Panacea to Several Maladies. *Bioactive Natural products in Drug Discovery*, https://doi.org/10.1007/978-981-15-1394-7_1
- Koul B, Taak P, Kumar A, Khatri T, Sanyal I (2017) The *Artemisia* Genus: A Review on Traditional Uses, Phytochemical Constituents, Pharmacological Properties and Germplasm Conservation. *J Glycomics Lipidomics* 7:1.
- Lass-Flörl C, Griffl K, Mayr A et al (2005) Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single center experience. *Br J Haematol* 131:201-207.
- Lee JH, Chiang SY, Nam D, et al (2014) Capillarisin inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through induction of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 345:140–148.
- Lima EO, Pontes ZBV, Oliveira NMC, Carvalho MFFP, Guerra MFL, Santos JP (1999) Frequência de dermatofitoses em João Pessoa - Paraíba - Brasil- Paraíba – Brasil 1999.
- Liu KC, Yang SL, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD (1992) Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Rep* 11:637–640.
- Lukyanova LD, Storozheva ZI & Proshin AT (2007) Corrective effect of flavonoid containing preparation extralife on the development of Parkinson's syndrome. *Bull Exp Biol Med* 144: 42-45.
- Lv W, Sheng X, Chen T, Xu Q, Xie X (2008) Jaceosidin induces apoptosis in human ovary cancer cells through mitochondrial pathway. *J Biomed Biotechnol*.doi:10.1155/2008/394802
- Maggi ME, Mangeaud A, Carpinella MC, Ferrayoli CG, Valladares GR, Palacios SM (2005) Laboratory evaluation of *Artemisia annua* L. extract and artemisinin activity against *Epilachna paenulata* and *Spodoptera eridania*. *J Chem Ecol* 31(7):1527–1536.
- Mandelbaum SH, Di Santis EP & Mandelbaum MHSA (2003) Cicatrization: current concepts and auxiliary resources—Part I. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 72:393–410.
- Masotti V, De Jong L, Moreau X, Rabier J, Laffont-Schwob I (2012) Thiéry A Larvicidal activity of extracts from *Artemisia* species against *Culex pipiens* L. mosquito: comparing endemic versus ubiquitous species for effectiveness. *C R Biol* 335:19–25.
- Matheus ME, Fernandes SBO, Silveira CS, Rodrigues VP, Menezes FS, Fernandes PD (2006) Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart on nitric oxide production and iNOS expression. *Journal of Ethnopharmacology* 107:291-296.

- Megdiche-Ksouri W, Trabelsi N, Mkadmini K, Bourgou S, Noumi A, Snoussi M, et al. (2014) *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind Crops Prod* 63:104–113.
- Meepagala KM, Kuhajek JM, Sturtz GD, Wedge DE, Vulgarone B(2003) The antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglassiana*. *J Chem Ecol* 29:1771–1780.
- Mendiola J, Bosa M, Perez N, Hernandez H, Torres D (1991) Extracts of *Artemisia abrotanum* and *Artemisia absinthium* inhibit growth of *Naegleria fowleri* *in vitro*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85(1):78–79.
- Menezes de Sequeira M, Espírito-Santo D, Aguiar C, Capelo J & Honrado, J (2012) Checklist da Flora de Portugal (Continental, Açores e Madeira) Associação Lusitana de Fitossociologia Lisboa, 74 pp ISBN: 978-989-20-2690-9
- Mesa LE, Vasquez D, Lutgen P, Vélez ID, Restrepo AM, Ortiz I, Robledo SM (2017) *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(1):52–60.
- Mohammadian A, Moradkhani S, Ataei S, Shayesteh TH, Sedaghat M, Kheiripour N, Ranjbar A (2016) Antioxidative and hepatoprotective effects of hydroalcoholic extract of *Artemisia absinthium* L. in rat. *J Herb Med Pharmacol* 5(1):29–32.
- Moslemi HR, Hoseinzadeh H, Badouei MA, Kafshdouzan K, Fard RMN (2012) Antimicrobial activity of *Artemisia absinthium* against surgical wounds infected by *Staphylococcus aureus* in a rat model Indian. *J Microbiol* 52(4):601–604.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Motaal A, Ezzat SM, Tadros MG & El-Askary HI (2016) *In vivo* anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharmaceutical Biology* 54(12):2864–2870.
- Msaada K, Salem N, Bachrouch O, Bousselmi S, Tammar S, Alfaify A, Al Sane K, Ammar WB, Azeiz S, Brahim AH, Hammami M, Selmi S, Limam F, Marzouk B (2015) Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. *J Chem*, 804658:1–12.
- Muyima N, Zulu G, Bhengu T, Popplewell D (2002) The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. *Flavour Fragr J* 17:258–266.
- Naili MB, Alghazeer RO, Saleh NA, Al-Najjar AY (2010) Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab J Chem* 3, 79–84.

- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V (2017) Review - Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* 10(4): 86.
- Neffati A, Skandrani I, Ben SM, Bouhlel I, Kilani S, Ghedira K, Mohamed N, Chraief I, Hammami M, Chekir-Ghedira L (2008) Chemical composition, mutagenic and antimutagenic activities of essential oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *Journal of Essential Oil Research* 20(5):471-477.
- Negahban M, Moharramipour S & Sefidkon F (2006) Chemical composition and insecticidal activity of *Artemisia scoparia* essential oil against three coleopteran stored-product insects. *J Asia Pac Entomol* 9:381–388.
- Negrone R (2012) Cryptococcosis - Clinics in dermatology. *Dermatology* 30(6):599-609.
- Nieto G (2017) Review: Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines* 4(3):63
- Obistoiu D, Cristina RT, Schmerold I, Chizzola R, Stolze K, et al (2014) Chemical characterization by GC–MS and in vitro activity against *Candida albicans* of volatile fractions prepared from *Artemisia dracuncululus*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Chem Cent J* 8: 1-11.
- Obolskiy D, Pischel I, Feistel B, Glotov N, Heinrich M (2011) *Artemisia dracuncululus* L. (Tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *J Agric Food Chem* 59:11367–11384.
- Ogwang PE, Ogwal JS, Kasasa S, Olila D, Ejobi F, Kabasa D, Obua C (2011) *Artemisia Annu* L infusion consumed once a week reduces risk of multiple episodes of malaria: a randomised trial in a Ugandan community. *Trop J Pharm Res* 11(3):445–453.
- Oren & Paul (2014) Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 20(S6):1-4.
- Otsuka K, Shoji J, Takido M, Cho SA. Pictorial Encyclopedia of Chinese Medical Herbs (I). Chuokoran-Sha Inc : Tokyo, Japan, 1992.
- Pagano L, Caira M, Candoni A et al (2006) The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 91(8):1068-75.
- Pagano L, Caira M, Nosari A et al. (2007) Fungal infection in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study. *Clin Infect Dis* 45:1161-1170.
- Palmeira de Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, Rodrigues AG (2009) Anti-*Candida* activity of essential oils *Mini Rev Med Chem* 9:1292–1305.
- Park H (2010) Chemistry and pharmacological action of caffeoylquinic acid derivatives and pharmaceutical utilization of chwinamul (korean mountainous vegetable). *Arch Pharm Res* 33(11):1703-1720.

- Park EJ, Nan JX, Kim JY, et al (2000) The ethanol-soluble part of a hot-water extract from *Artemisia iwayomogi* inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J Pharm Pharmacol* 52:875–881.
- Patravale V, Dandekar P & Jain R. Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles, Editor(s): Vandana Patravale, Prajakta Dandekar, Ratnesh Jain, In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Nanoparticulate Drug Delivery, Woodhead Publishing, 2012, Pages 123-155. ISBN 9781907568985
- Pereira CG, Barreira L, Bijttebier S, Pieters L, Marques C, Santos TF, Rodrigues MJ, Varela J, Custódio L (2018) Health promoting potential of herbal teas and tinctures from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*: from traditional remedies to prospective products. *Scientific Reports* 8, article number:4689.
- Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F (2006) Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int* 39:791-800.
- Perfect JR, Hachem R & Wingard JR (2014) Update on epidemiology of and preventive strategies for invasive fungal infections in cancer patients. *Clin Infect Dis* 59 (59)(S5):352-355.
- Pfaller MA & Diekema DJ (2002) Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 40:3551–3557.
- Pfaller MA & Diekema D J (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36:1-53.
- Poulsen HE, Prieme H & Loft S (1998) Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention* 7(1):9-16.
- Rabe T & Van Staden J (1997) Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J Ethnopharmacol* 56:81-87.
- Radulovic N, Blagojevic P, Zlatković B, Palic R (2009) A GC/MS profile of the volatile constituents of the aerial parts of *Artemisia abrotanum* L (Asteraceae) from Serbia South African. *Journal of Chemistry* 62 30-32.
- Rampersad, SN (2012) Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12(9):12347–12360.
- Rasooli I, Rezaeeb MB, Moosavic ML, Jaimand K (2003) Microbial sensitivity to and chemical properties of the essential oil of *Artemisia annua* L. *J Essent Oil Res* 15(1):59–62.
- Re R, Pellegrini N, Proteggentea A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay *Free Radical. Biology and Medicine* 26(9–10):1231-1237.
- Remberg P, Björk L , Hedner T, Sterner O (2004) Characteristics, clinical effect profile and tolerability of a nasal spray preparation of *Artemisia abrotanum* L. for allergic rhinitis. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 11(1):36–42.

- Reolon A, Perez LRR & Mezzari A (2004) Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J Bras Patol Med Lab* 40(5):293-298.
- Reza SM, Hamideh M & Zahra S (2015) The nociceptive and anti-inflammatory effects of *Artemisia dracuncululus* L. aqueous extract on fructose fed male rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:5.
- Rezende CP & Reis A (2019) Influência de galectina-3 no curso da infecção por *Cryptococcus neoformans*. <https://doi.org/10.11606/D.17.2020.tde-19092019-125830>
- Richardson MD & Warnock DW (2003) *Fungal Infections: Diagnosis and Management*, 3rd ed Oxford: Blackwell Publishing
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L, Storts D, Reid Y (2004) *Cell viability assays Assay guidance manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
- Robbins RJ (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem* 51(10):2866–2887.
- Rodrigues MJ et al (2015) Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Ind Crop Prod* 77:315–322.
- Roemer T & Krysan D (2014) Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine* 4, a019703 doi:10.1101/cshperspect.a019703
- Sabino R, Veríssimo C, Pais C, Denning DW (2015) The burden of serious fungal infections in Portugal. *Mycoses* 58(4):51–226 P211.
- Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L, De Logu A (2007) Antitherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 6(10).
- Samel et al. (2003) Supplementation and Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Influences Bacterial Transit Time During Bacterial Translocation in Rats. *Shock*:3, 19(4):378-382.
- Saoudi M, Badraoui R, Bouhajja H, Ncir M, Rahmouni F, Grati M, Jamoussi K, El Feki A (2017) Deltamethrin induced oxidative stress in kidney and brain of rats: Protective effect of *Artemisia campestris* essential oil. *Biomed Pharmacother* 94:955–963.
- Sayyaha M, Nadjafnia L & Kamalinejad M (2004) Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracuncululus* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* 94:283–287.
- Schmidt BM, Lipsky PE, Raskin I (2007) Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nat Chem Biol* 3:360-366.

- Sebai H, Jbrid M, Souli A, Hosni K, Selmi S, Tounsi H, Tebourbi O, Samir B, El-Benna J, Sakly M (2014) Protective effect of *Artemisia campestris* extract against aspirin-induced gastric lesions and oxidative stress in rat. RSC Adv 4:49831–49841.
- Senguttuvan J, Paulsamy, S & Arts, K (2014) Thin layer chromatographic analysis for various secondary metabolites in the methanolic leaf and root extracts of *Hypochoeris American*. Journal PharmTech Research 4:145–156.
- Sefi M, Fetoui H, Makni M, Zeghal N (2010) Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol 48:1986–1993.
- Sefi M, Fetoui H, Soudani N, Chtourou Y, Makni M, Zeghal N (2012) *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. Pathol Res Pract 208:157–162
- Setzer WN, Vogler B, Schmidt JM, Leahy JG, Rives R (2004) Antimicrobial activity of *Artemisia douglassiana* leaf essential oil. Fitoterapia 75:192–200.
- Silva FAM, Borges MFM & Ferreira MA (1999) Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. Química Nova, v.22(1):95-103, 1999.
- Silvestre A, Silva A, Almeida L, Pereira C, Cavaleiro J (1999) The essential oil of *Artemisia campestris* L subsp. *maritima* Arcangelis. Acta Horti 500:93–96.
- Singh HP, Kaur S, Mittal S, Batish DR, Kohli RKZ (2008) Phytotoxicity of major constituents of the volatile oil from leaves of *Artemisia scoparia* Waldst & Kit. Naturforsch 63:663–666
- Sinico, C , Logu, A , Lai, F , Valenti, D , Manconi, M , Loy, G , Bonsignore, L e Fadda, A M (2005) Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L essential oil and in vitro antiviral activity Eur J Pharm Biopharm 59:161–168
- Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP (2009) Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agentes (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. Cancer 115: 4745–1402.
- Soares S (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revista de Nutrição 15(1):71-81.
- Taherkhani M (2014) *In Vitro* cytotoxic activity of the essential oil extracted from *Artemisia absinthium*. Iran J Toxicol 8(26):1152–1156.
- Taleghani A, Emami SA & Tayarani-Najaran Z (2020) *Artemisia*: a promising plant for the treatment of cancer. Bioorganic & Medicinal Chemistry 28(1):115180.
- Tanaka K (1981) Antimicrobial activity of capillin, a component of the essential oil of *Artemisia capillaris* and of its derivatives. Seikagaku 33:399–409.
- Tawfiq, NK, Anderson LA, Roberts MF, Phillipson JD, Bray DH, Warhurst DC (1989) Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. Plant Cell Rep 8:425–428.
- The Plant List 2013 Versão 1 URL: [Acedido a 28 de outubro de 2020]

- Thring T & Weitz F (2006) Medicinal plant use in the Bredasdorp/Elim region of the Southern Overberg in the Western Cape province of South Africa. *J Ethnopharmacol* 103:261–275.
- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H et al (2004) Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:317-322.
- Tripathi AK, Prajapati V, Gupta R, Kumar S (2000) Herbal material for the insect-pest management in stored grains under tropical conditions. *J Med Aromat Plant Sci* 21:408–430.
- Tsui KH, Chang YL, Yang PS, et al (2017) The inhibitory effects of capillarisin on cell proliferation and invasion of prostate carcinoma cells *Cell Prolif* 2017 ,51 e12429
- Van Winkle (1967) The fibroblast in wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 124(2):369-86.
- Horsssen VR, Galjart N, Rens JAP, Eggermont, AMM, Hagen, TLM (2006) Differential effects of matrix and growth factors on endothelial and fibroblast motility: application of a modified cell migration assay. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:1536–1552.
- Vasconcelos JMJ, Silva MAS & Cavaleiro JAS (1998) Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. *Phytochemistry* 49:1421–1424.
- Veríssimo C, Sabino R, Martins C, Brandão J (2016) Infecção fúngica em Portugal - O gigante adormecido. *Infecção & Sepsis* 2:19-27.
- Villar MM, Puebla-Pérez AM, Sánchez-Peña MJ, González-Ortiz LJ, Martínez-Abundis E, González-Ortiz M (2016) Effect of *Artemisia Dracunculus* Administration on Glycemic Control, Insulin Sensitivity, and Insulin Secretion in Patients With Impaired Glucose Tolerance. *J Med Food* 19 (5):481-485.
- Wagner H & Bladt S - *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* Springer ed ISBN 3540586768 (2001)
- Weinberg J B, Fermor B & Guilak F (2007) Nitric oxide synthase and cyclooxygenase interactions in cartilage and meniscus – Relationships to joint physiology, arthritis, and tissue repair. *Subcell Biochem* 42:31-62. doi: 10.1007/1-4020-5688-5_2
- Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J & Kowalska T (EDS) - *Thin layer chromatography in phytochemistry* CRC Press ed London ISBN:9781420046779 (2008)
- Wang C, Lee W, Peng C, Wang C, Lee W, Peng C (1997) Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn during. Maturation *J Agric Food Chem* 45:1185–1188.
- Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry* 108(3):1019–1022.
- Wani H, Shah SA & Banday JA (2014) Chemical composition and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Kashmir. *India J Phyto* 3(2):90–94.

- Wu T, Tsanga Z, Wu PL, Lin FW, Li CY, Teng CM, Lee KH (2001) New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9(1):77-83.
- Yildiz K, Basalan M, Duru O, Gokpinar S (2011) Antiparasitic efficiency of *Artemisia absinthium* on *Toxocara cati* in naturally infected cats. *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 35(1):10–14.
- Yin Y, Gong FY, Wu XX, Sun Y, Li YH, Chen T, Xu Q (2008) Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol* 120(1):1-6.
- Younes K, Merghache S, Djabou N, Merghache D, Muselli A, Tabti B, Costa J (2012) Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of a new essential oil chemotype of Algerian *Artemisia arborescens* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(42):2912-2921.
- Zafar M M, Hamdard ME & Hameed A (1990) Screening of *Artemisia absinthium* for antimalarial effects of Plasmodium berghei in mice, a preliminary report. *J Ethnopharmacol* 30:223–226.
- Zhang YY, Teoh KH, Reed DW, Maes L, Goossens A, Olson DJH, Ross ARS, Covello PS (2008) The molecular cloning of artemisinic aldehyde 11(13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *J Biol Chem* 283:21501–21508.
- Zhao Y, Zhao J, Li XP, et al (2006) Advances in caffeoylquinic acid research *Journal of Chinese Materia Medica*, 31(11):869-874.
- Zima T, Fialova L, Mestek O, Janebova M, Crkovska J, Malbohan I, Stipek S, Mikulikova L, Popov P (2001) Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol related diseases. *J Biomed Sci* 8: 59-70.
- Zuzarte M, Gonçalves MJ, Canhoto J, Salgueiro L (2011) Antidermatophytic activity of essential oils In: Méndez-Vilas, A (Ed), *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances Microbial Pathogens*, pp 1167–1178.