



**VNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**Caracterização Química e Avaliação das Propriedades
Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.)
Hull**

Ana Filipa Mandim Pires

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca no âmbito do
Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Professora Doutora Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Professor Doutor Paulo Fernando da Conceição Santos

Bragança

Julho de 2018

Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



“Não tenha medo do trabalho difícil. Nada vale a pena se for fácil. Não deixe que os outros o desanimem ou lhe digam que você não pode fazê-lo.”

Gertrude B. Elion

Agradecimentos

Considero-me uma pessoa privilegiada. Tenho o privilégio de a vida me ter dado a oportunidade de trabalhar, crescer e de aprender com os melhores. Agradeço do fundo do coração a oportunidade e confiança depositada neste segundo projeto juntos. À professora Isabel, pelo interesse, dedicação, incentivo e por acreditar em mim e na minha capacidade de trabalho. Espero poder continuar a aprender e crescer consigo. É uma pessoa que nos faz querer ser melhores, fazer mais, saber mais, obrigada. Ao professor Paulo pela orientação, ensinamentos, pelo empenho e interesse para com este trabalho, mas acima de tudo, pelo otimismo, pelos conselhos, amizade e preocupação.

À Lillian, pela brilhante profissional que é, por todo o interesse, empenho, ajuda, pela capacidade de, entre a inimaginável quantidade de assuntos e coisas a tratar, conseguir sempre arranjar tempo para me ajudar, esclarecer, orientar. Conseguir coordenar tudo e estar sempre a par de todos os desenvolvimentos do trabalho, é incrível e um exemplo a seguir.

A todos os elementos do grupo BioChemCore, obrigada por estarem sempre disponíveis para ajudar, pelo profissionalismo, pela boa disposição e apoio. Não posso deixar de destacar a professora Maria José, a Ângela, a Tânia, a Inês, a Sandrina, a Carla, o Ricardo, o Zé pelo apoio, interesse, disponibilidade, contributo e ajuda.

Ao Centro de Química de Vila Real, por mais uma vez me receberem de braços abertos e com toda a boa disposição do mundo. À minha Vânia, que me faz falta todos os dias! Obrigada à Céu, à Fátima e à Mariana pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus pais por me apoiarem em mais uma etapa académica, por nunca terem duvidado das minhas capacidades. À minha mãe, pela super-mulher que é, por ouvir paragrafo a paragrafo este trabalho e ter toda a paciência do mundo para os meus dramas. Por estar sempre lá, incondicionalmente, venha quem vier e o que vier.

Aos elementos da minha família que continuam a preocupar-se, a interessar-se e a torcer pelo meu sucesso. Aos meus padrinhos, por serem os melhores padrinhos deste mundo e do outro, por serem companheiros, amigos e confidentes, por estarem sempre preocupados, interessados e à procura de formas para me ajudar. À minha avó Marquinhas, espero que, estejas onde estiveres, estejas orgulhosa de mim.

Aos meus amigos de sempre. À Daniela, Rute, Sara, Pietra, Ricardo, Tapina, sois os irmãos de coração, os “amigos para sempre”. Ao meu Mi, por todas as visitas inesperadas, cafés, por seres a pessoa e o amigo mais fantástico que conheço.

À minha Jo, que apesar de longe, transmite toda a força e incentivo como se estivesse comigo todos os dias. À Filipa, pelo companheirismo nestes dois anos, pela amizade e conversas. À Mónica, por acreditar e frisar que ainda vou ser uma grande cientista, pelos cafés e afins.

Finalmente, agradeço ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e ao Centro de Química de Vila Real por permitirem o desenvolvimento deste trabalho.

Espero não me ter esquecido de ninguém. A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, foram importantes na minha vida e para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigada.

Abreviaturas e Símbolos

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamida)di-hidroclorido
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação oficial de químicos analíticos
aq	Aquoso
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Hidroxitolueno butilado
C ₇ H ₈	Tolueno
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentração mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bactericida
CUPRAC	Capacidade redutora cúprica
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
dw	Massa seca
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização por electrospray
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
FBS	Soro fetal bovino

FRAP	Poder antioxidante redutor de ferro
Fr	Fração
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama
GI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração
IC ₅₀	Concentração responsável por 50% da atividade
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
IR	Infravermelho
LPS	Lipopolissacárido
m/v	Massa/volume
MAO-A	Monoaminoxidase A
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol
MH	Müeller Hinton
MRS	Man Rogosa e Sharpe
MS	Espectrometria de massa
MS ²	Segunda fase da espectrometria de massa
<i>m/z</i>	Razão massa/carga

n.d.	Não detetado
n.t.	Não testado
ORAC	Atividade de absorção de radicais de oxigénio
OxHLIA	Inibição da hemólise oxidativa
PDA	Detetor de fotodíodos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
R ²	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
Rt	Tempo de retenção
SBR	Sulforrodamina B
SD	Desvio padrão
SPSS	Pacote estatístico para as ciências sociais
TBARS	Inibição da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TSB	Trypticase Soy Broth
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFC	Unidade formadora de colónias
UPLC	Cromatografia líquida ultrarrápida
UV	Radiação ultravioleta
UVB	Radiação ultravioleta do tipo B
UV-VIS	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de protão

Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull

^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
λ_{max}	Comprimento de onda de absorção máxima

Índice

Abreviaturas e Símbolos	VII
Índice de Figuras	XIV
Índice de Tabelas	XV
Resumo	XVI
Resumen	XIX
Abstract	XXII
1.Estado da arte	2
1.1. Importância das plantas medicinais como fonte de novos compostos bioativos ...	2
1.2. <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull	3
1.2.1. Descrição botânica	3
1.2.2. Importância etnofarmacológica e etnobotânica	4
1.3. Composição química da <i>C. vulgaris</i>	7
1.3.1. Aminoácidos	7
1.3.2. Lípidos	8
1.3.3.1. Ácidos fenólicos	12
1.3.3.2. Flavonoides	14
1.4. Propriedades bioativas da <i>C. vulgaris</i>	19
1.4.1. Atividade antibacteriana	19
1.4.2. Atividade antioxidante	21
1.4.3. Atividade anti-inflamatória	24
1.4.4. Atividade citotóxica	25
1.4.5. Outras atividades	26
2. Objetivos	28
3. Material e métodos	31
3.1. Padrões e reagentes	31
3.2. Sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	31
3.3. Caracterização nutricional das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	32
3.3.1. Macronutrientes	32

3.3.1.1. Cinzas	32
3.3.1.2. Gorduras	32
3.3.1.3. Proteínas	33
3.3.1.4. Hidratos de carbono.....	33
3.3.1.5. Valor energético	33
3.3.2. Ácidos gordos	33
3.3.3. Ácidos orgânicos	34
3.3.4. Açúcares livres	35
3.3.5. Tocoferóis	35
3.4 Preparação dos extratos orgânicos.....	36
3.5. Preparação dos extratos aquosos	37
3.6. Análise da composição fenólica dos extratos por HPLC-DAD-ESI/MS	38
3.7. Avaliação das propriedades bioativas dos extratos	39
3.7.1. Atividade antioxidante.....	39
3.7.1.1. Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	39
3.7.1.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)	40
3.7.2. Citotoxicidade.....	41
3.7.3. Hepatotoxicidade	42
3.7.4. Atividade anti-inflamatória.....	43
3.7.5. Atividade antibacteriana	44
3.7.5.1. Microrganismos e condições de crescimento	44
3.7.5.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI).....	45
3.7.5.3. Determinação das concentrações mínimas bactericidas (CMB)	46
3.8. Fracionamento do extrato de acetona	46
3.8.1. Caracterização dos compostos fenólica por HPLC-DAD-ESI/MS das frações de acetona	47
3.8.2. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações de acetona.....	47
3.9. Análise estatística	48
4. Resultados e Discussão	50
4.1. Caracterização nutricional das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	50
4.2. Análise da composição fenólica dos extratos por HPLC-DAD-ESI/MS	53

4.3. Avaliação das propriedades bioativas dos extratos da <i>C. vulgaris</i>	57
4.3.1. Atividade antioxidante.....	57
4.3.2. Citotoxicidade e hepatotoxicidade.....	58
4.3.3. Atividade anti-inflamatória.....	59
4.3.4. Atividade antibacteriana	61
4.3.4.1. Microrganismos patogênicos	63
4.3.4.2. Microrganismos não patogênicos	64
4.4. Fracionamento	66
4.4.1. Composição fenólica das frações	66
4.4.2. Atividade antibacteriana e microbiota.....	74
4.4.2.1. Microrganismos patogênicos	76
4.4.2.2. Microrganismos não patogênicos	77
5. Conclusão	79
5.1. Perspetivas Futuras	80
6. Referências bibliográficas	81

Índice de Figuras

Figura 1. Exemplo do arbusto <i>C. vulgaris</i> (esquerda) e da respetiva floração (direita).	3
Figura 2. Ácido ursólico.	8
Figura 3. Lupeol (esquerda) e Friedelina (direita).....	9
Figura 4. Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico e rodiolinozida.	14
Figura 5. Canferol e quercetina.	19
Figura 6. Canferol-3- <i>O</i> - β -D-galactósido.	24
Figura 7. Sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i> secas (esquerda) e trituradas (direita).	32
Figura 8. Processo para obtenção dos extratos orgânicos.	37
Figura 9. Etapas para a obtenção dos extratos aquosos.	38
Figura 10. Coluna cromatográfica de fracionamento do extrato de acetona da <i>C. vulgaris</i>	47
Figura 11. Perfil fenólico do extrato de metanol das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i> a 280 nm e 370 nm.	56
Figura 12. Perfil fenólico da fração 8 do extrato de acetona das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i> a 280 nm e 370 nm.....	74

Índice de Tabelas

Tabela 1. Aplicações etnofarmacológicas da <i>C. vulgaris</i>	6
Tabela 2. Lípidos identificados nos extratos da <i>C. vulgaris</i>	10
Tabela 3 Ácidos fenólicos identificados nos extratos da <i>C. vulgaris</i>	13
Tabela 4. Flavonoides identificados nos extratos de <i>C. vulgaris</i>	16
Tabela 5. Atividade antibacteriana dos extratos de <i>C. vulgaris</i>	20
Tabela 6. Ensaio da atividade antioxidante da <i>C. vulgaris</i>	22
Tabela 7. Resultado da caracterização nutricional das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	50
Tabela 8 Ácidos gordos presentes nas sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	52
Tabela 9. Composição fenólica dos extratos orgânicos e aquosos da <i>C. vulgaris</i>	54
Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i> .57	
Tabela 11. Citotoxicidade e hepatotoxicidade associada aos extratos das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	58
Tabela 12. Atividade anti-inflamatória dos extratos das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	60
Tabela 13. Atividade antibacteriana e efeito na microbiota associada aos extratos orgânicos e aquosos da <i>C. vulgaris</i>	62
Tabela 14. Compostos fenólicos identificados nas frações do extrato de acetona das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	67
Tabela 15. Quantificação dos compostos fenólicos identificados em cada uma das frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona obtida a partir das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	69
Tabela 16. Atividade antibacteriana das frações do extrato de acetona das sumidades floridas da <i>C. vulgaris</i>	75

Resumo

Nos últimos tempos tem-se observado um aumento do interesse da população no sentido de melhorar o estilo e a qualidade de vida, dando-se cada vez mais ênfase à importância dos benefícios decorrentes do consumo dos produtos de origem natural. Dado este interesse, e também como resultado da imensa variedade química e biológica associada a estes produtos, a ciência tem aumentado o foco neste tipo de matrizes naturais, sendo cada vez mais importante e de reconhecimento global, a exploração destes recursos.

A *Calluna vulgaris* (L.) Hull, vulgarmente conhecida por urze, é um arbusto que se encontra intensamente presente nas paisagens de várias regiões e é tradicionalmente utilizado no tratamento de diferentes patologias. Os estudos descritos na literatura demonstram o seu elevado conteúdo em compostos fenólicos, bem como o seu promissor potencial biológico.

Na presente dissertação as sumidades floridas de *C. vulgaris* foram caracterizadas relativamente ao seu valor nutricional, perfil químico e propriedades bioativas. Assim, numa primeira fase, procedeu-se à sua caracterização nutricional através da determinação do teor em cinzas, gorduras, proteínas, hidratos de carbono e do seu valor energético utilizando métodos oficiais de análise de alimentos (AOAC); foi também determinado o teor em ácidos gordos (GC-FID), ácidos orgânicos (UFLC-PDA), açúcares livres (HPLC-RI) e tocoferóis (HPLC-fluorescência).

Através da extração sucessiva por maceração à temperatura ambiente e sob vigorosa agitação, foram obtidos cinco extratos distintos, usando solventes orgânicos de polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol); foram também obtidos dois extratos aquosos por infusão e decocção, formas tradicionais de utilização da urze. O perfil fenólico de cada um destes extratos foi avaliado por HPLC-DAD-ESI/MS.

Os cinco extratos orgânicos e dois aquosos foram analisados relativamente à sua bioatividade (atividade antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antibacteriana). O potencial antioxidante foi avaliado através de dois métodos distintos: inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). As propriedades citotóxicas dos sete extratos foram estudadas em cinco linhas celulares tumorais humanas: AGS (adenocarcinoma gástrico), HeLa

(adenocarcinoma cervical), HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão); por sua vez, a citotoxicidade em células não tumorais foi avaliada numa cultura de células não tumorais: PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco). A atividade anti-inflamatória foi estudada utilizando uma linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7. A atividade antibacteriana foi avaliada através da técnica de microdiluição, juntamente com o método colorimétrico de detecção rápida com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT). Por último, e como resultado do potencial antibacteriano demonstrado, os extratos de metanol, acetona, infusão e decocção foram analisados no sentido de verificar o seu efeito em bactérias que fazem parte da microbiota vaginal.

Na análise da composição nutricional verificou-se que os hidratos de carbono são os macronutrientes maioritários, seguidos das proteínas, lípidos e cinzas. Os açúcares identificados foram a glucose e a frutose. Verificou-se também a presença de quatro ácidos orgânicos (ácido oxálico, quínico, ascórbico e cítrico), das quatro isoformas de tocoferóis e, finalmente, foram identificados 16 ácidos gordos.

Através da análise do perfil fenólico dos extratos das sumidades floridas da urze foram identificados 12 compostos fenólicos (2 ácidos fenólicos e 10 flavonoides). A miricetina 3-*O*-glucosido e a miricetina-*O*-ramnósido foram as moléculas maioritárias em todos os extratos, com exceção do extrato de diclorometano que não apresentou nenhum dos compostos fenólicos identificados. De uma forma geral, o teor de compostos fenólicos aumenta com o aumento do grau de polaridade do solvente de extração.

No que respeita às bioatividades, os resultados apresentam diferenças consoante o tipo de extrato: enquanto para a atividade antioxidante o extrato que se destacou foi o de acetona, para a citotoxicidade foi o de acetato de etilo, para a atividade anti-inflamatória o de *n*-hexano e para a atividade antibacteriana (bactérias patogénicas e pertencentes à microbiota urogenital) destacaram-se os extratos de acetona e metanol.

Como resultado do elevado potencial antibacteriano demonstrado pelo extrato de acetona, tanto para as bactérias patogénicas como para os *Lactobacillus* pertencentes à microbiota urogenital, este foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel através de um sistema de eluentes de polaridade crescente. As 10 frações obtidas foram caracterizadas relativamente ao seu perfil fenólico e às propriedades antibacterianas.

A análise do perfil fenólico das 10 frações resultou na identificação de 47 compostos fenólicos (1 ácido fenólico, 16 flavan-3-óis, 2 flavanonas e 24 flavanóis), dos quais os dímeros do tipo B da (epi)catequina, (-)-epicatequina e (+)-catequina revelaram ser os compostos maioritários.

Apesar de as frações não serem eficazes para todas as bactérias patogénicas e não serem todas beneficiadas com o fracionamento, revelaram eficácia contra alguns destes microrganismos sem afetar os *Lactobacillus* da microbiota vaginal, destacando-se as frações **7 e 8**.

O presente trabalho permitiu comprovar o potencial biológico associado a esta espécie, em particular e para algumas concentrações o seu potencial antibacteriano contra bactérias patogénicas e a capacidade de preservar a microbiota vaginal. Além disso, também se demonstrou que as formas tradicionais de consumo da mesma são as que revelam maior atividade antibacteriana, servindo de base científica para alertar o consumidor dos potenciais associados à utilização deste arbusto.

Resumen

En los últimos años se ha observado un incremento del interés y atención de la población en mejorar el estilo y la calidad de vida, dando cada vez más énfasis a la importancia de los beneficios derivados del consumo de productos de origen natural. Debido a este interés, y también como resultado de la inmensa variedad química y biológica asociada a estos productos, la ciencia y la industria ha unificado fuerzas y enfocado su interés en la explotación de estos recursos.

La *Calluna vulgaris* (L.) Hull, vulgarmente conocida por brezo, es un arbusto que se encuentra intensamente presente en los paisajes de varias regiones y es tradicionalmente utilizada en el tratamiento de diferentes patologías. Los estudios descritos en la literatura científica demuestran su alto contenido en compuestos fenólicos, así como su prometedor potencial biológico asociado a esta especie.

En la presente disertación, las sumidades floridas de *C. vulgaris*, se caracterizaron por su valor nutricional, su perfil químico y potencial bioactiva. Así, en una primera fase, se procedió a su caracterización nutricional mediante la determinación del contenido en cenizas, grasas, proteínas, hidratos de carbono y su valor energético utilizando métodos oficiales de análisis de comida (AOAC); se determinó el contenido en ácidos grasos (GC-FID), los ácidos orgánicos (UFLC-PDA), los azúcares libres (HPLC-RI) y los tocoferoles (HPLC-fluorescencia).

A través de la extracción sucesiva por maceración, a la temperatura ambiente y bajo una vigorosa agitación, se obtuvieron cinco extractos distintos, usando disolventes orgánicos de polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol); se obtuvieron dos extractos acuosos por infusión y decocción, formas tradicionales de utilización del brezo. El perfil fenólico de cada uno de estos extractos fue evaluado por HPLC-DAD-ESI/MS.

Los cinco extractos orgánicos y dos acuosos fueron evaluados en relación a su bioactividad (actividad antioxidante, citotóxica, anti-inflamatoria y antibacteriana). El potencial antioxidante fue evaluado a través de dos métodos distintos: inhibición de la peroxidación lipídica en tejidos cerebrales de cerdo (TBARS) y de la inhibición del hemólisis oxidativa (OxHLIA). Las propiedades citotóxicas de los distintos extractos se estudiaron en cinco líneas celulares tumorales humanas: AGS (adenocarcinoma gástrico), HeLa (adenocarcinoma cervical), HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7

(adenocarcinoma de mama) y NCI-H460 (carcinoma de pulmón); a su vez, la citotoxicidad en células no tumorales se evaluó en una cultura de células no tumorales: PLP2 (cultivo primario de células de hígado de cerdo). La actividad anti-inflamatoria fue estudiada en una línea celular de macrófagos de rata RAW 264.7. La actividad antibacteriana fue evaluada a través de la técnica de microdilución junto con el método colorimétrico de detección rápida con cloruro de *p*-yodonitrotetrazolio (INT). Por último, y como resultado del potencial antibacteriano demostrado, los extractos de metanol, acetona, infusión y decocción se evaluaron para comprobar su efecto en las bacterias que forman parte de la microbiota vaginal.

Con la evaluación de la composición nutricional, se verificó que los hidratos de carbono son los macronutrientes mayoritarios, seguido de las proteínas, lípidos e cenizas. Los azúcares identificados fueron la glucosa y frutosa. Se verificó también la presencia de cuatro ácidos orgánicos (ácido oxálico, quínico, ascórbico y cítrico), de los cuatro isoformas de tocoferoles y, finalmente, de 16 ácidos grasos.

El análisis del perfil fenólico de los extractos, fueron identificados 12 compuestos fenólicos (2 ácidos fenólicos y 10 flavonoides). La miricetina 3-*O*-glucosido y la miricetina-*O*-ramnósido fueron los compuestos presentes en mayor cantidad en todos los extractos, excepto en el extracto de diclorometano que no ha presentado ninguno de los compuestos fenólicos identificados. De forma general, el contenido en compuestos fenólicos es mayor cuanto mayor es el grado de polaridad del solvente de extracción.

En cuanto a las bioactividades, los resultados presentan diferencias según el tipo de extracto: mientras que para la actividad antioxidante el extracto destacado fue el de acetona, para la citotoxicidad fue el de acetato de etilo, para la actividad anti-inflamatoria el de *n*-hexano y para la actividad antibacteriana (bacterias patógenas y pertenecientes a la microbiota urogenital) los extractos de acetona y metanol.

Como resultado del elevado potencial antibacteriano demostrado por el extracto de acetona, tanto para las bacterias patógenas como para los *Lactobacillus* pertenecientes a la microbiota urogenital, el extracto fue fraccionado por cromatografía en columna de sílice gel a través de un sistema de eluentes de polaridad creciente. Las 10 fracciones obtenidas se fueron caracterizadas por su perfil fenólico y sus propiedades antibacterianas.

El análisis del perfil fenólico de las 10 fracciones resultó en la identificación de 47 compuestos fenólicos (1 ácido fenólico, 16 flavan-3-óis, 2 flavanonas y 24 flavanoles), de los cuales los dímeros del tipo B de la (epi)catequina, (-)-epicatequina y (+)-epicatequina revelaron mayor concentración.

Aunque las fracciones utilizadas no han sido eficaces para todas las bacterias patógenas, revelaron eficacia contra algunos de los microorganismos patógenos, sin afectar a los *Lactobacillus* de la microbiota vaginal, destacándose las fracciones **7** y **8**.

El presente trabajo permitió comprobar el potencial biológico asociado a esta especie, en particular y para algunas concentraciones, el potencial antibacteriano contra bacterias patógenas y la capacidad de preservar la microbiota vaginal. Además, también se ha demostrado que las formas tradicionales de consumo de la misma son las que revelan una mayor actividad antibacteriana, sirviendo de base científica para alertar al consumidor de los potenciales asociados a la utilización de este arbusto.

Abstract

In recent times, there has been an increase in the population interest in improving the quality of life, with emphasis on the importance of the benefits derived from the consumption of products from natural origin. Due to this fact, and also as a result of the immense chemical and biological variety associated to these products, science has been focused in these matrices, being the exploitation of these resources one of the global priorities.

Calluna vulgaris (L.) Hull, commonly known as heather, is a shrub that is intensely present in the landscapes of several regions and is traditionally used in the treatment of different pathologies. The scarce studies described in the literature demonstrate its high content in phenolic compounds, as well as the promising biological potential associated to this species.

In this present dissertation, the flowering summits of *C. vulgaris*, were characterized regarding their nutritional value, chemical profile and bioactive properties. In first stage, its nutritional characterization was performing by determining the ash, fats, proteins, carbohydrates and their energy content using official methods of food analysis (AOAC); fatty acids (GC-FID), organic acids (UFLC-PDA), free sugars (HPLC-RI) and tocopherols (HPLC-fluorescence) were also determined.

By successive extraction by maceration at room temperature and under vigorous stirring, five different extracts were obtained using organic solvents of increasing polarity (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol); two aqueous extracts were also obtained by infusion and decoction, traditional forms of heather use. The phenolic profile of each of these extracts was evaluated by HPLC-DAD-ESI / MS.

The five organic and two aqueous extracts were evaluated for their bioactivity (antioxidant, cytotoxic, anti-inflammatory and antibacterial activity). The antioxidant potential was evaluated through two different methods: inhibition of lipid peroxidation in brain tissues (TBARS) and inhibition of oxidative hemolysis (OxHLIA). The cytotoxic properties of the different extracts were studied in five human tumor cell lines: AGS (gastric adenocarcinoma), HeLa (cervical carcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma) and NCI-H460 (lung carcinoma); in turn, cytotoxicity in non-tumor cells was evaluated in a non-tumor cell line: PLP2 (primary culture of pig liver cells). Anti-inflammatory activity was studied

using a RAW 264.7 macrophage cell line. The antibacterial activity was evaluated by the microdilution technique, together with the colorimetric method of rapid detection with *p*-iodonitrotetrazolium chloride (INT). Finally, as a result of the antibacterial potential demonstrated, extracts of methanol, acetone, infusion and decoction were analyzed in order to verify their effect on bacteria that are part of the vaginal microbiota.

By the evaluation of the nutritional composition it was verified that carbohydrates are the main macronutrients, followed by the proteins, lipids and ashes. The sugars identified were fructose and glucose. The presence of four organic acids (oxalic, quinic ascorbic and citric acids), four tocopherol isoforms and, finally, 16 fatty acids were also present.

Regarding the phenolic profile of flower summits of heather extracts, twelve phenolic compounds (two phenolic acids and ten flavonoids) were identified. Myricetin 3-*O*-glucoside and myricetin-*O*-ramnoside were the main molecules found in all the tested extracts, except for dichloromethane extract where none of the identified phenolic compounds were identified. In general, the content in phenolic compounds increases with increasing degree of polarity of the extraction solvent.

Regarding the bioactivities, the results show differences according to the type of extract: while for the antioxidant activity the extract with higher activity was the acetone extract, for the cytotoxicity was the ethyl acetate, for the anti-inflammatory activity the extract of *n*-hexane, for antibacterial activity (pathogenic bacteria and urogenital microbiota) the extracts of acetone and methanol were highlighted.

As a result of the high antibacterial potential demonstrated by the acetone extract for both the pathogenic bacteria and the *Lactobacillus* belonging to the urogenital microbiota, the extract was fractionated by silica gel column chromatography through an eluent system of increasing polarity. The 10 fractions obtained were characterized with respect to their phenolic profile and the antibacterial potential.

Analysis of the phenolic profile of the 10 fractions resulted in the identification of 47 phenolic compounds (1 phenolic acid, 16 flavan-3-ol, 2 flavanones and 24 flavanols), of which type B (epi)catechin dimers, (-)-epicatechin and (+)-catechin showed higher concentration.

Although the fractions obtained were not effective for all pathogenic bacteria and not all benefited with the fractionation, they showed efficacy against some of the pathogenic microorganisms without affecting the *Lactobacillus* of the vaginal microbiota, specially fractions **7** and **8**.

The present work allowed to confirm the biological potential associated to this species, in particular and for some concentrations the antibacterial potential against pathogenic bacteria and the capacity to preserve the vaginal microbiota. In addition, it has also been demonstrated that the traditional forms of consumption of this plant are those that show greater antibacterial activity, serving as the scientific basis to alert the consumer of the potential associated with the use of this shrub.

Capítulo 1: Estado da arte

Neste capítulo é feita uma descrição dos estudos apresentados na literatura relativamente à *Calluna vulgaris* (L.) Hull. Os artigos encontrados abordam diferentes aspetos relacionados com esta espécie, quer a nível da sua composição fitoquímica, quer das propriedades bioativas testadas até ao momento da realização desta dissertação.

1. Estado da arte

1.1. Importância das plantas medicinais como fonte de novos compostos bioativos

A utilização de recursos naturais com fins terapêuticos é uma prática generalizada na medicina tradicional. Os nossos ancestrais recorriam à utilização destes produtos como forma de prevenção e tratamento das mais variadas patologias, devido ao elevado potencial biológico que lhes está associado (Lobo & Lourenço, 2007; Ramawat *et al.*, 2009; Shakya, 2016).

Os recursos naturais e, neste caso em particular, as plantas medicinais, são não só fonte de importantes biomoléculas alimentares, mas também de compostos com alto valor medicinal, como são exemplo os compostos fenólicos. Esta particularidade levantou interesse pela área dos produtos naturais, aumentando o número de estudos que conduziram ao seu reconhecimento como fontes de compostos de interesse farmacológico e, conseqüentemente, ao ressurgimento dos benefícios associados à sua exploração e utilização (Bernhoft, 2010; Fabricant & Farnsworth, 2001; Hooper & Cassidy, 2006).

Os medicamentos são, hoje em dia, um importante aliado na conservação e na manutenção do bem-estar, saúde e qualidade de vida dos Homens. A ausência de resultados terapêuticos satisfatórios, em alguns casos, é um dos problemas da medicina, contribuindo para a priorização da descoberta de fórmulas terapêuticas mais eficazes. Dado o potencial associado aos recursos naturais, muitas das tentativas de descoberta de novas moléculas bioativas têm por base diferentes tipos de matrizes naturais (Hooper & Cassidy, 2006; Ji *et al.*, 2016). Parâmetros como o conhecimento e importância etnobotânica e etnofarmacológica, resultantes da utilização na medicina tradicional, bem como artigos de revisão e experimentais, têm sido considerados na seleção das espécies a explorar (Chaveerach *et al.*, 2017; Shakya, 2016). O aumento do conhecimento nesta área, tem contribuído positivamente para a produção e procura de produtos à base de plantas, não só com aplicação a nível alimentar e farmacológico, mas também na cosmética e perfumaria (Chaveerach *et al.*, 2017; Fabricant & Farnsworth, 2001; Ji *et al.*, 2016).

A planta medicinal estudada no presente trabalho, a *C. vulgaris*, mais comumente designada por urze, tem variadas aplicações na medicina tradicional. Além disso, estudos científicos demonstram promissoras propriedades bioativas no tratamento de doenças como a hepatite C, o cancro, a diabetes e doenças do foro psicológico (Filip *et al.*, 2011a; García-Risco *et al.*, 2014; Ghareeb *et al.*, 2014; Jäger *et al.*, 2013; Olteanu *et al.*, 2014).

1.2. *Calluna vulgaris* (L.) Hull

1.2.1. Descrição botânica

A *Calluna vulgaris* (**Figura 1**) é um arbusto cuja altura, dependendo das zonas e condições climáticas, pode variar entre 20 e 100 cm. Pertence à ordem das *Ericales*, à família das *Ericaceae* e ao género *Calluna*, do qual é o único representante (Ghedira & Goetz, 2013; Jardim Botânico UTAD, 2018). Em 1753, Linnaeus incluiu a urze no género *Erica*, do qual foi excluída por Hull em 1808 devido a características que a diferenciavam das restantes espécies, entre elas as suas flores e o tamanho e disposição das folhas (Ghedira & Goetz, 2013).



Figura 1. Exemplar do arbusto *C. vulgaris* (esquerda) e da respetiva floração (direita).

Comumente conhecida por urze ou torga, encontra-se amplamente distribuída pela Europa e noroeste de África, tendo sido introduzida noutras partes do mundo como Austrália, Canadá e nos Estados Unidos da América. Em Portugal continental e no

arquipélago dos Açores é considerada uma espécie autóctone; por sua vez, no arquipélago da Madeira é uma espécie exótica, tendo acabado por se aclimatar (Neto & Simões, 2007).

A *C. vulgaris* é um arbusto de fácil propagação e característico de solos com pH ácido e reduzida abundância em nutrientes, encontrando-se largamente disseminada, tanto em regiões áridas, como em bosques ou pinhais, onde se encontra normalmente associada a outras espécies como as giestas e as estevas. Trata-se de uma espécie muito resistente, suportando secas, baixas temperaturas e a neve característica de zonas montanhosas (Jardim botânico UTAD, 2018; Neto & Simões, 2007).

Em geral, o tempo de floração decorre de fevereiro a novembro. Trata-se de uma planta arbustiva, com caules eretos e lenhosos; as suas folhas verdes são muito pequenas, têm entre 2,5 a 3,5 mm, são persistentes e decussadas (cruza-se um par com o seguinte formando um “X”), característica que a distingue do género *Erica*. As suas flores têm uma tonalidade rosa e são providas de órgãos de reprodução masculinos e femininos; as suas raízes são muito ramificadas e lenhosas, permitindo que se segurem eficazmente no solo (Ghedira & Goetz, 2013; Neto & Simões, 2007).

1.2.2. Importância etnofarmacológica e etnobotânica

A *C. vulgaris* é uma espécie com ampla utilização na medicina tradicional de vários países, estando descritas na literatura variadas aplicações que se encontram resumidas na **Tabela 1**.

Diferentes propriedades medicinais estão associadas a este arbusto, entre as quais, propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, antirreumáticas e diuréticas (Ghedira & Goetz, 2013; Jardim Botânico UTAD, 2018; Kumarasamy *et al.*, 2002).

A aplicação mais frequentemente descrita na medicina tradicional é no tratamento de problemas associados às vias urinárias, devido à sua ação diurética, depurativa e antisséptica (Ghedira & Goetz, 2013; Kumarasamy *et al.*, 2002; Monschein *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2009). Encontram-se igualmente relatadas aplicações tópicas para tratamento de problemas de pele como eczema, feridas, frieiras e acne, bem como para o alívio de dores reumáticas, artrite, reumatismo e problemas de gota (Neves *et al.*, 2009; Neto & Simões, 2007; Vostinaru *et al.*, 2018). A presença de taninos nesta espécie torna-a uma poderosa aliada no tratamento de constipações e da tosse, com ação

Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull

adstringente e colagoga (Jardim Botânico UTAD, 2018; Kumarasamy *et al.*, 2002; Monschein *et al.*, 2010).

Tabela 1. Aplicações etnofarmacológicas da *C. vulgaris*.

Indicações e propriedades terapêuticas	Parte da Planta	Via e forma de administração	Referências
Adstringente	Partes aéreas floridas		Jardim Botânico UTAD, (2018)
Artrite, reumatismo			Jardim Botânico UTAD, (2018)
Antidiarreico			Neto & Simões, (2007)
Anti-inflamatório			Jardim Botânico UTAD, (2018); Kumarasamy <i>et al.</i> , (2002)
Antissético	Partes aéreas floridas		Ghareeb <i>et al.</i> , (2014); Jardim Botânico UTAD, (2018)
Calmante		Infusão	Saaby <i>et al.</i> , 2009); Jäger <i>et al.</i> , (2013)
Cistite	Rebentos das flores	Infusão	Jardim Botânico UTAD, (2018)
Colerético e colagogo	Partes aéreas		Ghareeb <i>et al.</i> , (2014); Jardim Botânico UTAD, (2018)
Dores reumáticas e gota		Cataplasmas	Ghareeb <i>et al.</i> , (2014); Kumarasamy <i>et al.</i> (2002)
Diurético e depurativo	Partes aéreas floridas	Infusão	Neves <i>et al.</i> , (2009); Orhan <i>et al.</i> , (2007); Jardim Botânico UTAD, (2018)
Eczema		Aplicação tópica	Jardim Botânico UTAD, (2018); Neto & Simões, (2007)
Entorses	Rebentos das flores	Infusão	Jardim Botânico UTAD, (2018)
Expetorante	Partes aéreas floridas		Ghareeb <i>et al.</i> , (2014); Jardim Botânico UTAD, (2018); Kumarasamy <i>et al.</i> , (2002)
Frieiras		Cataplasmas	Jardim Botânico UTAD, (2018); Neto & Simões, (2007)
Infeções das vias urinárias		Infusão	Ghareeb <i>et al.</i> , (2014); Kumarasamy <i>et al.</i> , (2002); Orhan <i>et al.</i> , (2007)
Sedativo ligeiro	Partes aéreas floridas		Jardim Botânico UTAD, (2018)
Sudorífico	Partes aéreas floridas		Jardim Botânico UTAD, (2018)
Tratamento de feridas e infeções		Aplicação tópica	Ghareeb <i>et al.</i> , (2014); Kumarasamy <i>et al.</i> , (2002)
Tratamento de insónia			Jardim Botânico UTAD, (2018)
Tratamento de tosse e resfriados	Rebentos das flores	Infusão	Jardim Botânico UTAD, (2018)
Vasoconstritor	Partes aéreas floridas		Jardim Botânico UTAD, (2018)

Para além da sua aplicação para fins medicinais este arbusto é também utilizado devido aos seus atributos decorativos e ornamentais, para confeção de cordas, palha, vassouras e roupas de cama; as suas raízes eram utilizadas para fabrico de cachimbos (Ghareeb *et al.*, 2014; Ghedira & Goetz, 2013).

As flores e folhas desta planta são utilizadas como componente na produção de uma cerveja local escocesa – *William Bros Brewing Company*. Consta-se que esta é produzida há mais de 4 mil anos e que a junção de diferentes espécies de plantas origina o sabor amargo característico da cerveja, tendo sido empregue antes do surgimento do lúpulo (Deliorman-Orhan *et al.*, 2009).

1.3. Composição química da *C. vulgaris*

Extratos obtidos a partir de diferentes partes da *C. vulgaris* e resultantes de extrações sólido-líquido, revelaram ter na sua constituição uma grande variedade de classes de compostos bioativos, resultantes tanto do metabolismo primário, como do metabolismo secundário. São exemplo: as proteínas, os aminoácidos, os lípidos, os esteróis e os compostos fenólicos.

1.3.1. Aminoácidos

Starchenko & Grytsyk (2017) analisaram o conteúdo em aminoácidos de um extrato de água e ácido clorídrico concentrado (1:1 v/v) obtido a partir das partes aéreas da *C. vulgaris* nativa de uma região da Ucrânia.

Foram identificados 17 aminoácidos no extrato da *C. vulgaris*, são eles: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina e a valina.

A presença de alguns destes aminoácidos pode estar associada a propriedades farmacológicas demonstradas pelos extratos obtidos a partir desta espécie. Aminoácidos como por exemplo, o ácido glutâmico e o ácido aspártico desempenham funções de neurotransmissão e fazem parte da constituição da albumina e da globulina do sangue; a alanina, para além de ser uma fonte de energia para o cérebro, está também envolvida no metabolismo de açúcares e ácidos orgânicos, bem como na produção de anticorpos; a glicina é comumente prescrita no tratamento da depressão e do alcoolismo; por fim, a leucina desempenha um importante papel no processo de contração muscular (Starchenko & Grytsyk, 2017).

1.3.2. Lípidos

Os lípidos são um grupo de compostos orgânicos naturais solúveis em solventes orgânicos polares e insolúveis em água. Desempenham importantes funções, tanto como componentes estruturais, como no armazenamento de energia.

Esta classe de metabolitos compreende sub-classes como são os ácidos gordos, os esteróides e os triterpenóides. Diversos compostos pertencentes a estas sub-classes foram identificados em extratos da urze (**Tabela 2**).

Os ácidos oleanólico, ursólico, betunílico, e o lupeol são conhecidos devido ao potencial biológico demonstrado e, todos eles, foram encontrados, em maiores ou menores quantidades, nos extratos da *C. vulgaris* (Chudzik *et al.*, 2015; Salminen *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2013).

Ao examinarem o teor em compostos triterpênicos no extrato de clorofórmio das ceras cuticulares de flores e de folhas da *C. vulgaris*, Szakiel *et al.* (2012) identificaram o ácido ursólico como o composto triterpênico maioritário.

O ácido ursólico (**Figura 2**) tem diversos efeitos terapêuticos associados, nomeadamente a sua atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, apoptótica e hepatoprotetora (Kashyap *et al.*, 2016; López-Hortas *et al.*, 2018). Apesar dos mecanismos associados a estas propriedades não serem totalmente compreendidos, os autores acreditam que a sua atividade contra os radicais livres é a principal responsável pelos efeitos biológicos associados a este composto (López-Hortas *et al.*, 2018).

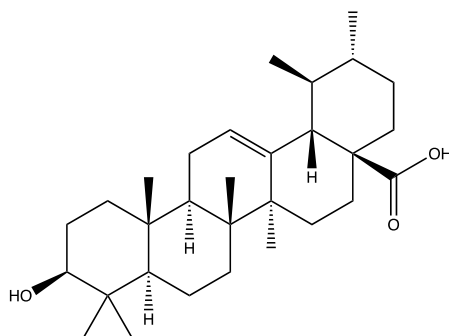


Figura 2. Ácido ursólico.

Nas folhas e flores, os compostos triterpênicos mais abundantes encontrados foram o lupeol e a friedelina, respetivamente (**Figura 3**) (Chudzik *et al.*, 2015). As principais propriedades biológicas associadas ao lupeol são: anti-inflamatório,

antimicrobiano e antitumoral (Gallo & Sarachine, 2009; Saleem, 2009), por sua vez, a friedelina demonstrou capacidades como a anti-inflamatória, analgésica e antipirética (Antonisamy *et al.*, 2011; Sunil *et al.*, 2013).

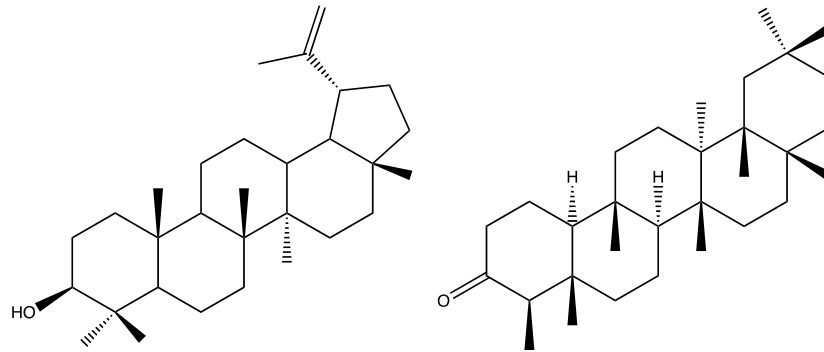


Figura 3. Lupeol (esquerda) e Friedelina (direita).

Os compostos pertencentes a estas subclasses e identificados nos extratos da *C. vulgaris* encontram-se sumariados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Lípidos identificados nos extratos da *C. vulgaris*.

Composto bioativo	Parte utilizada	Solvente de Extração	Método de análise	Referências
Ácidos Gordos				
Ácido mirístico	Flores			Olechnowicz-Stepien <i>et al.</i> , (1982)
Ácido esteárico				
Ácido α -linolénico				
Ácido linoleico				
Ácido palmítico				
Ácido ascórbico	Folhas	Ácido metafosfórico, 6% m/v		Jones & Hughes, (1983)
Ácido hexadecanóico	Flores	KOH, solução metanólica	GC-FID	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)
Ácido esteárico				
Ácido oleico				
Ácido araquídico				
Ácido beénico				
Triterpenóides				
Ácido oleanólico	Flores, folhas e raízes	Metanol/Diclorometano (polaridade crescente)	GC-MS	Pancost <i>et al.</i> , (2002)
α -Amirina				
β -Amirina				
Lupeol				
Taraxerol				
Taraxe-4-ona				
Ácido ursólico				
Ácido ursólico insaturado				
Ácido betulínico	Flores e folhas	Clorofórmio	GC-MS	Szakiel <i>et al.</i> , (2012)
Ácido 3-oxo-oleano-12-eno-28-óico				
Ácido 3-oxo-ursano-12-eno-28-óico				
Cicloartanol				
24-Metilenocicloartanol				
Friedelinol				

Germanicol				
Lupeol				
Taraxasterol				
Betulino				
Eritrodiol				
Uvaol				
α -Amirenona				
4-Epi-fridolina				
Fridolina				
Teraxerona				
<i>Esteróides</i>				
Campesterol	Flores e folhas	Clorofórmio	GC-MS	Szakiel <i>et al.</i> , (2012)
Colesterol				
Sitostanol				
Sitosterol				
Estigmasterol				
Estigmaste-3,5-dien-7-ona				
Estigmastano-3,6-diona				

1.3.3. Compostos fenólicos

O teor em compostos fenólicos na *C. vulgaris* tem sido extensivamente estudado. A literatura refere que os seus extratos possuem elevado conteúdo em compostos fenólicos, o qual pode ser influenciado pela época de colheita e da altitude a que esta se desenvolve (Allais *et al.*, 1991; Jalal *et al.*, 1982; Monschein *et al.*, 2010).

O elevado conteúdo em compostos fenólicos parece ser o responsável pela atividade antioxidante associada a esta espécie, bem como por algumas das restantes propriedades bioativas que exhibe, tais como são a atividade antibacteriana, anti-inflamatória e anticancerígena (Ferreira *et al.*, 2017; Ghareeb *et al.*, 2014).

Esta grande classe de compostos naturais subdivide-se em subclasses de diferente complexidade, como são os ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos), os flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, antocianidinas e isoflavonas), os taninos (taninos condensados e taninos hidrolisáveis), entre outros (lignanós, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antroquinonas, chalconas, ligninas) (Ferreira *et al.*, 2017).

1.3.3.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos identificados nos extratos obtidos a partir de diferentes partes da *C. vulgaris* e sob diversos métodos e solventes de extração, encontram-se compilados na **Tabela 3**.

Tabela 3 Ácidos fenólicos identificados nos extratos da *C. vulgaris*.

Composto bioativo	Parte utilizada	Extrato	Método de análise	Referências
Ácidos hidroxicinâmicos				
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico	Partes aéreas	Água e Água/Etanol	MS	Drózd et al., (2016a)
Ácido cafeico	Caules	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal et al., (1982)
Ácido ferúlico				
Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquinico				
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquinico	Partes aéreas	Acetato de Etilo	LC/PDA/ESI-MS, HPLC	Monschein et al., (2008)
Ácido <i>p</i> -cumaroilquinico				
Ácido <i>p</i> -cumárico				
Ácidos hidroxibenzóicos				
Ácido gentísico				Monschein et al., (2010)
Ácido protocatéquico				
Ácido siríngico				
Ácido vanílico				
Ácido quínico	Flores	Água, Etanol, Água/Etanol (50/50)	¹ H RMN, LC-MS	Rodrigues et al., (2018)
Fenóis				
Orcinol	Caules	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal et al., (1982)
Arbutina				S
Sakakina				
Rodiolinozida	Partes aéreas	Acetato de Etilo	LC/PDA/ESI-MS, HPLC	Monschein et al., (2008)
Hidroquinona			HPLC	Sticher et al., (1979)

O ácido 5-*O*-cafeiolíquinico é um dos ácidos fenólicos mais abundantes, ao qual estão associadas um conjunto de importantes propriedades biológicas, nomeadamente na proteção cardiovascular e diminuição dos níveis de açúcar no sangue, bem como propriedades antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas e antidiabéticas (Maalik *et al.*, 2016). Drózd *et al.* (2016a) avaliaram a presença deste composto nos extratos aquosos e hidroalcoólicos obtidos a partir das partes aéreas da *C. vulgaris* cultivada e selvagem, tendo verificado maiores rendimentos de extração nos extratos hidroalcoólicos, bem como com temperaturas de extração mais elevadas. Neste trabalho verificaram que as plantas selvagens apresentavam maior conteúdo de ácido 5-*O*-cafeiolíquinico ($1,52 \pm 0,029$ mg/g) que as cultivadas ($1,04 \pm 0,031$ mg/g) para o extrato hidroalcoólico.

Monschein *et al.* (2008) estudaram a composição química das partes aéreas da *C. vulgaris* e identificaram o ácido *p*-cumaroilquínico e a rodiolinozida (**Figura 4**) nesta espécie.

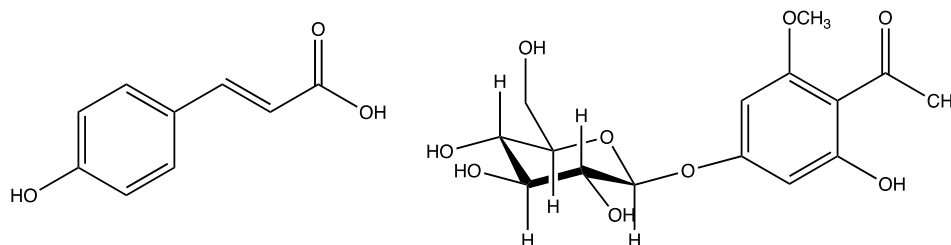


Figura 4. Ácido *p*-cumaroilquínico e rodiolinozida.

1.3.3.2. Flavonoides

Os flavonoides são a subclasse de compostos fenólicos mais frequentemente encontrados nas plantas, estando também presentes em frutas, com maior abundância na casca, em legumes, em diferentes tecidos das plantas e são também importantes constituintes de produtos como chá e vinho (Ferreira *et al.*, 2017; Lobo & Lourenço, 2007).

Os flavonoides são normalmente divididos em diferentes subclasses como são os flavan-3-óis, flavonas, flavanonas, antocianinas, flavonóis e isoflavonóis. Estes são

compostos naturais amplamente estudados devido às propriedades medicinais, nomeadamente antioxidantes, anticancerígenas, antivirais, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, entre outras (Ferreira *et al.*, 2017).

Nos extratos obtidos a partir de distintas partes de *C. vulgaris*, foram encontrados vários flavonoides, os quais se encontram sumariados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Flavonoides identificados nos extratos de *C. vulgaris*.

Composto bioativo	Parte utilizada	Extrato	Método de análise	Referências
Flavonas glicosidas				
Apigenina 7-(2-acetil-6-metilglucuronida)	Flores	Acetona		Allais <i>et al.</i> , (1991)
Apigenina hexuronolactona	Partes aéreas	Acetato de Etilo	LC/PDA/ESI-MS, HPLC	Monschein <i>et al.</i> , (2008)
Flavonóis				
Tricetina (5,7,3',4',5'-penta-hidroxi flavona)	Flores	Etanol/Água	HPLC/MS	Drózd <i>et al.</i> , (2016a)
Canferol	Caules, flores	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal <i>et al.</i> , (1982)
Miricetina				
Quercetina				
Herbacetina				
Isoscutelareína		Etanol	Cromatografia, UV, IR	Shelyuto <i>et al.</i> , (1975)
Flavonóis glicosidos				
Isoramnetina 3- <i>O</i> -galactósido	Partes aéreas			Monschein <i>et al.</i> (2010)
Canferol 3- <i>O</i> -glucósido	Caules, raízes, partes aéreas	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal <i>et al.</i> , (1982)
Quercetina 3- <i>O</i> -arabinose				
Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido				
Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido				
Canferol 3- <i>O</i> -arabinose				
Canferol deoxihexósido	Flores	Água, Etanol, Água/Etanol (50/50 v/v)	¹ H RMN, LC-MS	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)
Canferol 3- <i>O</i> -diacetilarabino-hexósido	Partes aéreas	Acetato de Etilo	LC/PDA/ESI-MS, HPLC	Monschein <i>et al.</i> (2008)
Tilirósido				
Canferol 3- <i>O</i> -galactósido	Caules, flores	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal <i>et al.</i> (1982)
Canferol 3-[2'',3'',5'''-triacetil- α -L-arabinofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucósido]	Flores	Acetona		Allais <i>et al.</i> , (1991)
Canferol 3-[2'',3'',4'''-triacetil- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucósido]				
Canferol -3- <i>O</i> - β -D-galactósido		Etanol	LC/DAD/MS	Deliorman-Orhan <i>et al.</i> , (2009)
3-Metoxi-5,7-di-hidroxi flavona 7- <i>O</i> -glucósido	Flores			Monschein <i>et al.</i> , (2010)
Herbacetina 8- <i>O</i> -gentiobiósido	Flores, caules e raízes			

Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull

Herbacetina 4'- <i>O</i> -glucósido	Partes aéreas			
Herbacetina 8- <i>O</i> -glucósido	Flores, caules e raízes			
Quercetina 3- <i>O</i> -arabinose				
Quercetina 3- <i>O</i> -diacetilarabino-hexósido	Partes aéreas	Acetato de Etilo	LC/PDA/ESI-MS, HPLC	Monschein <i>et al.</i> , (2008)
Quercetina 3- <i>O</i> -monoacetilarabino-hexósido				
Quercetina 3- <i>O</i> -tetraacetilarabino-hexósido				
Quercetina 3-[2'',3'',5'''-triacetil- α -L-arabinofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucósido]	Flores	Acetona		Simon <i>et al.</i> , (1993b)
Quercetina 3-[2'',3'',4'''-triacetil- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactósido]				Simon <i>et al.</i> , (1994)
Quercetina 3-[2'',3'',5'''-triacetil- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucósido]				Simon <i>et al.</i> , (1993a)
Di-hidroflavonóis				
Di-hidroherbacetina	Caules, raízes e partes aéreas	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal <i>et al.</i> , (1982)
Di-hidroflavonóis glucósidos				
2''-Acetilcalunina	Flores	Acetona	HPLC, UV, ¹ H e ¹³ C RMN	Allais <i>et al.</i> , (1995)
3-Desoxicalunina				
Taxifolina 3- <i>O</i> -glucósido	Flores			Monschein <i>et al.</i> , (2010)
Calunina	Caules, raízes e partes aéreas	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal <i>et al.</i> , (1982)
Flavanonas				
3,5,7,tetrahidroxi-4'-metoxi-flavanona 8-deoxihexosido	Flores	Água, Etanol, Água/Etanol (50/50 v/v)	¹ H RMN, LC-MS	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)
Catequinas, Procianidinas e Antocianidinas				
(+)-catequina	Caules, raízes e partes aéreas	Metanol/Água	UV, ¹ H RMN	Jalal <i>et al.</i> , (1982)
(-)-epicatequina				
Procianidina A ₂				
Procianidina B ₁				

Procianidina B ₂				
Procianidina B ₃				
Procianidina B ₄				
Procianidina B ₅				
Procianidina C ₁				
Procianidina D ₁				
Cianidina 3- <i>O</i> -glucósido	Flores	Acetona	HPLC, UV, ¹ H e ¹³ C RMN	Allais <i>et al.</i> , (1995)
Trímero de proantocianidina	Flores	Água, Etanol, Água/Etanol (50/50 v/v)	¹ H RMN, LC-MS	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)
Tetrâmero de proantocianidina				

Vários autores estudaram a constituição fitoquímica de diferentes extratos obtidos a partir dos constituintes da *C. vulgaris*, fazendo referência aos elevados teores em flavonoides como o canferol e a quercetina (**Figura 5**) (Jalal *et al.*, 1982), a mircetina (Allais *et al.*, 1991) e aos di-hidroflavonóides taxifolina-3-*O*-glucósido e calulina (Allais *et al.*, 1995; Monschein *et al.*, 2010).

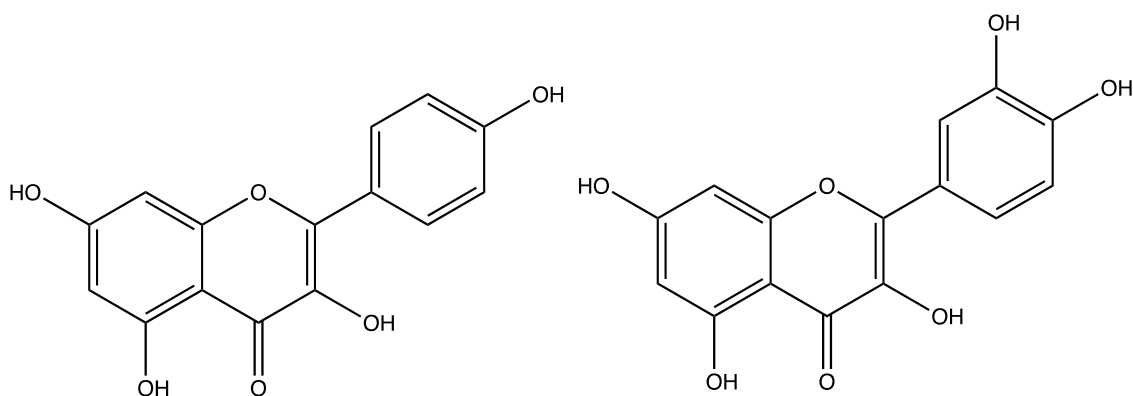


Figura 5. Canferol e quercetina.

1.4. Propriedades bioativas da *C. vulgaris*

Diversos estudos recorreram a diferentes técnicas e métodos para avaliar algumas das propriedades bioativas pelas quais a *C. vulgaris* é tradicionalmente conhecida e utilizada. Estes trabalhos pretendem não só comprovar cientificamente essas propriedades, mas também procuram identificar os compostos químicos responsáveis pelas mesmas.

Diferentes solventes e técnicas de extração foram utilizados para a obtenção de extratos a partir de diferentes constituintes deste arbusto e com diversas proveniências. Nos pontos seguintes são descritos os principais resultados e conclusões.

1.4.1. Atividade antibacteriana

As opções de agentes antimicrobianos eficientes são cada vez mais escassas devido ao facto de as estirpes bacterianas terem capacidade de desenvolver mutações genéticas que, ao serem transmitidas às gerações seguintes, levam a que os antibióticos deixem de ser eficientes. A Organização Mundial de Saúde considera esta temática uma das mais preocupantes na área da saúde, incitando à procura de agentes antibacterianos ainda não existentes no mercado (Enioutina *et al.*, 2017; Tacconelli *et al.*, 2018).

Tendo em conta o potencial associado aos recursos naturais e ao facto de se tratar de uma área ainda pouco explorada atendendo à enorme quantidade e variedade de espécies vegetais presentes no nosso planeta, estes recursos têm vindo a ser cada vez mais alvo de atenção, podendo ser uma fonte de novas soluções para este grave problema de saúde pública (Moloney *et al.*, 2016; Ramawat *et al.*, 2009; Tacconelli *et al.*, 2018).

Na **Tabela 5** encontram-se resumidos os ensaios realizados para avaliar a capacidade antibacteriana associada aos distintos extratos da *C. vulgaris*.

Tabela 5. Atividade antibacteriana dos extratos de *C. vulgaris*.

Microrganismo	Parte utilizada	Extrato	Resultados	Referências
Bactérias Gram-positivas				
<i>Mycobacterium aurum</i> ^a	Partes aéreas	Etanol, <i>n</i> -hexano, <i>n</i> -butanol, Diclorometano	CMI > 512 µg/mL	Gordien <i>et al.</i> , (2010)
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	Sementes	Metanol	CMI = 0,10 mg/mL	Kumarasamy <i>et al.</i> , (2002)
<i>Staphylococcus hominis</i> ^a			CMI = 0,10 mg/mL	
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	Folhas	Etanol	14 mm de inibição	Pavlović <i>et al.</i> , (2014)
<i>Bacillus subtilis</i> ^a			13,75 mm de inibição ^e	
<i>Enterococcus faecales</i> ^a	Flores e folhas	Água	CMI = 10 mg/mL	Vučić <i>et al.</i> , (2014)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^c	Flores	Água, Etanol, Água/Etanol (50/50 v/v)	CMI = 2,0 – 10,8 mg/mL	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{a,c}			CMI = 2,0 – 21,6 mg/mL	
MRSA			CMI = 2,0 – 43,2 mg/mL	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a			CMI > 8,5, 35 e 43,2 mg/mL	
<i>Klebsiella pneumonia</i> ^a			CMI > 8,5, 35 e 43,2 mg/mL	
Bacterias Gram-negativas				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ^{a, b}	Raízes	Éter de petróleo	4 cm de inibição ^d	Ghareeb <i>et al.</i> , (2014)
<i>Erwinia Sp</i> ^{a, b}			2,5 cm de inibição ^d	
<i>Klebsiella pneumonia</i> ^a			3 cm de inibição ^d	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a			2,8 cm de inibição ^d	
<i>Escherichia coli</i> ^a	Flores e folhas	Água	CMI = 10 mg/mL	Vučić <i>et al.</i> , (2014)
<i>Proteus vulgaris</i> ^a			CMI = 2,5 mg/mL	
<i>Escherichia coli</i> ^{a,c}	Flores	Água, Etanol, Água/Etanol (50/50 v/v)	CMI = 2,0 – 10,8 mg/mL	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)
Gram variável				
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ^a	Partes aéreas	<i>n</i> -hexano, Acetato de etilo, Metanol	22-97 % inibição ^f	Gordien <i>et al.</i> , (2010)

^a Culturas de bactérias de referência; ^b Agente patogénico de plantas; ^c Bactéria isolada clinicamente; ^d Concentração testada de 0,23 g/mL ^e Concentração testada de 10, 20 e 40 % de extrato; ^f Concentração testada de 100 µg/mL. CMI – concentração mínima inibitória. MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Na generalidade todos os extratos testados revelaram atividade antimicrobiana moderada, com resultados mais ou menos promissores dependendo do tipo de extrato e da parte da planta em estudo.

Extratos de metanol, *n*-hexano e diclorometano de sementes da *C. vulgaris* nativas da Escócia foram testados contra onze espécies bacterianas patogênicas (Kumarasamy *et al.*, 2002); apenas o extrato metanólico apresentou atividade antibacteriana e contra dois tipos de bactérias testadas, não evidenciando atividade contra *Escherichia coli* (Vučić *et al.*, 2014). Este fato pode estar relacionado com uma maior concentração de compostos com atividade antibacteriana nas partes aéreas, raízes ou rizomas da planta e não nas sementes (Kumarasamy *et al.*, 2002).

Ghareeb *et al.* (2014) demonstraram que extratos de raízes de *C. vulgaris* tiveram um efeito significativo contra bactérias patogênicas em comparação com os demais extratos testados (**Tabela 5**); foi a única planta com atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* em todas as concentrações testadas. Estes extratos também evidenciaram atividade contra *Mycobacterium aurum* e *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno humano associado a um problema de saúde global e a segunda causa infecciosa de morte no mundo, a tuberculose (Gordien *et al.* 2010; Talbot & Raffa, 2015). Apesar de apresentar atividade contra as duas estirpes bacterianas estudadas, o extrato de acetato de etilo das partes aéreas de *C. vulgaris* foi o extrato mais promissor contra o *M. tuberculosis*.

Os resultados obtidos por diversos grupos de investigação sugerem que *C. vulgaris* pode ser usada como agente antimicrobiano, dando suporte científico para o uso desta espécie na medicina popular.

1.4.2. Atividade antioxidante

O stress oxidativo está diretamente associado à maioria dos problemas de saúde atuais. Compostos com atividade antioxidante são um potente auxiliar no combate a inúmeras patologias que prejudicam a qualidade de vida e a saúde do ser humano (Carocho *et al.*, 2018; Ghareeb *et al.*, 2014).

A atividade antioxidante demonstrada pela *C. vulgaris* proveniente de várias regiões do planeta encontra-se descrita na **Tabela 6**. Os autores avaliaram esta atividade através de diferentes metodologias e diferentes extratos.

Tabela 6. Ensaio da atividade antioxidante da *C. vulgaris*.

Parte Utilizada	Solvente de Extração	Metodologia	Resultados	Referencias	
Partes aéreas	<i>n</i> -hexano, Clorofórmio, Metanol, Acetato de Etilo e Água	DPPH (%)	Com atividade ^a	Callisle <i>et al.</i> , (2001)	
		Etanol	DPPH (%) ^b	13,2 – 85,7	Deliorman-Orhan <i>et al.</i> , (2009)
		Poder quelante (%) ^b	10,5 – 20,4		
		H ₂ O ₂ (%) ^b	5,2 – 84,2		
		O ₂ ⁻ (%) ^b	3,3 – 95,0		
	Água, Etanol, Acetato de Etilo, Etanol/Água (60/40 v/v)	DPPH (mM/g dw)	0,058 – 1,43	Drózdź <i>et al.</i> , (2017)	
		CUPRAC (mM/g)	6,7 – 12,2		
		Poder quelante (%)	2,9 – 30,3		
	Etanol	DPPH (IC ₅₀ , mmol GA Eq/mmol)	0,211	Filip <i>et al.</i> , (2012); Filip <i>et al.</i> , (2011b)	
		ABTS (eq. mM Trolox)	38,92		
Flores	80% aq MeOH	Oxidação do MeLo (% inibição)	95 e 93 respectivamente	Kähkönen <i>et al.</i> , (1999)	
	Etanol/Água (60/40 v/v) e água	DPPH	Com atividade ^a	Drózdź <i>et al.</i> , (2016a)	
		Poder redutor (mg GA/g dw)	75,7 – 89,1	Drózdź <i>et al.</i> , (2016b)	
	Etanol/Água (60/40 v/v)	DPPH (mg TR/g dw)	5,63 – 7,60		
		Líquidos iônicos: Cl ⁻ , BF ₄ ⁻ , PF ₆ ⁻	DPPH (mmol TR/g)	0,04 – 0,15	Drózdź & Pyrzyńska, (2018)
		CUPRAC (mmol TR/g)	7,0 – 13,4		
Folhas	80% aq MeOH	DPPH (IC ₅₀ , µg/mL)	7,5 – 9,4	Rieger <i>et al.</i> , (2008)	
Flores	Água, Etanol e Etanol/Água (50/50 v/v)	DPPH (µmol TE/g dw)	15 - 52	Rodrigues <i>et al.</i> , (2018)	
		FRAP (µmol CE/g)	635 - 2138		
Material vegetal	Etanol	DPPH (IC ₅₀ , µg/mL)	12	Pavlocic <i>et al.</i> , (2009)	
Sementes	Metanol	ABTS (mg/mL)	0,064	Kumarasamy <i>et al.</i> , (2007)	
		FRAP (µmol Fe ²⁺ /g)	3,32		
Raízes	Éter de Petróleo	DPPH (% atividade) ^d	80	Ghrareeb <i>et al.</i> , (2014)	
		TBARS (% inibição) ^d	64,1		

^a Resultados apresentados sob a forma de gráficos; ^b Concentrações testadas – 25, 50, 100, 500, 1000, 2000 µg/mL; ^d Concentração testada – 100 µg/mL. IC₅₀ - concentração de extrato que inibe em 50% a atividade.

Vários métodos *in vitro* foram utilizados para avaliar o potencial antioxidante da urze; a maioria das avaliações utilizou o teste de atividade captadora de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), mas também métodos como FRAP - poder antioxidante redutor de ferro, ORAC - atividade de absorção de radicais de oxigênio, CUPRAC – capacidade redutora cúprica, TBARS - inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ensaios ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) e atividade quelante de metais. A maioria dos estudos utilizou extratos de partes aéreas, como são exemplo as folhas, os caules e as flores; extratos de sementes e raízes foram menos utilizados.

A correlação entre os teores de flavonoides, compostos fenólicos e a capacidade antioxidante das plantas tem sido amplamente descrita na literatura, tendo sido demonstrada uma correlação positiva entre o aumento da capacidade antioxidante e o teor em compostos fenólicos (Drózdź *et al.*, 2016b; Drózdź *et al.*, 2018; Kähkönen *et al.*, 1999). O conteúdo em compostos fenólicos pode ser modificado pelo *habitat* e pelas condições ambientais às quais as espécies são submetidas ao longo do seu desenvolvimento (Jalal *et al.*, 1982; Monschein *et al.*, 2010; Rieger *et al.*, 2008).

A análise da influência da altitude na capacidade antioxidante de extratos de folhas de *C. vulgaris* nativas da Áustria mostrou que os valores de IC₅₀ no ensaio de DPPH diminuem com a altitude, o que pode ser justificado pela menor concentração de espécies anti-radicalares (Rieger *et al.*, 2008). Além disso, a comparação entre os extratos obtidos de partes aéreas da urze cultivada e silvestre nativa da Polónia permitiu verificar que a amostra cultivada apresentou resultados mais promissores; essa evidência pode estar relacionada com as técnicas agrícolas atuais, que permitem controlar o desenvolvimento da planta (Drózdź *et al.*, 2016a; Drózdź *et al.*, 2016b; Drózdź *et al.*, 2017).

A comparação entre extratos obtidos a partir de diferentes constituintes da *C. vulgaris* e extratos de outras espécies vegetais, revelou um maior conteúdo em compostos fenólicos (Ghareeb *et al.*, 2014; Kähkönen *et al.*, 1999; Rieger *et al.*, 2008), uma atividade antioxidante mais promissora e menor tempo de reação redox (Kähkönen *et al.*, 1999; Perde-Schrepler *et al.*, 2011).

Deliorman-Orhan *et al.* (2009) isolaram o principal componente da fração de acetato de etilo, identificando-o como canferol-3-*O*- β -D-galactósido (**Figura 6**). Este composto pode contribuir para a alta capacidade antioxidante associada a esta planta.

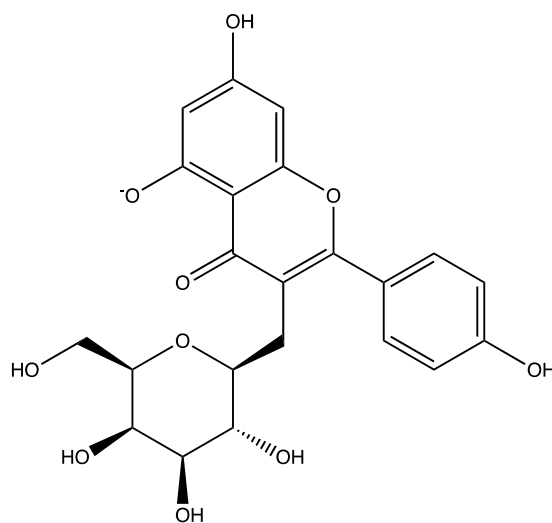


Figura 6. Canferol-3-O-β-D-galactósido.

Recentemente, Drózdź *et al.* (2018) descreveram, pela primeira vez, o uso de líquidos iônicos para a extração de flores da *C. vulgaris* e avaliaram a capacidade antioxidante associada. Este estudo permitiu verificar que o extrato líquido de Cl⁻ iônico foi o mais efetivo tanto na atividade de eliminação do radical DPPH quanto no poder redutor; esta evidência pode estar relacionada com o alto teor de flavonoides encontrados neste extrato.

As diferenças entre os resultados da atividade antioxidante podem ser justificadas pelos diferentes métodos de extração utilizados a proveniência e origem das matrizes estudadas, bem como pelo solvente de extração.

1.4.3. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta a agressões ao nosso sistema imunitário. Muitas substâncias com potencial anti-inflamatório, como são exemplo os compostos fenólicos, os ácidos gordos e as vitaminas, são encontrados em plantas, algas, cogumelos e outros recursos naturais, o que faz com que sejam importantes aliados na manutenção do nosso sistema imunológico (Bernstein *et al.*, 2018; Fernando *et al.*, 2016; Taofiq *et al.*, 2016).

A atividade anti-inflamatória da *C. vulgaris* não é amplamente conhecida. A maioria dos estudos descritos na literatura resulta de ensaios *in vitro*, sendo muito escassos os testes com linhas celulares. Tem sido descrito que extratos dessa espécie são fonte de compostos triterpênicos, como o ácido ursólico e oleanólico, que têm sido

objeto de vários estudos devido o potencial anti-inflamatório (Chudzik *et al.*, 2015; Szakiel *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2013).

Orhan *et al.* (2007) fracionaram o extrato etanólico obtido a partir das partes aéreas da urze e avaliaram a capacidade anti-inflamatória das frações resultantes, através do teste de edema da pata traseira em ratos albinos suíços, tendo isolado um composto fenólico, o canferol-3-*O*- β -D-galactósido, como responsável pela atividade anti-inflamatória.

Tunón *et al.* (1995) realizam ensaios *in vitro*, que lhes permitiu isolar e identificar o ácido ursólico como responsável desta propriedade, devido à capacidade de inibir a biossíntese de prostaglandinas e da 5-lipooxigenase. Por sua vez, Ghareeb *et al.* (2014) utilizaram hemácias e verificaram que o elevado teor em compostos como flavonoides, taninos e triterpenos é um fator diferenciador para que sejam verificadas diferenças significativas entre a atividade anti-inflamatória da *C. vulgaris* e de outras espécies. Rodríguez *et al.* (2015) utilizaram uma linha celular de macrófagos diferenciados a partir de monócitos (THP-1), para avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos etanólicos, aquosos e de *n*-hexano obtidos a partir das flores e folhas e não encontraram qualquer relação entre o conteúdo de ácidos triterpênicos e a atividade anti-inflamatória.

1.4.4. Atividade citotóxica

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, pelo que é de extrema importância a procura de novas terapêuticas e de compostos promissores para o seu tratamento.

Tal como foi referido anteriormente, os extratos de *C. vulgaris* são uma importante fonte de compostos triterpênicos, principalmente ácidos ursólico e oleanólico. Estes ácidos triterpênicos têm sido muito estudados devido às diversas propriedades biológicas que têm demonstrado, entre as quais a atividade citotóxica (Chudzik, *et al.*, 2015; Szakiel, *et al.*, 2012; Yan, *et al.*, 2014).

A influência que os diferentes extratos têm na proliferação de células cancerígenas foi avaliada através de ensaios *in vivo* e de ensaios *in vitro*. A maioria dos estudos *in vivo* foram levados a cabo com ratos SHK-1, através da avaliação da influência que os extratos têm na multiplicação das células cancerígenas e no processo inflamatório após exposição da pele a múltiplas doses de radiação UVB (Callisle *et al.*,

2001). Foi verificado que os extratos protegem a pele, não só pela diminuição da produção de espécies citotóxicas (Filip *et al.*, 2011a; Filip, *et al.*, 2011b), mas também pela diminuição de danos na mesma (Filip *et al.*, 2012), redução da inflamação e dos danos no ADN (Olteanu *et al.*, 2012).

Células endoteliais vasculares (HUVECs) e queratinócitos humanos (HaCaT) foram utilizados na avaliação da atividade citotóxica usando extratos etanólicos. Para as primeiras células, a concentração de 2,5 µg/mL de extrato, provocou um aumento das defesas antioxidantes, protegeu o ADN de danos diminuindo a morte celular (Olteanu *et al.*, 2014); por sua vez, para os queratinócitos humanos, os extratos revelaram ter um comportamento de agente fotoprotetor, diminuindo o stress oxidativo, os danos causados no ADN e aumentando a taxa de sobrevivência das células (Perde-Schrepler, *et al.*, 2011; Virág, *et al.*, 2015)

Callisle *et al.* (2001) avaliaram, numa linha celular de células de melanoma de ratos (B16), a atividade antiproliferativa de extratos de sete plantas medicinais distintas entre as quais a *C. vulgaris*. Os extratos foram obtidos com solventes de polaridade crescente: *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etilo, metanol e água. Constataram que o extrato de clorofórmio, obtido a partir das partes aéreas da *C. vulgaris* comercial, revelou ser o mais ativo comparativamente com os demais, inibindo mais de 75% das células cancerígenas, enquanto os extratos metanólico e aquoso apresentaram a menor capacidade antiproliferativa.

1.4.5. Outras atividades

Foram igualmente estudadas propriedades como a antinocicetiva, antivírica e de inibição enzimática.

Para avaliar a capacidade antinocicetiva da urze, Orhan *et al.* (2007) utilizaram ratos albinos suíços e o teste de contração abdominal induzida por *p*-benzoquinona, e avaliaram a atividade associada às diferentes frações obtidas após fracionamento do extrato etanólico das partes aéreas da *C. vulgaris* nativa da Turquia. Das frações testadas: acetato de etilo, clorofórmio e *n*-butanol, a primeira revelou a maior percentagem de inibição quando comparada com as de clorofórmio e *n*-butanol.

Também o potencial contra o vírus causador da hepatite C foi avaliado: foram utilizadas flores e folhas deste arbusto para obter extratos aquosos, etanólicos e de *n*-

hexano. Ensaios *in vitro* permitiram concluir que quanto maior a concentração de ácidos triterpênicos, entre os quais o ácido ursólico e o ácido oleanólico, maior é a atividade antivírica associada (García-Risco, et al., 2014; Rodríguez, 2015).

Por fim, os extratos de *C. vulgaris* foram testados contra enzimas como a acetilcolinesterase, a monoaminoxidase A e a α -glicosidase. A acetilcolinesterase é responsável por catalisar a reação de hidrólise da acetilcolina em colina e num grupo acetilo. A deficiência em acetilcolina é característica da doença de Alzheimer. Os melhores resultados obtidos no tratamento desta doença, foram obtidos através do aumento da concentração do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses recorrendo a medicamentos que inibem a sua hidrólise, os quais têm revelado vários efeitos adversos, como por exemplo hepatotoxicidade (Ferreira, et al., 2006). Das três plantas Escocesas testadas por Ghareeb et al. (2014), o extrato obtido com éter de petróleo utilizando as raízes de *C. vulgaris* revelou maior capacidade para inibir a acetilcolinesterase, tendo-se verificado que quanto maiores as concentrações de extrato testadas, maior a capacidade de inibição da acetilcolinesterase.

A monoaminoxidase A (MAO-A) é uma enzima presente no sistema nervoso, fígado e trato gastrointestinal, a sua função no sistema nervoso é inativar o excesso de neurotransmissores, especificamente monoaminas (dopamina, epinefrina e serotonina). Os inibidores desta enzima são utilizados no tratamento de depressão através do impedimento da degradação dos neurotransmissores e, conseqüentemente o seu aumento nos neurónios. Os extratos metanólicos obtidos a partir das partes aéreas da *C. vulgaris* obtidas na Escócia, foram avaliados relativamente à sua capacidade de inibição da MAO-A tendo-se isolado a quercetina como composto responsável por esta atividade e, conseqüentemente, pelo efeito calmante associado ao uso tradicional desta planta (Jäger, et al., 2013; Saaby, et al., 2009).

Ghareeb et al. (2014) testaram extratos de três espécies de plantas para inibir a α -glicosidase, enzima que aumenta a taxa de absorção da glicose, tendo verificado que a inibição é maior quanto maior a concentração de extrato. O extrato das raízes da *C. vulgaris* revelou capacidade de inibição desta enzima, com um IC₅₀ de $14 \pm 1,7$ μ g/mL (Bothon, et al., 2013; Ghareeb, et al., 2014).

2. Objetivos

A realização deste trabalho de dissertação teve como principal objetivo a avaliação de um conjunto de parâmetros químicos e propriedades biológicas da urze através de diferentes técnicas e métodos científicos.

A planta escolhida foi obtida comercialmente e submetida a estudos de caracterização química e de avaliação do seu potencial biológico.

Para a sua caracterização nutricional foram determinados o teor proteico, teor em cinzas, gorduras, açúcares, tocoferóis e o valor energético através de procedimentos AOAC (Associação Oficial de Químicos Analíticos). Os ácidos gordos foram identificados e quantificados individualmente por GC-FID, os ácidos orgânicos por UFLC-DAD, os açúcares livres foram analisados por HPLC-RI e, finalmente, os tocoferóis por HPLC-fluorescência.

Os extratos testados foram obtidos a partir de uma mistura homogênea das sumidades floridas trituradas, recorrendo a diferentes técnicas de extração: maceração, decocção e infusão. Para obtenção dos extratos orgânicos o método de extração utilizado foi a maceração com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol); por sua vez, para a obtenção dos extratos aquosos, recorreu-se a técnicas de decocção e infusão, métodos utilizados na medicina tradicional. O perfil fenólico dos sete extratos obtidos foi analisado por HPLC-DAD-ESI/MS.

As propriedades bioativas de cada um dos extratos foram também elas avaliadas:

- A avaliação da atividade antioxidante através de dois métodos: capacidade de inibição da peroxidação lipídica, através da formação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela capacidade de inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA);
- Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas e numa cultura primária de células não tumorais utilizando o ensaio da sulfarrodamina B;
- Atividade anti-inflamatória usando uma linha de macrófagos de rato;
- Atividade antibacteriana em bactérias patogénicas através do método da microdiluição juntamente com o método colorimétrico de deteção rápida com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT);

- Por fim, para os extratos com melhores resultados de atividade antibacteriana, foi avaliada a atividade antibacteriana em *Lactobacillus* pertencentes à microbiota vaginal.

Como resultado do potencial antibacteriano demonstrado por alguns dos extratos orgânicos e aquosos das sumidades floridas da *C. vulgaris* e dado o reduzido tempo disponível só foi possível o fracionamento de apenas um extrato. O extrato de acetona, que revelou ser um dos mais ativos, foi fracionado através de uma coluna cromatográfica e as 10 frações obtidas foram caracterizadas quimicamente, através de métodos cromatográficos e de espectrometria de massa, e a sua atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas e não patogênicas (*Lactobacillus* pertencentes à microbiota vaginal) foi também avaliada.

Capítulo 2: Procedimento Experimental

No capítulo II encontram-se descritos todos os procedimentos experimentais utilizados para o processo de extração das sumidades floridas da urze com diferentes solventes orgânicos e também métodos de utilização tradicional: decocção e infusão.

Estão igualmente descritas as técnicas utilizadas para a identificação e quantificação da composição química desta espécie, dos seus extratos e das frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona, bem como o procedimento de fracionamento em coluna cromatográfica. As diferentes propriedades bioativas associadas aos extratos orgânicos e aquosos, bem como das frações do extrato de acetona, nomeadamente as atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e a atividade antibacteriana (testada contra espécies patogénicas e da microbiota vaginal) são também descritas neste capítulo.

3. Material e métodos

3.1. Padrões e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para realizar este trabalho de dissertação foram obtidos comercialmente e utilizados na forma como foram adquiridos.

Reagentes como o DMSO, o lipopolissacarido (LPS), a dexametasona, a sulforrodamina B (SBR), o trisaminometano (Tris), o ácido tricloroacético e a elipticina foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), a solução salina equilibrada de Hank's (HBSS), o soro fetal bovino (FBS), a L-glutamina, a tripsina-EDTA e a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) foram obtidos na Gibco Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Califórnia, EUA). Os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8%, de grau HPLC foram adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O metanol e os restantes reagentes químicos de grau analítico foram obtidos a partir de fontes comuns. A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (referência 47885-U) foi adquirida na Sigma (St. Louis, MO, EUA), bem como os padrões de açúcares e ácidos orgânicos e o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A solução de Tocol racémico e o padrão de tocoferóis foram adquiridos na Matreya (Pleasant Gap, PA, EUA). O corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e utilizado como indicador do crescimento microbiano.

A água utilizada foi previamente purificada através do sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

3.2. Sumidades floridas da *C. vulgaris*

As sumidades floridas já secas da *C. vulgaris* foram obtidas comercialmente através da loja online da *Girassol*. Foram trituradas de forma a se obter uma mistura homogénea de um pó fino (**Figura 7**) e armazenadas no frigorífico sob proteção da luz para posterior análise.



Figura 7. Sumidades floridas da *C. vulgaris* secas (esquerda) e trituradas (direita).

3.3. Caracterização nutricional das sumidades floridas da *C. vulgaris*

3.3.1. Macronutrientes

As sumidades floridas foram analisadas relativamente ao seu valor energético e ao teor em gorduras, hidratos de carbono, cinzas e proteínas. A determinação destes parâmetros foi levada a cabo através de procedimentos recomendados pela AOAC (Associação Oficial de Químicos Analíticos) (AOAC, 2016). Todos os resultados são expressos em mg por 100 g de massa seca (dw).

3.3.1.1. Cinzas

Para determinar o teor em cinzas, uma massa conhecida de amostra homogénea das sumidades floridas da urze (500 mg) foi colocada num cadinho de porcelana previamente tarado e submetida a incineração a $600 \pm 15^\circ\text{C}$ durante cerca de 5 horas. Após esse tempo foi obtido o peso de amostra resultante da incineração.

3.3.1.2. Gorduras

A amostra em estudo (1,5 g) foi colocada dentro de um cartucho de papel e extraída em éter de petróleo, através de um sistema de extração em Soxhlet a 120°C

durante cerca de 7 horas. A mistura resultante foi transferida para um tubo de ensaio esmerilhado previamente tarado e colocado na estufa a evaporar até à secura.

3.3.1.3. Proteínas

O conteúdo proteico (N x 6,25) foi determinado de acordo com o método macro-Kjeldahl. Uma massa conhecida de amostra homogeneizada (500 mg) foi transferida para um tubo de Kjeldahl e foi adicionada a mistura catalítica e ácido sulfúrico (20 mL). A mistura foi colocada num bloco digestivo, a temperatura foi gradualmente aumentada até aos 400°C durante 70 minutos. Após esse período de tempo os tubos de Kjeldahl foram retirados do aquecimento e foi adicionada água (25 mL). Procedeu-se à destilação através de um destilador macro-Kjeldahl. Foi também feito um branco contendo apenas os reagentes utilizados (Helena *et al.*, 2010).

3.3.1.4. Hidratos de carbono

O teor em hidratos de carbono foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Hidratos de carbono g/100 g dw} = 100 - (\text{gorduras} + \text{proteínas} + \text{cinzas})$$

3.3.1.5. Valor energético

O valor energético associado à amostra em estudo foi determinado através da utilização da seguinte equação:

$$\text{Energia (Kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{g lípidos})$$

3.3.2. Ácidos gordos

Após o processo de extração das gorduras através de um sistema de extração em Soxhlet, foi realizado o processo de derivatização: a amostra foi colocada a extrair com reagente A (5 mL), constituído por MeOH, H₂SO₄ e C₇H₈, na proporção de 2:1:1, sob agitação a 160 rpm e num banho a 50°C durante toda a noite.

Foram adicionados à mistura reacional: H₂O (3 mL) e posterior agitação no vórtex, éter dietílico (3 mL) e agitação no vórtex. Após a verificação de separação de fases, o sobrenadante foi recolhido com uma pipeta de *Pasteur* e transferido para um

vial contendo sulfato de sódio anidro. Por fim, o conteúdo do *vial* foi transferido para uma seringa e filtrado através de um filtro nylon 0,22 µm para análise em cromatografia seguindo o procedimento anteriormente descrito por Grangeia *et al.* (2011).

O perfil de ácidos gordos foi determinado utilizando cromatografia gasosa (GC) modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial da coluna a 50°C por 2 min; aumento da temperatura em 30°C/min até 125°C, 5°C/min até 160°C, 20°C/min até 180°C, 3°C/min até 200°C e 20°C/min até 220°C, temperatura a que se manteve durante 15 min. Utilizou-se hidrogénio como gás de transporte com um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50°C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250°C. Foram utilizadas injeções de 1 µL de amostra para cada análise.

A identificação de ácidos gordos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos dos picos da amostra por comparação com padrões. Os resultados foram processados usando o Software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.3.3. Ácidos orgânicos

De acordo com o procedimento descrito por Barros *et al.* (2013a), a amostra (1,5 g) foi extraída com ácido metafosfórico (25 mL) a 25°C, sob agitação (150 rpm) durante cerca de 25 minutos; filtrada através de um papel de filtro Whatman N° 4 e transferida para uma seringa a partir da qual foi filtrada através de um filtro de nylon 0,22 µm.

A análise foi efetuada através de um sistema Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation). A separação dos compostos foi efetuada através de uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex), termostaticada a 35°C. A deteção ocorreu através de um detetor de díodos (DAD) nos comprimentos de onda de 215 nm e 245 nm. O solvente de eluição utilizado foi ácido sulfúrico (3,6 mM).

A identificação dos ácidos orgânicos e a respetiva quantificação foi determinada por comparação dos tempos de retenção, dos espectros com padrões comerciais e respetivas retas de calibração. Os resultados obtidos foram calculados em g por 100 g de peso seco (dw).

3.3.4. Açúcares livres

Para determinação do teor em açúcares livres foi seguido o procedimento previamente descrito por Barros *et al.* (2013b). Uma massa conhecida de amostra (1 g) foi colocada a reagir com uma solução de EtOH/H₂O (40 mL, 80:20 v/v) e com um padrão interno (1 mL, melezitose 25 mg/mL,) num banho a 80°C durante 90 minutos. A mistura foi agitada de 15 em 15 minutos; após esse período a mistura foi centrifugada durante 5 minutos a 3500 rpm, filtrada para um balão de fundo redondo através de um papel de filtro Whatman N° 4 e posteriormente foi evaporado o EtOH num evaporador rotativo Büchi K-210 a 40°C.

A mistura resultante foi transferida para uma ampola de decantação onde foi lavada com éter dietílico (10 mL x 3); a fase inferior resultante foi transferida para um balão volumétrico e o foi adicionada água até obter um volume final de 5 mL. A mistura foi então filtrada para um *vial* através de um filtro de nylon 0,22 µm para análise.

A determinação dos açúcares livres foi feita através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Knauer, sistema Smartline) acoplada a um detector de índice de refração (Knauer Smartline 2300) - HPLC-RI e com a coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada (70:30 v/v) com um caudal de 1 mL/min, a 35°C (forno 7971 R Grace).

A sua identificação foi feita através da comparação dos tempos de retenção dos picos amostras com soluções padrão obtidas comercialmente. A análise de dados ocorreu através do software Clarity 2.4 (DataApex), os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno. Os resultados obtidos foram calculados em g por 100 g de peso seco (dw).

3.3.5. Tocoferóis

Os tocoferóis presentes na amostra foram determinados de acordo com o procedimento descrito por Heleno *et al.* (2010). Foram adicionados a uma massa conhecida de amostra (500 mg): BHT (100 µL, 10 mg/mL em *n*-hexano), o padrão interno de tocol (400 µL, 50 µg/mL em *n*-hexano), e metanol (4 mL). A mistura foi homogeneizada no vórtex, de seguida foi adicionado *n*-hexano (4 mL) e uma solução concentrada de NaCl (2 mL), posteriormente a mistura foi agitada no vórtex durante 1

minuto entre as adições e centrifugada (Centurion K240R-2003) a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um *vial* gelado, previamente envolvido em papel de alumínio. Foi repetida a extração com *n*-hexano mais duas vezes. O extrato de *n*-hexano resultante foi desidratado com sulfato de sódio anidro e seco em corrente de azoto. Posteriormente foi redissolvido em *n*-hexano (2 mL) e a mistura foi filtrada através de um filtro de nylon de 0,22 µm para um *vial* âmbar para posterior análise por HPLC-fluorescência.

A análise foi levada a cabo num equipamento constituído por um sistema integrado com uma bomba quaternária (Smartline 1000, Knauer), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (Jasco) com uma coluna em fase normal de Poliamida II (250 x 4,6 mm, 5 µm, YMC da Waters) a 35°C (forno 7971 R Grace), o sistema foi programado para excitação ao comprimento de onda de 290 nm e emissão a 330 nm. A fase móvel consistiu numa mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30 v/v), com um caudal de 1 mL/min.

A análise dos resultados obtidos foi efetuada através do software Clarity 2.4 (DataApex), a quantificação foi baseada no sinal de fluorescência por comparação cromatográfica com padrão interno. Os resultados são expressos em mg por 100 g de massa seca (dw) (Petropoulos *et al.*, 2018).

3.4. Preparação dos extratos orgânicos

Os extratos com solventes orgânicos de crescente polaridade (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol) foram obtidos através de um processo de extração por maceração das sumidades floridas previamente trituradas.

Uma amostra da planta em estudo (150 g) foi extraída com *n*-hexano (750 mL) durante 24 horas, à temperatura ambiente, sob vigorosa agitação (150 rpm) e protegida da luz. Após esse tempo foi filtrada a pressão reduzida através de um papel de filtro Whatman Nº 541 e de um funil de Büchner. O resíduo consequente foi colocado a extrair com *n*-hexano (750 mL) novamente. Os filtrados resultantes foram evaporados à *secura* num evaporador rotativo Büchi K-210 a 40°C (**Figura 8**).

O procedimento descrito foi repetido para os restantes solventes: diclorometano, acetato de etilo, acetona e metanol, e seguindo a ordem pela qual foram mencionados.



Figura 8. Processo para obtenção dos extratos orgânicos.

3.5. Preparação dos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram obtidos por decocção e infusão, formas de emprego mais comumente utilizadas na medicina tradicional para preparação de chás (**Figura 9**).

Para a obtenção da decocção, uma massa conhecida de amostra (1 g) foi adicionada a água destilada (100 mL) e colocada numa placa de aquecimento onde foi deixada em ebulição durante 5 minutos. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante mais 5 minutos, sendo posteriormente filtrada sob pressão reduzida e através de um papel de filtro Whatman N° 541 e um funil de Büchner. O filtrado resultante foi congelado a - 20°C e liofilizado (Dura-Dry MP).

Relativamente à infusão, a amostra (1 g) foi adicionada a água destilada em ebulição (100 mL) e a mistura foi colocada em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após esse tempo foi filtrada a pressão reduzida através de um papel de filtro Whatman N° 541 e de um funil de Büchner. O filtrado obtido foi congelado a - 20°C e liofilizado (Dura-Dry MP).

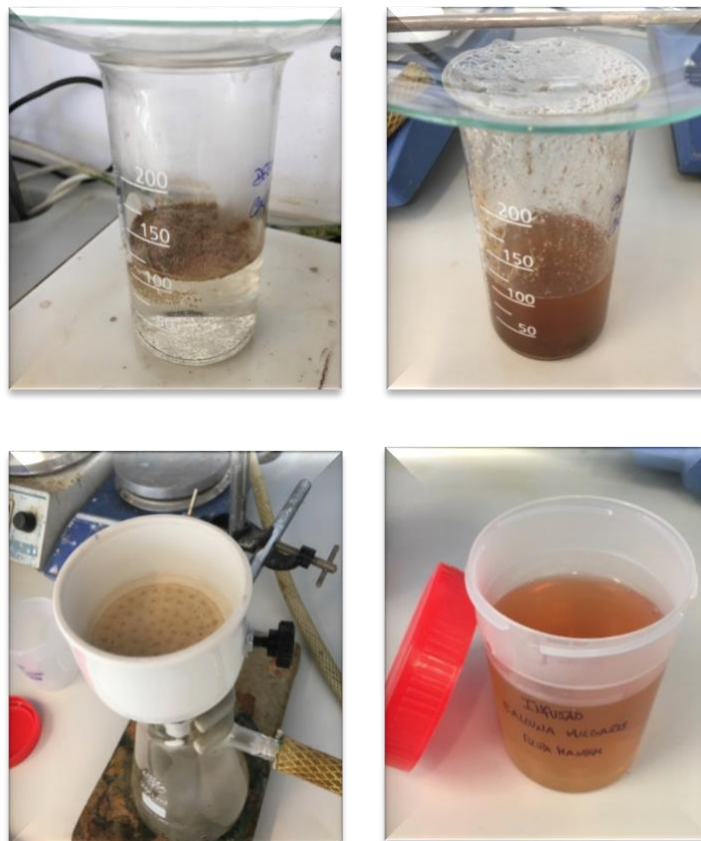


Figura 9. Etapas para a obtenção dos extratos aquosos.

3.6. Análise da composição fenólica dos extratos por HPLC-DAD-ESI/MS

Os extratos de *n*-hexano, diclorometano, acetona e acetato de etilo foram dissolvidos em MeOH e o de metanol em MeOH/H₂O (80:20 v/v) de forma a obter uma concentração de 15 mg/mL. Por sua vez, os extratos aquosos foram dissolvidos em H₂O, tendo-se obtido soluções com uma concentração de 5 mg/mL. As soluções foram transferidas para uma seringa e filtradas para um *vial* através de um filtro nylon 0,22 μm.

A análise de compostos fenólicos dos extratos de *C. vulgaris* foi efetuada através do sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Este sistema é constituído por uma bomba quaternária, um injetor automático (5°C), um degaseificador e um compartimento da coluna provido de um termostato automatizado. O detetor utilizado foi um detetor de díodos (DAD), acoplado a um detetor de espectrometria de massa (MS); a separação ocorreu através de uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈ (4,6 mm × 150 mm, 3 μm, Waters), a 35 ° C. A fase móvel foi

0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B) e o gradiente de eluição foi: 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), por fim a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min. A análise foi efetuada nos comprimentos de onda de 280, 330 e 370 nm.

A detecção de massa foi levada a cabo através de um espectrofotômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI) e tendo como gás de arraste o azoto (50 psi); a voltagem utilizada foi de 5 kV *spray*, com uma temperatura inicial de 325°C e uma tensão capilar de – 20 V; a voltagem do *tube lens offset* foi mantida a – 66 V. Os espectros foram obtidos no modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão foi de 35 U.A. O programa utilizado para recolher e analisar os resultados foi o Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

A identificação dos compostos fenólicos foi conseguida por comparação, quando disponível, com compostos padrão, ou tendo por base a informação disponível na literatura. Para o efeito foram considerados os tempos de retenção e os espectros de UV e massa obtidos.

Para a quantificação, obtiveram-se curvas de calibração (5-200 µg/mL) a partir de compostos fenólicos padrão (Extrasynthèse, Genay, France), tendo por base o sinal UV de cada um dos compostos. Aquando da indisponibilidade de padrões comerciais, recorreu-se às curvas de calibração dos padrões mais similares. Os resultados obtidos foram calculados em mg/g de extrato.

3.7. Avaliação das propriedades bioativas dos extratos

3.7.1. Atividade antioxidante

3.7.1.1. Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para avaliar a atividade antioxidante através do ensaio TBARS os extratos orgânicos foram dissolvidos em MeOH e os aquosos em H₂O; através de diluições sucessivas obtiveram-se as concentrações a testar (0,078 – 5 mg/mL).

Foi seguido o procedimento descrito por Souilem *et al.* (2017): os tecidos cerebrais de porco foram obtidos a partir de animais oficialmente abatidos; sucedeu-se a sua homogeneização com *Polytron* em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4), de forma a se obter uma proporção de 1:2 (m/v); a mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos.

Uma alíquota de sobrenadante do homogeneizado de cérebro de porco (100 µL), foi incubada com as diferentes concentrações de extratos (200 µL) na presença de FeSO₄ (10 mM, 100 µL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 100 µL) a 37.5°C durante 1 hora. Após esse período de tempo adição de ácido tricloroacético (28% m/v, 500 µL) levou a que a reação fosse interrompida. Seguiu-se a adição de ácido tiobarbitúrico (TBA 2% m/v, 380 µL) após o qual, a mistura foi aquecida a 80°C durante 20 minutos. Por fim a mistura reacional foi centrifugada a 3000 rpm e durante 5 minutos, com o intuito de remover o precipitado proteico.

A medição da intensidade da cor do complexo malondialdeído – ácido tiobarbitúrico (MDA - TBA) ocorreu a 532 nm; a percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição da peroxidação lipídica} = [(A - B) / A] \times 100 \%$$

onde A e B dizem respeito à absorvância do controlo e da solução de amostra, respetivamente.

3.7.1.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

Uma massa conhecida de extrato (100 mg) foi dissolvida numa solução salina tamponada com fosfato (PBS), de forma a se obterem soluções com uma concentração de 12,5-125 µg/mL.

No sentido de avaliar a capacidade de inibição da hemólise oxidativa associada a cada um dos extratos testados, uma amostra de sangue de ovino foi obtida a partir de animais saudáveis e centrifugada durante 5 minutos, a 1000 rpm e 10°C; as camadas sobrenadantes de plasma e leucócitos foram rejeitadas e a suspensão de células vermelhas foi lavada uma vez com uma solução de NaCl (150 mM) e três vezes com uma solução de PBS (pH 7,4) (Evans *et al.*, 2013).

Os eritrócitos foram novamente suspensos em PBS (2,8%, v/v) e uma alíquota (200 µL) desta solução foi colocada numa microplaca de 48 poços juntamente com uma alíquota (400 µL) de cada solução das amostras a testar ou água (para hemólise total). Foi utilizado Trolox como controlo positivo. A mistura foi incubada em agitação a 37°C durante 10 minutos, foi adicionada AAPH (200 µL, 160 mM em PBS) e a placa foi novamente incubada sob as mesmas condições.

A densidade ótica foi medida a 690 nm a cada 10 minutos (Takebayashi *et al.*, 2012), de forma a determinar a percentagem de eritrócitos que permaneceu intacta através da seguinte equação matemática:

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$$

onde S_t e S_0 dizem respeito à densidade ótica relativa ao tempo t e ao tempo 0 (em minutos), respetivamente, e CH_0 à densidade ótica da hemólise total no tempo 0. Os resultados são expressos em termos de intervalo de tempo (Δt) de atraso da hemólise, calculado através da fórmula:

$$\Delta t (\text{min}) = H_{t50} (\text{amostra}) - H_{t50} (\text{controlo})$$

onde H_{t50} corresponde ao tempo (minutos) no qual há 50 % de hemólise, valor obtido graficamente através da curva de hemólise de cada um dos extratos.

3.7.2. Citotoxicidade

No sentido de se avaliar o potencial citotóxico associado aos extratos orgânicos e aquosos da *C. vulgaris*, realizou-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB), previamente descrito por Barros *et al.* (2013b).

Foram utilizadas cinco linhas celulares tumorais humanas: AGS (adenocarcinoma gástrico), HeLa (adenocarcinoma cervical), HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH e todas elas mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL),

componentes necessários para o seu crescimento. Os frascos de cultura foram mantidos numa incubadora a 37°C e com 5% de CO₂, sob uma atmosfera húmida. As células foram utilizadas apenas quando apresentavam 70 a 80% de confluência.

Uma massa conhecida de cada um dos extratos (8 mg) foi dissolvida em DMSO (500 µL) e H₂O (500 µL), foram assim obtidas soluções *stock* com uma concentração de 8 mg/mL, a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas obtendo as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL). Uma alíquota (190 µL) da suspensão celular de cada uma das linhas testadas com uma concentração celular de 5x10⁴ células/mL, foi incubada com uma alíquota de cada uma das concentrações dos diferentes extratos (10 µL) em microplacas de 96 poços durante 48 horas. O intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 – 400 µg/mL.

Após a incubação, prosseguiu-se para a fixação das células: foi adicionado TCA (10% m/v; 100 µL) previamente refrigerado e as placas foram incubadas 1 hora a 4°C, foram lavadas com água desionizada e, após secagem, foi adicionada uma solução de SRB (0,057 %, m/v; 100 µL), foram deixadas a repousar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Para remoção da SRB não aderida, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de ácido acético (1% v/v) e colocadas a secar. Por fim, a SRB aderida foi solubilizada com Tris (10 mM, 200 µL) e foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm no leitor de microplacas Biotek ELX800. Os resultados encontram-se expressos em termos da concentração de extrato com capacidade para inibir o crescimento celular em 50% - GI₅₀. Como controlo positivo foi utilizada a elipticina.

3.7.3. Hepatotoxicidade

Foi utilizada uma cultura primária de células normais de fígado de porco com o objetivo de avaliar a citotoxicidade associada aos extratos em células não tumorais.

A preparação desta cultura celular, designada por PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco) foi feita a partir de fígado de porco obtido no matadouro local. O tecido de fígado foi lavado com uma solução salina equilibrada de Hank (HBSS), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e foram obtidos explantes de 1x1 mm³. Os explantes foram colocados em frascos de 25 cm² contendo DMEM suplementado com SFB (10 %), aminoácidos não essenciais (2 mM),

penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e foram incubados numa incubadora a 37°C e com 5% de CO₂, com atmosfera humidificada. No sentido de assegurar o crescimento celular, o qual foi acompanhado pela observação no microscópio com contraste de fase, a cada dois dias foi renovado o meio de cultura. As células foram sub-cultivadas e plaqueadas numa microplaca de 96 poços, de forma a se obter uma densidade de 1.0×10^4 células/poço.

As diluições utilizadas para avaliar a citotoxicidade nesta cultura primária de células não tumorais foram as mesmas que se encontram descritas na secção 3.7.2.. Também para a PLP2 os resultados são expressos em valores de concentração de extrato que inibe em 50% o crescimento celular – GI₅₀. Como controlo positivo foi utilizada a Elipticina.

3.7.4. Atividade anti-inflamatória

Para avaliar a atividade anti-inflamatória os extratos foram dissolvidos em DMSO (500 µL) e em H₂O (500 µL), foram assim obtidas soluções *stock* com uma concentração de 8 mg/mL, a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas obtendo as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL).

A linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7, obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, foi cultivada em meio DMEM, suplementada com soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (10%), glutamina e antibióticos, e mantida numa incubadora a 37°C, com 5% de CO₂ e sob uma atmosfera húmida.

As células foram destacadas com um raspador de células. Um alíquota da suspensão celular de macrófagos (300 µL) com uma densidade celular de 5×10^5 células/mL e com uma proporção de células mortas inferior a 5% de acordo com o teste de exclusão do azul de Tripiano, foi colocada em cada poço. A microplaca foi incubada durante 24 horas na incubadora com as condições anteriormente indicadas de forma a permitir uma adequada aderência e multiplicação das células. Após esse período as células foram tratadas com as diferentes concentrações de extrato (15 µL, 0,125 – 8 mg/mL) e incubadas durante uma hora, sendo que o intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 – 400 µg/mL. Procedeu-se à estimulação com a adição de 30 µL da solução de lipossacarídeo - LPS (1 mg/mL) e incubou-se durante mais 24 horas. Foi utilizado

como controlo positivo dexametasona (50 mM) e como controlo negativo, as amostras na ausência de LPS.

A quantificação de óxido nítrico foi feita através da utilização de um *kit* do sistema de reagentes de Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração de nitrito (nitrito de sódio 100 mM a 1,6 mM) preparada numa placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado através da leitura das absorvâncias a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e pela comparação com a reta de calibração do padrão ($y=0,0063x+0,1368$, $R^2=0,9989$).

Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico *versus* a concentração de amostra, e expressos relativamente à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição, em 50%, da produção de óxido nítrico - IC₅₀ (Sobral *et al.*, 2016).

3.7.5. Atividade antibacteriana

3.7.5.1. Microrganismos e condições de crescimento

Relativamente aos microrganismos patogénicos: foram utilizados microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. As bactérias Gram-positivas foram a *Enterococcus faecalis* isolada da urina, a *Listeria monocytogenes* isolada a partir do fluido da medula cérebro-espinal, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) da expetoração, *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA) isolada de um exsudado de uma ferida. Por sua vez, as bactérias Gram-negativas utilizadas foram a *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Proteus mirabilis*, isoladas da urina, a *Morganella morganii* e a *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da expetoração. Todos os microrganismos foram fornecidos pela Unidade Local de Saúde do Nordeste. Também a *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 49226) e *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018) foram utilizadas e obtidas comercialmente (Liofilchem, Itália).

Os microrganismos não patogénicos da microbiota vaginal humana utilizados foram o *Lactobacillus plantarum* (DSM 12028), o *Lactobacillus delbrueckii* subs. *Bulgaricus* (LMG 6901) e o *Lactobacillus casei* (NCTC 6375), todos eles foram cedidos pela Universidade Católica do Porto.

De acordo com as necessidades nutricionais de cada uma das espécies bacterianas foram utilizados diferentes meios de cultura: para a *Listeria monocytogenes* e para a *Enterococcus faecalis* foi utilizado Trypticase Soy Broth (TSB); para a *Neisseria gonorrhoeae* e *Gardnerella vaginalis* o meio Brain Heart Infusion (BHI), para os *Lactobacillus* o meio de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para as restantes bactérias o meio Müeller Hinton (MH).

Todos as bactérias foram incubadas a 37°C durante 24 horas com exceção da *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, e dos *Lactobacillus*, que foram incubados a 37°C com 10% de dióxido de carbono (CO₂) durante 48 horas.

3.7.5.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI)

Os extratos obtidos a partir das sumidades floridas de *C. vulgaris* foram analisados através do método da microdiluição descrito por Glamočlija *et al.*, (2015) e os resultados expressos em mg/mL.

Cada um dos extratos foi dissolvido em DMSO 3% (50 µL) e meio de cultura MH (1500 µL), obtendo-se soluções de concentração conhecida (50 mg/mL), a partir das quais foi obtido o intervalo das concentrações a testar (0,15 – 20 mg/mL).

Para os ensaios com os microrganismos da microbiota vaginal humana, os extratos com atividade antibacteriana mais promissora (acetona, metanol, infusão e decocção) foram redissolvidos em 5% de DMSO, água e meio de cultura BH, de forma a se obterem soluções de trabalho com uma concentração de 20 mg/mL e, posteriormente, as concentrações a testar (0,15625 – 20 mg/mL).

Em microplacas de 96 poços foram colocados 190 µL da solução de extrato ou fração no primeiro poço e, nos restantes, 90 µL de meio de cultura. A partir do primeiro poço, foram retirados 100 µL para o segundo e assim sucessivamente, de forma a obter o intervalo de concentrações a testar através de diluições sucessivas. Foram adicionados a todos os poços 10 µL de inóculo bacteriano ajustado à escala de MacFarland de 0,5 correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

As microplacas foram incubadas de acordo com as condições de crescimento de cada bactéria, condições referidas anteriormente (secção 3.7.5.1.). Após o período de incubação, foi adicionado a cada poço uma solução de INT (40 µL, 0,2 mg/mL) e as

microplacas foram incubadas novamente durante cerca de 30 minutos. Os organismos viáveis provocaram uma alteração na cor de amarelo a cor-de-rosa. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como sendo a menor concentração de extrato para inibir o crescimento bacteriano em 50%.

Os ensaios foram realizados em duplicado. Foram utilizados três controles negativos: um com meio de cultura, outro com meio de cultura e extrato, e o último com meio de cultura, extrato e o antibiótico adequado consoante o tipo de bactéria. Como controlo positivo foi utilizado com meio de cultura com a bactéria a testar.

3.7.5.3. Determinação das concentrações mínimas bactericidas (CMB)

As concentrações mínimas bactericidas foram determinadas para os extratos com valores de CMI muito baixos, com o intuito de verificar se o extrato, para além de inibir o crescimento bacteriano, tem também ação bactericida.

Para a sua determinação, foram retirados 50 µL dos poços da microplaca onde não ocorreu crescimento e semeados, por estriamento, em gelose de sangue. Estas placas foram incubadas 24 horas a 37°C. Após esse período foi averiguado se a presença da solução de extrato provoca ou não a morte das estirpes bacterianas, considerando-se a menor concentração sem ocorrência de crescimento bacteriano visível como sendo a CMB.

3.8. Fracionamento do extrato de acetona

Com base na análise dos resultados obtidos nas diferentes propriedades biológicas testadas, o extrato de acetona foi escolhido para fracionamento devido ao potencial antibacteriano demonstrado.

Assim, uma massa conhecida de extrato (5 g) foi dissolvida na menor quantidade possível de CH₂Cl₂, misturado com sílica e evaporado à secura no evaporador rotativo Büchi K-210 a 40°C. O extrato seco foi então fracionado numa coluna cromatográfica de eluição em gradiente (**Figura 10**), usando o seguinte sistema de eluição: CH₂Cl₂; CH₂Cl₂/EtOAc – (90/10), (80/20), (70/30), (60/40), (50/50), (40/60), (30/70), (20/80), (10/90); EtOAc; EtOAc/acetona – (90/10), (80/20), (70/30), (60/40), (50/50), (40/60);

acetona; acetona/MeOH – (80/20), (60/40), (10/90); MeOH; MeOH/ácido fórmico – (99/1), (97/3), (95/5). O fracionamento deste extrato levou à obtenção de 14 frações.



Figura 10. Coluna cromatográfica de fracionamento do extrato de acetona da *C. vulgaris*.

3.8.1. Caracterização dos compostos fenólica por HPLC-DAD-ESI/MS das frações de acetona

As frações obtidas, com massa suficiente para a realização dos novos ensaios, foram dissolvidas em metanol, de forma a se obter uma concentração de 20 mg/mL.

O procedimento levado a cabo para identificar e quantificar a composição em compostos fenólicos de cada uma das frações obtidas foi anteriormente descrito (secção 3.6.).

3.8.2. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações de acetona

A atividade antibacteriana das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato de acetona foi analisada seguindo o procedimento descrito anteriormente na secção 3.7.5. e os resultados foram expressos em valores de CMI e CMB (mg/mL).

As frações foram dissolvidas de forma a se obter uma concentração de 25 mg/mL e, por microdiluições sucessivas, foram obtidas as diferentes concentrações a testar (0,078 - 5 mg/mL). Para os ensaios com os microrganismos da microbiota vaginal foram testadas apenas as frações com melhor atividade contra os microrganismos patogênicos (Fr 7, 8, 9 e 10).

3.9. Análise estatística

Os ensaios descritos foram realizados utilizando três amostras e efetuados em triplicado, sendo os resultados expressos como valores médios \pm desvio padrão (SD).

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste HSD de Turkey com $\alpha = 0,05$. Quando nos resultados tínhamos menos de três amostras, foram analisados através do teste-*t Student* de forma a determinar as diferenças significativas entre duas amostras, com $p = 0.05$. Estes tratamentos estatísticos foram efetuados utilizando o programa SPSS v. 23.0.

Capítulo 3: Resultados e Discussão

Este capítulo diz respeito à apresentação e discussão dos resultados obtidos.

Em primeiro lugar são apresentados e discutidos os resultados relativos à caracterização nutricional da amostra e química dos extratos; seguida das diferentes atividades biológicas estudadas e, finalmente, da composição química e do potencial de cada uma das frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização nutricional das sumidades floridas da *C. vulgaris*

A *C. vulgaris* é um arbusto muito consumido na medicina tradicional como auxiliar no tratamento de variadas doenças. Os resultados da caracterização e elucidação da sua composição nutricional encontram-se resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultado da caracterização nutricional das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

Caracterização nutricional	
Hidratos de carbono (g/100 g dw)	83,1 ± 0,3
Cinzas (g/100 g dw)	4,06 ± 0,03
Energia (kcal/100 g dw)	406,9 ± 0,1
Lípidos (g/100 g dw)	4,42 ± 0,04
Proteínas (g/100 g dw)	8,4 ± 0,3
Açúcares livres (g/100 g dw)	
Frutose	2,92 ± 0,05
Glucose	5,36 ± 0,08
Ácidos orgânicos (g/100 g dw)	
Ácido oxálico	0,208 ± 0,001
Ácido quínico	1,97 ± 0,04
Ácido ascórbico	0,0166 ± 0,0001
Ácido cítrico	0,586 ± 0,007
Ácidos orgânicos totais	2,79 ± 0,04
Tocoferóis (mg/100 g dw)	
α - tocoferol	5,84 ± 0,07
β - tocoferol	0,2500 ± 0,0001
γ - tocoferol	0,75 ± 0,03
δ - tocoferol	1,05 ± 0,08
Tocoferóis totais	8,0 ± 0,2

dw – massa seca. Resultados expressos em média ± desvio padrão (SD).

Os hidratos de carbono foram o macronutriente mais abundante nas sumidades floridas da *C. vulgaris*, correspondendo a 83,1 g por cada 100 g de planta seca (dw). Seguiram-se as proteínas (8,4 ± 0,3 g/100 g dw), os lípidos (4,42 ± 0,04 g/100 g dw) e finalmente as cinzas (4,06 ± 0,03 g/100 g dw). Por cada 100 g de planta consumida, a energia fornecida é de 406 kcal.

Também Rodriguez *et al.* (2018) avaliaram a composição nutricional das flores silvestres de *C. vulgaris*, tendo identificado os hidratos de carbono ($36,2 \pm 0,2$ g/100 g dw) como componente maioritário, seguidos das proteínas ($6,8 \pm 0,27$ g/100 g dw), lípidos ($3,7 \pm 0,1$ g/100 g dw) e das cinzas ($2,3 \pm 0,04$ g/100 g dw). Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho e também a outros estudos que avaliaram a composição nutricional de diferentes plantas e que verificaram a elevada quantidade de hidratos de carbono comparativamente com os demais macronutrientes (Dias *et al.*, 2014; Pinela *et al.*, 2017).

Relativamente aos ácidos orgânicos, foram detetados os ácidos oxálico, quínico, ascórbico e cítrico; destes, o ácido presente em maior quantidade foi o cítrico ($0,586 \pm 0,007$ g/100 g dw) e em menor quantidade foi o ácido ascórbico ($0,0166 \pm 0,0001$ g/100 g dw). O ácido ascórbico já tinha sido identificado no extrato obtido a partir das folhas da *C. vulgaris* numa quantidade de 267,6 mg/100 g (Jones & Hughes, 1983), tal como o ácido quínico em extratos aquosos, alcoólicos e hidro-alcoólicos das flores deste arbusto, numa quantidade de 27,07 µg/mL (Rodrigues *et al.*, 2018).

Relativamente aos tocoferóis, foram identificados o α – tocoferol, o β – tocoferol, o γ – tocoferol e o δ – tocoferol, sendo que o α – tocoferol revelou ser o tocoferol maioritário ($5,84 \pm 0,07$ mg/100 g dw) e o β – tocoferol o minoritário ($0,2500 \pm 0,0001$ mg/100 g dw); todos os tocoferóis identificados já haviam sido reconhecidos na composição química das flores da *C. vulgaris* por Rodrigues *et al.* (2018) que, tal como no presente trabalho, identificou o α – tocoferol como sendo o tocoferol maioritário, contrariamente ao determinado neste trabalho, o tocoferol minoritário foi o δ – tocoferol.

Os ácidos gordos identificados nas sumidades floridas da *C. vulgaris* e respetiva quantificação, encontra-se na **Tabela 8**.

Tabela 8 Ácidos gordos presentes nas sumidades floridas da *C. vulgaris*.

Ácidos Gordos (%)	
C8:0	0,17 ± 0,01
C10:0	0,17 ± 0,01
C11:0	0,64 ± 0,03
C12:0	0,47 ± 0,01
C14:0	1,52 ± 0,06
C15:0	0,33 ± 0,02
C16:0	19,6 ± 0,6
C16:1	1,11 ± 0,03
C17:0	0,64 ± 0,03
C18:0	5,07 ± 0,02
C18:1n9c	3,097 ± 0,003
C18:2n6c	19,2 ± 0,1
C18:3n3	21,0 ± 0,2
C20:0	2,4 ± 0,2
C20:1	0,267 ± 0,005
C20:2	0,089 ± 0,003
C21:0	0,289 ± 0,002
C20:3n6	0,73 ± 0,04
C20:3n3	11,0 ± 0,5
C22:0	2,84 ± 0,01
C22:1	0,178 ± 0,007
C20:5n3	0,307 ± 0,006
C22:2	0,669 ± 0,006
C23:0	5,6 ± 0,3
C24:0	0,108 ± 0,006
C24:1	2,40 ± 0,07
SFA	39,9 ± 0,2
MUFA	7,05 ± 0,05
PUFA	53,0 ± 0,2

C8:0 – ácido caprílico; C10:0 – ácido cáprico; C11:0 – ácido undecanoico; C12:0 – ácido laurico; C14:0 – ácido mirístico; C15:0 – ácido pentadecanoico; C16:0 – ácido palmítico; C17:0 – ácido heptadecanoico; C18:0 – ácido esteárico; C18:1n9 – ácido oleico; C18:2n6 – ácido linoleico; C18:3n3 – ácido linolénico; C20:0 – ácido araquídico; C20:1 – ácido gadolénico; C20:2 – ácido 11,14 – eicosadienóico; C21:0 – heneicosanoico; C20:3n6 – ácido eicosatrienoico; C20:3n3 – ácido eicosatrienoico; C22:0 – ácido beénico; C22:1 – ácido eicosenoico; C20:5n3 – ácido eicosapentanoico; C22:2 – ácido docanesóico; C23:0 – ácido tricosenóico; C24:0 – ácido lignocérico; C24:1 – ácido nervónico. SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados. Resultados expressos em média ± desvio padrão (SD).

Foram identificados 16 ácidos gordos distintos nas sumidades floridas da *C. vulgaris*. Dos ácidos gordos identificados, o ácido linolénico (C18:2n6) foi o ácido maioritário, com uma abundância de 21 %, e o ácido eicosapentanoico (C20:2) o minoritário correspondendo a 0,089% do total dos ácidos gordos identificados.

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) têm uma maior abundância, cerca de 53%, seguidos dos ácidos gordos saturados (SFA), com 39,9 %, e dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), com 7,1 %.

Ácidos como o palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), linolénico (C18:3n3) e linoleico (C18:2n6c) já tinham sido previamente descritos e identificados na *C. vulgaris* (Rodrigues *et al.*, 2018; Olechnowicz-Stepien *et al.*, 1982).

4.2. Análise da composição fenólica dos extratos por HPLC-DAD-ESI/MS

Na **Tabela 9**, encontram-se os resultados obtidos relativamente à identificação e respetiva quantificação da composição fenólica dos sete diferentes extratos das sumidades floridas da planta estudada, bem como os tempos de retenção (R_t), absorvância ($\lambda_{\text{máx}}$), ião pseudomolecular ($[M-H]^-$) e os fragmentos iónicos principais (MS^2) de cada um dos compostos fenólicos presentes.

Tal como já foi referido anteriormente, a tentativa de identificação individual dos compostos fenólicos teve por base os dados relativos aos seus tempos de retenção, espetros de UV-VIS e de massa, precedendo-se, sempre que possível, à respetiva comparação com padrões disponíveis.

Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull

Tabela 9. Composição fenólica dos extratos orgânicos e aquosos da *C. vulgaris*.

Pico	R _t (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g extrato)						
						<i>n</i> -Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Acetona	Metanol	Decocção	Infusão
1 ^a	7,07	325	353	191(100),179(5),173(2),135(2)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeioilquínico	n.d.	n.d.	n.d.	0,20 ± 0,02c	3,3 ± 0,1b	3,1 ± 0,2b	5,0 ± 0,2q
2 ^b	7,15	275	289	245(100),203(5),137(2)	(+)-Catequina	n.d.	n.d.	0,52 ± 0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3 ^c	11,15	334	479	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -hexosido	n.d.	n.d.	n.d.	2,12 ± 0,02c	2,09 ± 0,01c	4,50 ± 0,03a	4,34 ± 0,02b
4 ^d	11,88	310	337	191(100),173(16),163(6)	Ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10 ± 0,01b	0,06 ± 0,01c	0,150 ± 0,001a
5 ^e	15,23	356	479	317(100)	Miricetina-3- <i>O</i> -glucósido	1,672 ± 0,001e	n.d.	1,63 ± 0,07e	4,96 ± 0,09d	4,30 ± 0,09c	5,80 ± 0,01b	8,08 ± 0,10a
6 ^c	17,85	349	463	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -ramnósido	1,668 ± 0,001e	n.d.	1,66 ± 0,09e	2,04 ± 0,06b	2,81 ± 0,05c	4,86 ± 0,06b	5,78 ± 0,10a
7 ^e	18,68	354	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	0,310 ± 0,001d	n.d.	0,37 ± 0,03d	2,20 ± 0,06b	1,680 ± 0,004c	1,650 ± 0,001c	3,01 ± 0,08a
8 ^e	19,08	354	463	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	0,3080 ± 0,0002e	n.d.	0,3550 ± 0,0003e	0,800 ± 0,002d	0,97 ± 0,07c	1,22 ± 0,03b	2,05 ± 0,09a
9 ^e	22,44	337	477	315(100)	Isorametina-3- <i>O</i> -glucósido	0,3100 ± 0,0002f	n.d.	1,6 ± 0,3d	1,25 ± 0,08e	2,8 ± 0,1b	2,33 ± 0,03c	5,48 ± 0,08a
10 ^e	26,42	343	463	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido	n.d.	n.d.	0,298 ± 0,005e	0,42 ± 0,03c	0,350 ± 0,005d	0,810 ± 0,001a	0,77 ± 0,01b
11 ^e	27,30	341	431	285(100)	Canferol- <i>O</i> -ramnósido	n.d.	n.d.	0,36 ± 0,04b	n.d.	0,39 ± 0,01b	0,830 ± 0,003a	0,81 ± 0,01a
12 ^e	28,38	345	461	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -ramnósido	0,3070 ± 0,0001e	n.d.	0,428 ± 0,001d	0,41 ± 0,01d	0,53 ± 0,01c	0,92 ± 0,01b	1,12 ± 0,03a
Ácidos fenólicos totais						n.d.	n.d.	n.d.	0,20 ± 0,02c	3,4 ± 0,1b	3,2 ± 0,2b	5,1 ± 0,2a
Flavonoides totais						4,570 ± 0,001f	n.d.	6,6 ± 0,5e	13,2 ± 0,1d	15,9 ± 0,2c	22,92 ± 0,01b	31,5 ± 0,5a
Compostos fenólicos totais						4,570 ± 0,001f	n.d.	7,2 ± 0,4e	13,39 ± 0,09d	19,31 ± 0,02c	26,1 ± 0,2b	36,6 ± 0,7a

nd – não detetado. Padrões das curvas de calibração: ^a ácido cafeico ($y = 388345x + 406,369$, $R^2 = 0,994$); ^b catequina ($y = 84950x - 23200$, $R^2 = 1$); ^c miricetina ($y = 23287x - 581708$, $R^2 = 0,9988$); ^d ácido *p*-cumárico ($y = 301950x + 6966,7$, $R^2 = 0,999$); ^e quercetina-3-*O*-glucósido ($y = 34843x - 160173$, $R^2 = 0,9988$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Dos doze compostos detetados e identificados nos diferentes extratos da urze, dois são derivados de ácidos fenólicos, mais propriamente derivados de ácido hidroxicinâmico, e dez são derivados de flavonoides, dos quais, nove são flavonóis e um flavan-3-ol.

Dos ácidos fenólicos identificados, o pico **1**, com um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ a m/z 353 foi identificado, no modo positivo, como sendo o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, tendo em conta as suas características de retenção, massa e UV-vis por comparação com um padrão comercial. Por sua vez, o pico **4** ($[M - H]^-$ a m/z 337) foi identificado como se tratando do ácido 5-*p*-coumaroilquínico, por consideração com o padrão de fragmentação hierárquica descrito por Clifford *et al.*, (2003). O pico **2** ($[M - H]^-$ a m/z 289), também ele identificado no modo positivo como sendo a catequina, tendo por comparação o padrão comercial. Todos os compostos mencionados foram previamente identificados nos diferentes extratos da *C. vulgaris* (Drózd *et al.*, 2016a; Jalal *et al.*, 1982; Monschein *et al.*, 2008).

Os picos restantes dizem respeito a flavonóis glicosídicos, todos eles derivados da quercetina (λ_{\max} por volta de 350 nm e um fragmento MS^2 a m/z 301), canferol (λ_{\max} por volta de 348 nm, fragmento MS^2 a m/z 285), miricetina (λ_{\max} por volta de 354 nm e com um fragmento MS^2 a m/z 317) e isoramnetina (λ_{\max} a 354 nm, fragmento MS^2 a m/z 315).

Os picos **5** (miricetina-3-*O*-glicosídeo), **7** (quercetina-3-*O*-glicosídeo) e **9** (isorannetina-3-*O*-glicosídeo) foram identificados positivamente em comparação com o padrão comercial. Com os picos numero **8** e **10**, foram identificados derivados de quercetina ($[M - H]^-$ a m/z 463); por sua vez, os picos **6** ($[M - H]^-$ a m/z 463), **11** ($[M - H]^-$ a m/z 431) e **12** ($[M - H]^-$ a m/z 461) foram identificados como sendo derivados de miricetina, canferol e isoramnetina, todos apresentando o fragmento MS^2 , correspondente às perdas das unidades hexosil (-162 mu) e ramosil (-146 mu), respetivamente. A ordem de eluição foi coerente com o tipo de substituinte de açúcar e de acordo com a sua polaridade esperada, embora a posição e a natureza das unidades de açúcar não pudessem ser identificadas, uma vez que os seus tempos de retenção não correspondiam a nenhum dos padrões disponíveis.

Diferentes derivados de quercetina, miricetina, canferol e isormarnetina foram anteriormente encontrados em diferentes partes de *C. vulgaris* (Allais *et al.*, 1991;

Allais *et al.*, 1995; Jalal *et al.*, 1982; Monschein *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2018; Orhan *et al.*, 2007; Shelyuto *et al.*, 1097; Simon *et al.*, 1993a; Simon *et al.*, 1993b; Simon *et al.*, 1994). No presente trabalho, a mircetina-3-*O*-glucósido e a mircetina-*O*-ramenósido foram os compostos mais abundantes presentes em todos os diferentes extratos orgânicos e aquosos, seguidos de ácido clorogénico nos extratos de metanol, na infusão e na decocção.

Até onde sabemos, os principais derivados glucósidos da miricetina não foram previamente identificados em *C. vulgaris*, tendo sido apenas identificadas as agliconas (Jalal *et al.*, 1982).

Dos extratos obtidos, a infusão revelou a maior concentração em compostos fenólicos, seguida da decocção e dos extratos com metanol, acetona, acetato de etilo e do extrato de *n*-hexano. O extrato de diclorometano não apresentou nenhum dos compostos fenólicos identificados.

O perfil fenólico correspondente ao extrato de metanol encontra-se devidamente identificado na **Figura 11**.

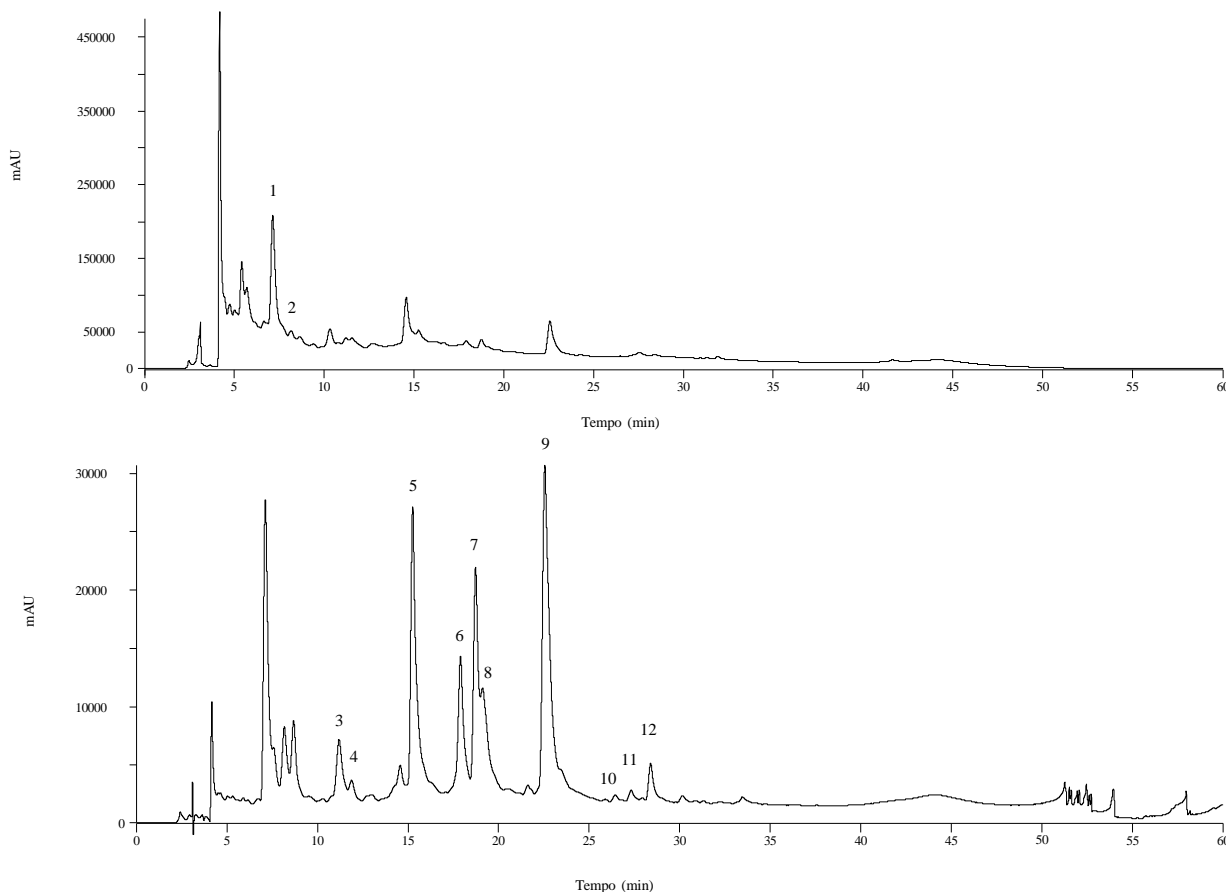


Figura 11. Perfil fenólico do extrato de metanol das sumidades floridas da *C. vulgaris* a 280 nm (cima) e 370 nm (baixo). Todos os números apresentados correspondem aos compostos identificados e referidos na **Tabela 9**.

4.3. Avaliação das propriedades bioativas dos extratos da *C. vulgaris*

4.3.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada através de dois métodos distintos: pela avaliação da inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco (TBARS), e pela inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 10** e expressos em valores de IC₅₀ em µg/mL.

Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

	Atividade antioxidante (IC ₅₀ , µg/mL)	
	TBARS	OxHLIA (Δt = 60 min)
<i>n</i> -Hexano	95 ± 4a	320 ± 10b
Diclorometano	n.d.	384 ± 10a
Acetato de Etilo	33 ± 3e	80 ± 2c
Acetona	8 ± 0.2f	14 ± 0.4e
Metanol	53 ± 1c	34 ± 0.6d
Decocção	79 ± 2b	38 ± 1d
Infusão	61 ± 1d	66 ± 0.3c
Trolox	9,1 ± 0.3	21,2 ± 0.7

Valores de IC₅₀ correspondem à concentração de extrato responsável por inibir 50% da oxidação. n.d. – não detetado. Em cada coluna letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05).

A atividade antioxidante é tanto maior, quanto menor a concentração de extrato necessária para inibir em 50% a oxidação. Todos os extratos revelaram capacidade antioxidante exceto o extrato de diclorometano para o ensaio de TBARS.

Em ambos os ensaios, o extrato que revelou uma melhor atividade foi o extrato de acetona, com um IC₅₀ de 8 µg/mL para o ensaio de TBARS e de 14 µg/mL para o ensaio de OxHLIA. O IC₅₀ obtido é inferior ao apresentado pelos padrões utilizados, tal como se encontra referido na **Tabela 10**, tornando estes extratos uma promissora fonte de compostos com potencial antioxidante.

Por sua vez o extrato de diclorometano foi o que demonstrou a menor capacidade antioxidante, não apresentando qualquer atividade no ensaio de TBARS para as concentrações testadas e, para o ensaio de OxHLIA apresentou um IC₅₀ de 384 µg/mL, bastante mais elevado do que os IC₅₀ associados aos restantes extratos testados.

A atividade antioxidante da *C. vulgaris* é a propriedade biológica mais descrita e estudada, a maior parte dos estudos utilizou o ensaio de avaliação da atividade captadora de radicais DPPH, o ensaio de TBARS foi avaliado apenas por Ghareeb *et al.* (2014) no extrato de éter de petróleo das raízes desta espécie.

Diferentes autores descrevem que, quanto maior o teor em compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante demonstrada (Drózdź *et al.*, 2016b; Drózdź & Pyrzynska, 2018; Kähkönen *et al.*, 1999). No presente estudo, o teor em compostos fenólicos é para os extratos obtidos a partir de solventes de extração com maior grau de polaridade.

4.3.2. Citotoxicidade e hepatotoxicidade

Os resultados obtidos para as cinco linhas celulares tumorais humanas e para a cultura primária de células não tumorais encontram-se na **Tabela 11** e são expressos em valores da concentração de extrato responsável por inibir em 50% o crescimento celular - GI₅₀, valores em µg/mL.

Tabela 11. Citotoxicidade e hepatotoxicidade associada aos extratos das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

	<i>n</i> -Hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	Acetona	Metanol	Decocção	Infusão
GI₅₀, µg/mL							
AGS	58 ± 5e	106 ± 9c	49 ± 4e	100 ± 6c	78 ± 4d	281 ± 12b	305 ± 10a
MCF-7	41 ± 4d	101 ± 5b	40 ± 3d	89 ± 5bc	65 ± 4cd	353 ± 32a	351 ± 6a
NCI-H460	61 ± 3d	133 ± 6a	50 ± 1e	121 ± 4b	101 ± 9c	n.d.	n.d.
HeLa	33 ± 2d	83 ± 3c	31 ± 3d	69 ± 5c	76 ± 6c	224 ± 22b	258 ± 14a
HepG2	43 ± 4e	120 ± 12c	44 ± 1e	145 ± 12b	97 ± 6d	368 ± 23a	352 ± 7a
PLP2	61 ± 3d	240 ± 8a	41 ± 2e	198 ± 5b	163 ± 8c	>400	>400

Valores GI₅₀ correspondem à concentração que provoca 50% de inibição da proliferação celular; n.d. – não detectado; AGS – adenocarcinoma gástrico humano; MCF-7 – adenocarcinoma de mama humano; NCI-H460 – carcinoma de pulmão humano; HeLa – adenocarcinoma de cérvix humano; HepG2 – carcinoma hepatocelular; PLP2 – cultura primária de células não tumorais de fígado de porco. Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05). Elipticina (Valores GI₅₀ em µg/mL): AGS: 2,59 ± 0,05; MCF-7: 1,21 ± 0,02; NCI-H460: 0,91 ± 0,11; HeLa: 1,03 ± 0,09; HepG2: 1,1 ± 0,09; PLP2: 2,29 ± 0,18.

Os extratos testados demonstraram atividade citotóxica para praticamente todas as linhas celulares testadas, apenas a decocção e a infusão não apresentaram atividade na linha celular tumoral de pulmão (NCI-H460).

Relativamente às linhas celulares tumorais, os valores de GI₅₀ mais baixos e, portanto, a maior citotoxicidade, foi observada na linha celular tumoral HeLa (31 – 258 µg/mL), com exceção do extrato de metanol, que revelou maior citotoxicidade para a linha celular MCF-7. Entre as linhas celulares tumorais, a que revelou menor suscetibilidade para os extratos foi a NCI-H460, apresentando os maiores valores de GI₅₀ (50 – 133 µg/mL). Dos extratos testados, o de acetato de etilo foi o que apresentou maior citotoxicidade, tendo associados os valores de GI₅₀ mais baixos (40 – 49 µg/mL). Por sua vez, os extratos aquosos apresentam os valores de GI₅₀ mais elevados.

Para a cultura primária de células não tumorais verificam-se diferenças, em alguns casos significativas, quando comparados os valores de GI₅₀ com os associados às linhas celulares tumorais. Os extratos com menor hepatotoxicidade são os aquosos - GI₅₀ > 400 µg/mL, por sua vez, o extrato que pode ser menos seguro é o de acetato de etilo, com um GI₅₀ de 41 µg/mL e mais baixo comparativamente a algumas linhas tumorais.

Também Callisle *et al.*, (2001) avaliaram a atividade citotóxica de extratos de diferentes polaridades numa linha celular de melanoma de ratos (B16), e verificaram que os extratos com menor polaridade apresentavam melhores resultados, enquanto os aquosos eram menos interessantes, conclusão que vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho.

Apesar de já terem sido descritos estudos relativamente à citotoxicidade associada à *C. vulgaris*, nenhuma das linhas celulares usadas neste trabalho foi utilizada em estudos anteriormente publicados.

4.3.3. Atividade anti-inflamatória

Os valores de IC₅₀ obtidos através da avaliação da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) numa linha celular de macrófagos de rato (RAW 264.7) encontram-se na **Tabela 12** e são expressos em µg/mL.

Tabela 12. Atividade anti-inflamatória dos extratos das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

Atividade anti-inflamatória (valores IC ₅₀ , µg/mL)	
<i>n</i> -Hexano	66 ± 3e
Diclorometano	81 ± 3de
Acetato de Etilo	81 ± 6de
Acetona	90 ± 4c
Metanol	189 ± 3b
Decocção	280 ± 13a
Infusão	297 ± 17a

Valores de IC₅₀ correspondem à concentração de extrato responsável por inibir 50% da produção de NO, atividade determinada em relação ao controle. Dexametasona (controle positivo) valor de IC₅₀ = 16 ± 1 µg/mL. Na coluna letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05).

Todos os extratos testados revelaram capacidade de inibir a produção de óxido nítrico, apresentando valores de IC₅₀ compreendidos entre 66 e 297 µg/mL.

O extrato de *n*-hexano foi o que revelou o valor de IC₅₀ mais baixo – 66 µg/mL, logo, dos extratos testados, é o que apresenta maior atividade anti-inflamatória. Entre os restantes, os extratos aquosos apresentaram os maiores valores de IC₅₀, 280 µg/mL para a decocção, e 297 µg/mL para a infusão, logo são os que apresentam menor potencial anti-inflamatório. De acordo com os resultados obtidos, podemos inferir que esta atividade aumenta à medida que diminui a polaridade do solvente de extração o que sugere que os compostos responsáveis pela propriedade anti-inflamatória associada a este arbusto têm um grau de polaridade baixo.

Diferentes autores consideram que o elevado teor em compostos como os flavonoides, taninos e ácidos triterpênicos associados à *C. vulgaris* é o responsável pelas diferenças demonstradas entre este arbusto e outras espécies. Este facto não foi comprovado no presente estudo, tal como se pode confirmar pelos valores apresentados na **Tabela 9**. O extrato de *n*-hexano, que revelou ser o mais promissor anti-inflamatório, apresenta o menor teor em flavonoides – 4,57 mg/g dw, por sua vez, os extratos aquosos, que revelaram os IC₅₀ maiores e, portanto, menor capacidade de inibição da produção de óxido nítrico, apresentam o maior teor em flavonoides – 22,92 mg/g dw no caso da decocção e 31,45 mg/g dw no caso da infusão.

Apesar de estudos anteriores já terem demonstrado o potencial anti-inflamatório associado a diferentes extratos da *C. vulgaris* (Ghareeb *et al.*, 2014; Orhan *et al.*, 2007;

Rodríguez, 2015), nenhum deles utilizou a linha celular de macrófagos RAW 264.7 para avaliar esta propriedade bioativa.

4.3.4. Atividade antibacteriana

Uma das utilizações etnofarmacológicas da urze mais frequentemente descrita na literatura diz respeito ao seu emprego no tratamento de infecções de diferentes origens, sendo as mais comuns, as infecções relacionadas com o trato urinário. Como resultado desta importante atividade, os extratos obtidos foram testados contra onze estirpes bacterianas distintas, que poderão ser responsáveis por infecções do trato urogenital. Foi ainda avaliada a atividade antibacteriana em *Lactobacillus* pertencentes á microbiota vaginal.

Os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e das concentrações mínimas bactericidas (CMB) associados aos diferentes extratos encontram-se na **Tabela 13** e são expressos em mg/mL.

Tabela 13. Atividade antibacteriana (CMI e CMB, mg/mL) e efeito na microbiota associada aos extratos orgânicos e aquosos da *C. vulgaris*

	<i>n</i> -Hexano		Diclorometano		Acetato de Etilo		Acetona		Metanol		Decocção		Infusão		Ampicilina (20 mg/mL)		Imipenem (1 mg/mL)		Vancomicina (1 mg/ml)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Patogénicos																				
Gram-negativo																				
<i>Escherichia coli</i>	20	>20	20	>20	20	>20	5	>20	2,5	>20	2,5	>20	2,5	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	>20	20	>20	20	>20	5	>20	2,5	>20	2,5	>20	2,5	>20	10	20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Morganella morganii</i>	20	>20	5	>20	5	>20	5	>20	2,5	>20	2,5	>20	2,5	>20	20	>20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	10	>20	20	>20	10	>20	20	>20	10	>20	20	>20	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	>20	20	>20	20	>20	5	20	10	>20	10	>20	10	>20	>20	>20	0,5	1	n.t.	n.t.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,5	>20	5	>20	2,5	>20	2,5	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Gram-positivo																				
<i>Enterococcus faecalis</i>	>20	>20	5	>20	20	>20	2,5	>20	10	>20	20	>20	10	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	>20	>20	20	>20	10	20	2,5	20	2,5	>20	2,5	>20	2,5	>20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
MRSA	20	20	10	20	20	20	1,25	20	1,25	20	1,25	20	1,25	20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078
MSSA	10	20	0,6	20	0,15	20	0,6	20	0,15	20	<0,15	20	0,15	20	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	0,25	0,5
Gram- variável																				
<i>Gardnerella vaginallis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	5	n.t.	5	n.t.	5	n.t.	5	n.t.	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Não Patogénicos – Microbiota																				
<i>L. delbrueckii</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	10	n.t.	20	n.t.	10	n.t.	10	n.t.	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>L. casei</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	10	n.t.	>20	n.t.	10	n.t.	10	n.t.	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>L. plantarum</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	20	n.t.	>20	n.t.	10	n.t.	10	n.t.	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Valores de CIM correspondem à concentração mínima inibitória; valores CMB correspondem à concentração mínima bactericida; MRSA –*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; MSSA –*Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina; n.t. – não testado.

4.3.4.1. Microrganismos patogénicos

A atividade antibacteriana associada a cada um dos extratos é maior quanto menor o valor das concentrações mínimas inibitórias (CMI). De uma forma geral, todos os extratos revelaram potencial contra as estirpes bacterianas utilizadas neste estudo, sendo que as bactérias Gram-positivas apresentaram valores de CMI inferiores e, portanto, uma maior sensibilidade quando comparadas com as bactérias Gram-negativas. Verificou-se também que a atividade é maior quanto maior a polaridade do solvente de extração, revelando melhores resultados para os extratos de solventes mais polares, como são a decocção e a infusão, e piores resultados para os extratos de *n*-hexano, diclorometano e acetato de etilo.

O extrato que revelou menor potencial antibacteriano foi o de *n*-hexano, uma vez que exibiu valores de CMI e CMB superiores para todas as bactérias testadas, apesar de os extratos de diclorometano e de acetato de etilo não deterem a atividade antibacteriana mais promissora, não apresentam resultados tão elevados quanto aos associados ao *n*-hexano. Por sua vez, os extratos de metanol, acetona e os aquosos demonstraram interessantes e promissoras atividades, de entre os quais a decocção foi o que mais potencial apresentou, tendo os valores de CMI mais baixos para praticamente todas as estirpes bacterianas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* e da *Enterococcus faecalis*, para as quais o extrato mais ativo foi o de acetona.

Os extratos aquosos apresentarem as atividades antibacterianas mais promissoras vai ao encontro dos conhecimentos da medicina tradicional, uma vez que as infusões e decocções dos constituintes da urze são tradicionalmente utilizados no tratamento de infeções de diferentes tipos, tal como referido anteriormente. A diferença demonstrada entre os extratos aquosos pode ser justificada pelo tempo de extração: para a decocção as sumidades floridas estiveram em contacto com a água durante mais tempo, 5 minutos em ebulição e 5 minutos em repouso à temperatura ambiente, enquanto que para a infusão as sumidades floridas foram colocadas na água já em ebulição e deixadas à temperatura ambiente durante apenas 5 minutos.

Diferentes autores demonstraram que os extratos de *C. vulgaris* não apresentavam atividade contra algumas das estirpes bacterianas testadas neste trabalho, como são exemplo a *Escherichia coli* (Ghareeb *et al.*, 2014; Kumarasamy *et al.*, 2002; Pavlović *et al.*, 2014), a *Klebsiella pneumoniae* (Pavlović *et al.*, 2014), a *Pseudomonas aeruginosa*

(Kumarasamy *et al.*, 2002; Pavlović *et al.*, 2014), a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e o *Proteus mirabilis* (Kumarasamy *et al.*, 2002). Este facto pode ser justificado pelas partes das plantas utilizadas para extração, sendo maioritariamente sementes e raízes, e também pelos solventes de extração, uma vez que foram utilizados solventes orgânicos de baixa polaridade.

A grande parte dos resultados apresentados na literatura avaliam a atividade de extratos orgânicos. Apenas Rodrigues *et al.* (2018) e Vučić *et al.* (2014) avaliaram o potencial, não só de extratos orgânicos, mas também de extratos aquosos, mesmo assim não se tratando das formas tradicionais de utilização.

Rodrigues *et al.* (2018) estudaram a atividade antibacteriana associada a extratos aquosos, etanólicos e hidro-etanólicos das flores da *C. vulgaris* silvestre contra sete estirpes bacterianas: a *Staphylococcus epidermidis*, a *Staphylococcus aureus*, a MRSA, a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Candida albicans*. Contrariamente ao ocorrido no presente trabalho de dissertação, o extrato que demonstrou melhor atividade foi o hidro-etanólico, uma vez que revelou os menores valores de CMI, variando entre 2,0 e 8,5 mg/mL; por sua vez, os maiores valores de CMI e, conseqüentemente, o extrato com menor potencial antibacteriano, foi o extrato etanólico, apresentando valores entre 10,8 e 43,2 mg/mL. No presente trabalho foram obtidos resultados mais interessantes, uma vez que os extratos de decocção e infusão apresentaram CMI inferiores.

Vučić *et al.* (2014) obtiveram infusões de água, etanol e acetato de etilo e testaram-nas contra as estirpes de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus vulgaris*, verificando que o extrato com maior atividade foi o extrato aquoso e o que apresentou uma atividade menos interessante, foi o de acetato de etilo, resultados que vão ao encontro das conclusões obtidas no presente trabalho.

4.3.4.2. Microrganismos não patogénicos

As bactérias pertencentes à microbiota vaginal, têm efeitos diretos no hospedeiro, uma vez que são detentoras da capacidade de proteger o organismo de possíveis infeções, como resultado do efeito antimicrobiano que exercem contra organismos patogénicos. Esta capacidade decorre da produção de substâncias como o ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogénio, principalmente pelos *Lactobacillus* (Ma *et al.*,

2012). Cada um destes compostos apresenta, efetivamente, capacidade de matar microorganismos patogénicos (Mishra *et al.*, 1996): o ácido láctico permite a manutenção de um baixo pH vaginal, entre 3,5 e 4,5, limitando o crescimento de microrganismos potencialmente perigosos; as bacteriocinas inibem o crescimento de diversas bactérias incluindo da *Gardnerella vaginalis*; finalmente, o peróxido de hidrogénio tem a capacidade de inibir algumas bactérias com Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, e de Gram-positivas, como o *Staphylococcus aureus* (Brunelli *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2014; Maloney *et al.*, 1990).

Como resultado da promissora atividade antibacteriana associada a alguns dos extratos (acetona, metanol, decocção e infusão) e tendo por base os conhecimentos da medicina tradicional, procedeu-se à avaliação da sua atividade também na microbiota vaginal, bem como à comparação com os valores das CMI obtidos para os microrganismos patogénicos (**Tabela 13**). Uma vez que a *Gardenerella vaginalis* e a *Neisseria gonorrhoeae* são as bactérias mais associadas à Vaginose Bacteriana (VB), uma infeção vaginal que afeta muitas mulheres em todo o mundo e que ocorre quando há um desequilíbrio na microbiota vaginal, nomeadamente com a diminuição da *Lactobacillus*, (Ma *et al.*, 2012; Witkin *et al.*, 2012; Bautista *et al.*, 2016), é desejável que os extratos apresentem valores de CMI inferiores para os agentes patogénicos e que interfiram o menos possível com os *Lactobacillus*.

Pela análise da **Tabela 13** e através da comparação entre os agentes patogénicos e os não patogénicos, podemos verificar que, de um modo geral, os valores de CMI para os extratos, são mais elevados para os *Lactobacillus* comparativamente com os microrganismos patogénicos testados, com a exceção do *Proteus mirabilis*, da *Pseudomonas aeruginosa* e da *Enterococcus faecalis*. Para uma CMI de 5 mg/mL ocorre inibição da maioria dos agentes patogénicos testados, com exceção dos *Lactobacillus*, que apresentam uma CMI superior (≥ 10 mg/mL). Para os antibióticos testados, a inibição dos *Lactobacillus* é total mesmo em baixas concentrações.

Relativamente aos microrganismos pertencentes à microbiota vaginal, os valores de CMI para a *Gardnerella vaginalis* e para a *Neisseria gonorrhoeae* são mais baixos quando comparados com os *Lactobacillus*, o que permite a inibição dos agentes patogénicos sem afetar os *Lactobacillus* testados, contrariamente ao demonstrado pelo antibiótico ampicilina (5 mg/mL). O extrato de metanol foi o que apresentou maiores

diferenças, revelando CMI de 5 mg/mL para a *Gardnerella vaginalis* e para a *Neisseria gonorrhoeae* e igual ou superior a 20 mg/mL para os *Lactobacillus*. Apesar de os extratos aquosos também apresentarem as diferenças expectáveis entre estes dois grupos, não são tao acentuadas quanto os associados ao extrato metanólico.

Não existem estudos na literatura relativamente à atividade antibacteriana dos extratos dos constituintes da *C. vulgaris* relativamente à microbiota vaginal; no entanto um estudo publicado recentemente por Machado *et al.* (2017), utilizando também um produto natural demonstrou que é possível inibir a *Gardenerella vaginal* sem interferir com a microbiota vaginal.

4.4. Fracionamento

O fracionamento do extrato de acetona resultou na obtenção de 14 frações. Apenas 10 destas frações foram analisadas quanto ao seu conteúdo em compostos fenólicos e quanto potencial biológico associado, devido ao facto de algumas não terem massas suficientes.

4.4.1. Composição fenólica das frações

Na **Tabela 14**, encontram-se os resultados obtidos relativamente à identificação da composição fenólica das frações obtidas através do fracionamento, em coluna cromatográfica, do extrato de acetona das sumidades floridas da planta estudada, bem como os tempos de retenção (R_t), absorvância ($\lambda_{m\acute{a}x}$), ião pseudomolecular ($[M-H]^-$) e os fragmentos iónicos principais (MS^2) de cada um dos compostos fenólicos presentes.

Por sua vez, na **Tabela 15**, encontra-se a respetiva quantificação de cada um dos compostos fenólicos identificados em cada uma das frações analisadas. Os resultados são em expressos em mg/g de extrato.

Tal como já foi referido, a tentativa de identificação individual dos compostos fenólicos resultou da análise dos tempos de retenção, espectros de UV e de massa, precedendo-se, sempre que possível, à respetiva comparação com padrões disponíveis.

Tabela 14. Compostos fenólicos identificados nas frações do extrato de acetona das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação
1	5,19	279	577	425(100), 289(15)	Dímero de (epi)catequina tipo B
2	5,51	279	577	425(100), 289(15)	Dímero de (epi)catequina tipo B
3	6,19	279	577	425(100), 289(15)	Dímero de (epi)catequina tipo B
4	6,26	345	353	191(100), 179(11), 173(7), 161(15), 135(6)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
5	6,33	279	577	425(100), 289(15)	Dímero de (epi)catequina tipo B
6	6,99	279	289	245(100),203(12),137(5)	(+)-Catequina
7	7,5	280	865	711(100), 573(19), 451(24), 411(16), 289(5), 287(2)	Trímero de (epi)catequina tipo B
8	7,61	279	577	425(100), 289(15)	Dímero de (epi)catequina tipo B
9	8,12	281	449	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido
10	8,35	279	577	425(100), 289(15)	Dímero de (epi)catequina tipo B
11	9,57	279	289	245(100),203(15),137(5)	(-)-Epicatequina
12	9,85	280	865	711(100), 573(22), 451(25), 411(18), 289(6), 285(2)	Trímero de (epi)catequina tipo B
13	10,51	281	479	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -hexósido
14	10,71	280	865	711(100), 573(19), 451(24), 411(16), 289(5), 285(2)	Trímero de (epi)catequina tipo B
15	11,23	280	865	711(100), 573(19), 451(24), 411(16), 289(5), 285(2)	Trímero de (epi)catequina tipo B
16	11,27	281	479	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -hexósido
17	12,36	279	577	425(100), 289(12)	Dímero de (epi)catequina tipo B
18	12,47	280	865	711(100), 573(19), 451(24), 411(16), 289(5), 285(2)	Trímero de (epi)catequina tipo B
19	12,89	280	865	711(100), 573(19), 451(24), 411(16), 289(5), 285(2)	Trímero de (epi)catequina tipo B
20	14,27	291	465	303(74),285(100)	Taxifolina-3- <i>O</i> -hexósido
21	14,97	281	479	317(100)	Miricetina-3- <i>O</i> -glucósido
22	15,45	280	865	577(45),425(100), 289(12)	Trímero de (epi)catequina tipo B
23	15,47	281	449	287(100)	Eriodictiol- <i>O</i> -hexósido

Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull

24	16,14	291	465	303(74),285(100)	Taxifolina- <i>O</i> -hexósido
25	17,14	281	479	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -hexósido
26	17,35	285	303	285(100)	Taxifolina
27	17,49	355	463	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido
28	17,52	281	479	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -hexósido
29	17,68	281	463	317 (100)	Miricetina- <i>O</i> -ramnósido
30	17,99	280	575	303(40),285(100)	Derivado de taxifolina
31	18,25	281	479	317(100)	Miricetina- <i>O</i> -hexósido
32	18,5	355	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido
33	19,09	354	463	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido
34	21,47	353	433	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -pentósido
35	22,52	347	477	315(100)	Isoramnetina-3- <i>O</i> -glucósido
36	22,55	347	447	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -ramnósido
37	23,52	342	447	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -ramnósido
38	26,39	355	463	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexósido
39	27,33	343	431	285(100)	Campferol- <i>O</i> -ramnósido
40	28,4	346	461	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -ramnósido
41	30,15	354	583	315(100)	Derivado de Isoramnetina
42	30,93	308	639	463(100),301(32)	Quercetina- <i>O</i> -(feruloil)-hexósido
43	31,36	306	463	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -(feruloil)-hexósido
44	31,36	308	639	463(100),301(32)	Quercetina- <i>O</i> -(feruloil)-hexósido
45	33,49	352	567	301(100)	Derivado de quercetina
46	34,67	336	609	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -(cafeoil)-pentósido
47	37,59	326	593	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroil)-ramnósido

Tabela 15. Quantificação dos compostos fenólicos identificados (mg/g de extrato) em cada uma das frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona obtida a partir das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

Pico	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6	Fr7	Fr8	Fr9	Fr10
1 ^a	1,444 ± 0,003e	n.d.	1,100 ± 0,008e	206 ± 2a	17,2 ± 0,6c	8,5 ± 0,2d	31,6 ± 0,2b	n.d.	n.d.	n.d.
2 ^a	0,755 ± 0,005e	n.d.	3,04 ± 0,01d	101,1 ± 0,3a	7,73 ± 0,02c	3,60 ± 0,01d	26,4 ± 0,7b	n.d.	n.d.	n.d.
3 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,68 ± 0,06	n.d.	n.d.	n.d.
4 ^b	1,29 ± 0,03 ^a	0,204 ± 0,002c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,90 ± 0,02b
5 ^a	n.d.	n.d.	0,31 ± 0,01c	20,2 ± 2,5a	1,526 ± 0,002c	n.d.	n.d.	4,50 ± 0,07b	n.d.	n.d.
6 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,1 ± 0,3*	48,3 ± 0,8*	n.d.	n.d.	n.d.
7 ^a	0,19 ± 0,04*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,4 ± 0,3*	n.d.	n.d.
8 ^a	n.d.	n.d.	0,85 ± 0,03*	n.d.	n.d.	n.d.	11,69 ± 0,08*	n.d.	n.d.	n.d.
9 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,10 ± 0,01
10 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,32 ± 0,01	10,92 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.
11 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,88 ± 0,03*	62,37 ± 1,52*	n.d.	n.d.	n.d.
12 ^a	n.d.	0,105 ± 0,002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32,6 ± 0,6*	13,0 ± 0,2*	n.d.
13 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,5 ± 0,1
14 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45 ± 1a	27 ± 1b	8,0 ± 0,2c	n.d.
15 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,3 ± 0,3	n.d.	n.d.	n.d.
16 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,4 ± 0,2
17 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,4 ± 0,4	n.d.	n.d.
18 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,5 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.
19 ^a	7,24 ± 0,06b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,70 ± 0,03c	11,67 ± 0,04a	n.d.	n.d.	n.d.
20 ^d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,26 ± 0,03b	44 ± 1a	3,14 ± 0,02c
21 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,8 ± 0,4
22 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,45 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,56 ± 0,05	n.d.	n.d.	n.d.
24 ^d	0,84 ± 0,01*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,78 ± 0,05*	n.d.

Caracterização Química e Avaliação das Propriedades Bioativas das Sumidades Floridas de *Calluna vulgaris* (L.) Hull

25 ^e	2,280 ± 0,005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26 ^d	4,1 ± 0,1b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,18 ± 0,09c	11,2 ± 0,2a	n.d.	n.d.	n.d.
27 ^e	n.d.	0,4589 ± 0,0004a	n.d.	0,25 ± 0,01c	0,301 ± 0,002b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,64 ± 0,08	n.d.	n.d.
29 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,9 ± 0,1
30 ^d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,4 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.
31 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,3 ± 0,2	4,6 ± 0,1	n.d.
32 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,240 ± 0,002c	n.d.	n.d.	n.d.	5,4 ± 0,2b	18,696 ± 0,008a
33 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,84 ± 0,03
34 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,234 ± 0,002c	n.d.	n.d.	n.d.	1,80 ± 0,04a	0,89 ± 0,03b
35 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,234 ± 0,002*	0,804 ± 0,001*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
36 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29,4 ± 0,3	20,0 ± 0,1*	2,07 ± 0,08*
37 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,4 ± 0,1	n.d.
38 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,745 ± 0,004	3,8 ± 0,2	n.d.
39 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,529 ± 0,002*	2,13 ± 0,03*	n.d.	n.d.
40 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,37 ± 0,04*	1,26 ± 0,04*	n.d.
41 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,15 ± 0,02	n.d.
42 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,39 ± 0,04	n.d.	n.d.
43 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,77 ± 0,05*	0,833 ± 0,005*
44 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,62 ± 0,04	1,55 ± 0,01	n.d.
45 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,95 ± 0,02	1,31 ± 0,06	n.d.
46 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,84 ± 0,02	0,93 ± 0,01
47 ^e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,11 ± 0,05*	0,87 ± 0,02*	n.d.
TPC	23,55 ± 0,03	0,768 ± 0,005	5,29 ± 0,06g	327 ± 4h	27,4 ± 0,6h	48,5 ± 0,3f	174 ± 3b	146 ± 1c	116 ± 2d	58 ± 7e

n.d. – não detetado; ^a catequina ($y = 84950x - 23200$, $R^2 = 1$); ^b ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$, $R^2 = 0,999$); ^c miricetina ($y = 23287x - 581708$, $R^2 = 0,9988$); ^d taxifolina ($y = 203766x - 208383$, $R^2 = 1$); ^e quercetina 3-*O*-glucosido ($y = 34843x - 160173$, $R^2 = 0,9988$); Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nas frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona (Fr1 – Fr10), foram identificados quarenta e sete compostos, dos quais um é um ácido fenólico, dezasseis são flavan-3-óis ((epi)catequina, dímeros e trímeros de (epi)catequina do tipo B), duas flavanonas (derivados de eriodictiol), quatro flavanonóis (derivados da taxifolina) e finalmente vinte e quatro flavonóis (derivados de miricitina, quercetina, isoramnetina e do canferol).

Os picos **4**, **6**, **16**, **21**, **32**, **33**, **35**, **38**, **39** e **40** dizem respeito a compostos presentes nos extratos orgânicos e aquosos previamente identificados e apresentados na secção 4.2.; apesar de nem todos os compostos identificados, nomeadamente os picos **6** e **39**, estarem presentes no extrato de acetona. Após o seu fracionamento a concentração em que se encontram é maior, são separados e, conseqüentemente, a identificação de todos os compostos presentes na matriz natural torna-se mais fácil.

O ácido 5-*O*-cafeiolquínico (pico **4**) foi o único ácido fenólico identificado nas frações e foi identificado positivamente por comparação com o padrão comercial.

Relativamente aos dezasseis compostos identificados como derivados de flavan-3-óis, a deteção foi efetuada com base nos iões pseudomoleculares e padrões de fragmentação MS², os quais são caracterizados pela formação de iões resultantes da clivagem da ligação entre flavanóis, através da ocorrência da reação de retro Diels Alder (RDA) e pela separação do anel heroróclico (HRF) das unidades elementares do flavan-3-ol (Dias *et al.*, 2015). Os espetros de massa não facultam informação suficiente que nos permita estabelecer a posição da ligação entre as unidades de flavanol (ligações C4-C8 ou C4-C6), bem como a diferenciação entre as catequinas isoméricas (catequina/epicatequina). Os picos **6** e **11**, relativos à (+)-catequina e à (-)-epicatequina, respetivamente, foram positivamente identificados por comparação com padrões comerciais e de acordo com os tempos de retenção, espetro de massa e UV. Os restantes compostos correspondem a oligómeros de proantocianidina da classe da procianidiana (consistindo em unidades de catequina e/ou epicatequina).

Relativamente aos picos **1**, **2**, **3**, **5**, **8**, **10** e **17**, apresentaram o mesmo ião pseudomolecular [M-H]⁻ a *m/z* 577, bem como padrões de fragmentação coerentes com os dímeros de catequina do tipo B, ou seja, dímeros de (epi)catequina. Foram observadas quebras características (*m/z* 451 (-126 u), 425 (-152 u) e 407 (-152 -18 u)) e atribuíveis a HRF, RDA e à perda de uma unidade de água da (epi)catequina a *m/z* 289

e 287, estes fragmentos poderiam estar associados à unidade de (epi)catequina inferior ou superior, respetivamente.

Similarmente, os compostos **7**, **12**, **14**, **15**, **18**, **19** e **22** (ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 865) foram considerados como se tratando de um trímero da (epi)catequina do tipo B. Estes compostos foram anteriormente identificados no extrato hidroalcoólico da *C. vulgaris* (Rodrigues *et al.*, 2018; Jalal *et al.*, 1982).

Com base nos espectros de UV e no fragmento 303 $[taxifolina-H]^-$, os picos **20**, **24**, **26** e **30** foram atribuídos a derivados de taxifolina. Destes, os picos **20** e **24**, com $[M-H]^-$ a m/z 465, libertaram um único fragmento a m/z 303 $[taxifolina-H]^-$ (-162 mu) correspondente à perda de metade de um hexosilo, como a taxifolina-3-*O*-glicósido foi previamente identificada nas flores da *C. vulgaris*, o pico **20** foi considerado como sendo esse composto. A tentativa de identificação do pico **24** recaiu para a taxifolina-*O*-hexósido, uma vez que a análise ESI/MS não nos facultou as informações suficientes sobre a natureza e posição das frações de açúcar. O composto **26** ($[M-H]^-$ com m/z 303) foi identificado positivamente em comparação com o padrão comercial como sendo a taxifolina.

Pressupostos semelhantes foram utilizados para a identificação dos compostos correspondentes aos picos **9** e **23** ($[M-H]^-$ a m/z 449), que foram provisoriamente identificados como eriodictiol-*O*-hexósido. Tanto quanto sabemos, estes compostos não foram previamente identificados nos extratos da urze.

Os restantes picos correspondentes a derivados glicosídicos do flavonol derivados da quercetina (picos **27**, **32**, **33**, **34**, **36**, **37**, **38**, **42**, **43**, **44**, **45** e **47**), canferol (pico **39**), miricetina (**13**, **16**, **21**, **25**, **28**, **29** e **31**) e isoramnetina (picos **35**, **40**, **41** e **46**) (Tabela **15** e **16**). Os compostos correspondentes aos picos **32** (quercetina-3-*O*-glucósido) e **35** (isoramnetina-3-*O*-glucósido) foram identificados positivamente em comparação com o padrão comercial. Os picos **27**, **33** e **38** ($[M-H]^-$ a m/z 463) libertaram um fragmento a m/z 301 $[quercetina-H]^-$ (-162 um), resultante da perda de metade de um hexósido e, portanto identificados como derivados de quercetina-*O*-hexósido. Os compostos **34** ($[M-H]^-$ a m/z 433), **36** e **37** ($[M-H]^-$ a m/z 433), apresentaram um fragmento MS² correspondente à perda de um pentosil (-132 mu) e de um ramenósido (-146 mu), respetivamente, sendo, por essa razão, identificados como quercetina-*O*-pentósido e quercetina-*O*-ramenósido. Com base no mesmo raciocínio, os picos **13**, **16**, **21**, **25**, **28**,

31 ($[M-H]^-$ a m/z 479) e **29** ($[M-H]^-$ a m/z 463) foram identificados como miricetina-*O*-hexósido e miricetina-*O*-ramenósido; os picos **39** ($[M-H]^-$ a m/z 431) e **40** ($[M-H]^-$ a m/z 461), de acordo com os iões pseudomoleculares, foram identificados como canferol-*O*-ramenósido e isorametina-*O*-ramenósido, respetivamente. Não foi possível obter nenhuma informação sobre a identidade das unidades de açúcar, bem como da localização na aglicona.

Os picos **42**, **43** e **44**, com o mesmo ião pseudomolecular ($[M-H]^-$ a m/z 639), foram identificados como quercetina-*O*-feruloil-glucósido, como resultado da perda do resíduo feruloil (-176) e da eluição tardia, visto a presença do resíduo hidroxicinamoil implicar uma diminuição da polaridade. Similarmente, os compostos **46** ($[M-H]^-$ a m/z 609) e **47** ($[M-H]^-$ a m/z 593) foram identificados, respetivamente, como isoramnetina-*O*-(cafeoil)-pentósido e quercetina-*O*-(*p*-coumaroil)-ramnósido.

Finalmente, para os compostos **30** ($[M-H]^-$ a m/z 575), **41** ($[M-H]^-$ a m/z 583) e **45** ($[M-H]^-$ a m/z 567) não foi possível a identificação precisa, portanto, foram identificados como taxifolina, isoramnetina e derivados de quercetina. A existência de derivados de flavanol foi extensivamente relatada em extratos das diferentes partes da *C. vulgaris* (Allais *et al.*, 1991; Allais *et al.*, 1995; Jalal *et al.*, 1982; Monschein *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2018; Orhan *et al.*, 2007; Shelyuto *et al.*, 1097; Simon *et al.*, 1993a; Simon *et al.*, 1993b; Simon *et al.*, 1994). Alguns dos compostos identificados não foram relatados anteriormente nesta espécie.

Das frações obtidas, a **4** apresentou a maior concentração de alguns dos compostos identificados, seguida da Fr **7** > Fr **8** > Fr **9** > Fr **10** > Fr **6** > Fr **5** = Fr **1** > Fr **3** = Fr **2**, sendo os compostos mais abundantes flavan-3-óis, tais como o dímero do tipo B da (epi)catequina, (-)-epicatequina e (+)-catequina.

A **Figura 12** corresponde ao perfil fenólico da fração **8**.

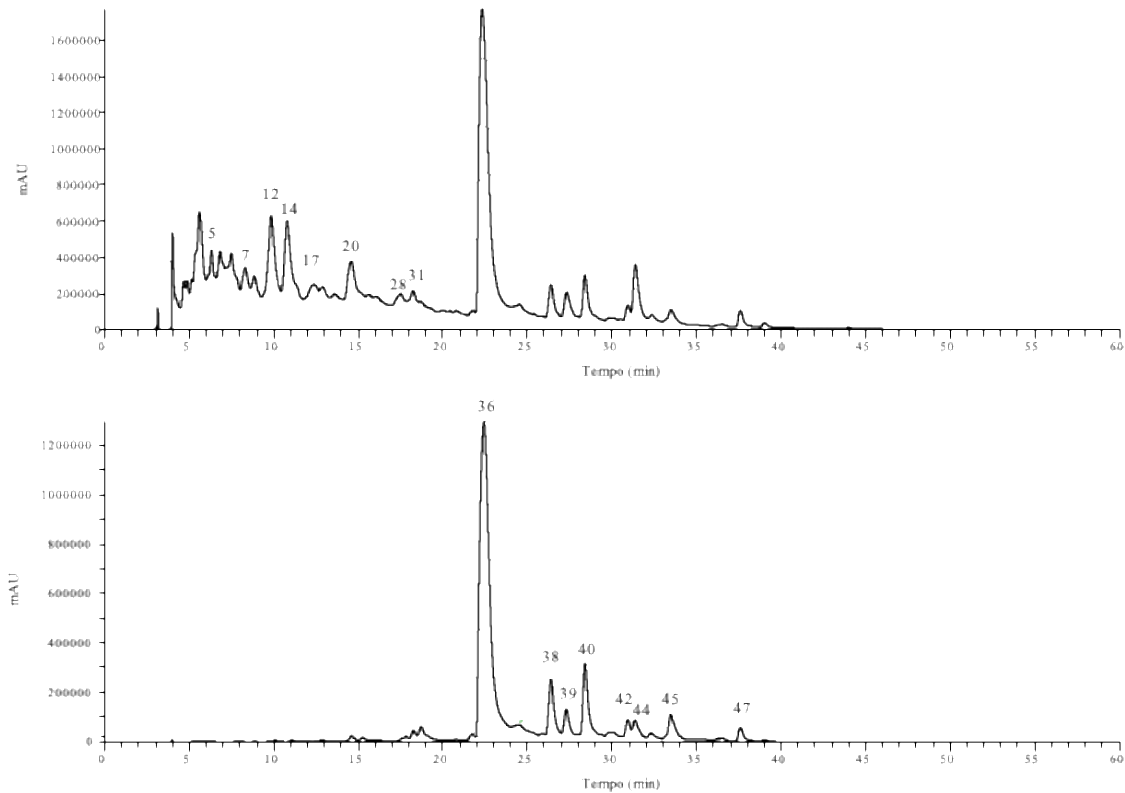


Figura 12. Perfil fenólico da fração **8** do extrato de acetona das sumidades floridas da *C. vulgaris* a 280 nm (cima) e 370 nm (baixo). Todos os números apresentados correspondem aos compostos identificados e referidos na **Tabela 14** e **15**.

4.4.2. Atividade antibacteriana e microbiota

Os valores das concentrações mínimas inibitórias - CMI associados à atividade antibacteriana das frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona encontram-se na **Tabela 16** e são expressas em mg/mL.

Tabela 16. Atividade antibacteriana das frações do extrato de acetona das sumidades floridas da *C. vulgaris*.

	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6	Fr7	Fr8	Fr9	Fr10	Ampicilina (20 mg/mL)	Imipenem (1 mg/mL)	Vancomicina (1 mg/ml)			
<i>Patogénicos</i>																
	CMI										CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Gram-negativas																
<i>Escherichia coli</i>	>20	>20	>20	>20	>20	5	2,5	2,5	2,5	2,5	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	>20	>20	>20	>20	5	1,25	1,25	2,5	2,5	10	20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Morganella morganii</i>	>20	>5	>5	20	20	5	1,25	1,25	2,5	2,5	20	>20	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Proteus mirabilis</i>	>20	>20	>20	>20	>20	5	5	2,5	2,5	5	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	>20	10	5	5	>20	>20	>20	>20	0,5	1	n.t.	n.t.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1,25	0,625	1,25	1,25	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Gram-positivas																
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	20	20	20	20	10	5	5	5	5	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0,625	1,25	20	20	10	0,625	0,625	5	5	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
MRSA	>20	>20	20	>20	20	10	2,5	0,625	0,625	1,25	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078
MSSA	10	20	20	20	20	10	2,5	0,15	0,15	0,3	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	0,25	0,5
Gram- variável																
<i>Gardnerella vaginalis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,5	1,25	1,25	2,5	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Não patogénico – Microbiota</i>																
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,5	1,25	1,25	2,5	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Lactobacillus casei</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,5	1,25	1,25	2,5	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,5	1,25	1,25	1,25	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Valores de CMI correspondem à concentração mínima inibitória; valores CMB correspondem à concentração mínima bactericida; MRSA –*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; MSSA –*Staphylococcus aureus* suscetível a metilicina; n.t. – não testada

4.4.2.1. Microrganismos patogénicos

Todas as frações revelaram potencial contra as bactérias utilizadas neste estudo. As bactérias Gram-positivas demonstraram uma maior sensibilidade uma vez que apresentaram os menores valores de CMI, particularmente para as frações **7, 8, 9 e 10**, sugerindo que o fracionamento pode ter sido benéfico. Assim, e de uma forma geral, a atividade das frações é maior quanto maior o grau de polaridade do eluente da coluna cromatográfica, sugerindo que, dos compostos presentes no extrato de acetona, os de maior polaridade são os que apresentam uma atividade antibacteriana maior.

As frações **4 e 5** exibiram os maiores valores de CMI detendo assim a atividade antibacteriana menos promissora. A *Pseudomonas aeruginosa* foi a estirpe bacteriana com menor suscetibilidade para os extratos testados e a *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA) a mais suscetível.

Comparando os resultados das frações com os antibióticos utilizados como controlo, as frações **6, 7, 8, 9 e 10** apresentam melhores resultados que a Ampicilina para a *Klebsiella pneumoniae*, para a *Morganella morganii* e para a *Pseudomonas aeruginosa*.

Comparando os resultados obtidos para a atividade antibacteriana associada às frações resultantes do fracionamento do extrato de acetona com os do extrato por fracionar, podemos tirar diferentes conclusões.

Foram obtidos maiores valores de CMI em todas as estirpes bacterianas para as frações **1, 4 e 5**. As frações **2 e 3** revelaram melhores resultados apenas para a *Listeria monocytogenes*, uma vez que a acetona ostentou um CMI de 2,5 mg/mL e para estas frações foram obtidas concentrações de 0,625 e 1,25 mg/mL respetivamente. Por sua vez, a fração **6** revelou piores resultados para a maioria das bactérias de Gram-negativas com a exceção do *Proteus mirabilis* com um CMI de 5 mg/mL, frente aos 10 mg/mL associados ao extrato,

Para as frações **7 e 8** foram obtidos melhores resultados para as bactérias Gram-negativas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* para a qual não foram verificadas alterações nos valores das CMIs; para as bactérias Gram-positivas, foram obtidos melhores resultados apenas para a *Listeria monocytogenes* e, a fração **8**, revelou melhor atividade também para a MRSA e para a MSSA. Os dois agentes patogénicos vaginais testados (*Neisseria gonorrhoeae* e *Gardenerella vaginalis*) parecem beneficiar do fracionamento.

Por fim, as frações **9** e **10** revelaram resultados menos interessantes para a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que para as restantes bactérias Gram-negativas o fracionamento é vantajoso, obtendo-se valores de CMI inferiores aos do extrato. Para a MSSA foram obtidos melhores resultados em ambas as frações e para a MRSA apenas a fração **9** revelou melhor atividade.

4.4.2.2. Microrganismos não patogénicos

De encontro com a explicação referida anteriormente (secção 4.3.4.2.), olhando para as CMI dos *Lactobacillus* podemos concluir que apresentam um comportamento muito semelhante nas quatro frações testadas. Apesar de os valores das CMI serem baixos, entre 0,625 e 2,5 mg/mL, apenas as frações **7** e **8** apresentaram valores de CMI inferiores para a *Neisseria gonorrhoeae* comparativamente aos *Lactobacillus*. Relativamente à *Gardnerella vaginalis* podemos constatar que os valores de CMI são iguais aos dos *Lactobacillus*. Para a fração **10** o valor de CMI é inferior para a *Neisseria gonorrhoeae* e para a *Lactobacillus plantarum*, em comparação com as demais estirpes utilizadas para avaliar esta propriedade bioativa. Olhando para os restantes patogénicos, apenas o MSSA e MRSA e para as frações **8** e **9**, é que os valores de CMI são inferiores às dos *Lactobacillus* testados.

Comparando os resultados das frações com os resultados associados ao extrato de acetona, apenas as frações **7** e **10** apresentam valores de CMI similares com os do extrato, sendo inferiores apenas para a *Lactobacillus plantarum* e para a *Neisseria gonorrhoeae*; por sua vez, a atividade das frações **8** e **9** é superior, com CMI inferiores o que faz com que os compostos presentes nestas frações tenham uma maior atividade quando fracionados.

Com a avaliação destes resultados verifica-se que a inibição dos agentes patogénicos sem interferir com os *Lactobacillus* é difícil. Apesar de as frações apresentarem capacidade para inibir o crescimento de bactérias causadoras de infeções perigosas, podem interferir com bactérias pertencentes à microbiota vaginal que são descritas como fundamentais no equilíbrio do pH vaginal e combate de infeções.

Capítulo 4: Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste último capítulo são descritas as principais conclusões obtidas com a realização deste trabalho e os possíveis futuros “caminhos”.

5. Conclusão

A presente dissertação permitiu, não só caracterizar quimicamente sete extratos obtidos a partir das sumidades floridas da *C. vulgaris* através de diferentes técnicas de extração e de solventes com diferentes graus de polaridade, mas também avaliar as suas propriedades bioativas, o que possibilitou averiguar qual o melhor extrato em cada uma das propriedades biológicas.

Diferentes estudos fazem referência à proporcionalidade entre o teor em compostos fenólicos e o potencial para as diferentes propriedades biológicas, relação que não foi verificada com a realização do presente trabalho. Neste trabalho conseguimos verificar que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior o teor em compostos fenólicos e flavonoides.

Relativamente às propriedades bioativas, verificou-se que são influenciadas pela natureza do solvente de extração utilizado. Para a atividade antioxidante, o extrato que se destacou, em ambos os ensaios utilizados, foi o de acetona, por sua vez, o extrato mais citotóxico, tanto nas linhas celulares tumorais como na cultura primária não tumoral, foi o de acetato de etilo. Para a atividade anti-inflamatória o extrato que revelou maior capacidade de inibição da produção de óxido nítrico foi o de *n*-hexano. Na atividade antibacteriana, foram os extratos de acetona, metanol, infusão e decocção que revelaram resultados mais interessantes contra os microrganismos patogénicos; finalmente, para os microrganismos pertencentes à microbiota vaginal, os extratos com capacidade para inibir o crescimento de microrganismos patogénicos sem afetar os *Lactobacillus* foram os extratos de acetona e de metanol.

Algumas das frações obtidas a partir do extrato de acetona revelaram um maior potencial antibacteriano e, conseqüentemente, beneficiaram do fracionamento por cromatografia em coluna. Destacam-se as frações **7** e **8** uma vez que revelaram melhor atividade antibacteriana em microrganismos patogénicos e também a capacidade de inibir agentes patogénicos sem afetar os *Lactobacillus* pertencentes à microbiota vaginal.

Todos os objetivos propostos para a realização deste trabalho de dissertação foram alcançados, apresentando resultados interessantes e com perspectivas para continuar o trabalho aqui iniciado.

5.1. Perspetivas Futuras

Existe uma infinidade de espécies por explorar na natureza, as quais são uma importante fonte de biomoléculas com grande potencial, pelo que o estudo destas matrizes é extremamente importante. A exploração destes recursos é, portanto, uma das principais perspetivas futuras deste trabalho.

Como resultado do variado potencial demonstrado por esta espécie, seria interessante o fracionamento de todos os extratos obtidos, particularmente dos extratos aquosos, dado o potencial antibacteriano demonstrado e a possível identificação dos compostos químicos responsáveis pela mesma. Também a otimização das técnicas de extração, variando condições e solventes, e consequentes alterações no potencial biológico, seria uma interessante vertente a explorar.

Por fim, e como resultado da ampla utilização desta espécie na medicina tradicional e do variado leque de propriedades biológicas que lhe estão associadas, seria também interessante a sua aplicação em matrizes alimentares.

6. Referências bibliográficas

- Allais, D. P., Chulia, A. J., Kaouadji, M., Simon, A., & Delage, C. (1995). 3-desoxycallunin and 2"-acetylcallunin, two minor 2,3-dihydroflavonoid glucosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochem*, *39*, 427-430.
- Allais, D. P., Simon, A., Bennini, B., Chulia, A. J., Kaouadji, M., & Delage, C. (1991). Flavone and flavonol glycosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochem*, *30*, 3099-3101.
- Antonisamy, P., Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2011). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. *J Pharm Pharmacol*, *63*, 1070-1077.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. (2013a). Optimize analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Anal Method*, *6*, 309-316.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2013b). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *J Funct Foods*, *5*, 1732-1740.
- Bautista, C. T., Wurapa, E., Sateren, W. B., Morris, S., Hollingsworth, B., & Sanchez, J. L. (2016). Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil Med Res*, *13*, 4.
- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. Em A. Bernhoft, *Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals* (pp. 11-29). Oslo: Aksel Bernhoft editor.
- Bernstein, N., Akram, M., Daniyal, M., Koltai, H., Fridlender, M., & Gorelick, J. (2018). Antiinflammatory potential of medicinal plants: A source for therapeutic secondary metabolites. *Adv Agron*. In press.
- Brunelli, R., Papi, M., Arcovito, G., Bompiani, A., Castagnola, M., Parasassi, T., Sampaolese, B., Vincenzoni, F., Spirito, M. D. (2007). Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J*, *21*, 3872-3876.

- Bothon, F. T., Debiton, E., Avlessi, F., Forestier, C., Teulade, J.-C., & Sohounhloue, D. K. (2013). *In vitro* biological effects of two anti-diabetic medicinal plants used in Benin as folk medicine. *BMC Complement Altern Med*, *13*, 51-59.
- Callisle, C.-A., Trouillas, P., Allais, D.-P., Simon, A., & Duroux, J.-L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J Agric Food Chem*, *49*, 3321-3327.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci Technol*, *71*, 107-120.
- Chaveerach, A., Sudmoon, R., & Tanee, T. (2017). Interdisciplinary researches for potential developments of drugs and natural products. *Asian Pac J Trop Biomed*, *7*, 378-384.
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I., & Król, W. (2015). Triterpenes as a potentially cytotoxic compounds. *Molecules*, *20*, 1610-1625.
- Clifford, M. N., Johnston, K. I., Knight, S., & Kuhnert, N. A. (2003). A hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem*, *51*, 2900-2911.
- Deliorman-Orhan, D., Senol, S., Kartal, M., & Orhan, I. (2009). Assessment of antiradical potential of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and its major flavonoid. *Society of Chemical Industry*, *89*, 809-814.
- Dias, M. I., Barros, L., Alves, R. C., Oliveira, M. B., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2014). Nutritional composition, antioxidant activity and phenolic compounds of wild *Taraxacum sect. Ruderalia*. *Food Res Int*, *56*, 266-271.
- Dias, M. I., Barros, L., Oliveira, M. B., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2015). Phenolic profile and antioxidant properties of commercial and wild *Fragaria vesca* L. roots: A comparison between hydromethanolic and aqueous extracts. *Ind Crops Prod*, *63*, 125-132.
- Drózdź, P., & Pyrzynska, K. (2018). Screening of ionic liquids for extraction of flavonoids from heather. *Nat Prod Res*, *16*, 1-4.

- Drózdź, P., Sentkowska, A., & Pryrzynska, K. (2017). Flavonoid content and antioxidant properties in different extracts of *Calluna vulgaris* (L.) flowers. *J Agric Sci Technol A*, 7, 39-44.
- Drózdź, P., Sentkowska, A., & Pryrzynska, K. (2016a). *Calluna vulgaris* (L.) Hull as a source of chlorogenic acid. *Acad J Med Plant*, 4, 75-80.
- Drózdź, P., Sentkowska, A., & Pryrzyńska, K. (2016b). Biophenols and antioxidant activity in wild and cultivated heather. *Nat Prod Res*, 1-4.
- Enioutina, E. Y., Teng, L., Fateeva, T. V., Brown, J. C., Job, K. M., Bortnikova, V. V., Krepkova, L. V., Gubarev, M. I., Sherwin, C. M. (2017). Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 10, 1203-1214.
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., Nelson, H. M., Giorgio, T. D., Duvall, C. L. (2013). *Ex vivo* red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J Vis Exp*, 73, e50166.
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*, 109, 69-75.
- Fernando, I. S., Nah, J.-W., & Jeon, Y.-J. (2016). Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environ Toxicol Pharmacol*, 48, 22-30.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M., & Araújo, M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*, 108, 31-37.
- Ferreira, I. C., Martins, N., & Barros, L. (2017). Charter One - Phenolic compounds and its bioavailability: *In Vitro* bioactive compounds or health promoters? Em F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 82, pp. 1-44). Academic Press.
- Filip, A., Clichici, S., Daicoviciu, D., Catoi, C., Bolfa, C., Postescu, I. D., Gal, A., Baldea, I., Gherman, C., Muresan, A. (2011b). Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera* extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *J Physiol Pharmacol*, 62, 385-392.
- Filip, A., Daicoviciu, D., Clichici, S., Mocan, T., Muresan, A., & Postescu, I. D. (2011a). Photoprotective effects of two natural products on ultraviolet B-

- induced oxidative stress and apoptosis in SKH-1 mouse skin. *J Med Food*, *14*, 761-766.
- Filip, G. A., Postescu, I. D., Tatomir, C., Muresan, A., & Clichici, S. (2012). *Calluna vulgaris* extract modulates NF-kB/ERK signaling pathway and matrix metalloproteinase expression on SKH-1 hairless mice skin exposed to ultraviolet B irradiation. *J Physiol Pharmacol*, *63*, 423-432.
- Gallo, M. B., & Sarachine, M. J. (2009). Biological activities of lupeol. *Int J Biomed Pharmaceut Sci*, *3*, 46-66.
- García-Risco, M. R., Vázquez, E., Sheldon, J., Steinmann, E., Riebesehl, N., Fornari, T., & Reglero, G. (2014). Supercritical fluid extraction of heather (*Calluna vulgaris*) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts. *Virus Res*, *198*, 9-14.
- George, W., & Latimer, J. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition (20th ed.)*. (W. George, & J. Latimer, Editores) Obtido de AOAC: https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product_id=1937367
- Ghareeb, D. A., ElAhwany, A. M., El-mallawany, S. M., & Saif, A. A. (2014). *In vitro* screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnol Biotechnol Equip*, *28*, 1155-1164.
- Ghedira, K., & Goetz, P. (2013). Bruyère commune: *Calluna vulgaris* (L.) Hull ou *Calluna vulgáris* Salisb. (Ericaceae). *Phytothérapie*, *11*, 52-55.
- Glamočlija, J., Stojković, D., Nikolić, M., Ćirić, A., Reis, F. S., Barros, L., Ferreira, I. C., Soković, M. (2015). A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods. *Food Funct*, *6*, 1900-1910.
- Gordien, A. Y., Gray, A. I., Ingleby, K., Franzblau, S. G., & Seidel, V. (2010). Activity of scottish plant, lichen and fungal endophyte extracts against *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res*, *24*, 692-698.
- Grangeia, C., Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2011). Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Res Int*, *44*, 1029-1035.

- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., & Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chem*, *119*, 1443-1450.
- Hooper, L., & Cassidy, A. (2006). A review of the health care potencial of biactive compounds. *J Sci of Food Agric*, *86*, 1805-1813.
- Huang, B., Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2014). The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clin Lab Med*, *34*, 747-761.
- Jäger, A. K., Gauguin, B., Andersen, J., Adsernen, A., & Gudiksen, L. (2013). Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. *J Ethnopharmacol*, *145*, 822-825.
- Jalal, M. A., Read, D. J., & Haslam, E. (1982). Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, *21*, 1397-1401.
- Ji, L., Larregieu, C. A., & Benet, L. Z. (2016). Classification of natural products as sources of drugs according to the biopharmaceutics drug disposition classification system (BDDCS). *Chin J Nat Med*, *14*, 888-897.
- Jones, E., & Hughes, R. E. (1983). Foliar ascorbic acid in some *Angiosperms*. *Phytochem*, *22*, 2493-2499.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, *47*, 3954-3962.
- Kashyap, D., Tuli, H. S., & Sharma, A. K. (2016). Ursolic acid (UA): a metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci*, *146*, 201-213.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., & Jaspars, M. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother Res*, *21*, 615-621.
- Kumarasamy, Y., K Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2002). Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, *83*, pp. 73-77.
- Lobo, A. M., & Lourenço, A. M. (2007). *Biossíntese de Produtos Naturais*. Lisboa, Portugal: IST Press.

- López-Hortas, L., Pérez-Larrán, P., González-Muñoz, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2018). Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Res Int*, *103*, 130-149.
- Ma, B., Forney, L. J., & Ravel, J. (2012). Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Ver Microbiol*, *66*, 371-389.
- Maalik, A., Bukhari, S. M., Zaidi, A., Shah, K. H., & Khan, F. A. (2016). Chlorogenic acid: A pharmacologically potent molecule. *Acta Pol Pharm*, *73*, 851-854.
- Machado, D., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., & Cerca, N. (2017). *Thymbra capitata* essential oil as potential therapeutic agent against *Gardnerella vaginalis* biofilm-related infections. *Future Microbiol*, *12*, 407-416.
- Maloney, P. C. (1990). Microbes and membrane biology. *FEMS Microbiol Rev*, *21*, 3872-3876.
- Mishra, C., & Lambert, J. (1996). Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pac J Clin Nutr*, *5*, 20-24.
- Moloney, M. G. (2016). Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*, *37*, 689-701.
- Monschein, M., Iglesias, J. N., Kunert, O., & Bucar, F. (2008). Phytochemical investigation of *Calluna vulgaris* (L.) Hull using LC/PDA/ESI-MS analysis. *Abstracts, 9th International symposium on instrumental analysis*, (p. 46).
- Monschein, M., Neira, J. I., Kumert, O., & Bucar, F. (2010). Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochem Rev*, *9*, 205-215.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*, *97*, 67-74.
- Neto, F. C., & Simões, M. T. (2007). *As Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares da Sub – região do Alto Tâmega e Barroso*. Obtido em 14 de Janeiro de 2018, de DRAP - Direção Regional de Agricultura e Pescas: http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/cen_documentos/outros/AltoTam_Barroso.pdf

- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *J Ethnopharmacol*, *124*, 270-283.
- Olechnowicz-Stepien, W., Rzakowska-Dodalska, H., & Grimshaw, J. (1982). Investigation on lipid fraction compounds of heather flowers (*Calluna vulgaris* L.). *Pol J Chem*, *56*, 153-157.
- Olteanu, D., Baldea, I., Chichici, S., Bolfa, P., Cenariu, M., Schrepler-Perde, M., Alupeii, M., Museran, A., Filip, A. (2014). *In vitro* studies on the mechanisms involved in chemoprevention using *Calluna vulgaris* on vascular endothelial cells exposed to UVB. *J Photochem Photobiol B*, *136*, 54-61.
- Olteanu, E. D., Filip, G. A., Clichici, S., Daicoviciu, D., Achim, M., Postescu, I. D., Bolfa, P., Bolojan, L., Vlase, L., Muresan, A. (2012). Photochemoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, *31*, 233-243.
- Orhan, I., Küpeli, E., Terzioglu, S., & Yesilada, E. (2007). Biosay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *J Ethnopharmacol*, *114*, 32-37.
- Pancost, R. D., Baas, M., Geel, B. v., & Damsté, J. S. (2002). Biomarkers as proxies for plant inputs to peats: an example from a sub-boreal ombrothrophic bog. *Org Geochem*, *33*, 675-690.
- Pavlović, D., Lakušić, B., Kitić, D., Milutinović, M., Kostić, M., Miladinović, B., & Kovačević, N. (2014). Antimicrobial activity of selected plant species of genera *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. and *Erica* L. (*Ericaceae*). *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, *31*, 81-85.
- Pavlović, R. D., Lakušić, B., Došlov-Kokoruš, Z., & Kovačević, B., Kitić, D., Milutinović, M., Kostić, M., Miladinović, B., & Kovačević, N. (2009). Arbutin content and antioxidant activity of some *Ericaceae* species. *Pharmazie*, *64*, 656-659.
- Perde-Schrepler, M., Chereches, G., Brie, I., Virag, P., Barbos, O., Soritau, O., Tatomir, C., Fischer-Fodor, E., Filip, A., Vlase, L., Postescu, I. D. (2011).

- Photoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract against UVB-induced phototoxicity in human immortalized keratinocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 30, 323-331.
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2018). Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of Mediterranean okra genotypes in relation to harvest stage. *Food Chem*, 242, 466-474.
- Pinela, J., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2017). Wild edible plants: nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food Chem Toxicol*, 110, 165-188.
- Ramawat, K. G., Dass, S., & Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. Em K. G. Ramawat, *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine* (pp. 7-32). Springer, Berlin, Heidelberg: Ramawat K. (eds).
- Rieger, G., Müller, M., Guttenberger, H., & Bucar, F. (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *J Agric Food Chem*, 56, 9080-9086.
- Rodrigues, F., Moreira, T., Pinto, D., Pimentel, F. B., Costa, A., Nunes, M. A., Albuquerque, T. G., Costa, H. S., Palmeira-de-Oliveira, A., Oliveira, A. I., Sut, S., Dall'Acqua, S., Oliveira, M. B. (2018). The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Calluna vulgaris* L. flowers. *Food Res Int*, 111, 724-731.
- Rodríguez, E. V. (2015). *Actividades Biológicas de extratos de plantas y de sus combinaciones*. Tese de Doutorado, Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias, Departamento de Química-Física Aplicada, Madrid.
- Saaby, L., Rasmussen, H. B., & Jäger, A. K. (2009). MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *J Ethnopharmacol*, 121, 178-181.
- Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett*, 28, 109-115.
- Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarninanta, K., & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potencial. *Cell Mol Life Sci*, 65, 2979-2999.

- Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: future source of new drugs. *Internacional Journal of Herbal Medicine*, 4, 59-64.
- Shelyuto, V. L., Smirnova, P., L., Glyzin, V. I., & Anufrieva, L. I. (1975). Flavonoids of *Calluna vulgaris*. *Khim Prir Soedin*, 11, 652.
- Simon, A., Chulia, A. J., Kaouadji, M., & Delage, C. (1994). Quercetin 3-[triacetyl-arabinosyl(1->6)galactoside] and chromones from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 36, 1043-1045.
- Simon, A., Chulia, A. J., Kaouadji, M., Allais, D. P., & Delage, C. (1993a). Further flavonoid glycosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 32, 1045-1049.
- Simon, A., Chulia, A. J., Kaouadji, M., Allais, D. P., & Delage, C. (1993b). Two flavonol 3-[triacetyl-arabinosyl(1->6)glucosides] from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 33, pp. 1237-1240.
- Simon, A., Najid, A., Chulia, A. J., Delage, C., & Rigaud, M. (1992). Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim Biophys Acta*, 1125, 68-72.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M. J., Calhelha, R. C., Vilas-Boas, M., & Ferreira, I. C. (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food Chem Toxicol*, 94, 172-177.
- Souilem, F., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Barreira, J. C., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A., Ferreira, I. C. (2017). Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chem*, 230, 40-48.
- Starchenko, G., & Grytskyk, A. (2017). Analysis of amino acid composition of *Calluna vulgaris* L. (Hull.). *The Pharma Innovation Journal*, 6, 88-89.
- Sticher, O., Soldati, F., & Lehmann, D. (1979). High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of arbutin, methyl arbutin, hydroquinone and hydroquinone monomethylether in *Arctostaphylos*, *Bergenia*, *Calluna* and *Vaccinium* species. *J Med Plant Res*, 53, 253-261.

- Sunil, C., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S., & Al-Dhabi, N. A. (2013). Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. *Food Chem*, *139*, 860-865.
- Szakiel, A., Nizyrński, B., & Paczkowski, C. (2012). Triterpenoid profile of flower and leaf cuticular waxes of heather *Calluna vulgaris*. *Nat Prod Res*, pp. 1-4.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L. Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, *18*, 318-327.
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chem*, *134*, 606-610.
- Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2016). Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends Food Sci Technol*, *50*, 193-210.
- Tunón, H., Olavsdotter, C., & Bohlin, L. (1995). Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J Ethnopharmacol*, *48*, 61-76.
- Jardim Botânico UTAD, (23 de Maio de 2018). *Calluna vulgaris* L. (Hull). Obtido em 23 de Maio de 2018, de Jardim Botânico UTAD: https://jb.utad.pt/especie/Calluna_vulgaris
- Virág, P., Brie, I. C., Burz, C. C., Tatomir, C. B., Hodor, T., Orasan, R., & Decean, H. P. (2015). Modulation of the UV-B-induced oxidative stress and apoptosis in HaCaT cell line with *Calluna vulgaris* extract. *Not Bot Horti Agrobo*, *43*, 313-319.
- Vostinaru, O., Dinte, E., Soran, M. L., Lung, I., Opris, O., & Mogosan, C. (2018). Evaluation of the anti-gout potential of *Calluna vulgaris* L. (Ericaceae) in rats. *Rec Nat Prod*, *12*, 432-444.

- Vučić, D. M., Petkovic, M. R., Rodic-Grabovac, B. B., Stefanovic, O. D., Vasic, S. M., & Comic, L. R. (2014). *In vitro* activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens. *BJBMS*, *14*, 234-238.
- Yan, X.-J., Gong, L.-H., Zheng, F.-Y., Cheng, K.-J., Chen, Z.-S., & Shi, Z. (2013). Triterpenoids as Reversal Agents for Anticancer Drug Resistance Treatment. *Drug Discov Today*, *19*, 482-488.
- Witkin, S. S., & Ledger, W. J. (2012). Complexities of the uniquely human vagina. *Sci Transl Med*, *4*, 132fs11.