



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Urtica spp. Bioactividade e Cultivo



Ana Rita Amaro de Carvalho

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Urtica spp. Bioactividade e Cultivo

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Teresa M. Batista (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Jorge P. Canhoto (Universidade de Coimbra)

Ana Rita Amaro de Carvalho

2014

Imagens da capa

(1) <http://irapl.altervista.org/botany/main.php?taxon=Urtica+dioica;>

(2) <http://www.uco.es/rea/part-alergogenas/urtica.html>

(3) <http://luirig.altervista.org/flora/taxa/floranam.php?genere=Urtica>

*“ Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade.”*

(Sísifo) Miguel Torga

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Teresa Batista, não só por me ter encaminhado neste projecto, mas por todo o seu entusiasmo, a sua atenção e cuidado, e pela sua contagiante confiança em mim na elaboração deste trabalho. Ao meu orientador, Doutor Jorge Canhoto, pela sua constante boa disposição e entusiasmo, um muito obrigado.

Ao Gustavo, pela sua disponibilidade e acessibilidade no decorrer do meu percurso pelos meandros da farmacognosia. À Joana Liberal, pela sua ajuda, palavras de apoio e sorriso sempre pronto.

Gostaria de agradecer a todos os elementos dos Laboratórios de Farmacognosia, do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, nomeadamente a Doutora Maria José e Doutora Teresa Cruz por me terem assistido e acompanhado. Ao LEM/CEF-UC (Rede Nacional de Espectrometria de Massa), pela aquisição dos espectros de massa. A todos os que me acompanharam, pela sua inestimável disponibilidade para ajudar e pelas palavras de amizade, tão necessárias quando as horas de trabalho se alongavam.

Às migas: Patrícia Fernandes, um enorme obrigado pela ajuda imprescindível, e Mariana Roxo, a vocês as duas, o espírito de entreajuda, o apoio e carinho destes dois anos é precioso.

À Té e ao Joca, pelo apoio, preocupação e pelas palavras certas na hora certa, a vossa amizade é inestimável.

Ao Luís, ao longo dos anos, o seu interesse e entusiasmo deram-me um reforçado alento em todo o meu percurso académico.

À minha família, não tenho palavras para descrever o seu apoio, carinho e por sempre terem acreditado que eu conseguiria ser mais e melhor.

A todos os que, de algum modo, participaram neste percurso, um muito obrigado.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1.INTRODUÇÃO	XV
1.1 ENQUADRAMENTO GERAL.....	3
1.2 FAMÍLIA URTICACEAE	5
1.2.1 Género <i>Urtica</i>	6
1.3 FITO-CONSTITUINTES EM <i>URTICA</i> SP.	13
1.3.1 Compostos fenólicos.....	13
1.4 OUTROS FITO-CONSTITUINTES.....	16
1.4.1 Identificação e dosagem de compostos fenólicos	17
1.5 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.....	20
1.5.1 Anti-oxidante.....	20
1.5.2 Anti-inflamatória.....	24
1.5.3 Anti-microbiana	27
1.6 GERMINAÇÃO E PROPAGAÇÃO DE SEMENTES DE <i>URTICA DIOICA</i>	31
1.6.1 Avaliação da germinação de sementes e propagação <i>in vitro</i> de <i>Urtica dioica</i>	32
2.OBJECTIVOS.....	35
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 REAGENTES.....	41
3.2 MATERIAL VEGETAL DE ESTUDO	41
3.3 EXTRACÇÃO DE FITOCONSTITUINTES.....	42
3.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	42
3.4.1 Métodos espectrofotométricos.....	42
3.4.2 Métodos cromatográficos	44
3.5 AVALIAÇÃO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	46
3.5.1 Anti-oxidante.....	46
3.5.2 Anti-inflamatória.....	48
3.5.3 Anti-microbiana	50
3.6 GERMINAÇÃO E PROPAGAÇÃO DE SEMENTES DE <i>URTICA DIOICA</i>	51
3.6.1 Avaliação da germinação de sementes <i>in vitro</i>	51
3.6.2 Propagação de <i>Urtica dioica</i>	52
3.6.3 Aclimatização das plantas de <i>Urtica dioica</i>	53
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55

4.1 PARTE AÉREA FLORIDA.....	57
4.1.1 Caracterização fitoquímica.....	57
4.1.2 Actividades biológicas.....	79
4.2 ÓRGÃOS ISOLADOS DA PARTE AÉREA.....	87
4.2.1 Caracterização fitoquímica.....	87
4.2.2 Actividades biológicas.....	88
4.3 GERMINAÇÃO E CULTIVO DE <i>URTICA DIOICA</i>	93
4.3.1 Avaliação da germinação de sementes	93
4.3.2 Propagação de plantas	93
4.3.2 Aclimatização de plantas	94
5.CONCLUSÕES	95
6.BIBLIOGRAFIA	99

Lista de Abreviaturas

ABTS – [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato)]

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

CoQ10 – Coenzima Q10

COX – Ciclooxygenase

DAD – Detector de Fotodíodos

DPPH – 2,2-difenil-2-picril-hidrazilo

ESCOP – Cooperativa Científica Europeia em Fitoterapia

eNOS – Sintase endotelial de óxido nítrico

FRAP – Capacidade redutora de ferro do plasma

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

IL – Interleucina

iNOS – Sintase indutível de óxido nítrico

LPS – Lipopolissacarídeo

MS – Espectrometria de Massa

NF-kB – Factor Nuclear-kappa B

NO – Óxido Nítrico

NOS – Sintase de óxido nítrico

nNOS – Sintase neuronal de óxido nítrico

PG – Prostaglandinas

RNS – Espécie Reactiva de Azoto

ROS – Espécie Reactiva de Oxigénio

Rf – Factor de retenção

Rt – Tempo de retenção

TEAC – Capacidade antioxidante equivalente- (Trolox)

TLC – Cromatografia de Camada Fina

TNF- α - Factor alfa de necrose tumoral

Trolox – Ácido 6-hidroxi-2-5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UV – Ultra Violeta

Resumo

As urtigas, apesar de comumente conhecidas pela sua picada dolorosa, são também utilizadas pelas suas propriedades terapêuticas. Desde as folhas à raiz, são tradicionalmente utilizadas para tratamento da diabetes, de patologias reumáticas, inflamatórias e hipertensão. De entre as muitas espécies existentes, a *Urtica dioica* L. (Urticaceae), espécie distribuída globalmente, é uma fonte de sais minerais, fibra e proteína, permitindo-lhe ser integrada na alimentação, sendo também reconhecida por utilizações que vão desde o uso da raiz para tratamento da Hiperplasia Benigna da próstata, ao uso das partes aéreas como anti-diurética, anti-reumática e anti-inflamatória.

Neste trabalho procedeu-se ao estudo de três espécies de urtigas: *Urtica dioica*, *Urtica urens* L. (Urticaceae), usada por vezes em substituição da *Urtica dioica*, e *Urtica membranacea* Poir. ex Savigny (Urticaceae), sobre a qual são praticamente inexistentes estudos científicos. O principal objectivo foi avaliar a bioactividade das três espécies; anti-oxidante, anti-inflamatória e anti-fúngica, e paralelamente, caracterizar constituintes fenólicos - metabolitos secundários vegetais com propriedades terapêuticas amplamente divulgadas - de modo a destacar, não só a espécie de maior interesse, mas também inferir sobre a natureza química dos compostos que podem contribuir maioritariamente para estas propriedades.

Com recurso a técnicas cromatográficas, nomeadamente, HPLC acoplado a dois detectores: fotodíodos e espectrómetro de massa, foi possível identificar pela primeira vez, na *Urtica dioica* o ácido cafeoiltartárico e o *p*-cumaroilmalato.

As outras duas espécies abordadas, *Urtica urens* e *Urtica membranacea*, apesar de menos bioactivas, revelaram também uma presença significativa de compostos fenólicos, tendo sido também identificados, pela primeira vez, na *Urtica urens*, os ácidos 3-*O*-cafeoilquínico, 4-*O*-cafeoilquínico, 5-*O*-cafeoilquínico e *p*-cumaroilcafeoilquínico, para além do flavonóide, diosmetina-*O*-rutinósido. Quanto à *Urtica membranacea*, espécie cuja distribuição é restrita à região Mediterrânica, demonstrou também algum potencial bioactivo, apesar de nunca antes ter sido objecto de estudos fitoquímicos. Foram identificados sete derivados de ácidos hidroxicinâmicos e dez flavonóides do tipo flavona e flavonol, *C*-, *O,C*- e *C*- glicosilados, assim como três

derivados do 3-hidroxi-3-metilglutarilo, de distribuição muito pouco referenciada noutras plantas.

A *Urtica dioica* demonstrou ter potencial como antioxidante, superior à das outras espécies testadas, bem como uma forte capacidade anti-inflamatória e alguma actividade anti-fúngica. Consequentemente, esta espécie foi seleccionada para um estudo posterior, que permitiu avaliar o órgão aéreo da planta (flores, folhas e caules) que contribuía de modo maioritário para as propriedades bioactivas.

As folhas demonstraram ser a parte com maior actividade anti-oxidante e anti-inflamatória, bem como a maior concentração em ácidos hidroxicinâmicos, comparativamente à parte aérea total da planta florida.

A espécie de maior bioactividade, *Urtica dioica*, foi também seleccionada para implementar um método de propagação desta espécie. Procedeu-se à optimização de um método de cultivo *in vitro* e procedeu-se a uma posterior aclimatização para solo, sendo que os resultados obtidos foram bastante promissores para o futuro cultivo *in vitro* da espécie.

Palavras-Chave: *Urtica dioica*; *U. urens*; *U. membranacea*; compostos fenólicos; anti-oxidante; anti-inflamatória; anti-fúngica; propagação *in vitro*.

Abstract

Nettles, although commonly known for their painful sting, are also used for its therapeutic properties. From the leaves to the root, they are traditionally used for the treatment of diabetes, rheumatic, inflammatory disorders, and hypertension. Among the many existing species, *Urtica dioica* L. (Urticaceae), globally distributed species, is a source of minerals, fiber and protein, allowing it to be integrated as food, and also recognized for uses ranging the use of the root to treat benign prostatic hyperplasia, the use of aerial parts as anti-diuretic, anti-rheumatic and anti-inflammatory.

In this work we undertook an analysis of three species of nettles: *Urtica dioica*, *Urtica urens* L. (Urticaceae), sometimes used as a replacement of *Urtica dioica* and *Urtica membranacea* Poir. ex Savigny (Urticaceae), on which scientific studies are virtually nonexistent. The primary objective was to evaluate the bioactivity of the three species; anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-fungal, and in parallel, characterizing phenolic constituents - plant secondary metabolites with therapeutic properties widely disseminated - in order to highlight not only the species of greatest interest, but also to infer the chemical nature of compounds which can largely contribute to these properties.

With the use of chromatographic techniques, including HPLC coupled to two detectors: photo diodes and the mass spectrometer, it was identified for the first time, in *Urtica dioica*, caffeoyltartaric and *p*-coumaroylmalate acids.

The other two species addressed, *Urtica urens* and *Urtica membranacea*, although less bioactive also revealed a significant presence of phenolic compounds being also identified for the first time in *Urtica urens*, 3-*O*-caffeoylquinic, 4-*O* - caffeoylquinic, 5-*O*-caffeoylquinic and *p*-coumaroyl-caffeoylquinic acids, in addition to flavonoid diosmetin-*O*-rutinoside. *Urtica membranacea*, whose distribution is restricted to the Mediterranean region, also showed some bioactive potential, despite it has never been submitted to phytochemical nor bioactivity studies. There were seven derivatives of hydroxycinnamic acids and ten flavonoids, flavone and flavonol-type, *C*-, *O*, *C*- and *C*- glycosides identified, as well as three derivatives of 3-hydroxy-3-methylglutaryl, with distribution rarely referenced in other plants.

Urtica dioica demonstrated an antioxidant potential superior than that of other species tested, as well as a strong anti-inflammatory ability and some anti-fungal

activity. Consequently, this species was selected for further study, which allowed us to assess the aerial plant organ (flowers, leaves and stems) with major contribution for bioactive properties.

The leaf has proven to be the part with greater anti-oxidant and anti-inflammatory activity, as well the higher concentration in hydroxycinnamic acids, compared to total aerial parts of the flowering plant.

The species with highest bioactivity, *Urtica dioica*, has also been selected to implement a propagation method for the species. There was an optimization for *in vitro* cultivation method and we proceeded to acclimatization to soil, and the results were quite promising for the future growth of the species *in vitro*.

Keywords: *Urtica dioica*; *U. urens*; *U. membranacea*; phenolic compounds; antioxidant; anti-inflammatory; antifungal; *in vitro* propagation.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento geral

As antigas civilizações, com um particular conhecimento das plantas e suas propriedades, permitiram que chegasse até nós, ainda que reescrito pela passagem por numerosas épocas históricas o reconhecimento das plantas e o seu património. Nas últimas décadas, registou-se um incremento da utilização, em várias vertentes, das plantas pelo homem - alimentação, indústria, serviços. Foram estes saberes acumulados, transmitidos ao longo de gerações, que permitiram, não só a sobrevivência das sociedades humanas, como o desenvolvimento da Medicina actual e também a crescente investigação acerca das propriedades das plantas (Rodrigues, 2002).

O progresso industrial veio contribuir para o desenvolvimento de grandes metrópoles e urbanizações de enorme densidade populacional, e também para a desertificação de zonas rurais, caso que tão bem se conhece até em Portugal. Se bem que no passado a medicina popular fosse muito comum e desempenhasse para muitas populações a única forma de acesso à Medicina, hoje em dia, nas sociedades ditas mais desenvolvidas, é relativamente fácil o acesso à chamada Medicina Convencional e a muitos e variados fármacos (Rodrigues, 2002).

Desde a entrada no novo Milénio tem vindo a crescer uma onda social muito forte que promove o regresso às origens, o contacto com a natureza e a obtenção dos seus recursos para uso antropológico. De facto, assiste-se actualmente a um retorno à fitoterapia. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população em países em vias de desenvolvimento utiliza a medicina tradicional à base de plantas como fonte primária para tratar e controlar diferentes patologias (Tamayo 2006 *in* (Teixeira, 2012)). Contudo, há que ter em conta que as plantas medicinais não podem ser utilizadas para o tratamento de todas as patologias e em qualquer paciente, e que não estão isentas de efeitos secundários, nem de contra-indicações e interacções (Teixeira, 2012). A organização Mundial de Saúde, com diversos documentos técnicos sobre as plantas medicinais, e países como a Alemanha, França e Inglaterra incluíram já várias plantas medicinais nas respectivas farmacopeias e elaboraram monografias tão importantes como as da Comissão E (Comité de peritos em plantas medicinais, criado pela Agência Federal de Saúde Alemã) para avaliar a segurança das fitomedicinas, tendo publicado, nos últimos 15 anos, 410 monografias sobre 324 plantas, onde se incluem todas as informações relevantes à utilização destas plantas num âmbito farmacológico, incluindo, para além das propriedades farmacológicas, as descrições das

plantas e respectivos constituintes, propriedades farmacológicas, indicações terapêuticas, aceites, contraindicações, efeitos secundários, interacções, doses recomendadas, requisitos de controlo de qualidade e condições recomendadas de armazenamento (Martins, 2007).

É neste contexto que surgem cada vez mais estudos, empresas farmacêuticas, confrarias e centros de estudo que lançam, quase diariamente, estudos científicos, notícias e produtos naturais, que resultam de um aprofundado estudo sobre as propriedades físico-químicas, farmacológicas, nutricionais, e outras, de muitas espécies, vegetais e animais, que fazem ou farão, num futuro próximo, parte do quotidiano de várias sociedades. O uso controlado destes produtos, seja pela avaliação da sua toxicidade, interacção com outros fármacos ou até pela vantagem que demonstram sobre outro produto já existente, abrem campo para novas áreas científicas e profissionais. Neste enquadramento, o presente trabalho propõe-se avaliar algumas propriedades biológicas de três espécies do género *Urtica*, cujo uso tradicional, sustentado por diversos estudos etnobotânicos, se considera vir a ter um grande potencial num futuro próximo.

Há muito que se associam as propriedades terapêuticas das plantas aos compostos únicos produzidos por elas – metabolitos secundários. Estes compostos, que têm diversas funções dentro da comunidade vegetal, desde adjuvantes à reprodução, protecção contra a dessecação ou defesa contra predadores, são essenciais à sobrevivência de algumas espécies. Por experimentação e um saber empírico resultante de muitas gerações, o Homem tem vindo a utilizar estes compostos em prol da melhoria da sua qualidade de vida.

O recurso a fármacos sintéticos, de largo espectro de acção, a perda da sua eficácia, os efeitos indesejados que induzem devido à utilização frequente, geraram a necessidade da utilização de medicinas alternativas e/ou complementares, particularmente baseadas em produtos de origem natural.

Produtos tais como o vinho e os frutos vermelhos têm sido muito publicitados como fonte natural de anti-oxidantes. Isto deve-se ao conteúdo em compostos fenólicos - antocianinas e taninos, que existem naturalmente ou que resultam da transformação tecnológica destes fito-constituintes. Estudos científicos atribuem aos polifenóis do

vinho efeitos benéficos para a saúde humana – caso do paradoxo francês, nomeadamente em doenças cardiovasculares e aterosclerose.

Torna-se assim premente o estudo dos recursos naturais que outrora fizeram parte do quotidiano tradicional e medicinal de cada cultura, não só por serem resultado de um conhecimento adquirido ao longo de muitas gerações, como também pela influência de uma evolução conjunta. As plantas revelam diversas propriedades biológicas e farmacológicas que hoje, através do conhecimento científico, conseguem ser compreendidas e projectadas para usos extraordinários, de formas nunca antes realizadas.

1.2 Família Urticaceae

Estudos etnobotânicos como (Camejo-Rodrigues, Ascensão, Bonet, & Vallès, 2004) e (Carvalho, 2005) revelam a importância da cultura e do saber popular sobre as plantas a que as populações têm acesso, guiando-se por um conhecimento da natureza, intrínseco e apoiado nas suas propriedades medicinais. Tem crescido a vontade de manter o cariz artesanal, de certificar e validar estas plantas, assim como as propriedades que tradicionalmente lhes são atribuídas, e sem que ocorra um impacto ambiental prejudicial. Em Portugal, vários levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos, abrangendo áreas como a Serra da Estrela, Parque Montesinho, Trás-os-Montes, entre outros, revelam o saber empírico das propriedades das plantas.

A família Urticaceae é amplamente conhecida, tendo diversos géneros com usos tradicionais conhecidos, de entre os quais se destaca o género *Urtica*, cujas espécies são referenciadas globalmente como tendo propriedades terapêuticas de interesse. As espécies desta família têm uma distribuição mundial alargada, com propriedades muito próprias e com interesse holístico crescente, uma vez que as urtigas fornecem já uma ampla gama de recursos, não só alimentares, mas também terapêuticos, como refere a seguinte citação:

“Las urticáceas se usan en dermatología, para el reuma y enfermedades circulatorias, para el colesterol y la diabetes. Las afecciones del sistema circulatorio son tratadas con catorce especies que pertenecen a ocho de estas familias botánicas.” (Carvalho, 2005)

1.2.1 Género *Urtica*

O género *Urtica* L. (1753), que compreende 24 a 39 ou 30 a 45 espécies, segundo diferentes autores, é constituído por plantas herbáceas, de folhas opostas, serradas, com estípulas; flores unissexuais, monóicas ou dióicas, dispostas em espigas axilares, simples ou ramosas; pêlos vulnerantes, que segregam um líquido cáustico (Coutinho, 1939). Este género está distribuído globalmente; em Portugal com maior incidência no Norte e Centro do País.

A característica sensação de calor, comichão e ardor produzida pela picada do pêlo de urtiga é resultado da acção combinada de histamina e acetilcolina, presentes no fluido do pêlo (Emmelin & Feldberg, 1947). Este é constituído por um tubo capilar calcificado na parte inferior e uma parte superior siliciada, e fechado na ponta numa estrutura com a forma de um pequeno bolbo. Em contacto com a pele, o bolbo quebra-se e fica exposta uma ponta fina, que injecta o fluido (Emmelin & Feldberg, 1947). É esta pungente picada que origina o desconforto na utilização das urtigas, mas que apesar de dolorosa, pode ser usada para efeitos benéficos.

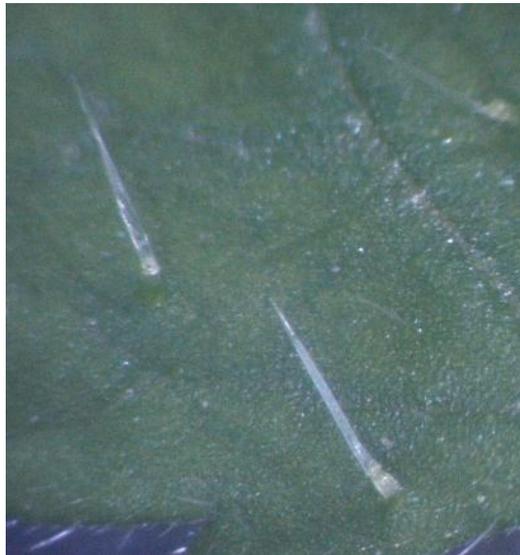


Figura 1. Detalhe do pêlo urticante em *Urtica dioica*.

De facto, já nas antigas civilizações se tirava partido desta picada, esfregando urtigas frescas em membros artríticos ou paralisados para estimular a circulação e trazer calor às articulações e extremidades, num tratamento conhecido como “urtication” (Upton, 2013). Os antigos egípcios também reportaram o uso da infusão para o alívio da artrite e do lumbago (Upton, 2013). As tropas romanas, além de esfregarem urtigas frescas no corpo para manter o calor, transportaram a semente de uma espécie semelhante à urtiga romana (*Urtica pilulifera*) para Inglaterra, com o sentido “de lhes ter sido dito que o clima da Grã-Bretanha era tão frio que não era para ser suportado” (Upton, 2013). Esta prática de “urtication” tornou-se habitual na medicina tradicional para tratamento da artrite, reumatismo e paralisia muscular e é, possivelmente, o uso medicinal mais antigo da urtiga (Upton, 2013).

Usos e Aplicações

Segundo (Bisht, Bhandari, & Bisht, 2012), o próprio nome Urtiga vem da palavra que significa “planta têxtil”, tendo um grande potencial para polpa de fibras longas e mercados têxteis, pois possui propriedades semelhantes ao linho e ao cânhamo. Na Escócia era cultivada para extrair fibra têxtil. Embora menos, é também usada para fazer papel. Actualmente é extraído das urtigas um tecido sedoso conhecido como “Ramic”, além de corda, papel e fibra têxtil.

Na vertente cosmética, a urtiga é usada em shampoos para a caspa, como anti-eczematoso e para recuperar a cor natural do cabelo. Além disso, estimula o crescimento do cabelo.

As urtigas podem ser integradas na alimentação humana, existindo diversas receitas tradicionais como Sopa de Urtigas e Esparregado de urtigas. Ao serem cozinhadas, secas ou sujeitas a qualquer processo extractivo, as urtigas perdem as suas propriedades urticantes. Estudos como (Rutto, Xu, Ramirez, & Brandt, 2013) demonstram que estas plantas, mesmo após secagem ou cozedura, não perdem o seu valor nutricional, retendo minerais, vitaminas e outros compostos, para além de serem bastante ricas em fibra e proteína – o que lhe confere valor a nível alimentar. A urtiga é bastante rica em diversos constituintes e tem um valor dietético bastante relevante (Bisht *et al.*, 2012), como se pode ver pela Figura 2.

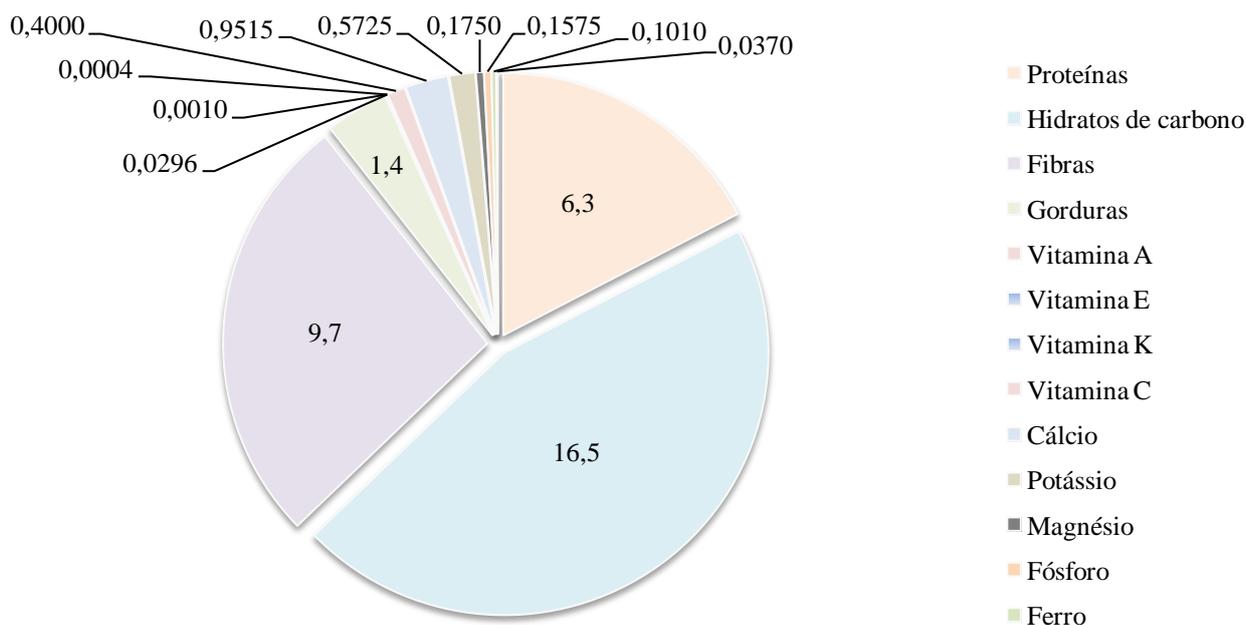


Figura 2. Representação gráfica do conteúdo em Metabolitos primários, Vitaminas e sais minerais das urtigas (adaptado de (Upton, 2013)).

As urtigas podem ser usadas como alimento na produção aviária, sendo que promovem a absorção de proteínas e vitaminas, além de reduzirem as necessidades de alimentação verde em 30% (Bisht *et al.*, 2012).

A urtiga é igualmente importante como promotor da saúde humana.

- ∴ A *Urtica dioica* tem demonstrado ser usada para diversos tipos de doenças, sendo de destacar os usos referentes a disfunções do aparelho urinário e digestivo, usos dermatológicos diversos, entre outras aplicações terapêuticas, nomeadamente, analgésicas.
- ∴ A *Urtica membranacea* é usada como hipocolesterolémica na diabetes e a nível dermatológico.
- ∴ Testemunhou-se que a *Urtica urens* tem especiais aplicações relacionadas com dores de articulações (reumatismo) e também usos dermatológicos.

As urtigas têm já vários usos validados: a ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) considera que, sob a forma de chás, extractos e outros produtos, as urtigas podem ser usadas como: adjuvante no tratamento de artrites, artroses e estados

reumatismais; diurético, nas afecções das vias urinárias baixas (litíase urinária – formação de cálculos renais); depurativo nos estados seborreicos da pele; remineralizante.

Urtica dioica está classificada como planta de classe 1 – podendo ser, de modo seguro, consumida quando usada apropriadamente, tal como é referenciado no livro “The Botanical Safety Handbook” (1997), da American Herbal Products Association (AHPA) (Upton, 2013).

De acordo com a Comissão E está aprovado o uso das raízes para a HBP (Hiperplasia Benigna da Próstata).

No presente trabalho, pretende destacar-se o interesse e possível potencial biológico de *Urtica dioica*, *Urtica membranacea* e *Urtica urens*. Estas espécies têm já um historial de usos populares, com diferentes aplicações e às quais foram atribuídas diversas propriedades medicinais.

1.2.1.1 *Urtica dioica* - revisão bibliográfica

Urtica dioica L. (1753), mais conhecida por urtiga maior ou ortigão, é uma planta herbácea, lenhosa na base, dióica; podendo atingir até 1,5 m de altura, tem as características folhas ovado-lanceoladas, cordiformes na base, com a face coberta de pelos urticantes; espigas de ambos os sexos ramosas e delgadas, compridas (Castroviejo et al., 1997; Coutinho, 1939). A época de floração decorre entre Maio e Junho, desenvolvendo-se em lugares cultivados, húmidos ou sombrios, principalmente em regiões montanhosas. Encontra-se distribuída pelas regiões temperadas de ambos os Hemisférios; a distribuição em Portugal está representada na Figura 2.

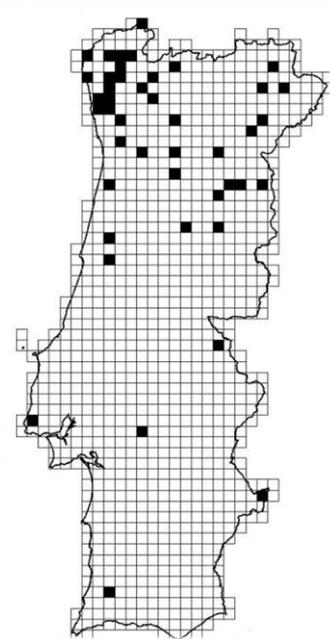


Figura 3. Distribuição de *Urtica dioica* em Portugal (retirado de floraon em 22-06-2014)

As propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de *Urtica dioica* são alvo de levantamentos etnobotânicos e estudos científicos há já muitas décadas. Recentemente, tem crescido a procura de fontes naturais de anti-oxidantes, que se sabe terem uma

importante relação com as propriedades anteriormente referidas. Os extractos de *Urtica dioica*, estudados por Gülçin *et al.* (2004), ricos em compostos fenólicos e ácido linoleico, demonstram ter, *in vitro*, propriedades analgésicas e anti-oxidantes. O elevado conteúdo de compostos fenólicos de *Urtica dioica* confere-lhe actividade enzimática significativa, mas moderada actividade anti-oxidante não-enzimática (Kukrića *et al.* 2012). Já em 2013, Hajhashemi & Klooshani, validaram o elevado conteúdo em flavonóides e polifenóis nos extractos de *Urtica dioica*, sendo que, *in vitro*, foi efectiva a actividade analgésica e anti-inflamatória, em ensaios de mimetização da dor abdominal humana; também Ghaima *et al.* 2013 demonstram que a *Urtica dioica* é rica em compostos fenólicos, e que demonstra ter uma forte actividade anti-oxidante, relativamente ao α -tocoferol (Ghaima, Hashim, & Ali, 2013).

Há já muito tempo que *Urtica dioica* é descrita como anti-diabética. Diversos estudos têm sido realizados para validar o potencial desta espécie e o modo como pode ser usada para minimizar patologias associadas à diabetes. Haouri *et al.* (2007) relacionaram a capacidade de diminuir a resistência à insulina com a capacidade de *Urtica dioica* em inibir a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (endógenas), de mobilização de Ca^{2+} e da fosforilação da tirosina (a qual desempenha importantes funções em todo o organismo, ao nível do crescimento e divisão celular). Os extractos hidroalcoólicos de urtiga mostraram diminuir alguns mediadores inflamatórios (citocinas) em pacientes com diabetes tipo II (Namazi, Esfanjani, Heshmati, & Bahrami, 2011); os extractos de urtiga actuam a nível pancreático, nos ilhéus de Langerhans, e possuem também outros mecanismos, como a inibição da absorção intestinal de glicose, efeitos inibitórios ao nível enzimático e facilitação do *uptake* de glicose, o que confirma a capacidade efectiva de reduzir os níveis de açúcar no sangue (Mehri, Hasani-Ranjbar, Larijani, & Abdollahi, 2011), sendo essa redução de 60 % segundo (Golalipour, Ghafari, Kouri, & Kestkar, 2010). Além disso, verificou-se que a administração de extractos de *Urtica dioica* promoveu a proliferação de células- β , antes do tratamento, em ratos, com estreptozotocina (Dar *et al.*, 2013; Golalipour *et al.*, 2010).

Tradicionalmente descrita também como anti-microbiana, os resultados científicos têm validado esta actividade. De facto, os extractos de *Urtica dioica* têm demonstrado possuir actividade efectiva contra microrganismos (Dar *et al.*, 2013), tais como - *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*;

Staphylococcus aureus; *Streptococcus pneumoniae*; *Enterobacter aerogenes*; *Micrococcus luteus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Candida albicans* - tendo melhores resultados do que os padrões e potentes agentes antimicrobianos tais como nitrato de miconazol, amoxicilina, ácido clavulânico, ofloxacina e netilmicina (Gülçin, 2006). Já Singh *et al.* (2012) comprovou, *in vitro*, a acção efectiva dos extractos de Urtiga, nas bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella flexneri*; o extracto revelou maior eficácia para bactérias gram negativas.

Estudos *in vitro* concluíram que o conteúdo em glicosilflavonóides imunoestimulantes na composição de *Urtica dioica* explica o seu uso tradicional como anticancerígena (Akbar, Basaran, Undeger, & Basaran, 2003). O uso da raiz de *Urtica dioica* foi já alvo de estudo em humanos para o tratamento da Hiperplasia Benigna da Próstata (Bisht *et al.*, 2012); este uso é também validado pela Comissão E.

São várias as referências para o uso tópico de *Urtica dioica* no tratamento de osteoartrite (Rayburn, Fleischbein, & Song, 2009); pela sua acção inibitória de factores de transcrição, nomeadamente NF-kB, (Riehemann, Behnke, & Schulze-Osthoff, 1999), que além de ter um efeito pró-inflamatório, está directamente envolvido na regulação genética de condrócitos, os quais regulam a produção de colagénio e a formação de cartilagem (Shakibaei, Allaway, Nebrich, & Mobasheri, 2011), sendo este efeito semelhante ao modo de actuação de fármacos não-esteróides utilizados no tratamento da artrite reumática e da osteoartrite (Khalili, Rezazarandi, & Vahidi, 2012; Upton, 2013).

1.2.1.2 *Urtica urens* - revisão bibliográfica

Urtica urens L. (1753), mais conhecida como urtiga-menor, é uma planta herbácea, com as já características folhas ovado-elípticas, inciso-dentadas, glabras excepto os pelos urticantes na face e nervuras na parte inferior; flores masculinas e femininas reunidas nas mesmas espigas, em redor do eixo (Castroviejo *et al.*, 1997; Coutinho, 1939). A época de floração decorre de Março a Setembro. Esta espécie desenvolve-se em hortas, terrenos incultos e sebes. Encontra-se distribuída pela Europa, Norte de África e em algumas zonas do Médio Oriente; a distribuição em Portugal pode ver-se na Figura 3.

Supradita como tendo, etnofarmacologicamente, propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas, extractos de *Urtica urens*, *in vitro*, demonstram ter acção antibacteriana e também a possibilidade de actuar como anti-oxidantes, devido à sua grande capacidade de actuar como scavenger (Jimoh, Adedapo, Aliero, & Afolayan, 2010). Esta capacidade de doação de prótons foi associada ao flavonóide patuletina, podendo esta propriedade estar na base de estudos futuros como anti-diabética (Abdel-Wahhab, Said, & Huefner, 2005). Este polifenol tem acção anti-inflamatória, tendo-se avaliado a redução significativa de edemas induzidos por carragenina (Marrassini, Acevedo, Miño, Ferraro, & Gorzalczany, 2010), e antimicrobiana, efectivamente testada contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis*, *Escherichia coli*, e *Candida albicans* (Upton, 2013). Usada tradicionalmente para o tratamento de hematomas, os extractos de *Urtica urens* contêm um composto anti-inflamatório ACG (ácido clorogénico), presente em concentrações bastante significativas e que parece conferir a esta espécie uma acção anti-inflamatória, através de um mecanismo de inibição de efeitos da inflamação a nível vascular e celular.

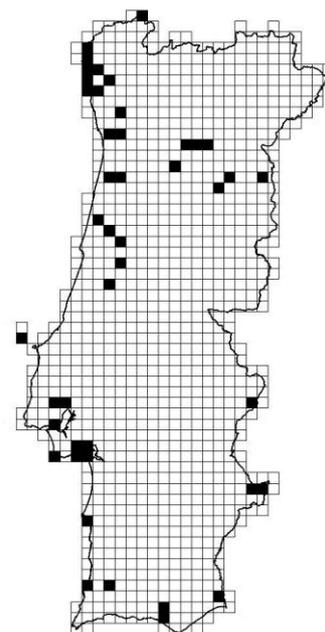


Figura 4. Distribuição de *Urtica urens* em Portugal (retirado de floraon em 22-06-2014)

Urtica urens revelou ser antinociceptiva em ensaios como contorção induzida por ácido acético, teste da formalina e teste da placa quente, demonstrando uma possível actuação na redução da síntese de prostaglandinas e em mecanismos de transdução de efectores nociceptivos (Marrassini *et al.*, 2010). É também referida como hepatoprotectora, visto que extractos de *Urtica urens* revelaram efeitos protectores em lesões do fígado, quando usados em estudos *in vivo* de mimetização de fibrose hepática (Sen, 2007).

1.2.1.3 *Urtica membranacea* - revisão bibliográfica

Urtica membranacea Poir. ex Savigny (1798), mais conhecida por urtiga-de-caudas, é uma planta herbácea monóica, de folhas ovadas, dentado-serradas, os pelos urticantes poucos e dispersos; as espigas masculinas (apenas as superiores, ou todas elas)

alongadas e unilaterais, com o eixo dilatado-membranoso; as espigas femininas (as inferiores, ou todas) mais curtas, com as flores dispostas em redor do eixo não dilatado (Castroviejo et al., 1997; Coutinho, 1939). A época de floração decorre durante quase todo o ano. Esta espécie desenvolve-se em hortas, pátios, muros e sebes, principalmente nas províncias marítimas. Encontra-se distribuída pela Região Mediterrânica e a distribuição em Portugal pode ver-se na Figura 4.

Apesar de ter várias propriedades medicinais, a revisão bibliográfica desta espécie é ainda escassa. Há a destacar, no óleo extraído da planta, a presença do cineole e limoneno (Santos, 2010).

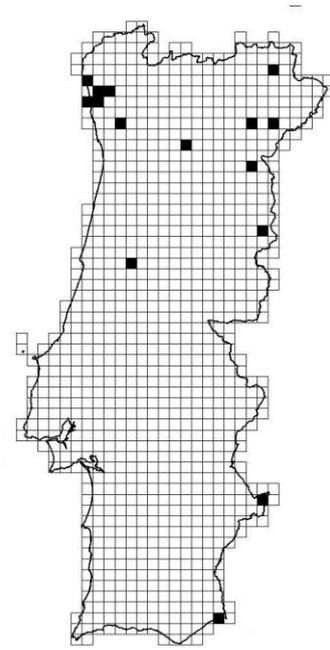


Figura 5. Distribuição de *Urtica membranacea* em Portugal (retirado de flora-on em 22-06-2014)

1.3 Fito-constituintes em *Urtica* sp.

1.3.1 Compostos fenólicos

Os metabolitos secundários sintetizados pelas plantas têm como funções: defesa – contra predadores e organismos oportunistas – e sinalização – atracção de polinizadores e agentes de competição entre plantas. Não entram em processos respiratórios, de crescimento ou fotossintéticos mas são importantes à sobrevivência e reprodução das plantas. Estes metabolitos são assim representativos da adaptação dos organismos vegetais e foram, também, sujeitos à selecção natural ao longo da evolução (Wink, 2003).

Entre os variados tipos de metabolitos secundários produzidos pelas plantas pode falar-se em alcalóides, poliacetatos, terpenóides, esteroides e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são substâncias não azotadas, que contêm pelo menos um anel benzénico, ao qual se liga pelo menos um, grupo hidroxilo, livres ou fazendo parte de ésteres, éteres ou heterósidos (Proença da Cunha, 2005); a classificação pode ver-se na Tabela 1, de acordo com (Vermerris & Nicholson, 2006). Estes são principalmente derivados do metabolismo do ácido chiquímico e/ou de um poliacetato (Proença da Cunha, 2005). Estão presentes numa enorme gama de produtos alimentares como frutos,

vegetais, nozes, sementes, flores e caules (Nichols & Katiyar, 2010). Os compostos fenólicos englobam vários subgrupos, dos quais se destacam: ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Os taninos são largamente referenciados nas folhas de chá e no vinho, tendo propriedades adstringentes e anti-sépticas; sabe-se hoje que os taninos são anti-oxidantes naturais. Os flavonóides são compostos que têm terem várias actividades biológicas: anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-hepatotóxica, anti-microbiana e anti-viral, anti-alérgica, protector gastro-intestinal, actividade estrogénica, acção venotrópica, inibição enzimática. Estudos epidemiológicos indiciam que os compostos fenólicos da dieta Mediterrânica são anti-radicalares, possuindo, consequentemente, propriedades anti-oxidantes (Vermerris & Nicholson, 2006).

Estes metabolitos são geralmente formados a partir de metabolitos primários e as vias de síntese destes compostos são diversas. No presente trabalho, iremos abordar os compostos fenólicos presentes em 3 espécies do género *Urtica*, sua identificação e actuação em sistemas biológicos.

Tabela 1. Classificação de Compostos Fenólicos (adaptado de (Vermerris & Nicholson, 2006)).

ESTRUTURA	CLASSE
C6	Fenóis simples
C6 – C1	Ácidos fenólicos (do tipo benzoico) e compostos derivados
C6 – C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6 – C3	Ácidos, aldeídos, álcoois cinâmicos
C6 – C3	Cumarinas, isocumarinas e cromonas
C15	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C6-C3-C6	Flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas, flavononóis, flavanóis e antociadinas
C30	Biflavonóides
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C6, C10, C14	Quinonas
C18	Betacianidinas
Dímeros ou oligómeros	Linhanos e neolinhanos
Oligómeros ou polímeros	Taninos
Polímeros	Flobafenos

A actividade farmacológica dos compostos fenólicos, nomeadamente de ácidos fenólicos e flavonóides, cumarinas, taninos e compostos quinónicos, tem como base a reactividade destes compostos. A natureza acídica do hidroxilo fenólico, a facilidade de oxidação do núcleo aromático e a capacidade de formação de novas moléculas (ligação homolítica) (Proença da Cunha, 2005) fazem dos compostos fenólicos biomoléculas de grande interesse, na procura de novas armas terapêuticas.

1.3.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos do tipo benzóico com maior predomínio na natureza são o ácido gálico e o ácido elágico, encontrando-se frequentemente sob a forma de ésteres e heterósidos (Proença da Cunha, 2005). Os ácidos fenólicos do tipo cinâmico são os de maior expressão na natureza, dos quais são exemplo: ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico. Têm características muito próprias, sendo que sob a forma de ésteres ou heterósidos são hidrossolúveis (água e solventes orgânicos polares), enquanto sob a forma de ácidos são solúveis nos solventes orgânicos, em meio ácido. Estes compostos têm vindo a ser, nos últimos anos, estudados na vertente biológica, nomeadamente anti-oxidante/anti-radicalar, que está na base da expressão da sua actividade anti-carcinogénica e cardioprotectora (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996).

1.3.1.2 Flavonóides

Tal como referido anteriormente, os compostos fenólicos raramente são encontrados, na natureza, na forma livre (Vermerris & Nicholson, 2006). No caso dos flavonóides, estes ocorrem predominantemente na forma heterosídica (Proença da Cunha, 2005). Os flavonóides têm por base a estrutura flavânica, englobando um enorme grupo de moléculas, resultado de pequenas alterações estruturais e, conseqüentemente, diferentes mecanismos de acção e actividades farmacológicas (Proença da Cunha, 2005). Os flavonóides têm vindo a ser, progressivamente estudados e reconhece-se hoje o seu enorme potencial de actuação ao nível de variados sistemas biológicos, bem como tendo propriedades: anti-carcinogénicas, anti-alérgicas, anti-inflamatórias, estrogénicas e *benzodiazepina-like*, não esquecendo anti-radicalar/anti-oxidante (Proença da Cunha, 2005).

Englobados neste grupo, estão flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonóides, antocianidinas entre outros, dos quais se dão alguns exemplos na Tabela 2.

Tabela 2. Classes de Flavonóides e exemplos de compostos (adaptado de (Vermerris & Nicholson, 2006))

CLASSE DE FLAVONÓIDES	EXEMPLOS DE COMPOSTOS
Flavonas	Apigenina
	Luteolina
Flavonóis	Camferol
	Quercetina
Flavanonas	Naringenina
	Eriodictiol
	Hesperidinal
3-Flavanóis	Catequina
	Epicatequina
Antocianidinas	Afzelequina
	Cianidina
	Delfinidina

1.4 Outros fito-constituintes

Urtica dioica é uma espécie com uma forte presença de compostos fenólicos, onde se incluem maioritariamente ácidos fenólicos e flavonóides. Os compostos de maior expressão são derivados do ácido cafeico – estudos *in vitro* demonstram a actividade anti-inflamatória, anti-oxidante e analgésica (Chrubasik, Roufogalis, Wagner, & Chrubasik, 2007) dos derivados do ácido cafeiolumálico, ácido clorogénico (Gil, 2006); camferol, quercetina e isoramnetina, e seus heterósidos (rutinósidos e glucósidos), respectivamente. Os compostos quercetina e isoramnetina têm comprovada actividade imunomodulatória, em estudos *in vitro* com neutrófilos (Akabay *et al.*, 2003).

A literatura refere, para a espécie *Urtica urens* um grande conteúdo em flavonóides e ácidos fenólicos, sendo de destacar o composto patuletina, amplamente descrito nesta espécie, como tendo propriedades farmacológicas de interesse, destacando-se a capacidade anti-inflamatória e anti-fúngica (Abdel-Wahhab *et al.*, 2005; Upton, 2013). É também rica em derivados do ácido cafeico e do ácido clorogénico e neoclorogénico (Ghedira, Goetz, & Jeune, 2009), os quais têm sido estudados pelas suas propriedades.

A caracterização de compostos fenólicos presentes na *Urtica membranacea* está ainda por avaliar; este estudo propõe-se avaliar e identificar os compostos fenólicos de maior relevo para esta espécie, bem como um *screening* quanto às suas propriedades bioactivas.

As espécies de urtiga estudadas neste trabalho apresentam, segundo a literatura, metabolitos de interesse farmacológico, destacando-se os compostos fenólicos, dos quais são referidos frequentemente os ácidos fenólicos, como se pode ver na Tabela 3.

Tabela 3. Compostos fenólicos identificados em *Urtica dioica*, *Urtica urens* e *Urtica membranacea*.

ESPÉCIE	LOCALIZAÇÃO NA PLANTA	COMPOSTO	REFERÊNCIA
<i>Urtica dioica</i>	Parte aérea	Derivados do ácido cafeico	(Chrubasik <i>et al.</i> , 2007) (Ghedira <i>et al.</i> , 2009)
	Não definido	Ácido linoleico	(Gülçin, Küfrevioğlu <i>et al.</i> 2004)
	Não definido	Derivados do ácido cafeiolmálico	(Chrubasik <i>et al.</i> , 2007)
	Parte aérea	Quercetina	(Ghedira, Goetz <i>et al.</i> 2009); (Chrubasika, Roufogalis <i>et al.</i> 2007)
	Não definido	Ácido clorogénico/neoclorogénico	(Chrubasik <i>et al.</i> , 2007) (Hajhashemi & Klooshani, 2013)
	Parte aérea	Isoramnetina	(Ghedira <i>et al.</i> , 2009)
<i>Urtica membranacea</i>	Parte aérea	Limoneno	(Santos, 2010)
	Parte aérea	Linalol	(Santos, 2010)
	Parte aérea	Cineol	(Santos, 2010)
<i>Urtica urens</i>	Toda a planta	Derivados do ácido cafeico	(Chrubasik <i>et al.</i> , 2007)
	Parte aérea	Ácido clorogénico	(Belinati, 2010)
	Parte aérea	Rutina	(Ghedira, Goetz <i>et al.</i> 2009)
	Parte aérea	Quercetina	(Ghedira, Goetz <i>et al.</i> 2009)
	Toda a planta	Escopoletina	(Chrubasik <i>et al.</i> , 2007)
	Toda a planta	Patuletina	(Abdel-Wahhab, Said, & Huefner, 2005)

1.4.1 Identificação e dosagem de compostos fenólicos

Existem diversas técnicas para identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos tecidos vegetais, sendo que devem ser utilizados vários métodos para

obter uma quantificação abrangente das várias classes de fenóis (Vermerris & Nicholson, 2006).

Alguns dos compostos fenólicos são corados ao visível, outros, evidenciam-se por exposição à luz ultravioleta, directamente ou após acção de vapores de amónio, tornando-se fluorescentes. Diversos reagentes, como cloreto férrico e vanilina, são utilizados em técnicas de coloração de compostos fenólicos (Proença da Cunha, 2005).

A detecção e identificação de compostos fenólicos, podem ser realizadas por recurso a técnicas cromatográficas, nomeadamente: cromatografia de camada fina e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), esta última acoplada a detectores de natureza diversa, tal como detectores de ultra-violeta-visível (UV-V), de fotodíodos (PDA) ou mesmo a um espectrómetro de massa. Para a quantificação, pode recorrer-se à HPLC, quando se pretende a dosagem individual dos diversos constituintes de um extracto, ou a métodos espectrofotométrico, para a dosagem total dos diversos grupos de compostos fenólicos.

1.4.1.1 Métodos espectrofotométricos

Além da caracterização dos fito-constituintes, é também importante a avaliação do teor desses compostos. Para tal, é frequente o recurso a técnicas espectrofotométricas.

Tendo como principal enfoque a constituição em compostos fenólicos, são vários os métodos espectrofotométricos disponíveis para a dosagem das classes de fenóis. Particularmente, para a avaliação do teor em fenóis totais, o método Folin-Ciocalteu é o mais comumente utilizado, inicialmente descrito como Folin-Denis e posteriormente optimizado (waterhouse, 2002). Também para a avaliação em flavonoides existem diversos métodos, sendo que o método descrito por (Lamaison & Carnat, 1990) permite a sua quantificação; igualmente pelo mesmo autor é descrito um método para a quantificação em ácidos hidroxicinâmicos totais (Lamaison, Petitjean-Freytet, & Carnat, 1991).

1.4.1.2 Métodos cromatográficos

1.4.1.2.1 Análise por cromatografia de camada fina

A cromatografia de camada fina é uma técnica cromatográfica largamente utilizada num rastreio inicial sobre a natureza química dos fito-constituintes, nomeadamente de fenóis: é uma técnica rápida, recorre a uma pequena quantidade de amostra e solventes, de grande versatilidade, permitindo avaliar várias amostras em simultâneo e apresentando uma boa resolução (Dias, 2009). Existem vários sistemas de solventes, com maior ou menor especificidade consoante o tipo de compostos, que se escolhem em conformidade com a classe de polifenóis a detectar (Harborne & Williams, 2000) Para ácidos fenólicos do tipo hidroxicinâmico e flavonóides, os sistemas mais frequentes são da celulose ou sílica e uma fase móvel mais polar. Tanto as placas utilizadas como os solventes são hidrofílicos, pelo que, de acordo com a sua polaridade, todos os compostos serão arrastados pela fase móvel. Nesta técnica, a observação dos resultados é feita à luz visível e à luz UV, a um comprimento de onda de 366nm. São também utilizados reveladores, como o reagente de Neu/PEG, a vanilina, entre outros, por apresentarem uma grande sensibilidade para os compostos fenólicos (Hajnos *et al*, 2008).

1.4.1.2.2 Análise por cromatografia líquida de alta resolução

A cromatografia líquida de alta resolução é uma técnica comumente utilizada para a separação, identificação e quantificação de fito-constituintes em extractos de plantas. Baseia-se num sistema pressurizado, em que se utiliza uma fase estacionária – normal ou reversa, e uma fase móvel, que é normalmente constituída por solventes de baixa polaridade – ou solventes polares como acetonitrilo, metanol, água ou tampões, respectivamente. A pressão a que está submetido o sistema permite diminuir o tempo de separação dos compostos, os quais vão ficando retidos na coluna de acordo com as suas características de adsorção à fase estacionária e a polaridade dos compostos relativamente à fase móvel. Este sistema separativo encontra-se acoplado a detectores de natureza diversa, nomeadamente: absorvência (ultra-violeta e visível), fluorescência, electroquímicos, índice de refração, condutividade, espectrometria de massa, etc.

1.5 Actividades biológicas

1.5.1 Anti-oxidante

A produção de energia na forma de ATP, componente energético essencial à vida aeróbica, ocorre através da transferência de electrões de um átomo para outro, processo designado de oxidação, sendo o oxigénio último aceitador de electrões no sistema de fluxo de electrões (Pietta, 2000). Quando este sistema sofre um desequilíbrio, e ocorre transferência de electrões não emparelhados, gerando radicais livres, que, quando em excesso, podem provocar dano celular. É amplamente reconhecida a existência de radicais livres – espécies reactivas de Azoto (RNS) e de Oxigénio (ROS), como, respectivamente, o óxido nítrico radicalar, e o radical anião superóxido, radical hidroxilo e peróxido de hidrogénio, que são continuamente formados no decurso de processos metabólicos do nosso organismo (Pandey, Sah, Sah, & Mishra, 2010), sendo balanceada homeostaticamente a formação de espécies oxidativas como oxigénio singlete, o peróxido de hidrogénio e o ácido hipocloroso e os anti-oxidantes (Pietta, 2000). Alguns desses radicais são favoráveis e estão relacionados com a produção de energia, fagocitose, regulação de crescimento celular e sinalização intracelular, e síntese de compostos biologicamente relevantes (Pietta, 2000).

Actuando numa enorme gama de processos biológicos, o desequilíbrio na produção de espécies radicalares induz *stress* oxidativo nos tecidos, o que pode conduzir a danos irreparáveis em biomoléculas de grande importância, uma vez que podem causar danos nas membranas celulares, modificação de proteínas em tecidos ou enzimas e danos no ADN. Daqui resultam diversas patologias, como cancro, aterosclerose, diabetes, entre muitas outras, e até o envelhecimento.

Os humanos evoluíram com sistemas anti-oxidantes de protecção contra os radicais livres. Estes sistemas incluem anti-oxidantes produzidos no corpo (endógenos) e outros obtidos pela alimentação (exógenos). Os anti-oxidantes endógenos incluem defesas enzimáticas, como Se-glutationa peroxidase, catalase, e a superóxido dismutase, que metabolizam os radicais superóxido, peróxido de hidrogénio, e peróxidos lipídicos, prevenindo assim grande parte da formação do tóxico HO[•]; e ainda as defesas não enzimáticas como glutatona, péptidos de histidina, as proteínas ligantes de ferro - transferrina e ferritina -, ácido dihidrolipídico, CoQ10 reduzida, melatonina, urato e

tióis proteicos do plasma, sendo que os dois últimos têm a maior contribuição na capacidade de captar radicais do plasma (Pietta, 2000).

No entanto, os sistemas de defesa endógenos não têm capacidade para colmatar os efeitos das espécies oxidativas, excessivamente formadas devido a diversos agentes como a poluição ambiental, radiação química, toxinas e até através da alimentação, tornando-se necessário o recurso aos anti-oxidantes da dieta a fim de diminuir os efeitos cumulativos do dano oxidativo (Pietta, 2000). Anti-oxidantes provenientes da dieta alimentar são as vitaminas A, C e E, e carotenóides, os quais têm sido estudados intensamente. Ao longo da última década, tem-se tornado evidente que os polifenóis vegetais são uma importante classe de anti-oxidantes defensivos. Estes compostos, largamente distribuídos por todas as plantas alimentares, frequentemente em elevados níveis, incluem fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e linhanos (Pietta, 2000). As suas propriedades físico-químicas, com a capacidade de captar ROS, permitem classificá-los como anti-oxidantes; para a validação desta capacidade, estes compostos têm de obedecer a duas condições: quando presentes em baixas concentrações, relativamente à substância a oxidar, podem atrasar, retardar ou prevenir a auto oxidação ou oxidação mediada por radical livre; o radical resultante após *scavenging* tem de ser estável – através de uma ligação de hidrogénio intramolecular numa oxidação posterior (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Conhecendo-se a importância dos radicais livres, o seu efeito degenerativo nos sistemas biológicos, que pode conduzir a processos inflamatórios, tem sido grande o interesse pela investigação e produção industrial de agentes inibidores destes radicais, consumidos, quer sob a forma de suplementos ou de aditivos alimentares e cosméticos. As espécies de urtiga possuem compostos fenólicos e são-lhes também reconhecidas propriedades medicinais e a sua utilização na dieta humana. Consequentemente torna-se relevante a avaliação da capacidade anti-oxidante de urtigas consumidas em Portugal e estabelecer uma relação com os fitoquímicos de natureza fenólica presentes nessas espécies.

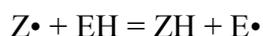
1.5.1.1 Avaliação da capacidade anti-oxidante

A capacidade anti-oxidante está sempre dependente da capacidade captadora ou anti-radicalar dos compostos. É por isso muitas vezes avaliada a capacidade de captar radicais livres, e só posteriormente a capacidade anti-oxidante, em sistemas *in vivo*. De

modo geral, há variadíssimas técnicas de avaliação do potencial anti-radicalar em extractos vegetais, compostos isolados e outros substratos. Cada um dos métodos depende da formação de um radical livre, actuando através de uma variedade de mecanismos e tipos de medição. Pode falar-se em dois tipos distintos de análise: inibição do radical doando electrões ou hidrogénio, ou envolvimento da presença de sistemas anti-oxidantes durante a formação do radical.

1.5.1.1.1 DPPH

O DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazilo) é um radical livre, estável, sintético muito utilizado em ensaios de detecção da capacidade anti-radicalar. Apesar de não ocorrer em sistemas biológicos, este radical permite inferir de modo seguro acerca da capacidade anti-oxidante das amostras em estudo. Este radical tem um electrão desemparelhado, cuja banda de absorção é a cerca de 520nm, característica que lhe confere estabilidade e uma forte cor violeta (Molyneux, 2004). Quando o radical DPPH contacta com uma solução com propriedades anti-oxidantes ocorre uma reacção colorimétrica, correspondente à diminuição da absorvência do radical, onde resulta a perda da cor violeta - ficando um pálido amarelo como coloração residual.



Esta reacção representa o que ocorre com o radical DPPH ($Z\bullet$) e uma solução com actividade captadora de radicais (EH), e pretende mimetizar os processos oxidativos que ocorrem naturalmente (Molyneux, 2004).

1.5.1.1.2 ABTS

Entre os vários métodos existentes para a avaliação da actividade anti-oxidante, o ABTS⁺⁻ é frequentemente utilizado, sendo aplicável ao estudo de soluções anti-oxidantes hidro- e lipossolúveis, compostos puros e extractos alimentares (Re et al., 1999).

Existem actualmente dois métodos distintos envolvendo o radical ABTS (2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato), que se diferenciam pelo substrato utilizado – peroxidase ou persulfato de potássio.

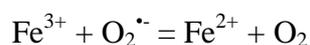
O método original baseava-se na activação da metamioglobina com peróxido de hidrogénio na presença de ABTS para produzir o radical catiónico, na presença ou

ausência de anti-oxidantes. Mais tarde o método sofreu alguns melhoramentos, deixando de ser necessário o emprego da metamioglobina. Actualmente, o radical é gerado pela actividade da enzima peroxidase a um pH ácido. Paralelamente surgiu outra técnica em que se recorre à reacção entre ABTS e persulfato de potássio, a pH neutro, onde se forma o cromóforo azul/esverdeado ABTS. A banda de absorção pode ser de 415, 645, 734 e 815 nm, sendo mais comumente usada a 734 nm (Rice-Evans et al., 1996). Em presença de um anti-oxidante, ocorre a perda da cor e consequentemente uma diminuição da absorvência, à qual corresponde a inibição do catião. Com estas duas técnicas distintas, é possível retirar mais informação acerca do potencial anti-oxidante da amostra testada, uma vez que se observa o seu comportamento tanto a pH ácido como a pH neutro, cobrindo assim a gama de pH fisiológica que se pode encontrar nas diferentes regiões do organismo humano.



1.5.1.1.3 FRAP

Em sistemas biológicos, o ferro é um elemento essencial mas também um potencial tóxico celular (Beard, 2001). Devido a estas características, é necessário um sistema de regulação que permita manter os níveis de ferro essenciais ao funcionamento dos processos bioquímicos como reacções de transferência de electrões, regulação de genes, ligação e transporte de oxigénio, e regulação do crescimento e diferenciação celular (Beard, 2001), e também não permitir o aumento, para níveis prejudiciais, deste elemento. Devido à sua capacidade de funcionar em modo ião e da presença essencial em sistemas fisiológicos, o ferro pode ser usado para avaliações sobre sistemas biológicos, uma vez que a sua regulação está dependente do óptimo funcionamento dos sistemas em que intervém.



A avaliação da actividade redutora de ião ferro baseia-se na capacidade de reduzir ferro do plasma (FRAP). Este ensaio permite avaliar o potencial redutor ou anti-oxidante de fluidos biológicos (Benzie & Strain, 1996). Num baixo pH, quando o complexo Ferro-Trotripiridiltriazina (Fe III - TPTZ) – forma férrica - é reduzido para a forma ferrosa (Fe II), adquire uma cor azul intensa, com absorção aos 593 nm. Este método é rápido e fácil de reproduzir/replicar. Apesar de ser uma reacção não

específica, permite analisar variados tipos de amostras e detectar a capacidade de captação do catião ferro.

1.5.2 Anti-inflamatória

A inflamação caracteriza-se por uma série de complexos eventos fisiológicos que ocorrem para reparar danos corporais resultantes de lesão ou infecção. O termo resposta inflamatória, definido por inflamação, cura, permite ao organismo defender-se dos agentes agressores e promove a reparação de tecidos, por activação de células imunitárias (mastócitos, leucócitos, células dendríticas). Este processo resulta em sintomas como calor, dor, edema e rubor, e decorre em três fases distintas: inflamação aguda – onde corre vasodilatação e permeabilidade capilar; fase subaguda, com a mobilização de células imunitárias, como leucócitos e células fagocíticas, e finalmente a libertação de agentes mediadores que actuam ao nível dos agentes agressores – bactericidas e mediadores lipídicos (Gilman, 2011). Em humanos, os níveis de citocinas e quimiocinas são consistentemente baixos e, tipicamente, aumentam apenas em resposta ao *stress* fisiológico para atrair as células imunitárias para o local de lesão e/ou infecção. Elevados níveis destas citocinas (TNF, IL 1 β , entre outras) e de proteína C reactiva (CRP) têm sido amplamente estudados como indicadores de patologias em humanos (Lorenzo *et al.*, 2013). A fase final da resposta inflamatória (fase crónica) corresponde à degeneração tecidular e fibrose, em paralelo com a proliferação de nova massa tecidular (Gilman, 2011). A inflamação crónica, ainda não totalmente compreendida, deve-se a uma resposta inflamatória exagerada e continuada, e da qual resultam efeitos nefastos ao organismo (Gilman, 2011); é um factor crítico que pode resultar de uma resposta aguda não neutralizada, de infecções persistentes, de exposição prolongada a agentes tóxicos (endógenos ou exógenos) e de doenças autoimunes (Correia, González-Paramás, Amaral, Santos-buelga, & Batista, 2006). No caso de certas patologias, incluindo cardiovascular, neuro degenerativa e doenças degenerativas das articulações, cancro e diabetes (Lorenzo *et al.*, 2013), a inflamação crónica surge como resposta do organismo. Nestas situações, os processos de inflamação e de reparação ocorrem simultaneamente e não consecutivamente (Wakefield & Kumar, 2001).

O desconhecimento dos mecanismos subjacentes à inflamação crónica torna a terapêutica incapaz de dar resposta, uma vez que as drogas anti-inflamatórias hoje disponíveis têm várias limitações como falta de resposta, efeitos secundários, problemas de biodisponibilidade e custos de produção (Francisco et al., 2011)

No processo inflamatório os macrófagos têm um papel-chave na linha de defesa imediata contra agentes estranhos/agressores. Após activação por um estímulo inflamatório, tais como lipopolissacarídeos (LPS), os macrófagos produzem uma variedade de mediadores pró inflamatórios, incluindo a prostaglandina E₂ (PGE₂) e o óxido nítrico (NO) (Geller & Billiar, 1998). A PGE₂ é sintetizada pela enzima ciclooxigenase (COX), enquanto o óxido nítrico é sintetizado pelas sintases de óxido nítrico (NOS).

A ciclooxigenase ocorre maioritariamente em duas formas (COX-1 e COX-2) e numa variante (COX-3). Enquanto a COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tecidos, COX-2 é uma enzima induzida, expressa em células relacionadas com a inflamação, como macrófagos, produzindo grandes quantidades de prostaglandinas. Adicionalmente, macrófagos activados por LPS também expressam sintases de NO indutíveis (iNOS), que produzem grandes quantidades de NO a partir da L-arginina (Lee et al., 2008). O grande aumento do óxido nítrico devido à estimulação da iNOS contribui para a patogénese do choque séptico e doenças inflamatórias. Portanto, a inibição selectiva de COX-2 e iNOS em macrófagos é uma estratégia útil para avaliar outros mecanismos de actuação de novos fármacos anti-inflamatórios (Francisco et al., 2011).

1.5.2.1 Compostos fenólicos com actividade anti-inflamatória

Surge assim uma demanda na procura de novos compostos bioactivos que permitam aplacar o processo de inflamação, sem que ocorram os efeitos secundários resultantes da ingestão dos agentes anti-inflamatórios actuais. Os compostos fenólicos, entre outras bioactividades, têm sido reportados como possíveis agentes anti-inflamatórios (Figueirinha, Cruz, Francisco, Lopes, & Batista, 2010), uma vez que de acordo com o tipo, podem actuar subjacentes a um ou vários mecanismos do processo inflamatório: têm actividade anti-radicalar e anti-oxidante; regulam actividades celulares de células relacionadas com a inflamação – mastócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos; modulam actividades do metabolismo enzimático do ácido araquidónico e

da iNOS; modulam a produção de moléculas inflamatórias, produzidas pelas enzimas do metabolismo do ácido araquidónico como: ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos e NO, conhecidos mediadores do processo inflamatório (Dias, 2009).

Diversos trabalhos científicos demonstraram a actividade anti-inflamatória apresentada por diversos tipos de extracto de *Urtica dioica*. Esta bioactividade referida para algumas espécies permite que sejam utilizadas no tratamento de enfermidades inflamatórias crónicas, frequentes por todo mundo, como é o caso da artrite reumatóide. O processo inflamatório desta patologia tem intervenção de diversos intermediários e mediadores inflamatórios; podem definir-se dois mecanismos distintos: metabolismo do ácido araquidónico e actuação do sistema imunitário (Gil, 2006).

1.5.2.2 Avaliação da capacidade anti-inflamatória

Nas últimas décadas foram crescentes os estudos sobre o óxido nítrico, produto gasoso biologicamente activo, com papéis fisiológicos e fisiopatológicos de grande relevância nos sistemas biológicos, actuando como vasodilatador, neurotransmissor, molécula efectora anti-microbiana e imunomodulador (Geller & Billiar, 1998). A molécula sinalizadora NO é sintetizada, somente quando necessário, por curtos períodos de tempo (segundos ou minutos), através da oxidação da L-arginina pela família das NO sintases (NOS), formando-se também a citrulina como produto secundário. O NO pode ser de expressão constitutiva endotelial (eNOS) ou sintase neuronal (nNOS). Em contraste, a sintase indutível de NO (iNOS) é expressa através da activação celular.

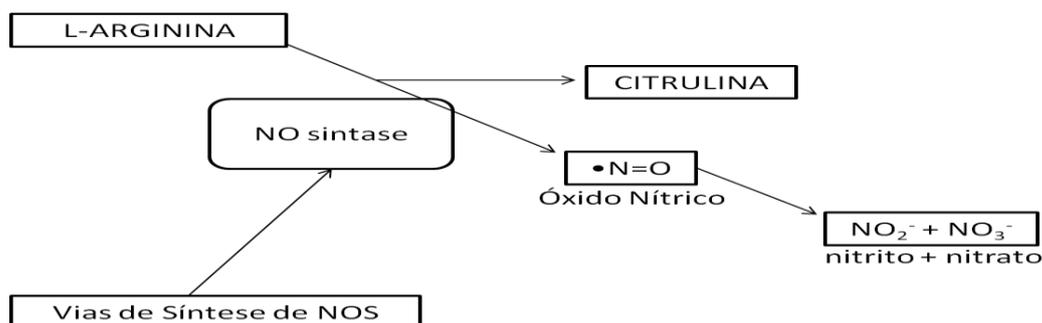


Figura 6. Representação da produção de NO por NO sintases (adptado de (Geller & Billiar, 1998))

O NO é uma molécula com curto período de vida, sendo rapidamente degradada em nitrito e nitrato. Portanto, a síntese regulada por pulsares curtos *versus* produção

constante de NO diferencia entre acções fisiológicas ou fisiopatológicas de NO (Kroncke, Fehsel, & Kolb-Bachofen, 1998).

Além de actuar como um mediador biológico, semelhante aos neurotransmissores, da capacidade de regular o tónus dos vasos sanguíneos no sistema vascular e de ser um efectivo defensor no sistema imunitário, é também um radical livre de oxigénio (NO[•]) e pode actuar como um agente citotóxico em processos patológicos, particularmente em desordens inflamatórias, pelo que a inibição da iNOS pode ser benéfica no tratamento de doenças inflamatórias (Aktan, 2004).

É frequente a utilização de um modelo *in vivo* – edema da pata em ratos induzido pela carragena – para determinar a actividade anti-inflamatória. No entanto, este tipo de ensaios, além de fornecerem pouca informação acerca dos mecanismos de acção, recorre a animais vivos, incorrendo-se em testes morosos e dispendiosos, que nem sempre conseguem contrabalançar a informação obtida. Neste sentido, novas técnicas se têm desenvolvido para determinar a capacidade inibidora de mediadores do processo inflamatório, em modelos *in vitro*, após indução deste processo por acção de um lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Também se pode recorrer a processos *in chimico*, recorrendo a um dador de óxido nítrico – SNAP (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina), que, em contacto com fito-constituíntes, permite avaliar a sua actividade captadora de NO.

A reacção de Griess, descrita pela primeira vez em 1879 por Peter Griess, é o ensaio modelo mais utilizado para a medição da produção de nitritos, em fluídos biológicos. Sendo de fácil execução e de viabilidade analítica de pouco custo, são hoje muito variados os ensaios que têm como base esta reacção (Tsikas, 2007). O estímulo por LPS (lipopolissacarídeos), presentes nas paredes celulares de bactérias gram-negativas, e que estimulam fortes respostas imunitárias, em células como macrófagos e hepatócitos causa a indução de iNOS (Lee *et al.*, 2008).

1.5.3 Anti-microbiana

As infecções microbianas são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, por todo o mundo, particularmente em pacientes imunocomprometidos (Jimoh *et al.*, 2010). Organismos parasitas, fungos, bactérias e vírus causam estados infecciosos, os quais podem ser desfigurativos, recorrentes e crónicos, requerendo, geralmente, tratamentos persistentes (Shehata *et al.*, 2008). As doenças infecciosas são

assim uma ameaça à saúde humana, sendo o seu impacto mais alargado em países em desenvolvimento, devido à relativa indisponibilidade de terapias adequadas e ao desenvolver de resistência aos fármacos utilizados (Okeke *et al.*, 2005).

Há já várias décadas que a terapia medicamentosa se tornou *standard* no tratamento de diversas infecções, a qual rapidamente se vulgarizou, resultando na emergência de novos agentes patogénicos, resistentes aos princípios activos contidos nestes medicamentos; e, por isso, surgiu a necessidade de desenvolver novos e mais poderosos fármacos. A emergência da síntese química de medicamentos, e uma paralela desacreditação da medicina baseada nas plantas, desencadeou vários efeitos adversos: efeitos secundários, consumo abusivo de certos fármacos, resistência de microrganismos, prescrição de antibióticos de largo espectro, aumento de casos de debilidade imunitária, infecções oportunistas e maior necessidade de cirurgias e tratamentos invasivos (Friedman *et al.* 2002; Friedman *et al.* 2003; Friedman *et al.* 2006 *in* (N.i., n.d.)

Apesar de estarem disponíveis numerosos antibióticos para tratamento e controlo de infecções microbianas, o desenvolver de resistência contra os antibióticos actuais é uma grande preocupação de saúde pública (Jimoh *et al.*, 2010). Desta forma, surge uma necessidade premente de descobrir novos medicamentos antimicrobianos, através da procura de compostos, seguros, que possam satisfazer a ineficácia dos existentes.

Os fitoquímicos podem ser uma renovada fonte destes medicamentos, por fornecerem um farmacóforo com grande potencial para o desenvolvimento de renovadas terapias com novos mecanismos de acção (Jimoh *et al.*, 2010). São diversas as iniciativas, um pouco por todo o mundo, que têm estudado as plantas medicinais na procura de novos constituintes bioactivos. As propriedades antissépticas das plantas medicinais e seus extractos são já reconhecidas desde a antiguidade, enquanto a tentativa de caracterizar estas propriedades em laboratório ocorre desde o início do séc. XX (Dorman & Deans, 2000), tendo sido isolados agentes anti-infecciosos como a penicilina, as tetraciclinas e os glicopeptídeos (Cushnie & Lamb, 2005), entre outros.

Foi já demonstrado que alguns compostos de origem natural, como derivados do ácido cinâmico e benzóico têm potencial para serem uma alternativa aos agentes antimicrobianos já existentes, no entanto, a avaliação da segurança e certificação destes,

com base em evidências científicas, necessitam ainda de mais estudos (Jimoh *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos, pela presença do grupo hidroxilo, e outras propriedades estruturais, são consideravelmente tóxicos para certos microrganismos (Alam, Ameen, Muyibi, & Kabbashi, 2009). Pensa-se que esta toxicidade dos compostos fenólicos está relacionada com a sua acção na inibição enzimática pelos compostos oxidados, possivelmente através da reacção com grupos sulfidril ou através de interacções proteicas não-específicas. Compostos fenólicos ou compostos contendo grupos sulfuro podem ser activos potenciais redox e inibir o crescimento microbiano pela interferência com a homeostase celular (Arif *et al.*, 2009). A aplicação combinada de alcalóides, ou fenólicos redox-activos, com os agentes anti-fúngicos já existentes, pode vir a revelar-se num melhorado método de controlo das infecções fúngicas (Shvedova *et al.*, 2000).

1.5.3.1 Avaliação da capacidade anti-microbiana

O sistema imunitário humano tem uma elevada capacidade de resposta contra fungos patogénicos que permite a subsistência, frequentemente com efeitos benéficos, de uma extensa micoflora que habita no nosso organismo. Deste modo, existem apenas cerca de 200 espécies de fungos com capacidade de infectar humanos, ao contrário dos fungos parasitas de plantas; a excepção é referente aos fungos da pele, unhas e cabelo – dermatófitos. Há vários mecanismos de acção e desenvolvimento que são partilhados pelos fungos e pelos humanos, razão pela qual são essenciais os estudos de toxicidade quando se trata de desenvolver novos produtos anti-fúngicos (Deacon, 2009).

As micoses superficiais, como são geralmente conhecidas, são comuns por todo o mundo. Estima-se que afectem entre 20 a 25% da população mundial, e a tendência é o aumento da incidência de afectados (Ameen, 2010). A maioria das espécies responsáveis por estas infecções está distribuída globalmente, como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*, mas podem existir variantes geográficas (Ameen, 2010). As infecções resultantes da colonização destes fungos, em tecidos animais e queratinizados humanos, podem ser de intensidade média a forte – sendo preocupantes em doentes imunocomprometidos (Zuzarte, 2012). Para este tipo de patologias, existem diversas terapias, de ingestão oral e aplicação tópica, havendo dois grupos maioritários

de compostos bioativos: azoles, onde se incluem clotrimazol, miconazol, econazol, oxiconazol, tioconazol, e alilaminas, que englobam terbinafina e naftifina (Gupta & Cooper, 2008).

Tabela 4. Espécies dominantes de dermatófitos de acordo com a sua localização clínica (adaptado de (Havlickova, Czaika, & Friedrich, 2008)).

CONDIÇÃO	ESPÉCIE DOMINANTE
<i>Tinea capitis</i> (escalpe)	<i>Tricophyton violaceum</i>
	<i>T. tonsurans</i>
	<i>T. soudanense</i>
	<i>Microsporum canis</i>
<i>Tinea pedis</i> (pés)	<i>M. audouinii</i>
	<i>T. rubrum</i>
	<i>T. mentagrophytes</i> (var. <i>interdigitale</i>)
<i>Tinea cruris</i> (virilha)	<i>Epidermophyton floccosum</i>
	<i>T. rubrum</i>
<i>Tinea corporis</i> (braços, pernas e tronco)	<i>T. mentagrophytes</i> (var. <i>interdigitale et granulatum</i>)
	<i>T. rubrum</i>
	<i>M. canis</i>
<i>Tinea unguium</i> (unhas)	<i>T. tonsurans</i>
	<i>T. rubrum</i>
	<i>T. mentagrophytes</i> (var. <i>interdigitale</i>)

A alguns compostos fenólicos têm sido atribuídas propriedades anti-microbianas, impulsionando a avaliação da eficácia de extractos que os possuem na inibição de várias classes de fungos patogénicos humanos, nomeadamente fungos dermatófitos.

1.6 Germinação e propagação de sementes de *Urtica dioica*

O clima mediterrânico é caracterizado pela sua sazonalidade na temperatura e precipitação, a qual leva a um quente período de seca no verão e a um frio período de chuva no inverno (Joffre, Rambal, & Damesin, 1999). As plantas que se desenvolvem neste clima têm características adaptativas muito próprias, estando preparadas para a limitada disponibilidade de água no verão e para as frias temperaturas no inverno, factores que afectam as condições de germinação de sementes (Galmés, Medrano, & Flexas, 2006). A época de reprodução é extremamente variável, de acordo com cada espécie de planta, existindo condições determinantes para o seu sucesso, tais como o fotoperíodo, a temperatura e factores genéticos endógenos, entre outros (Martins, 2007).

À semelhança de outros organismos, as plantas reproduzem-se sexuadamente, através da fusão de gâmetas, formação de um zigoto e subsequente desenvolvimento embrionário e pós-germinativo, com a génese de uma nova planta cuja informação genética é diferente da dos progenitores (George, Hall, & De Klerk, 2008). Para além deste método de reprodução, as plantas são organismos onde a reprodução assexuada é comum. Neste caso, o mecanismo base de divisão celular é a mitose (por oposição à importância da meiose na reprodução sexuada) e ao conjunto de indivíduos, obtidos a partir de uma mesma planta é dado o nome de clone, e a sua constituição genética é igual à planta original (George et al., 2008). Na natureza, as características de sobrevivência e adaptação das plantas determinam o método preferencial de propagação de cada espécie.

No decorrer da presença do Homem no planeta, desenvolve-se a fulcral relação homem-planta – o surgimento da agricultura gerou as primeiras modificações nas plantas, induzidas pelo Homem, ao tentar melhorar as características das espécies alimentares – maior rendimento, menor tempo de crescimento e manutenção de espécies com características de interesse. A obtenção de clones permitiu manter as características seleccionadas, ou seja a sua fixação, situação que não se verifica durante a reprodução sexuada. Muitas variedades de plantas utilizadas na alimentação são hoje mantidas com recurso a diversas técnicas propagativas. Paralelamente, a variabilidade das plantas e a obtenção de novas características é crucial ao melhoramento; uma vez obtida, é importante mantê-la, recorrendo-se a métodos de clonagem (Canhoto, 2010). Além das plantas usadas na alimentação, também as culturas das chamadas plantas aromáticas e medicinais são, hoje em dia, uma importante mais-valia e de grande expressão na

actividade agrícola (Martins, 2007). As PAMs são um elemento principal ou suplementar de 80 % das práticas de saúde no mundo. O uso de plantas medicinais tem aumentado significativamente ao longo das últimas duas décadas, alimentando o desenvolvimento de um importante mercado agrícola avaliado em mais de 60 mil milhões de dólares anuais (World Health Organization, 2004; Ammarellou, Kazemeitabar, Najafei, Mostazavei, & Ammarellou, 2012). A grande necessidade, por parte da indústria farmacêutica, de obter os compostos bioactivos das plantas com usos terapêuticos, tem aumentado o desenvolvimento de novas e efectivas técnicas de propagação em larga escala (Ammarellou *et al.*, 2012). A propagação vegetativa é a técnica de maior sucesso para a multiplicação e reprodução destas espécies vegetais. Esta técnica apresenta diversas vantagens, como uma maior taxa de crescimento, maior biomassa e uniformidade e maior fiabilidade na replicação da produção de plantas (Fielding, 1969 *in* (Ammarellou *et al.*, 2012)).

1.6.1 Avaliação da germinação de sementes e propagação *in vitro* de *Urtica dioica*

Como já referido anteriormente, as urtigas, além de propriedades medicinais já reconhecidas, são também usadas na alimentação, sob a forma de chás, infusões e sopas, e têm um elevado potencial para a produção de fibra (Hartl & Vogl, 2002). Apesar de serem consideradas plantas daninhas e uma espécie a eliminar de jardins e locais de cultivo, têm uma grande exequibilidade como planta de cultivo em condições de cultura orgânica (Gatti, Di Virgilio, & Baronti, 2008). A utilização comercial das urtigas é possível, uma vez que não só são já reconhecidas algumas propriedades terapêuticas destas plantas como também podem ser utilizadas as várias componentes da planta, desde as sementes às folhas, tornando praticável uma série de produtos derivados destas plantas, que vão desde a produção têxtil e de papel, aos usos terapêuticos e à produção de cosméticos (Luna, 2001). Por outro lado, devido ao seu alto nível de heterozigotia, a homogeneidade na produção de fibra e na colheita de plantas seleccionadas não é garantida pela propagação por sementes, pelo que a investigação sobre esta planta tem sido direccionada para a selecção de clones com alto teor de fibra (Gatti, Di Virgilio, Baronti, & Bacci, 2008), uma vez que *Urtica dioica* pode ser propagada por semente ou propagação vegetativa (Luna, 2001).

As sementes desta espécie apresentam dormência fisiológica e, muito frequentemente, requerem um longo período de estratificação (Baskin & Baskin, 1998). A germinação ocorre a temperaturas entre os 15 e os 25 °C, seguida de uma estratificação quente e na presença de luz, em sementes previamente armazenadas por mais de 3 meses (Grime et al., 1981). Em termos de propagação assexuada, foi descrita a propagação através de rizomas (Luna, 2001).

A espécie de maior potencial de estudo e produção – *Urtica dioica* – tem sido estudada relativamente à viabilidade da germinação nesta espécie, sendo que protocolos adaptados para o cultivo em meio de cultura adaptado à espécie são ainda inexistentes, bem como o processo de aclimatização quando transferidas de meio *in vitro* para solo.

2.OBJECTIVOS

O uso das plantas e o recurso às suas propriedades foi, e é ainda, a base económica de grande parte dos serviços de ecossistema do qual usufruímos, sendo por isso o estudo da comunidade vegetal existente, suas aplicações, e até formas de melhoramento, um contributo vital na melhoria da qualidade de vida de uma população com necessidades cada vez mais exigentes. A biotecnologia vegetal, com todas as suas abrangentes temáticas, na procura de novas soluções e progressos torna-se uma área vital para a utilização criteriosa dos recursos vegetais, e também, na descoberta de novos usos e aplicações de espécies com valor intrínseco à sociedade.

O levantamento bibliográfico efectuado sugere que *Urtica dioica* é a espécie com maior potencial de estudo, no que consta ao conhecimento já existente sobre composição e propriedades da espécie. *Urtica membranacea* é a espécie menos estudada, apesar de os dados obtidos serem bastante favoráveis a um estudo mais aprofundado. *Urtica urens* tem propriedades já descritas muito semelhantes a *Urtica dioica*, mas demonstra maior potencial para estudos de actividade anti-microbiana/anti-fúngica, entre outras, de acordo com os estudos encontrados.

Apesar de haver já algum conhecimento sobre as espécies de urtiga cujo estudo é aqui proposto (*Urtica dioica*, *Urtica membranacea* e *Urtica urens*) é de destacar que não há resultados que comparem actividades nas três espécies em distintas partes da planta, em diversos estádios. É ainda escassa a presença de produtos de ou com extractos de Urtigas no mercado, bem como a certificação de produtos com esta origem, pelo que se torna imprescindível um estudo mais abrangente nestas espécies. Assim, são seguintes os objectivos deste trabalho:

1. Rastrear, por ensaios *in vitro*, actividades biológicas (anti-oxidante, anti-inflamatória e anti-microbiana) em *U. dioica*, *U. membranacea* e *U. urens*.
2. Identificar, para a espécie mais promissora, o órgão onde se localizam predominantemente os constituintes que conferem as bioactividades em estudo.
3. Seleccionar a espécie mais promissora para uma futura aplicação na indústria alimentar, farmacêutica e/ou cosmética e o órgão da parte aérea com maior valor industrial.

4. Efectuar ensaios de toxicidade para os extractos detentores da actividade biológica mais expressiva.
5. Avaliar a composição química de extractos, eficazes e seguros, de modo a identificar os fito-constituintes relacionados com a(s) bioactividade(s) detectadas e que possam constituir uma mais-valia para uma futura comercialização de produtos com base em Urtiga.
6. Estudar a viabilização de cultivo, por semente, para a espécie mais promissora.
7. Inferir sobre a viabilidade do uso de espécies de urtigas para fins científicos e em projectos comerciais.

Este trabalho é realizado em colaboração com a Confraria da Urtiga, de Fornos de Algodres, a qual forneceu o material vegetal utilizado neste estudo. Esta Confraria tem diversas iniciativas, no âmbito da protecção, divulgação e aplicação da urtiga na área alimentar, pretendendo alargar a sua utilização a outras áreas industriais.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O ácido acético glacial, *n*-hexano, carbonato de sódio deca-hidratado, carbonato de sódio anidro, reagente Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio, etanol e os solventes usados para fazer o gradiente de eluição no HPLC foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha). O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 2,2-azino-*bis*(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), ácido 6-hidroxi-2-5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), rutina, ácido gálgico, piragalhol, ácido cafeico, reagente fosfomolibdotungstíco, corante *tryptan blue*, isopropanol, 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina (MTT), LPS da *Escherichia coli* (serotipo 026:B6), a D-glucose, penicilina e a estreptomicina, e também o meio RPMI foram da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com baixo teor de glucose foi obtido da Invitrogen (Paisley, UK) enquanto o soro fetal bovino (FBS) foi obtido da Gibco (Paisley, UK). O tampão fosfato-salino (PBS) e o reagente Griess (dicloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina e sulfanilamida) foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Germany). A SNAP foi obtida de Biogen® (Cambridge, USA). Todos os outros reagentes, acetona, acetato de sódio anidro e tri-hidratado, nitrito de sódio, molibdato de sódio, acetato de etilo, ácido fórmico, ácido clorídrico, bicarbonato de sódio, cloreto de ferro hexahidratado, persulfato de potássio, peroxidase, peróxido de hidrogénio, glicina, ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (Neu), polietilenoglicol-4000 (PEG-400) e 4-dimetilamino-cinamaldeído (DMACA) foram comprados à Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO) ou à Merck® (Darmstadt, Germany). A água Ultra-pura Milli-Q da Millipore (Molsheim, France) foi sempre usada.

3.2 Material vegetal de estudo

As partes totais de *Urtica dioica* L., *Urtica membranacea* Poir. e *Urtica urens* L. foram gentilmente fornecidas pela Confraria da Urtiga, Portugal. O material vegetal foi colhido durante a fase de floração, em Março de 2012, seco, identificado e um voucher de cada espécie foi depositado no Herbário de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Foi efectuada uma nova colheita de material, em 2013, abrangendo apenas a espécie *Urtica dioica*, também pela Confraria da Urtiga. O material foi colhido antes e durante a floração e seco.

3.3 Extração de fitoconstituintes

Realizou-se uma separação do material vegetal em parte aérea total e caules – excepto para *Urtica membranacea*, por não se dispôr de material suficiente. Para cada espécie, maceraram-se 10 g de material em pó para cada espécie, com 200 mL de etanol 50 % durante 24 h, sob agitação magnética. Designaram-se os extractos por: UdT (*Urtica dioica*, parte aérea total) e UdC (*Urtica dioica*, caules), UuT (*Urtica urens* parte aérea total) e UuC (*Urtica urens*, caules) e UmT (*Urtica membranacea* parte aérea total). Os extractos foram filtrados, concentrados no evaporador rotativo a 30 °C, congelados em atmosfera de N₂, liofilizados e mantidos a -40 °C até utilização posterior.

A parte aérea de *Urtica dioica* foi separada por órgãos – folhas, flores e caules. Pulverizou-se o material e passou-se por um tamis 250 µm, para homogeneizar a granulometria. Maceraram-se 10 g de material em 200 mL de etanol 50 % durante 48 h, em agitação magnética. Deram-se os nomes aos extractos: UdFl (*Urtica dioica*, flores), UdF (*Urtica dioica*, folhas) e UdC (*Urtica dioica*, caules). Os extractos foram filtrados, concentrados no evaporador rotativo a 30 °C, congelados em atmosfera de N₂, liofilizados e mantidos a -40 °C até utilização posterior. O rendimento de cada extracto foi expresso em peso seco de planta, calculado a partir de 3 réplicas de 1 g de amostra. Utilizou-se o método gravimétrico, por perda de peso do material, em estufa aquecida a 100 °C durante 24 h.

3.4 Caracterização fitoquímica

3.4.1 Métodos espectrofotométricos

3.4.1.1 Dosagem de fenóis totais

Para a avaliação dos fenóis totais, utilizou-se uma versão modificada do método Folin-Ciocalteu (Wang, Lee, & Peng, 1997). Colocou-se, em tubos de vidro, 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu e as amostras em análise, já solubilizadas em acetona 70 %. Após uma agitação vigorosa, foram adicionados 5 mL de carbonato de sódio 20 %. A absorvência foi medida a 700 e 735 nm num espectrofotómetro Cintra 101, e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálgico por 100 g de amostra. O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.4.1.2 Dosagem de flavonóides totais

Para a dosagem de flavonóis totais recorreu-se ao método descrito por (Lamaison & Carnat, 1990). Num tubo de ensaio protegido da luz, adicionaram-se 5 mL de tricloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 2% em metanol) a 5 mL de cada amostra solubilizada em metanol. A mistura foi agitada em vórtice durante 1 min e, após 10 min, a absorvência foi lida a 430 nm num espectrofotómetro Cintra 101. As leituras foram realizadas contra um branco, preparado do mesmo modo mas sem a adição do tricloreto de alumínio, sendo substituído por 5 mL de metanol. Foi construída uma curva padrão com rutina e ajustado o intervalo de absorvências dentro do qual estava compreendida a absorvência dos ensaios. Os resultados da concentração em flavonóis totais foram expressos em equivalentes de rutina por 100g de amostra. O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.4.1.3 Dosagem de ácidos hidroxicinâmicos totais

Para a dosagem de ácidos hidroxicinâmicos totais recorreu-se ao método descrito por (Lamaison et al., 1991). Preparou-se o reagente de Arnow, pela solubilização de 1 g NaNO_2 em 10 mL de Água MiliQ e 1 g NaMO_4 em 10 mL de água MiliQ e posterior mistura das duas soluções. Num tubo de ensaio adicionou-se 1 mL do extracto em análise, já solubilizado em metanol 50 %, 1 mL de HCl 0,5N, 1 mL de Reagente de Arnow, 1 mL NaOH e perpez-se com água MiliQ, para um volume final de 10 mL. A mistura foi agitada no vórtice durante 1 min e a absorvência lida a 505 nm num espectrofotómetro Cintra 101. As leituras realizaram-se contra um branco, preparado do mesmo modo mas sem a adição do reagente de Arnow, substituindo-se por 1 mL de metanol. Foi construída uma curva padrão com ácido cafeico e ajustado o intervalo de absorvências dentro do qual estava compreendida a absorvência dos ensaios. O teor em ácidos hidroxicinâmicos foi expresso em percentagem de derivados hidroxicinâmicos (m/m), equivalentes de ácido cafeico. O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.4.2 Métodos cromatográficos

3.4.2.1 Cromatografia em camada fina

De modo a obter uma informação preliminar sobre os compostos presentes nos extractos de urtiga, recorreu-se à cromatografia de camada fina (TLC).

Para a realização da TLC, utilizou-se como fase móvel o ácido acético 15% e como fase estacionária placas de celulose (Merck). Aplicaram-se 20 µL de cada amostra, a 1 cm da base da placa. Deixou-se correr o solvente, numa câmara saturada do mesmo, ao abrigo da luz. Retirou-se a placa da câmara e deixou-se evaporar o solvente. Observou-se a placa à luz visível e, de seguida, com o auxílio de luz ultravioleta a 366 nm. Por fim, pulverizou-se a fase estacionária com o reagente Neu (solução do éster difenilbórico-ácido β-etilamino a 1% em metanol) e, após evaporação deste, com o reagente PEG (solução de polietilenoglicol a 5% em etanol). Novamente foi observado o compostamento dos compostos, tanto à luz visível como ultravioleta a 366 nm. O PEG foi utilizado com o intuito de aumentar a sensibilidade para a detecção dos compostos fenólicos.

Uma outra placa foi sujeita à acção de uma solução metanólica do radical DPPH, observando-se o comportamento à luz visível.

3.4.2.2 Cromatografia de alta resolução acoplada a um detector de fotodíodos

A análise por cromatografia líquida de alta resolução realizou-se cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) GILSON, equipado com duas bombas modelo 305 e 306; misturador modelo 811B; módulo manométrico modelo 805 e um injetor automático GILSON 234, acoplado a um detector de fotodíodos (PDA) GILSON, modelo 170 e a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (*Unipoint*® 2.10). Usiu-se uma coluna de fase reversa RP18 Spherisorb Waters® ODS-2 (4,6 × 250 mm; 5 µm). A fase móvel consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico a 5 % (A) e metanol (B), em gradiente descontínuo, ilustrado na Tabela seguinte, a um fluxo de 1 mL/min. Foram injectados 100 µL das amostras. Os respectivos espectros de UV foram adquiridos entre 200 e 600 nm e o registo do perfil cromatográfico, efectuado a 280 nm e 320 nm.

Tabela 4. Gradiente usado nas análises por HPLC/PDA

TEMPO (min)	A %	B %
0.00	95.0	5.0
10.00	85.0	15.0
15.00	75.0	25.0
50.00	50.0	50.0
60.00	30.0	80.0
70.00	0.0	100.0

3.4.2.3 Cromatografia de alta resolução acoplado a detector de fotodíodos e espectrómetro de massas

As amostras foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida HP 1100 equipado com um detector de PDA (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) e acoplado com um espectrómetro de massa Finnigan LCQ (San Jose, CA, USA) equipado com uma câmara de ionização API-ES. A separação foi realizada numa coluna de fase reversa Spherisorb® ODS-2 C18 (150 x 2.1 mm, com partículas de 3 µm, (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)) e protegida por uma pré-coluna Spherisorb® S5 ODS-2 C18 (10 x 4.6 mm, 5 µm; Waters Corporation [Milford, Massachusetts, USA]), a 25 °C, usando uma solução aquosa de ácido fórmico a 1 % v/v (A) e metanol (B) como fase móvel, a um fluxo de 200 µL/min, cujo gradiente descontínuo se transcreve na Tabela seguinte. A aquisição dos espectros de UV-V foi realizada com o detector de PDA no intervalo de comprimento de onda entre 200-600 nm, com registo do perfil cromatográfico a dois comprimentos de onda: 280 nm e 320 nm, seguido de uma segunda detecção no espectrómetro de massa.

Tabela 5. Gradiente dos solventes utilizados em HPLC-PDA-ESI/MSⁿ

TEMPO (min)	A %	B %
0.00	95.0	5.0
10.00	85.0	15.0
15.00	75.0	25.0
50.00	50.0	50.0
60.00	20.0	80.0
70.00	0.0	100.0

A análise de massas foi obtida em modo íão negativo. O espectrómetro de massas foi programado para realizar 3 análises sucessivas: MS¹ (m/z 50-2000), MS² do íão mais abundante em MS¹ e MS³ do íão mais abundante em MS². A voltagem na fonte foi de 4.7 kV e a voltagem no capilar e a temperatura foram de -10 V e 275 °C, respectivamente. Foi utilizado nitrogénio como gás de nebulização, a uma taxa de fluxo de 20 unidades arbitrárias. A energia de colisão normalizada foi de 45 %, tendo-se usado Hélio como gás de colisão.

3.5 Avaliação de actividades biológicas

3.5.1 Anti-oxidante

3.5.1.1 DPPH

O ensaio de actividade anti-radicalar foi realizado com o radical DPPH, de acordo com o método descrito por Blois 1958. A mistura de reacção foi preparada com 100 µL de cada amostra foi testada pela sua reactividade com 500 µL de uma solução de DPPH a 500 µM em metanol, na presença de 1 mL de tampão acetato 100 mM e 1,4 mL de metanol. A mistura da reacção (3 mL) foi mantida ao abrigo da luz durante 30 min, à temperatura ambiente. A diminuição da absorvência foi medida num espectrofotómetro Cintra 101 a 517 nm, contra um branco, sem adição de DPPH. Os resultados foram analisados através da interpolação da absorvência numa curva de calibração, obtida com Trolox (62,5 - 1000 µM). Prepararam-se, para cada amostra, 6 diluições em metanol 50 %. Os resultados foram expressos em capacidade anti-oxidante equivalente a Trolox (TEAC), que se define como a concentração milimolar de uma solução de amostra cuja

capacidade anti-oxidante seja equivalente a uma solução de Trolox a ,.0 mM. O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.5.1.2 ABTS-peroxidase

Este ensaio de avaliação de potencial anti-radicalar realizou-se segundo o método estabelecido por (Re et al., 1999). O radical livre foi gerado por um sistema enzimático que consiste numa enzima peroxidase, no seu substrato oxidativo (peróxido de hidrogénio) e o cromóforo 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS). O radical foi gerado através de uma reacção entre 1,5 mM ABTS, 15 µM de peróxido de hidrogénio e 0,25 µM de peroxidase em 50 mM de tampão glicina-HCl (pH 4,5). A concentração final do catião radicalar $ABTS^{+\cdot}$ foi de 30 µM. A cuvete de referência – branco – continha o tampão glicina-HCl. Após a formação do radical, adicionaram-se 100 µL da amostra em teste a 2 mL da solução de $ABTS^{+\cdot}$, agitou-se no vórtice durante 10 s, realizando-se posteriormente a diminuição da absorvência. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente e a absorvência lida, a 414 nm, após 2 min de reacção. Prepararam-se, para cada amostra, 6 diluições em metanol 50 %. Os resultados foram expressos em valor TEAC, que se obteve através da interpolação das absorvências do ensaio na curva de calibração obtida usando Trolox, de 62,5 a 500 µM. O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.5.1.3 ABTS-persulfato

Neste ensaio, o radical ABTS foi produzido através da oxidação de 7 mM ABTS com persulfato de potássio (2,45 mM concentração final) em água MiliQ. A mistura permaneceu ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, de 12-16 h antes da utilização, após o que foi diluída numa solução tampão salina de fosfato (PBS), pH 7,4 e equilibrada a 30 °C, para originar uma concentração num intervalo de absorvência, entre 0,2 - 0,7, a 734 nm. Adicionaram-se 50 µL da amostra, em solução aquosa de metanol 50 %, a 2 mL da solução ABTS, após o que se agitou no vórtice durante 10 s, tendo-se procedido à leitura da absorvência, a 734 nm, após 4 min de reacção. Em cada caso, prepararam-se, para cada amostra, 6 diluições em metanol 50 %. Os resultados foram expressos em valor TEAC, obtidos pela interpolação da absorvência, numa curva de calibração obtida com Trolox (62,5 – 500 µM). O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.5.1.4 FRAP

A capacidade de redução do íão Ferro foi avaliada segundo (Benzie & Strain, 1996), com algumas modificações. O reagente FRAP continha 10 mM de solução TPTZ em 40 mM HCl, 20 mM de cloreto de ferro hexahidratado (III) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e tampão acetato (300 mM, pH 3.6) (1:1:10, v/v/v). Foram adicionados 100 μL de solução aquosa de metanol 50 % de todas as amostras a testar a 3 mL do reagente FRAP. A absorvência foi medida a 593 nm, após incubação durante 6 min, à temperatura ambiente, usando o reagente FRAP como branco. Em cada caso, prepararam-se 6 diluições em metanol 50 %. Os resultados foram expressos em valor TEAC, obtidos pela interpolação da absorvência numa curva de calibração obtida com Trolox (62,5 – 500 μM). O ensaio foi realizado em triplicado para todas as amostras testadas.

3.5.2 Anti-inflamatória

Linhas celulares de macrófagos de ratinhos RAW 264.7, de American Type Cultura Collection, gentilmente cedidas pela Dr.^a Otilia Vieira (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal), foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Tabela 6, a 37 °C, numa atmosfera humedecida de 95 % ar e 5 % CO_2 . Ao longo das experiências, as células foram monitorizadas por observação microscópica, no sentido de detectar qualquer alteração morfológica.

Tabela 6. Componentes do Meio de cultura DMEM.

COMPONENTES	VOLUME FINAL (1000 mL)
DMEM (baixa glucose)	10 g
Bicarbonato de Sódio	1,5 g
D-Glucose	3,5 g
Penicilina	0,0626 g
Estreptomina	0,1 g
FBS não activado	100 mL

3.5.2.1 Avaliação da produção de nitritos

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida através da acumulação de nitritos no sobrenadante das culturas celulares, usando uma reacção colorimétrica com reagente de Griess (sulfanilamida 1 % (p/v) em ácido fosfórico 5 % (v/v) e N-1-naftilenodiamina 0.1 % (p/v)). As células Raw 264.7 foram plaqueadas, na concentração $0,3 \times 10^6$ células/poço, para um volume final de 1000 μL , e ficaram a estabilizar durante 12 h. A seguir a este período as células ou foram mantidas no seu meio de cultura (DMEM) ou pré-incubadas, em placas de 48 micropoços com 50 μL dos extractos em estudo durante 1h, e depois estimuladas com 1 μL de LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 24 h. Retiraram-se 170 μL do sobrenadante de cada poço para uma placa de ELISA e adicionaram-se 170 μL do Reagente de Griess, reagindo durante 30 min, ao abrigo da luz. A absorvência foi medida a 550 nm num leitor de placas Elisa SLT. O meio de cultura foi usado como branco e a concentração de nitritos foi determinada numa análise de regressão, usando uma série de diluições de Nitrito de Sódio como padrão.

3.5.2.2 Viabilidade celular

A avaliação de células metabolicamente activas foi realizada através do ensaio de redução colorimétrica, usando brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol- 2- il) - 2,5- difenil tetrazólio (MTT), como descrito por Mosmann 1983. Após a retirada do sobrenadante, adicionaram-se 83 μL de solução de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato salino) às células aderentes em cada poço, e levou-se a incubar a 37 °C, durante 15 min, numa atmosfera humedecida de 95 % ar e 5 % CO₂. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e às células aderentes adicionaram-se 300 μL de isopropanol ácido (HCl 0.04 N em isopropanol), dissolvendo os cristais azul-escuros de *formazan*. Homogeneizou-se e transferiu-se esta solução para placas de ELISA. A quantificação de *formazan* foi realizada num leitor de placas de ELISA SLT, a 570 nm, com um valor de referência de comprimento de onda de 620 nm.

3.5.2.3 Avaliação da capacidade anti-radicalar contra o óxido nítrico

A actividade *scavenging* de óxido nítrico dos extractos foi avaliada utilizando um dador de NO: SNAP (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina). Em placas de ELISA, para um volume final de 300 μL incubaram-se 15 μL dos extractos com 0,9 μL de SNAP (100 mM) em 285 μL de meio de cultura (DMEM), durante 3 h a 37 °C, numa atmosfera humedecida de 95 % ar e 5 % CO₂. Após o tratamento, recolheram-se 170 μL

de sobrenadante e adicionou-se igual volume de reagente de Griess, numa placa de ELISA; deixou-se a incubar durante 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorvência foi lida a 570 nm num leitor de ELISA. A quantificação de nitritos determinou-se com base numa curva padrão de nitrito de sódio, sendo os resultados expressos em % SNAP. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.5.3 Anti-microbiana

3.5.3.1 Avaliação da concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória (MIC) dos extractos foi determinada pelo método de macrodiluição Broth com base em Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS), protocolos de referência M27-A3 (CLSI, 2008a), M27-S3 (CLSI 2008b) e M38-A2 (CLSI, 2008c), para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Apenas se testaram fungos filamentosos do tipo dermatófitos: *Trichophyton mentagrophytes* FF7, *T. rubrum* CECT 2794, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* CECT 2958, *T. verrucosum* CECT 2992, *Microsporum canis* FF1, *M. gypseum* CECT 2908, *Epidermophyton floccosum* FF9.

Prepararam-se as diluições dos extractos, em RPMI, e adicionaram-se às suspensões celulares, obtendo-se concentrações de teste entre os 0,8 e os 0,05 mg/mL. O meio de cultura RPMI foi esterilizado por membrana e incubado durante 2 dias em estufa a 30 °C para avaliar a esterilidade do mesmo. As suspensões de inóculo foram preparadas em meio RPMI 1640 (com L-glutamina, sem bicarbonato e com o indicador de pH, vermelho de fenol) de culturas PDA (Potato Dextrose Agar) ou SAD (Sabouraud Dextrose Agar), e distribuídas por tubos de vidro 12 x 75 mm. A suspensão do inóculo obteve-se adicionando 81 µL de inóculo, com a densidade óptica confirmada por contagens de viabilidade em DAS e acertada a 0,5 unidades de Macfarland, a 40 mL de RPMI. Em tubos de vidro, colocou-se a diluição do extracto em análise e em seguida a suspensão do inóculo, e deixou-se a incubar aerobicamente a 30 °C durante 7 dias. Realizaram-se 2 réplicas para cada diluição de extracto e procedeu-se a três ensaios independentes. Determinaram-se os valores MIC como a mínima concentração de extracto a provocar inibição total do crescimento.

3.5.3.2 Avaliação da concentração mínima letal

Para avaliar a concentração mínima letal (MLC) retiraram-se, 20 µL de cada tubo negativo e colocaram-se em placas com meio SDA, após leitura do MIC. Como controlo, retirou-se o mesmo volume do tubo de controlo positivo. Deixou-se em incubação a 30 °C durante 7 dias. Determinaram-se os valores MLC como a mínima concentração de extracto a causar morte dos fungos.

3.6 Germinação e propagação de sementes de *Urtica dioica*

3.6.1 Avaliação da germinação de sementes *in vitro*

As sementes de *Urtica dioica* foram conservadas a -20 °C. Numa fase inicial foi necessário proceder à separação das sementes do restante material vegetal. As sementes isoladas manualmente foram esterilizadas numa solução de 3% hipoclorito de cálcio (2% p/v). Neste ensaio, as sementes foram primeiro colocadas em etanol a 25% com umas gotas de Tween 20 durante 2 min, sob agitação. Após três lavagens com água destilada esterilizada, as sementes foram transferidas para a solução de hipoclorito acima referida, sob agitação, durante 10 min. Após lavagem em água destilada esterilizada, as culturas das sementes foram colocadas em tubos de ensaios contendo cerca de 15 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com a concentração reduzida para 1/4, com 0,75 % de sacarose e 1,5 g/L de agar (Tabela 7). Os meios foram previamente autoclavados a 121 °C durante 20 min, e a uma pressão de 1,1 atm. O pH dos meios foi ajustado 5,6 – 5,8 antes da autoclavagem, utilizando soluções diluídas de KOH. Em cada tubo de ensaio foram colocadas 4 sementes sendo o número total de tubos de 40, correspondente a 160 sementes. As culturas foram colocadas numa estufa, 25 °C, num fotoperíodo de 16h luz/8 h escuro.

Tabela 7. Composição do Meio MS utilizado nos ensaios de germinação de sementes e de micropropagação

COMPOSIÇÃO (soluções stock)	VOLUME (mL/L)	25% VOLUME (mL/L)
Macronutrientes	50	12,5
Micronutrientes	2	0,5
Mio-inositol	1	0,25
Ferro - EDTA	5	1,25
Vitaminas	2	0,5
Sacarose	3 %	0,75 %
Agar	0,6 %	0,15 %

3.6.2 Propagação de *Urtica dioica*

Nos ensaios de micropropagação, foi igualmente utilizado o meio MS de composição e modo de preparação análogos ao que foi previamente descrito, mas de concentração reduzida (Tabela 7). A este meio foi adicionado o regulador de crescimento citocinina BAP (benzilaminopurina), conforme indicado na Tabela 8. Os ápices das plântulas obtidas por germinação de sementes nas condições anteriormente referidas foram utilizados para estabelecer as culturas.

Para cada combinação hormonal foram testados 15 tubos de ensaio, cada um deles contendo 2 ápices caulinares. As culturas foram colocadas numa estufa, a 25 °C, no fotoperíodo 16h luz/8 h escuro.

Tabela 8. Concentrações do regulador de crescimento utilizado na propagação de *Urtica dioica*

	REGULADORES DE CRESCIMENTO	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
MS 25%	BAP	0,1
		0,05

3.6.3 Aclimatização das plantas de *Urtica dioica*

Para aclimatizar as plantas propagadas para o solo, preparou-se uma mistura de terra e turfa (2:1) e perlite (1:1). Esta mistura foi autoclavada a 121 °C durante 20 min, e a uma pressão de 1,1 atm, após o que se distribuiu pelos recipientes. As plantas foram transferidas para o recipiente (1 planta por cada recipiente), tendo sido efectuadas cerca de 5 réplicas de cada meio utilizado na propagação, e colocadas na câmara de cultura a 20°C com um fotoperíodo 16h luz (25-35 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 8h escuro.

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos do estudo da dosagem em compostos fenólicos, da avaliação da capacidade anti-oxidante e anti-microbiana, e da capacidade germinativa, foram analisados com recurso ao Microsoft Excel. Os resultados obtidos da avaliação da actividade anti-inflamatória foram estatisticamente analisados com recurso ao programa Prism5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parte aérea florida

4.1.1 Caracterização fitoquímica

4.1.1.1 Métodos espectrofotométricos

A dosagem de fenóis, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos totais nas espécies de urtiga foi inicialmente realizada recorrendo a ensaios espectrofotométricos, de acordo com as metodologias descritas anteriormente. A avaliação espectrofotométrica de compostos fenólicos nas espécies de urtiga abordadas neste trabalho, com base nos ensaios executados, não foi ainda realizada, de acordo com a literatura. Estabeleceu-se uma comparação entre as três amostras e os respectivos ensaios, como se pode ver na Figura 7.

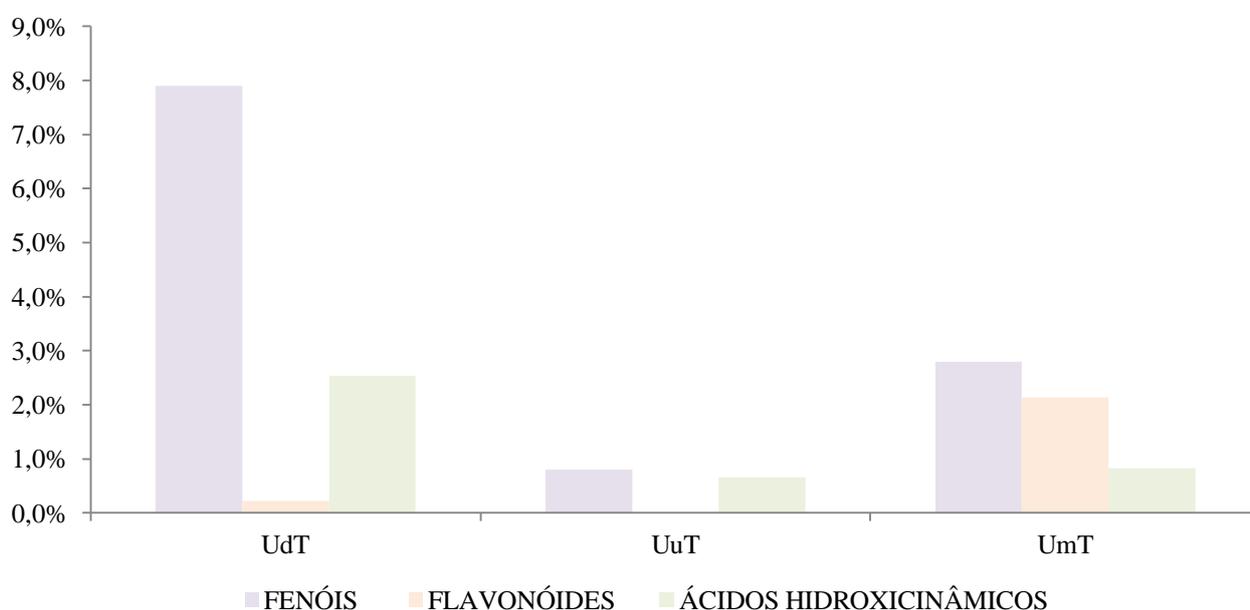


Figura 7. Teor de fenóis, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos totais, nos extractos da parte aérea de *Urtica dioica* - UdT, *Urtica urens* - UuT e *Urtica membranacea* - UmT. Os resultados foram expressos em % por 100 g dos extractos liofilizados.

Tabela 9. Dosagem de fenóis, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos totais, para as amostras UdT, UuT e UmT.

ENSAIO	AMOSTRA		
	UdT	UuT	UmT
FENÓIS	7,90%	0,80%	2,80%
FLAVONÓIDES	0,22%	0,00%	2,14%
ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	2,54%	0,66%	0,82%

A *Urtica dioica* (UdT) demonstrou ter o maior conteúdo em fenóis totais, 7,9 % e de ácidos hidroxicinâmicos, 2,54 %, enquanto a *Urtica urens* (UuT) revelou o menor conteúdo em fenóis, 0,8 % e também de ácidos hidroxicinâmicos, 0,66 %.

A *Urtica membranacea* (UmT) foi a espécie que evidenciou o maior conteúdo em flavonóides totais, 2,14 %, enquanto na UuT não foram quantificáveis.

4.1.1.2 Métodos cromatográficos

4.1.1.2.1 Cromatografia em camada fina

Não há referências relativamente à análise cromatográfica de compostos fenólicos nas espécies de urtiga em estudo. Para uma análise preliminar de ácidos fenólicos e de flavonóides, recorreu-se à cromatografia de camada fina (TLC). Como já descrito, utilizou-se o sistema celulose/ácido acético a 15 %, como descrito anteriormente, em que os compostos migram de acordo com a sua massa molecular. Apesar da complexidade dos extractos, que não permitem uma óptima separação dos compostos, é notória a presença e abundância de alguns polifenóis, nomeadamente ácidos fenólicos, que, aos UV, ocorrem com uma fluorescência azul após a acção do Neu/PEG, e flavonóides, de coloração amarela ou amarello-esverdeado, com o mesmo revelador, como se pode ver na Figura 8.

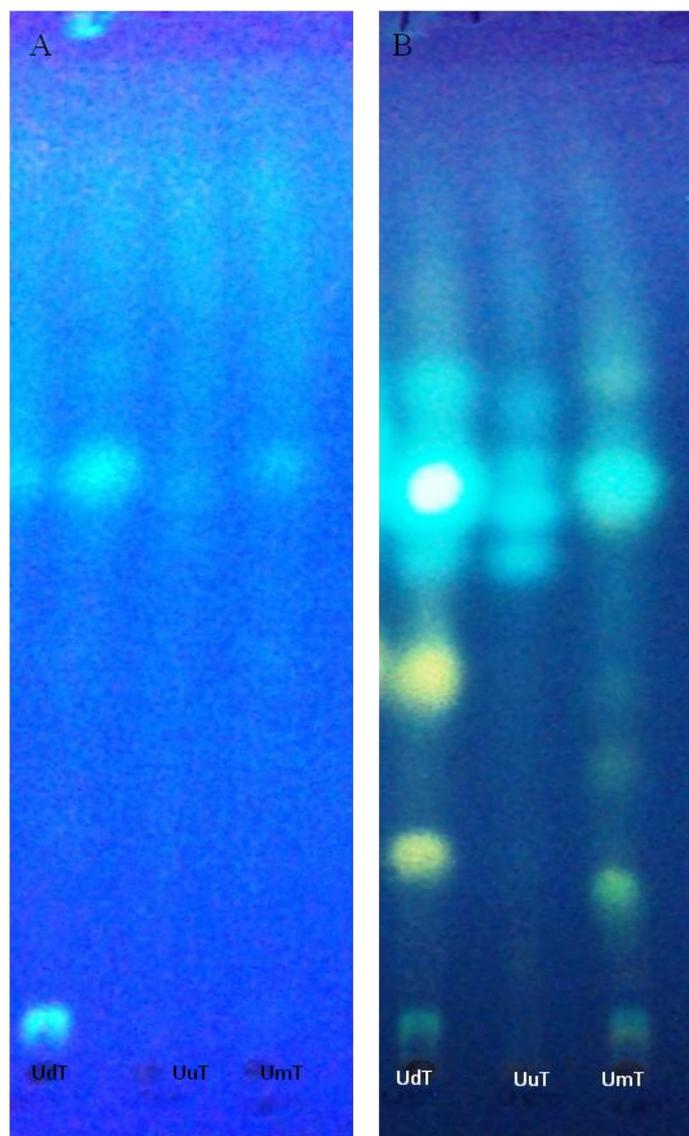


Figura 8. Perfil cromatográfico, por TLC após desenvolvimento e revelação com o sistema celulose/ácido acético 15 %. (A) Observação ao UV (366nm); (B) Observação ao UV (366nm) após revelação com Neu/PEG.

Abreviaturas: UdT – parte aérea de *Urtica dioica*; UuT – parte aérea de *Urtica urens*; UmT – parte aérea de *Urtica membranacea*

Estes resultados corroboram os anteriormente descritos relativamente às dosagens espectrofotométricas; a parte aérea de *Urtica dioica* tem um maior conteúdo em ácidos hidroxicinâmicos (manchas de cor azul-clara), como se pode ver na Figura 9, sendo também evidente a ausência de flavonóides (manchas amarelas) em *Urtica urens*.



Figura 9. Perfil cromatográfico, por TLC após desenvolvimento e revelação com ácido acético a 15 %. (D) Observação à luz visível, com o revelador Neu/PEG; (E) Observação à luz visível, com uma solução do radical DPPH.

Abreviaturas: UdT – parte aérea de *Urtica dioica*; UuT – parte aérea de *Urtica urens*; UmT – parte aérea de *Urtica membranacea*.

A observação à luz visível demonstra a presença de compostos fenólicos (manchas cor laranja), particularmente notória na amostra Udt, como se pode ver na Figura 9 (D). A pulverização da placa com uma solução de DPPH permite também identificar a presença destes compostos, uma vez que se sabe terem comprovada actividade captadora (Vermerris & Nicholson, 2006). Deste modo, a redução da cor lilás, característica do radical DPPH, como se pode ver na Figura 9 (E), ocorre pela redução do radical, permitindo também detectar a presença dos compostos fenólicos.

Tabela 10. Caracterização do tipo de compostos fenólicos e seus respectivos valores de Rf.

366NM	UdT	UuT	UmT	Tentativa de Identificação
1	-	-	0,04	Flavonóide
2	0,05	-	0,05	Ácido Fenólico
3	-	-	0,16	Flavonóide
4	0,19	-	-	Flavonóide
6	-	-	0,27	Flavonóide
8	0,37	-	-	Flavonóide
9	0,47	0,47	-	Ácido Fenólico
10	-	-	0,5	Flavonóide
11	0,53	0,53	0,53	Ácido Fenólico
12	-	0,55	-	Ácido Fenólico
13	0,59	-	-	Ácido Fenólico
14	-	0,61	-	Ácido Fenólico
15	0,65	-	0,65	Ácido Fenólico
16	0,74	-	-	Flavonóide

Detecção após tratamento pelo revelador Neu/PEG

4.1.1.2.2 Identificação de compostos fenólicos dos extractos por HPLC-PDA-ESI/MSⁿ

A fim de se proceder à identificação dos compostos fenólicos presentes nos diversos extractos, recorreu-se à cromatografia líquida de alta resolução, acoplada a dois detectores: fotodíodos e espectrómetro de massa (HPLC-PDA-ESI/MSⁿ). A Figura 10 ilustra o perfil cromatográfico das partes aéreas da *Urtica dioica*.

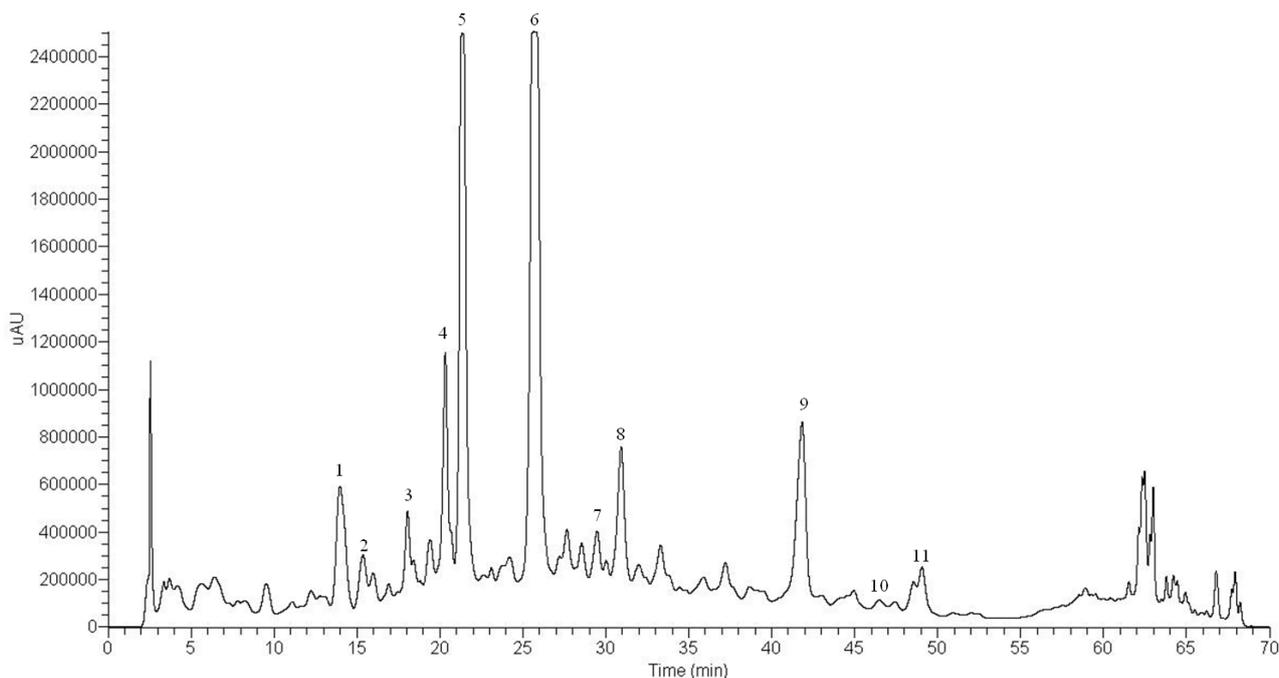


Figura 10. Perfil cromatográfico do extracto da parte aérea de *Urtica dioica*, registado a 280 nm.

Por recurso à informação dos espectros de ultra violeta (UV), máximos de absorção e perfil espectral, assim como através dos correspondentes espectros de massa, por análise do ião molecular adquirido no modo ião negativo $[M-H]^-$ e dos iões resultantes da sua fragmentação (MS^2), foi possível propor a estrutura dos compostos presentes em *Urtica dioica*, referidos na Tabela 11.

Tabela 11. Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MS) e identificação de compostos presentes em *Urtica dioica*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
1	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	13.97	250; 298sh; 324	353	191(100); 179(79); 135(3)	-
2	Ácido cafeoiltartárico	15.36	251; 298sh; 328	311	179(70); 178(4); 149(100); 135(3)	-
3	Derivado do ácido <i>p</i> -cumárico	18.05	290sh; 314	355	337(16); 209(77); 191(100); 173(1); 129(1)	-
4	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	20.33	251; 298sh; 325	353	173(100)	-
5	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	21.35	251; 298sh; 326	353	191(100)	-
6	Derivado cafeoilico do ácido málico	25.68	260; 294sh; 326	591*	295(100); 179(34)	179(20); 133(100)

Tabela 11(a). Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica dioica*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
7	<i>p</i> -Cumaroilmalato (isômero)	29,42	270sh; 311	279	163(100); 133(94)	
8	<i>p</i> -Cumaroilmalato (isômero)	30,92	313	279	163(100); 133(1); 119(3)	119(100)
9	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido	41,83	257; 270sh; 293sh; 353	609	591(1); 463(1); 343(7); 301(100); 271(11); 179(2)	299(4); 283(5); 271(93); 255(85); 211(3); 179(100); 151(33)
10	Camferol- <i>O</i> -rutinósido	47,44	265; 336	593	505(1); 357(1); 327(3); 285(100); 255(4); 195(1)	267(80); 257(100); 241(27); 227(33); 213(27); 199(38)
11	Isoramnetina- <i>O</i> -rutinósido	49,05	256; 270sh; 298sh; 354	623	591(1); 387(1); 357(1); 315(100); 301(20); 271(8); 243(1); 215(1)	301(100); 287(5); 271(7); 257(1)

* [2M-H]⁻: Ião de carga dupla

Os compostos correspondentes aos picos **1**, **4** e **5** apresentam um espectro de UV característico do ácido cafeico e o ião molecular com uma relação massa/carga (m/z) de 353. Considerando que a aquisição dos espectros de massa foi realizada no modo ião negativo, pode-se inferir que a massa destes compostos é de 354 Da. Estes resultados e a ocorrência, no espectro de segunda ordem (MS^2), dos fragmentos com m/z de 191 (compostos 1 e 5) ou 173 (composto 4) resultantes, respectivamente de perdas de 162 $[(M-H)-162]^-$ ou de 180 u.m.a. $[(M-H)-180]^-$, sugerem a presença de ácidos cafeoilquínicos. Com base nos padrões de fragmentação referenciados por (Clifford, Knight, & Kuhnert, 2005), o composto **1** foi identificado como **ácido 3-O-cafeoilquínico**, devido à presença, no MS^2 , de um intenso sinal (79%) com m/z 179, enquanto a ausência deste fragmento, correspondente ao cinamato, no composto **5** permitiu identificá-lo como **ácido 5-O-cafeoilquínico**. O composto **4** corresponde ao **ácido 4-O-cafeoilquínico**, devido à presença, no MS^2 , de um pico base com m/z 173. A sequência de eluição, evidenciada pelos respectivos tempos de retenção (tR), corrobora a identificação destes compostos.

O pico **2** tem também um espectro de UV comum ao do ácido cafeico. Apresenta um ião molecular com m/z 311 e um pico base, no MS^2 , com m/z 149, correspondente à molécula desprotonada do ácido tartárico, resultante da perda de um resíduo cafeóílico $[(M-H)-162]^-$. A corroborar esta interpretação, registou-se, como segundo fragmento mais representativo, o ião m/z 179, ião molecular do ácido cafeico. De acordo com este padrão de fragmentação e suportado na informação de (Jaiswal, Kiprotich, & Kuhnert, 2011) o composto **2** foi identificado como o **ácido cafeoiltartárico** ou ácido caftárico.

O pico **3** apresenta um espectro de UV semelhante ao do ácido *p*-cumárico, mas uma massa molecular de 356 Da, sugerindo tratar-se de um dos seus derivados. O pico base no MS^2 com m/z 191, pode resultar da libertação de uma molécula de ácido cumárico $[(M-H)-164]^-$, enquanto um fragmento também representativo (77%) com m/z 209, poderá eventualmente corresponder ao ião molecular do ácido hidroxiferúlico ou do álcool sinapílico.

O pico **6** originou um ião com dupla carga, do que se infere que o composto possuía uma massa de 296 Da. O espectro de UV corresponde ao ácido cafeico, tratando-se, no entanto, de um derivado. No espectro de massa de terceira ordem (MS^3) o pico de base resultou da perda de um resíduo cafeóílico $[(M-H)-162]^-$ e da consequente formação de um ião com m/z 133, que pode estar relacionado com o ião molecular do ácido málico. Assim, o composto **6** pode tratar-se de um derivado

cafeóilico do ácido málico, tal como já identificado por (Farang, Weigend, Luebert, Brokamp, & Wessjohann, 2013).

O pico **8** apresenta o espectro de UV do ácido *p*-cumárico e o pico base do MS² com *m/z* 163, coincidente com o deste ácido hidroxicinâmico, e resultante da perda de 116 u.m.a., que corresponde a um resíduo maloílico. Este padrão de fragmentação, assim, como a ocorrência dos fragmentos com *m/z* 133 e 119, no MS² e MS³, respectivamente, sugerem, à semelhança do foi descrito para espécies da *Brassica campestris* L. (Harbaum *et al.*, 2007), que o composto **7** possua o ácido *p*-cumárico esterificado pelo ácido málico, e seja consequentemente identificado como um ***p*-cumaroilmalato**. O pico **6a** possui o mesmo padrão de fragmentação, pelo que poderá corresponder a um **isómero do *p*-cumaroilmalato**.

Com menor expressão no extrato da *Urtica dioica*, foram também identificados três flavonóides, picos **9,10** e **11**, com iões moleculares distintos, [M-H]⁻ = 609, 593 e 623, respectivamente, mas com picos base, no MS², com *m/z* 301, 285 e 315, todos eles resultantes da perda de 308 u.m.a., ou seja de um resíduo glucosil-ramnosilo, embora unido a geninas distintas; quercetina, canferol e isorramnetina. Os espectros de UV evidenciaram que os compostos 9 e 11 possuem o perfil espectral da quercetina, e o composto 10 do canferol, o que corrobora os resultados sugeridos pela espectrometria de massa. As características espectrais anteriormente referidas para o composto **9**, assim como a presença, no MS² do ião *m/z* 271 e no MS³ dos fragmentos com *m/z* 179 e 151 são concordantes com a **quercetina-*O*-rutinósido** (rutina), tal como referem (Farang *et al.*, 2013) e (Seeram, Lee, Scheuller, & Heber, 2006). Quanto aos compostos **10** e **11**, foram identificados como **campferol-*O*-rutinósido** e **isorramnetina-*O*-rutinósido**, flavonóis já detectados em espécies da urtiga (Farang *et al.*, 2013).

Revela-se importante destacar que, na *Urtica dioica*, o ácido cafeioltartárico e o composto *p*-coumaroilmalato foram identificados pela primeira vez, nesta espécie no decorrer deste trabalho.

Na Figura 11 ilustra-se o perfil cromatográfico do extracto obtido a partir da parte aérea total de *Urtica urens*.

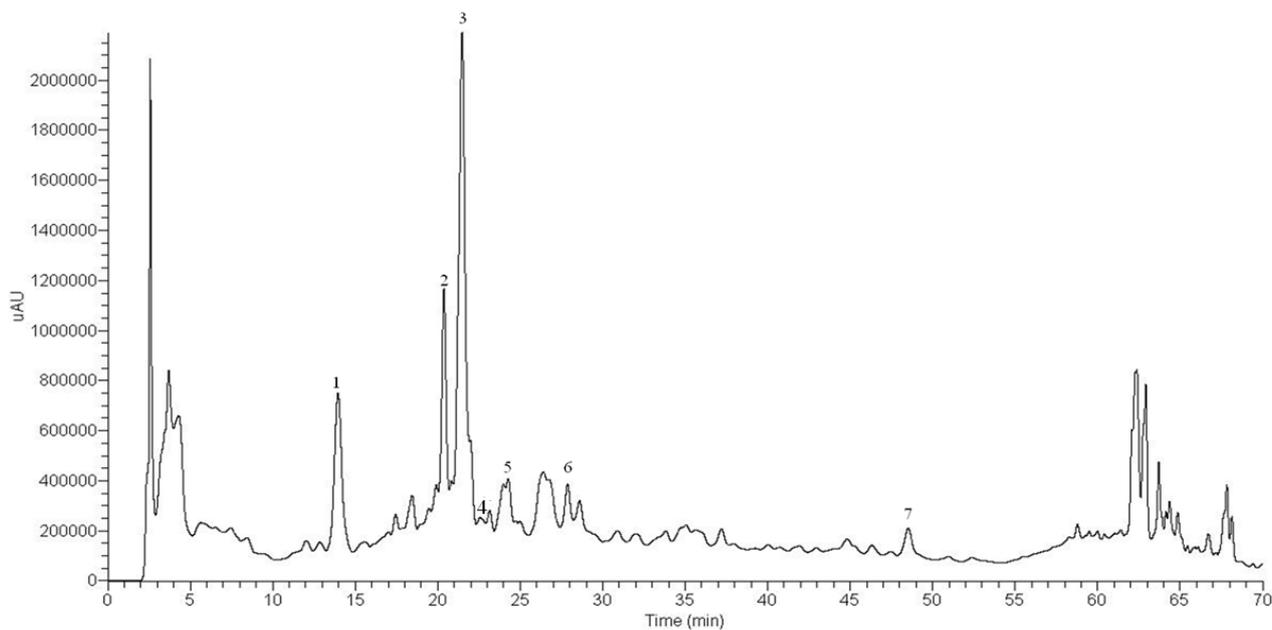


Figura 11. Perfil cromatográfico do extracto da parte aérea de *Urtica urens*, registado a 280 nm.

Por recurso à informação dos espectros de ultra violeta (UV), máximos de absorção e perfil espectral, assim como através dos correspondentes espectros de massa, por análise do ião molecular adquirido no modo ião negativo $[M-H]^-$ e dos iões resultantes da sua fragmentação (MS^2), foi possível propor a estrutura dos compostos presentes em *Urtica urens*, referidos na Tabela 12.

Tabela 12. Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica urens*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
1	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	13.97	250; 298sh; 324	353	191(100); 179(79); 135(3)	
2	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	20.33	251; 298sh; 325	353	173(100)	
3	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	21.35	251; 298sh; 326	353	191(100)	
4	Ácido feruloil málico	23.97	254sh; 295sh; 317	309	291(4); 263(11); 246(21); 219(2); 201(4); 193(100); 177(5); 149(15); 131(8); 115(7)	
5	Ácido <i>p</i> -cumaroil-cafeoilquínico	24.27	308	499	353(100); 163(2)	173(100)

Tabela 12(a). Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica urens*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
6	Derivado do ácido cafeoilquínico	27.87	295sh; 326	593	575(5); 515(2); 503(34); 473(100); 455(5); 425(3); 413(6); 395(3); 383(41); 353(64); 325(1)	455(1); 395(1); 383(20); 353(100); 325(2); 297(1)
7	Diosmetin <i>O</i> -rutinoside	48.53	259sh; 268; 325	607	299 (100); 285(19)	285(100)

Os compostos correspondentes aos picos **1**, **2** e **3** são os mais representativos do perfil cromatográfico obtido a partir da *Urtica urens* (Figura 11). Apresentam um espectro de UV característico do ácido cafeico, o ião molecular com uma relação massa/carga (m/z) de 353, assim como os perfis de fragmentação comuns a compostos detetados na *Urtica dioica* (Tabela 12). Baseados nas suas características espectrais e também nos tempos de retenção, o composto **1** foi identificado como **ácido 3-O-cafeoilquínico**, o composto **2** como **ácido 4-O-cafeoilquínico** e o composto **3** como **ácido 5-O-cafeoilquínico**.

O pico **5** com 500 Da de massa molecular, evidencia, no MS², como pico base, o fragmento com m/z 353 [(M-H)-146]⁻, correspondente ao ácido cafeoilquínico e resultante da perda de 146 u.m.a., ou seja, de um resíduo *p*-cumaroílico. Com base nesta hipótese e num padrão de fragmentação comum ao referido por (Jaiswal et al., 2011), o composto **5** foi identificado como o ácido ***p*-cumaroil-cafeoilquínico**.

A presença de flavonóides no extrato da *Urtica urens* é residual, destacando-se o pico **7**, com um ião molecular com m/z 607, que originou, no MS² um ião maioritário m/z 299 [(M-H)-308]⁻ correspondente à perda de um resíduo glucosilramnósido. Após nova fragmentação deste ião, ocorreu, no MS³ o fragmento m/z 285 [(M-H)-308-15]⁻, proveniente da libertação de um grupo metilo. À semelhança do que é mencionado por (Lin & Harnly, 2010) este padrão de fragmentação sugere que o composto **7** possa corresponder à **diosmetina-O-rutinósido**.

Os dados bibliográficos referentes a *Urtica urens* confirmam a presença de ácidos fenólicos, particularmente derivados do ácido clorogénico e a descrição do composto patuletina, flavonol metilado que pode, eventualmente, não ter sido extraído, em quantidades detectáveis, nas condições utilizadas neste trabalho.

A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico do extracto obtido a partir da parte aérea da *Urtica membranacea*.

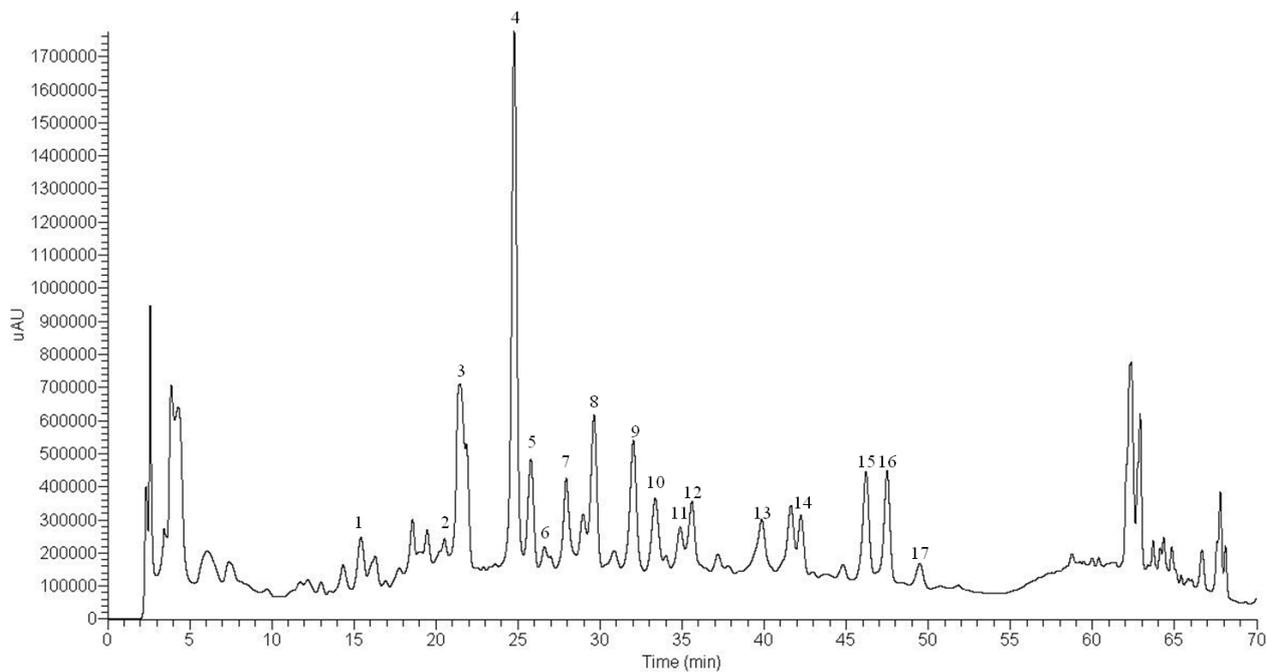


Figura 12. Perfil cromatográfico do extracto da parte aérea de *Urtica membranacea*, registado a 280 nm..

Por recurso à informação dos espectros de ultra violeta (UV), máximos de absorção e perfil espectral, assim como através dos correspondentes espectros de massa, por análise do ião molecular adquirido no modo ião negativo $[M-H]^-$ e dos iões resultantes da sua fragmentação (MS^2), foi possível propor a estrutura dos compostos referidos na Tabela 13.

Tabela 13. Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica membranacea*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
1	Ácido cafeoiltartárico	15.36	251; 298sh; 328	311	179(70); 178(4); 149(100); 135(3)	-
2	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico	21.35	251; 298sh; 326	353	191(100)	
3	Derivado do ácido sinápico	21.56	281; 288sh; 326	399	369(4); 223(40); 205(100)	
4	Ácido cafeoilquinico (isômero)	24.77	252; 298sh; 326	707*	353	191(100); 173(37); 155(7); 111(20)
5	Luteolina-6,8-di- <i>C</i> -hexósido	25.81	254; 286; 330	609	591(3); 519(24); 501(3); 489(100); 471(8); 441(3); 429(10); 411(3); 399(30); 369(26)	471(4); 441(2); 399(38); 381(1); 369(100); 333(1)
6	Apigenina 6,8-di- <i>C</i> -hexósido	27.94	271; 332	593	575(7); 503(34); 473(100); 455(8); 425(4); 413(5); 383(37); 353(62);	383(16); 353(100); 325(2); 297(1)
7	Ácido <i>p</i> -cumaroilquinico (isômero)	28.93	312	337	191(9); 173(100)	

Tabela 13(a). Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica membranacea*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
8	Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico (isômero)	29.63	314	337	191(1); 173(100)	
9	Ácido 4- <i>O</i> -feruloilquínico	32.02	298sh; 329	367	173 (100); 155(8); 111 (19)	
10	Apigenina-6- <i>C</i> -hexosil-8- <i>C</i> -pentósido	33.36	257; 273; 320	563	545(7); 517(3); 503(4); 485(5); 474(16); 473(65); 455(7); 444(20); 443(100); 425(4); 413(8); 384(6); 383(38); 354(8); 353(47)	383(30); 354(11); 353(100); 311(1)
11	Luteolina-6- <i>C</i> -hexósido	34.87	259sh; 269; 345	447	429(21); 399(3); 369(3); 357(100); 339(2); 327(76); 285(2)	339(100); 327(13); 311(10); 299(10); 297(64); 285(26)

Tabela 13(b). Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica membranacea*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
12	Luteolina-6-C-rutinósido	35.59	259sh; 269; 347	593	575(3); 503(1); 473(100); 447(2); 429(53); 411(3); 371(3); 369(5); 357(24); 351(3); 339(11); 327(12); 309(10); 298(1)	399(1); 327(100); 325(11); 298(30)
13	Apigenina-8-C-rutinósido	39.85	270; 336	577	457(8); 431(1); 414(15); 413(100); 377(1); 353(3); 341(10); 323(7); 311(6); 294(4); 293(37)	396(1); 353(1); 335(6); 294(6); 293(100); 281(1)
14	Luteolina-3-hidroxi-3-metilglutarilo-6-C-rutinósido	42.23	260sh; 269; 349	737	675(9); 635(31); 593(100); 575(25); 473(20); 429(6); 357(3); 309(1)	575(1); 473(100); 429(48); 369(3); 357(29); 351(3); 339(11); 327(11); 309(14); 298(2)
15	Apigenina-3-hidroxi-3-metilglutarilo-8-C-rutinósido	46.20	270; 338	721	659(6); 619(36); 577(100); 559(21); 495(1); 457(4); 455(9); 413(14); 395(1); 293(4)	457(8); 431(1); 413(100); 383(1); 355(2); 341(11); 335(4); 323(8); 311(8); 293(48); 269(1)

Tabela 13(c). Comportamento cromatográfico, características espectrais (UV/Vis e ESI-MSⁿ) e identificação de compostos presentes em *Urtica membranacea*.

PICO	HIPÓTESE ESTRUTURAL	T _R (MIN)	λ _{MAX} (NM)	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³
16	Diosmetina-3-hidroxi-3-metilglutarilo-8-C-rutinosídeo	47.49	258; 270; 349	751	689(5); 649(28); 608(5); 607(100); 589(17); 487(4); 485(7); 443(13); 425(1); 323(6)	487(10); 461(2); 443(100); 383(2); 371(14); 365(5); 353(9); 341(6); 323(84); 308(8); 299(1)
17	Camferol-3-O-matonglucosídeo	49.47	265; 344	533	489(100); 285(2)	285(100); 213(2); 163(2)

O pico **1** apresenta características cromatográficas e espectrais comuns às do **ácido cafeoiltartárico** (ácido caftárico), igualmente detectado na *Urtica dioica*

O pico **2** tem um tempo de retenção, espectro de UV e de massa coincidentes com o **ácido 5-O-cafeoilquínico**, composto comum às três espécies de *Urtica* estudadas. No entanto, na *Urtica membranacea* ocorre, adicionalmente, o pico **4**, que originou um ião de carga dupla $[2M-H]^- = 707$, que ao fragmentar-se deu um ião base com m/z 353 e, no MS³, fragmentos sobreponíveis aos identificados nos outros ácidos cafeoilquínicos. Sabendo-se que a isomeria *cis/trans* destes ácidos pode ocorrer quer em presença de misturas hidro-metanólicas (onde a amostra foi solubilizada), quer numa fonte de ionização por eletrospray, por acção do campo eléctrico (Xie *et al.*, 2011), pode-se inferir que o composto 4a possa corresponder a um **isómero do ácido 5-O-cafeoilquínico** anteriormente identificado (composto 2).

Para o pico **3** obteve-se um ião molecular com m/z 399 que após fragmentação evidenciou, no MS² um ião maioritário m/z 205 e outro com 40% de intensidade relativa, m/z 223, que sugerem, respectivamente, um resíduo sinápico e o ião molecular $[M-H]^-$ do ácido sinápico. Estes iões resultam da perda de 194 e 176 u.m.a. que podem corresponder a uma molécula de ácido ferúlico ou de ácido glucurónico (194 Da) ou aos respetivos resíduos, feruloilo ou glucuronilo provenientes da sua desidratação. Baseados nestes resultados infere-se que o composto **3** seja um **derivado do ácido sinápico**.

Os picos **7** e **8** têm espectros de UV do ácido *p*-cumárico. Apresentam as mesmas massas (338 Da) e iguais padrões de fragmentação. No MS² o pico base tem m/z 173 $[(M-H)-164]^-$, que confirma a ocorrência de uma molécula de ácido *p*-cumárico. Além disso, este pico base do MS², assim como a existência de outro fragmento, m/z 191 são indicadores da acilação deste ácido hidroxicinâmico com o ácido quínico. Destes resultados infere-se que os compostos **7** e **8** são isómeros do **ácido p-cumaroilquínico**.

O pico **9** apresenta um espectro de UV idêntico ao do ácido ferúlico. Um ião molecular de 367 é indiciador de um ácido feruloilquínico. O fragmento principal deste ião molecular, com m/z 173 $[(M-H)-194]^-$, evidencia uma molécula de ácido quínico desidratada, resultante da libertação de ácido ferúlico. Este padrão de fragmentação, em que o ião de m/z 173 ocorre com uma abundância relativa de 100%, permite deduzir, com base na informação de (Jaiswal *et al.*, 2011), que o composto **9** corresponde ao **ácido 4-O-feruloilquínico**.

Nos espectros de UV e de massa do extrato da *Urtica membranacea* são diversos os perfis espectrais comuns a flavonóides, apesar de apresentarem padrões de fragmentação distintos.

Os picos **5**, **6**, **10** e **11** apresentam particularidades de fragmentação de flavonóides C-glicosilados, tal como descrito por (Figueirinha, Paranhos, Pérez-Alonso, Santos-Buelga, & Batista, 2008).

No MS² e MS³ dos compostos **5** e **6** ocorrem fragmentos resultantes da perda de 120 e 90 u.m.a. correspondentes à clivagem de duas unidades hexosilo, uma em cada estágio da fragmentação, do que se infere tratar-se de 6,8-di-C-hexósidos que diferem na natureza da genina. Assim, a ocorrência, no composto **5** do fragmento *m/z* 369 (genina+83) e 399 (genina+113) sugere, de acordo com (Ferrerres, Silva, Andrade, Seabra, & Ferreira, 2003), a presença da luteolina, enquanto o fragmento *m/z* 353 (genina+83) e 383 (genina+113) registados para o composto **6** indicia a presença da apigenina. Estes dados são consistentes com a presença da **luteolina-6,8-di-C-hexoside** (composto **5**) e **apigenina-6,8-di-C-hexoside** (composto **6**). Quanto ao pico **10**, apresenta uma massa 30 Da inferior à do composto **6** e perdas de 120 e 90 u.m.a. no MS², mas de 90 e 60 u.m.a. no MS³, sugerindo a presença de uma hexose ligada ao C-6 da genina e uma pentose unida ao C-8. Os fragmentos com *m/z* 353 e 383, correspondentes à genina+83 e genina+113, respetivamente, ou seja à apigenina, permitem identificar o composto **10** como **apigenina-6-C-hexosil-8-C-pentoside**.

O pico **11** exhibe apenas no MS² sinais correspondentes à ruptura de uma unidade hexosil, com *m/z* 327 [(M-H)-120]⁻ e 357 [(M-H)-90]⁻. A ocorrência do fragmento *m/z* 327 (genina+41) e 357 (genina+71) sugere, de acordo com (Ferrerres, Gil-Izquierdo, Andrade, Valentao, & Tomas-Barberam, 2007), a presença de uma genina tetrahidroxilada como a luteolina, identificação suportada pelo espectro de UV. A posição da glicosilação, em C-6, foi deduzida pela presença do fragmento com *m/z* 429 [(M-H)-H₂O]⁻ com uma abundância relativa de 21%, com base em (Cuyckens & Claves, 2004) segundo os quais, a substituição em C-6 origina um fragmento com 20-30% de abundância relativa, resultante da perda de água. A informação espectral obtida permitiu identificar o composto **11** como **luteolina-6-C-hexósido**.

Os picos **12** e **13** apresentam uma massa molecular com 16 Da de diferença, mas um idêntico padrão de fragmentação. Em ambos espectros ocorre uma perda de 120 u.m.a. que pode ser indiciador da presença de uma unidade C-hexosilo, normalmente

hexose, assim como de 146 e 146+18 u.m.a. referentes à perda de um resíduo ramnosilo e de uma unidade de ramnose, respectivamente. Atendendo a uma baixa abundância relativa dos iões resultantes da perda de 146 u.m.a., e significativamente maior para os iões formados pela perda de 164 u.m.a., pode-se concluir, de acordo com (Cuyckens & Clayes, 2004), que estes compostos são *O,C*-diglicósidos. Adicionalmente, a presença do ião correspondente à perda de 164 u.m.a. indica que a ligação interglucídica da ramnose está localizada em C-2'' da hexose (Ferrerres *et al.*, 2007). Apesar da parte glicosídica ser igual para os dois compostos (*O,C*-glucosilramnósido – *C*-rutinósido), são diferentes os locais de ligação. No composto 12, o MS² apresenta o fragmento com *m/z* 357 (genina+71) com o dobro da abundância relativa do fragmento com *m/z* 327 (genina+41), enquanto no composto 13 são semelhantes as abundâncias relativas dos iões *m/z* 341 (genina+71) e 311 (genina+41), correspondendo, a ligações ao C-6 e C-8, respectivamente (Ferrerres *et al.*, 2007).

Os espectros de UV são marcadamente diferentes, sobreponível com o da luteolina, para o composto 12 e à apigenina, para o composto 13, o que justifica uma massa molecular do composto 13, 16 Da inferior à do composto 12. Do anteriormente exposto, o composto **12** foi identificado como **luteolina-6-C-rutinósido**, e o composto **13** como **apigenina-8-C-rutinósido**.

Os picos **14**, **15** e **16** têm padrões de fragmentação semelhantes, todos eles caracterizados, no MS², por perdas de 62 [(M-CO₂-H₂O)-H]⁻, 102 [(M-C₄H₆O₃)-H]⁻ e 144 u.m.a. [(M-C₆H₈O₄)-H]⁻, que foram igualmente detectadas em glicosilflavanonas derivadas do 3-hidroxi-3-metilglutarilo, presentes em espécies do *Citrus* (Barreca, Bellico, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011; Di Donna *et al.*, 2009). Resultantes da perda de 144 u.m.a. ocorreram, no MS², os picos base com *m/z* 593, 577 e 607, para os compostos **14**, **15** e **16**, respetivamente, os quais evidenciaram, no MS³, padrões de fragmentação anteriormente descritos para os *C*-rutinósidos da luteolina e da apigenina. Suportados nestes resultados e nos respectivos espectros de UV, para o composto **14** sugere-se a **luteolina-3-hidroxi-3-metilglutarilo-6-C-rutinósido** e para o composto **15** a **apigenina-3-hidroxi-3-metilglutarilo-8-C-rutinósido**. Quanto ao composto **16**, o MS³ evidencia uma fragmentação sobreponível à do composto 15. No entanto, a presença de um ião com *m/z* 299, indica a presença de uma genina com 300 Da de massa molecular. Esta informação, assim como o espectro de UV deste composto, sugerem a diosmetina como genina. Deste modo, a estrutura proposta poderá corresponder à **diosmetina-3-hidroxi-3-metilglutarilo-8-C-rutinósido**.

Pico **17** apresenta um ião molecular com m/z 533 e um pico base no MS³ com m/z 285. A ocorrência deste fragmento, assim como o espectro de UV sugerem a presença do campferol. Tendo em consideração as premissas anteriores e a existência, no MS² de um fragmento maioritário com m/z 489 [(M-CO²)-H]⁻ pode-se inferir que este flavonol possa estar ligado a uma molécula de glucose acilada pelo ácido malónico originando um resíduo glucosilmalonilo {[180 + (104-18)]-18} com 248 u.m.a.. Este padrão de fragmentação, igualmente referido para um dos flavonóides de *Ribes nigrum* L. (Vagiri, Ekholm, Andersson, Johansson, & Rumpunen, 2012) conduziu à identificação do composto **17** como **campferol-malonilglucósido**.

É importante referir que para *Urtica membranacea*, de acordo com a literatura existente para esta espécie, nunca foi efectuada uma avaliação da presença de compostos fenólicos. Deste modo, todas as identificações foram realizadas, de acordo com o nosso conhecimento, pela primeira vez.

A análise dos compostos fenólicos presentes nas três espécies de urtigas demonstrou alguma semelhança entre as espécies, particularmente na presença de ácidos clorogénicos (ácidos cafeoilquínicos), e derivados de flavonóis e flavonas. No entanto, é clara a abundância de flavonóides na *Urtica membranacea* enquanto na *Urtica dioica* são claramente maioritários os compostos derivados de ácidos hidroxicinâmicos.

4.1.2 Actividades biológicas

4.1.2.1 Anti-oxidante

A acção anti-oxidante dos extractos correspondentes às partes totais de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT) efectuou-se pela detecção da capacidade captadora dos radicais DPPH, ABTS-peroxidase, ABTS-persulfato e FRAP, como descrito anteriormente. A amostra (UdT) revelou o maior potencial de redução, ou actividade captadora, para todos os ensaios, com valores TEAC inferiores a 5, como se pode ver na Tabela 6, para todos os ensaios, excepto para o ensaio ABTS peroxidase, cujo valor TEAC foi de 11,62, ainda assim, valor inferior ao registado para as outras amostras.

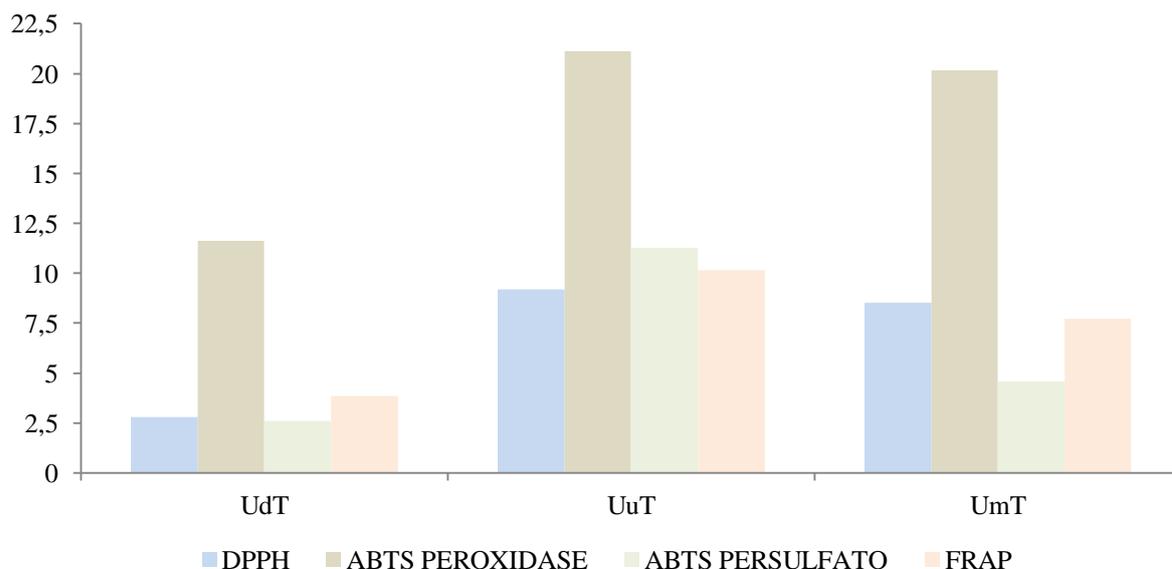


Figura 13. Avaliação da actividade anti-oxidante expressa em TEAC para os testes do DPPH, ABTS-peroxidase, ABTS-persulfato e FRAP, a que foram sujeitos os extractos de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT).

A amostra UuT apresentou, para todos os ensaios, a menor capacidade captadora de radicais, tendo-se registado valores TEAC muito superiores aos obtidos para a *Urtica dioica*.

O ensaio ABTS-peroxidase, realizado a pH ácido, permitiu detectar uma diminuição da acção captadora, provavelmente devida ao baixo pH desta reacção; comparativamente, no ensaio ABTS-persulfato, que decorre a pH neutro, as amostras têm uma forte actividade anti-radicalar, particularmente a amostra UdT.

Os resultados referentes à capacidade anti-oxidante/anti-radicalar evidenciam uma relação directa com o teor de fenóis totais. Ou seja, a *Urtica dioica*, que contém maior concentração em fenóis totais é igualmente a mais activa, enquanto a *Urtica urens*, a espécie com menor teor em fenóis totais é a que demonstra menor actividade.

Os ácidos fenólicos e flavonóides são já reconhecidos pela sua actividade anti-radicalar e anti-oxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996); de acordo com a avaliação dos compostos fenólicos presentes nas espécies de urtigas, *Urtica dioica* demonstra uma forte presença de ácidos hidroxicinâmicos, particularmente derivados do ácido cafeico, os quais, têm um forte potencial anti-radicalar (Nagaoka *et al.*, 2003).

A *Urtica membranacea* foi avaliada pela primeira vez também relativamente à sua capacidade anti-oxidante que, apesar de ser superior à da *Urtica urens*, se mostrou menor do que a *Urtica dioica*. Tal facto sugere que os flavonóides largamente representados na *Urtica membranacea*, não devem ser os principais responsáveis por esta actividade.

Tabela 13. Actividade anti-radicalar dos extractos de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT), expressa em valor TEAC.

ENSAIO	AMOSTRAS (TEAC)*		
	UdT	UuT	UmT
DPPH	2,81	9,2	8,53
ABTS PEROXIDASE	11,62	21,11	20,16
ABTS PERSULFATO	2,60	11,27	4,59
FRAP	3,84	10,16	7,71

* Resultados obtidos a partir da extrapolação da curva de absorvência de Trolox com, pelo menos, cinco concentrações de cada amostra

4.1.2.2 Anti-inflamatória

4.1.2.2.1 Avaliação da capacidade inibitória do óxido nítrico (NO)

O efeito dos extractos correspondentes à parte aérea da *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT) na produção de NO, em células RAW 264.7 estimuladas por LPS, foi realizado através da mediação de nitritos libertados no sobrenadante das culturas celulares, recorrendo à reacção de Griess. As células foram previamente tratadas e incubadas com uma gama de concentrações dos extractos, e depois estimuladas com LPS, de modo a induzir a produção de mediadores inflamatórios, como o NO. A quantidade de NO produzida foi avaliada pela concentração de nitritos presentes nos sobrenadantes das culturas celulares, após 24h do tratamento. Todas as amostras revelaram diminuir a produção de nitritos, sendo que a amostra UuT foi a que originou maior redução (59 %) (Figura 14), apesar de esse efeito ter ocorrido para uma concentração dupla da *Urtica dioica*. De facto, para iguais concentrações (175 µg/mL) foi marcadamente superior a actividade inibitória do NO, para a *Urtica dioica*, o que permite inferir a sua maior actividade para menores concentrações de extracto.

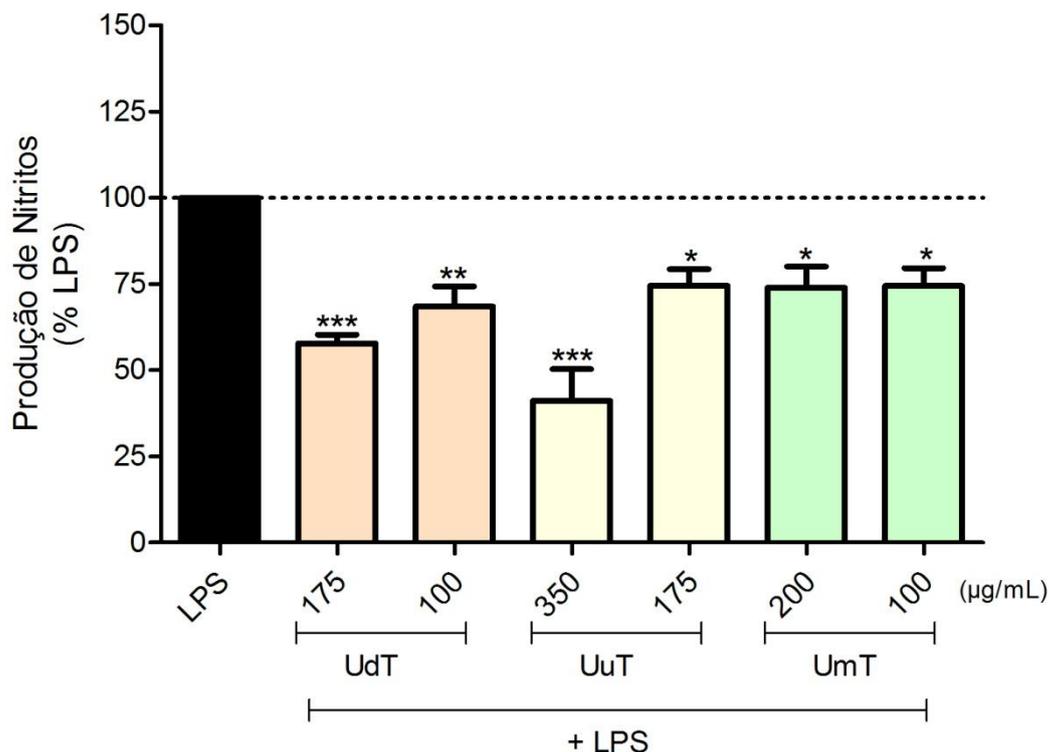


Figura 14. Efeito dos extractos de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT) na produção de NO em células RAW 264.7 activadas por 1 µg/mL de LPS. Os resultados foram expressos em percentagem de produção máxima de LPS em culturas de células com LPS. Cada valor representa a média±erro-padrão de pelo menos 3 experiências independentes (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparado com LPS).

É já reconhecida a actividade anti-inflamatória de ácidos fenólicos (Vermerris & Nicholson, 2006) e flavonóides (Nijvdelt *et al.*, 2001), tanto pela sua acção inibitória de enzimas que sintetizam mediadores inflamatórios, como pela sua capacidade de reagir com radicais livres, também envolvidos no processo inflamatório, além de outros mecanismos de acção (Pietta, 2000; Seyoum, Asres, & El-fiky, 2006). A presença de derivados fenólicos, nomeadamente de ácidos clorogénicos em *Urtica dioica* poderá estar relacionada, pelo menos em parte, com a capacidade do extracto diminuir a produção de óxido nítrico (Marrassini *et al.*, 2010). De entre os flavonoides, o maioritário é um glicósido da quercetina, a quercetina-O-rutinósido (rutina). Em ensaios *in vitro* e em modelos animais, este flavonoide tem evidenciado propriedades anti-inflamatórias (Chen *et al.*, 2005), pelo que também pode contribuir para a actividade demonstrada nesta planta.

A forte presença de flavonas, como derivados da luteolina e apigenina, com reconhecida capacidade de reduzir a produção de NO (Matsuda, Morikawa, Ando, Toguchida, & Yoshikawa, 2003), em *Urtica membranacea* permite associar a sua actividade anti-inflamatória a estes compostos.

4.1.2.2.3 Determinação da capacidade sequestrante do óxido nítrico

O efeito *scavenging*/captador de NO dos extractos de *Urtica dioica*, *Urtica urens* e *Urtica membranacea* foi avaliado sobre o sobrenadante dos extractos incubados com o indutor de NO, o SNAP, por recurso à reacção de Griess. Apesar de a amostra UdT 175 µg/mL ter diminuído em cerca de 34 % a SNAP, não se considerou existirem diferenças significativas esta amostra, o mesmo se tendo verificado para as restantes (Figura) para nenhuma das amostras testadas.

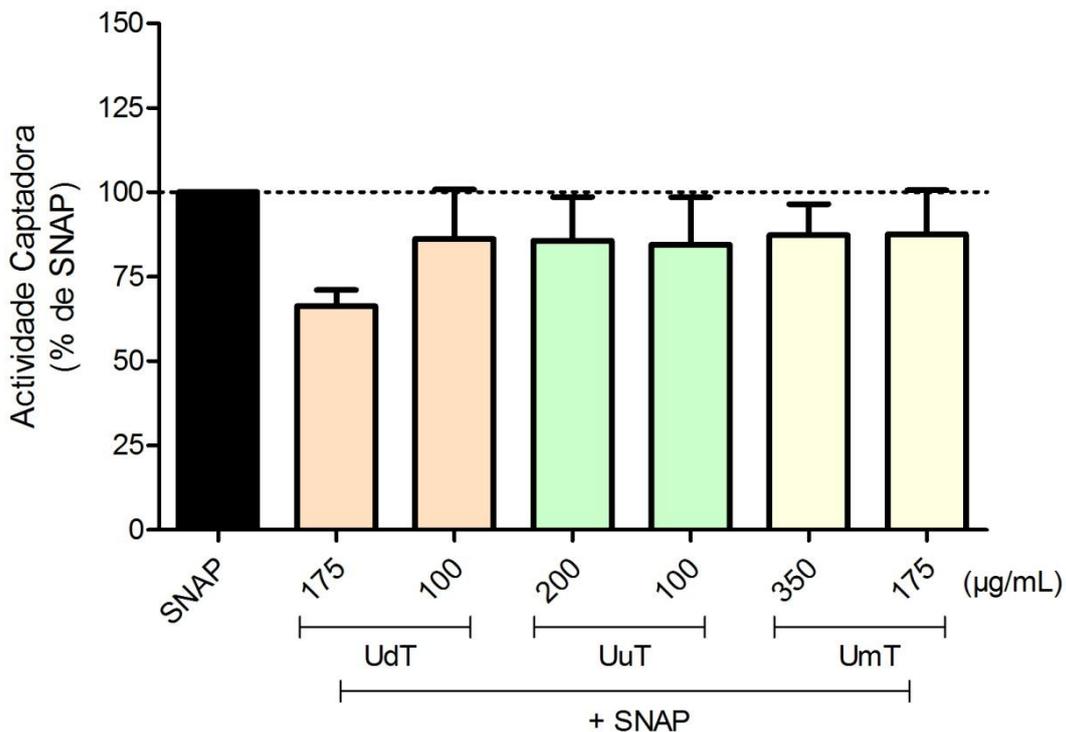


Figura 15. Efeitos na actividade captadora de óxido nítrico pelos extractos de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT). Diferentes concentrações dos extractos foram incubadas com 0,9 µL/mL de SNAP (100 mM). Os resultados foram expressos em percentagem de produção SNAP em presença dos extractos. Cada valor representa a média±erro-padrão de pelo menos 3 experiências independentes.

4.1.2.2 Viabilidade Celular

O efeito citotóxico dos extractos foi avaliado na presença e na ausência de LPS, pelo ensaio MTT, tendo evidenciado o mesmo comportamento. Na Figura 16 apresentam-se os resultados de células não estimuladas pelo LPS, podendo verificar-se que nenhuma das amostras testadas demonstrou afectar significativamente a viabilidade celular, mesmo para as concentrações mais eficazes: 175 µg/mL da *Urtica dioica* e 350 µg/mL da *Urtica urens*. Curiosamente, para a *Urtica membranacea*, as concentrações testadas demonstraram um acréscimo da viabilidade/multiplicação celular.

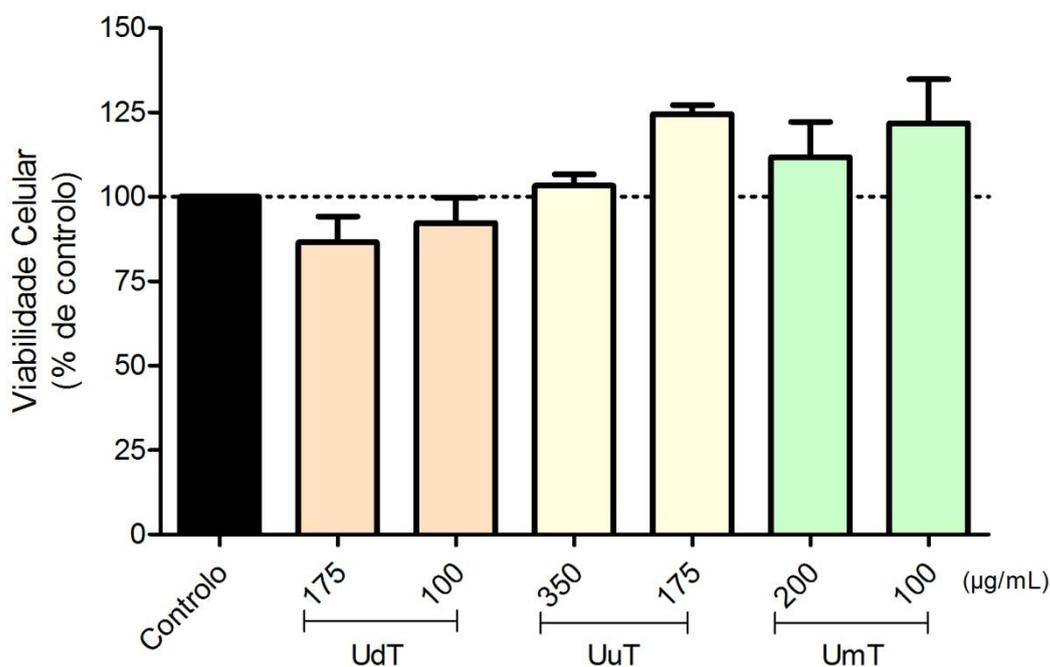


Figura 16. Efeito na viabilidade celular dos extractos de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT). Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade celular, em culturas de células RAW 264.7 em meio de cultura. Cada valor representa a média±erro-padrão de pelo menos três experiências independentes.

Uma vez que ocorreu uma considerável redução na produção de nitritos, por parte das amostras (Figura 16) e que os resultados da actividade captadora de óxido nítrico não apresentam a mesma percentagem de redução, pode inferir-se a capacidade de reduzir a produção de nitritos estará provavelmente relacionada com outros mecanismos de acção, por parte dos compostos presentes nas espécies de urtigas, não sendo de

excluir a hipótese de se dever a uma acção inibitória da iNOS (Lopez-Posada et al., 2008).

4.1.2.3 Anti-microbiana

A avaliação da actividade anti-microbiana efectuou-se através da incubação dos extractos com os dermatófitos em estudo, como descrito anteriormente. Como se pode ver na Tabela 15, o extracto correspondente à parte aérea de *Urtica dioica* revelou a maior capacidade de inibir o crescimento de dermatófitos, particularmente para o *Microsporum canis*, para o qual a concentração de 0,4 mg/mL foi suficiente para inibir o crescimento do fungo. O crescimento de *Trichophyton rubrum* foi também inibido pelo extracto de *Urtica dioica*, a 0,8 mg/mL

Quanto aos extractos da *Urtica urens* e *Urtica membranacea* verificou-se, para o *Microsporum canis* uma inibição do crescimento, numa concentração de 0,8 mg/mL.

Relativamente à capacidade letal das amostras relativamente aos dermatófitos testados, o extracto correspondente à parte aérea de *Urtica dioica* demonstrou, para a concentração de 0,4 mg/mL, ser letal para *M. canis*. Para o mesmo fungo, o extracto de *Urtica urens* e *Urtica membranacea* revelaram também capacidade letal, numa concentração de 0,8 mg/mL. Para os outros dermatófitos testados não houve actividade letal por parte dos extractos de urtigas.

Tabela 14. Efeito dos extractos de *Urtica dioica* (UdT), *Urtica urens* (UuT) e *Urtica membranacea* (UmT) no crescimento de fungos dermatófitos. Os resultados foram expressos como Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Letal Inibitória (MLC). Cada Valor representa a média de pelo menos duas experiências independentes.

	<i>Urtica dioica</i> (UdT) ^(a)		<i>Urtica urens</i> (UuT) ^(a)		<i>Urtica membranacea</i> (UmT) ^(a)		Fluconazol ^(b)	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	16-32	32-64
<i>T. rubrum</i>	≥0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	16	64
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	128	≥128
<i>T. verrucosum</i>	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	>128	>128
<i>Microsporum canis</i>	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	128	128
<i>M. gypseum</i>	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	128	>128
<i>Epidermophyton floccosum</i>	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	> 0,8	16	16

^a MIC e MLC foram determinados por método de macrodiluição e expressos em µl/ml (V/V).

^b MIC e MLC foram determinados por método de macrodiluição e expressos em µg/ml (M/V).

Também para a actividade anti-fúngica, a *Urtica dioica* demonstrou ter o maior potencial, sendo que a forte presença de compostos hidroxilados, como ácidos fenólicos e flavonóides, remeterá para uma acção inibitória no crescimento dos fungos. A presença de rutinósidos de quercetina, campferol e isoramnetina, flavonóides do tipo flavonol, têm comprovada actividade anti-microbiana (Cushnie & Lamb, 2005), pelo que podem contribuir para esta actividade.

4.2 Órgãos isolados da parte aérea

4.2.1 Caracterização fitoquímica

4.2.1.1 Métodos espectrofotométricos

A dosagem de compostos fenólicos foi inicialmente realizada recorrendo aos ensaios espectrofotométricos para avaliar os fenóis, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos totais nos diversos órgãos aéreos (flores, folhas, e caules) de *Urtica dioica*. Estabeleceu-se uma comparação entre os três ensaios, os órgãos e a amostra constituída pela parte aérea - UdT. Como se pode ver na Figura 17 e na Tabela 16, a amostra UdT apresenta o maior conteúdo em fenóis totais, de 7,9 %. De entre os diversos órgãos, os caules desta planta UdC foram os que revelaram menor conteúdo em fenóis, com 3,89 %; enquanto as flores – UdFl mostraram a maior concentração em fenóis, 7,25 %.

Quanto aos flavonóides, as flores foram as que maior concentração mostraram, 2,29 % e as folhas – UdF, o menor conteúdo com 0,25 %, sendo que a amostra UdT apresentou o menor conteúdo em flavonóides, com 0,22 %. A dosagem de ácidos hidroxicinâmicos totais permitiu detectar o maior conteúdo para as folhas - UdF, com 7,51 % apresentando os caules o menor conteúdo em ácidos hidroxicinâmicos, 2,08 %.

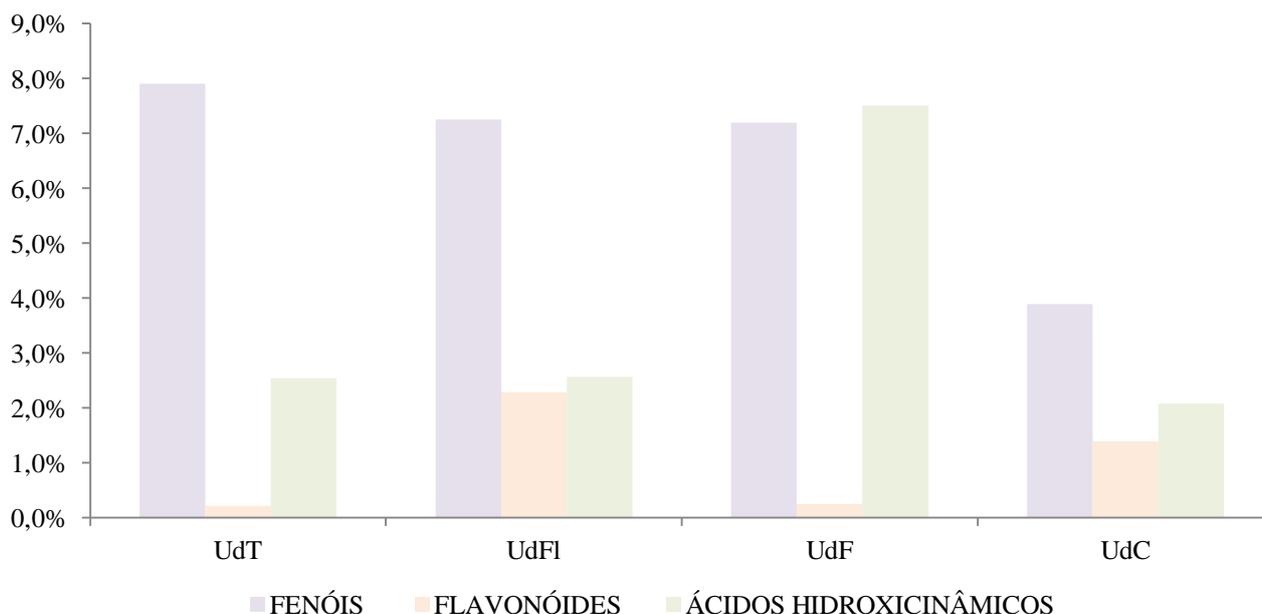


Figura 17. Teor de fenóis, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos totais nos extractos da parte aérea de *Urtica dioica* (UdT), flores de *Urtica dioica* (UdFl), folhas de *Urtica dioica* (UdF) e caules de *Urtica dioica* (UdC). Os resultados foram expressos em % por 100 g dos extractos liofilizados.

Tabela 16. Dosagem de fenóis, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos totais, para as amostras UdT, UdFl, UdF e UdC.

Ensaio	Amostras (%)			
	UdT	UdFl	UdF	UdC
FENÓIS	7,90%	7,25%	7,20%	3,89%
FLAVONÓIDES	0,22%	2,29%	0,25%	1,39%
ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	2,54%	2,57%	7,51%	2,08%

4.2.2 Actividades biológicas

4.2.2.1 Anti-oxidante

A actividade anti-oxidante foi avaliada através da capacidade de captação ou inibição da produção dos radicais DPPH, ABTS-peroxidase, ABTS-persulfato e FRAP, pelos extractos correspondentes à parte aérea de *Urtica dioica* (UdT), flores (UdFl), folhas (UdF) e caules (UdC). A comparação entre as amostras e os diferentes ensaios está representada na Figura 18 e os valores ilustrados na Tabela 17. As amostras correspondentes às folhas e flores de *Urtica dioica* (UdF e UdFl) demonstraram ter um potencial anti-oxidante superior ao da UdT e ao dos caules, para todos os ensaios, com valores TEAC inferiores a 2,83, como se pode ver na Tabela 17.

Para os órgãos aéreos não foi relevante a diferença dos ensaios do ABTS a pH ácido, o que pode sugerir a mais-valia destas partes da planta, de *per si*, como bons anti-oxidantes a nível biológico.

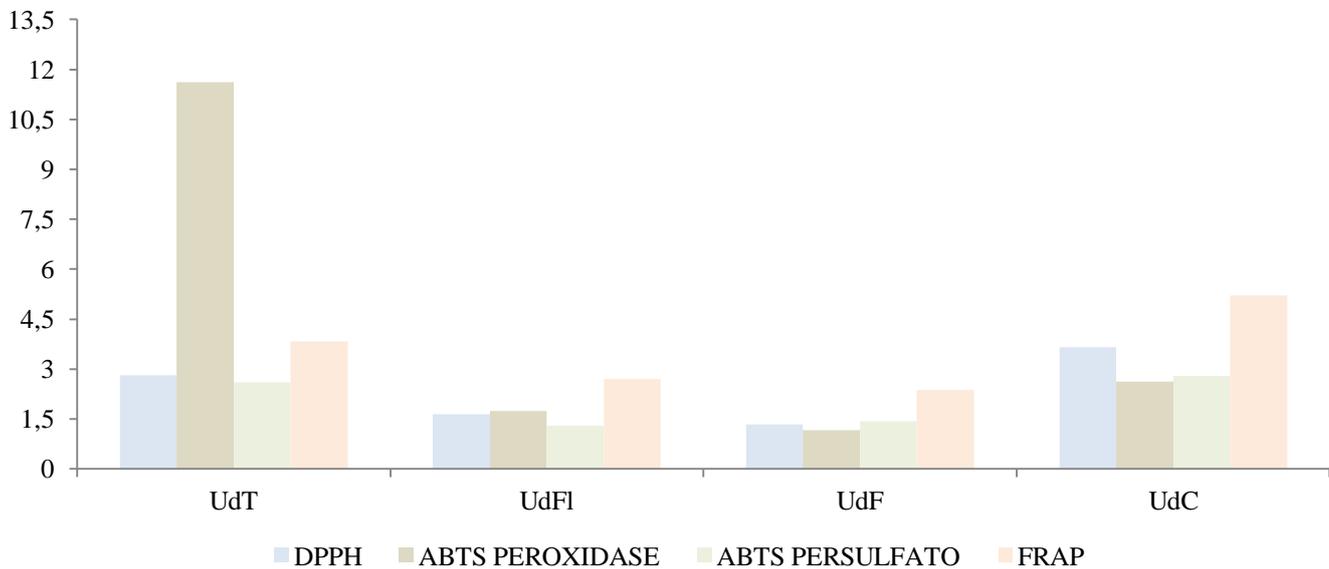


Figura 18. Avaliação da actividade anti-oxidante, expressa em TEAC, para os teste do DPPH, ABTS-peroxidase, ABTS-persulfato e FRAP, a que foram sujeitos os extractos de *Urtica dioica* (UdT), flores de *Urtica dioica* (UdFl), folhas de *Urtica dioica* (UdF) e caules de *Urtica dioica* (UdC).

Tabela 17. Actividade anti-radicalar dos extractos de *Urtica dioica* (UdT), flores de *Urtica dioica* (UdFl), folhas de *Urtica dioica* (UdF) e caules de *Urtica dioica* (UdC), expressa em valor TEAC.

ENSAIO	AMOSTRA			
	UdT	UdFl	UdF	UdC
DPPH	2,81	1,64	1,34	3,65
ABTS-PEROXIDASE	11,62	1,75	1,16	2,62
ABTS-PERSULFATO	2,60	1,31	1,44	2,79
FRAP	3,84	2,71	2,38	5,21

4.2.2.2 Anti-inflamatória

4.2.2.2.1 Avaliação da capacidade inibitória do óxido nítrico(NO)

O efeito dos extractos correspondentes às partes totais de *Urtica dioica* (udT), flores (UdFl), folhas (UdF) e caules (UdC) de *Urtica dioica*, na produção de NO foi feito em culturas de células RAW 264.7 estimuladas por LPS. Mediram-se os nitritos libertados no sobrenadante das culturas celulares, através da reacção de Griess, em

células, previamente tratadas com uma gama de concentrações dos extractos, e depois estimuladas com LPS, de modo a estimular a libertação de mediadores inflamatórios, como NO. A produção de NO avaliou-se pela determinação da concentração de nitritos presentes nos sobrenadantes das culturas celulares, após 24 h de tratamento.

Todas as amostras revelaram diminuir a produção de nitritos, embora a diferentes concentrações. A amostra das partes totais de *Urtica dioica* (UdT), demonstrou diminuir a produção de nitritos para todas as concentrações testadas, sendo que a concentração de 175 µg/mL reduziu em cerca de 42 % a produção de nitritos. A amostra (UdF) reduziu em cerca de 32 % a produção de nitritos, enquanto as flores e os caules, para as mesmas concentrações, 200 µg/mL, apesar de terem também inibido o NO, fizeram-no numa menor percentagem.

É de destacar que a redução na produção de nitritos por parte dos órgãos individualizados não foi de tanta relevância como a da amostra correspondente à parte aérea total de *Urtica dioica*. Esta diferença pode dever-se a um efeito sinérgico ou ampliado dos compostos presentes nos diversos órgãos que foram estudados.

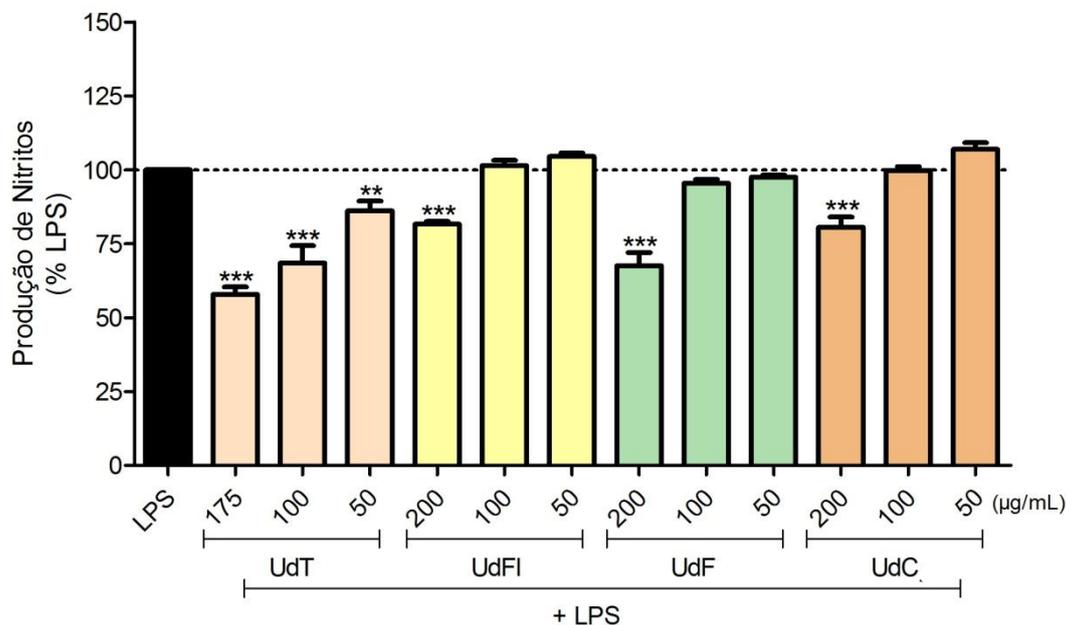


Figura 19. Efeito dos extractos na produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com 1 µg/mL de LPS. Os resultados foram expressos em percentagem de produção máxima de LPS, em culturas de células com LPS. Cada valor representa a média±erro-padrão de cada amostra, testada em pelo menos três experiências independente (**p<0,01, ***p<0,001, comparado com LPS).

4.2.2.2.3 Determinação da capacidade sequestrante do óxido nítrico

O efeito *scavenging*/captador de NO dos extractos de *Urtica dioica* e das suas flores, folhas e caules foi feito com o sobrenadante dos extractos incubados com SNAP, com recurso à reação de Griess.

Todas as amostras demonstraram capacidade de redução da SNAP. No entanto, as flores e os caules foram os que evidenciaram maior capacidade sequestrante, 50 % e 56 %, respectivamente, para maior concentração testada (200 $\mu\text{g/mL}$), como se pode ver na Figura 20.

Os resultados relativos à diminuição na produção de nitritos são bastante concordantes com os resultados de redução da SNAP, sendo esta ainda mais notória. Contrariamente ao que se verificou para UdT, no caso dos órgãos aéreos diferenciados, a diminuição na produção de nitritos pode estar significativamente relacionada com a actividade captadora do radical NO.

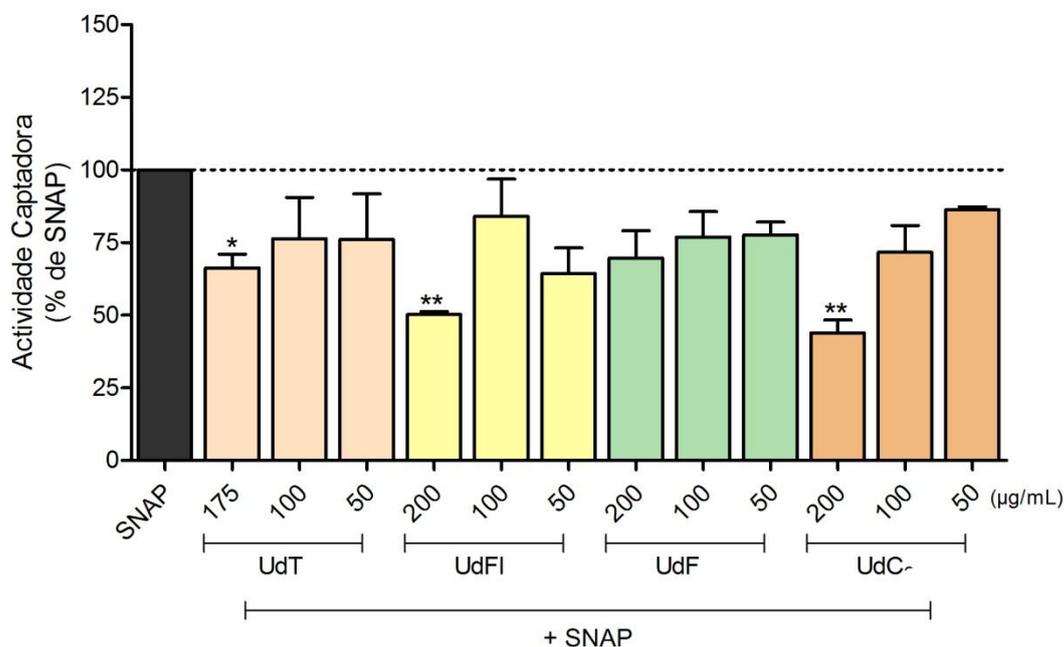


Figura 20. Efeitos na actividade captadora de óxido nítrico pelos extractos da parte aérea total de *Urtica dioica* (UdT), flores (UdFI), folhas (UdF) e caules (UdC). Diferentes concentrações dos extractos foram incubadas com 0,9 $\mu\text{L/mL}$ de SNAP (100 mM). Os resultados foram expressos em percentagem de produção SNAP em presença dos extractos. Cada valor representa a média \pm erro-padrão de pelo menos 3 experiências independentes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com SNAP).

4.2.2.2. Viabilidade Celular

O efeito citotóxico dos extractos de *Urtica dioica* e seus vários órgãos – flores, folhas e caules – foi avaliado de acordo com o ensaio MTT, em culturas de células RAW 264.7 sem estímulo e estimuladas por LPS. Os dados apresentados na Figura 20 são relativos às culturas de células não estimuladas, de modo a avaliar o efeito dos extractos. Nenhuma das amostras afectou de modo significativo a viabilidade celular; mesmo nas concentrações mais eficazes.

Curiosamente, verificou-se que, para as folhas, flores e caules, em concentrações mais baixas, embora destituídas de actividade anti-inflamatória parecem estimular a proliferação celular.

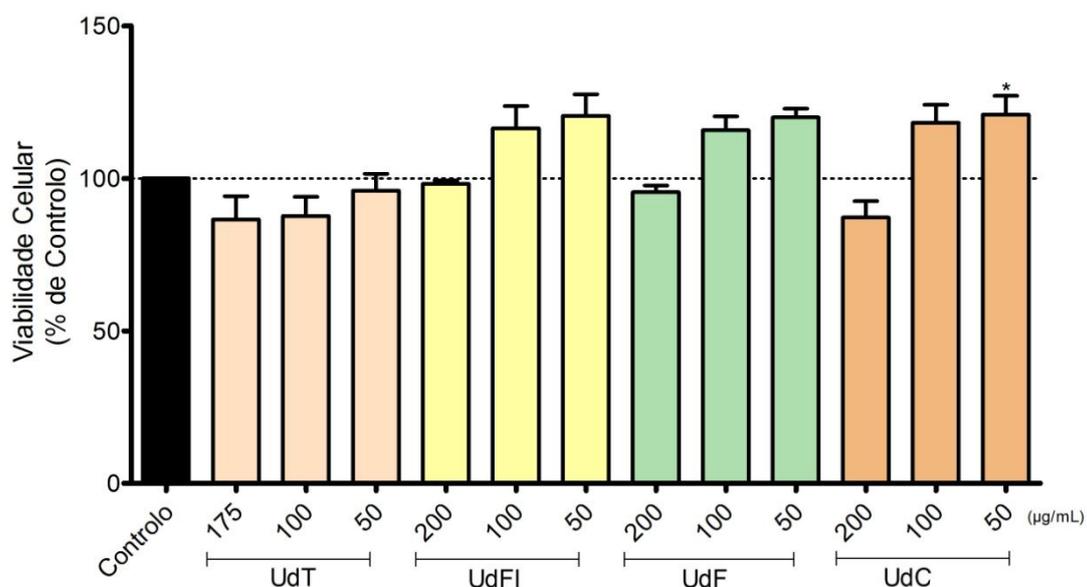


Figura 21. Efeito na viabilidade celular dos extractos da parte aérea total de *Urtica dioica* (UdT), flores (UdFl), folhas (UdF) e caules (UdC). Os resultados foram expressos em percentagem de controlo, em culturas de células RAW 264.7 em meio de cultura. Cada valor representa a média±erro-padrão de pelo menos três experiências independentes (*p<0,05, comparado com Controlo).

4.3 Germinação e cultivo de *Urtica dioica*

4.3.1 Avaliação da germinação de sementes

A avaliação da germinação de sementes de *Urtica dioica* foi otimizada colocando as sementes a germinar directamente em meio de cultura MS, de concentração total reduzida para 1/4, como anteriormente descrito. Os resultados da germinação de sementes revelaram-se bastante favoráveis, tendo sido viável a germinação em cerca de 65 % das réplicas efectuadas. Fez-se uma avaliação visual todas as semanas, de modo a detectar possíveis contaminações e sementes não germinadas (Figura 22). A redução dos componentes do Meio MS demonstrou ser um óptimo método para germinação de sementes de urtiga *in vitro*.

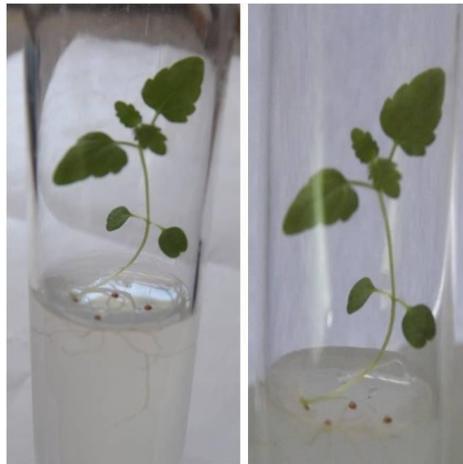


Figura 22. Avaliação da germinação de sementes de *Urtica dioica*, em Meio de cultura MS 25 %, após 2 semanas.

4.3.2 Propagação de plantas

Após a germinação das sementes e crescimento das plântulas, preparou-se novamente Meio de cultura MS 25 %, com a adição do regulador de Crescimento BAP, como descrito anteriormente. Isolaram-se os ápices caulinares das plântulas e colocaram-se no novo meio de cultura. Os resultados da propagação provaram ser muito promissores, uma vez que a taxa de propagação foi de cerca de 90 %. O desenvolvimento de meristemas axilares foi particularmente notório em meios com BAP 0,1 mg/mL, apesar de estudos anteriores como (Gatti, Di Virgilio, Baronti, et al., 2008) referirem concentrações superiores de reguladores de crescimento para a propagação, sendo que o enraizamento e desenvolvimento axilar ocorreu em todas as réplicas, como se pode ver na Figura 23.

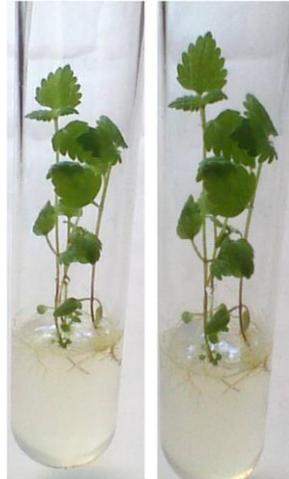


Figura 23 Avaliação da propagação de *Urtica dioica* em Meio de cultura MS 25 %, após 4 semanas.

4.3.2 Aclimatização de plantas

A aclimatização das plantas demonstrou um favorável enraizamento e crescimento das plantas. Sem recurso a reguladores de crescimento (Ammarellou et al., 2012), as urtigas foram passadas para solo, mantendo-se na câmara de cultura, tendo enraizado e prosseguido o seu desenvolvimento. Não se registaram diferenças entre as plantas propagadas com diferentes concentrações do regulador de crescimento. Em cerca de 5 semanas as plantas demonstraram um elevado desenvolvimento e encontram-se no início da fase de floração (Figura 24).



Figura 24. Aclimatização de *Urtica dioica*, em câmara de cultura. A - semana 1; B - semana 2; C - semana 3; D - semana 4; E - semana 5

5.CONCLUSÕES

A elaboração do presente trabalho permitiu destacar *Urtica dioica* como espécie promissora para investigação e futuras aplicações comerciais. Revelando um forte potencial anti-oxidante, anti-inflamatório e anti-fúngico, devido à abundante concentração em ácidos fenólicos e à presença de flavonóides, bem como uma óptima resposta ao cultivo *in vitro*, e posterior aclimatização, *Urtica dioica* é uma espécie de grande interesse fitoterapêutico e nutracêutico.

Foi realizado o rastreio de actividades biológicas em *Urtica dioica*, *Urtica urens* e *Urtica membranacea* avaliando a actividade anti-oxidante, anti-inflamatória e anti-fúngica. Das três espécies em estudo, através dos extractos correspondentes à parte aérea de cada planta, *Urtica dioica* revelou ter o maior potencial bioactivo, para as três actividades estudadas. É particularmente notória a actividade anti-oxidante e anti-inflamatória desta espécie, com resultados bastantes favoráveis a uma possível aplicação industrial.

Urtica membranacea, espécie cuja distribuição está restrita à região Mediterrânica, e pela primeira vez analisada pelo seu potencial bioactivo, demonstrou ter também potencial para futuras aplicações.

A identificação dos principais fito-constituintes, nas três espécies indicadas, com particular incidência sobre os compostos fenólicos, foi realizada com recurso a cromatografia líquida de alta resolução acoplada a dois detectores: fotodíodos e espectrómetro de massa. Particularmente rica em derivados do ácido cafeico e com a presença de flavonóides, como glicósidos da quercetina e da isoramnetina, foi possível detectar para *Urtica dioica* a relação intrínseca entre a sua constituição em fenóis e as bioactividades demonstradas. O ácido cafeoiltartárico e o *p*-cumaroilmalato foram pela primeira vez descritos para esta espécie.

Foram também, pela primeira vez, identificados em *Urtica urens* os ácidos fenólicos: 3-*O*-cafeoilquínico, 4-*O*-cafeoilquínico e 5-*O*-cafeoilquínico, e o *p*-cumaroilcafeoilquínico, e o flavonóide diosmetina-*O*-rutinósido.

É de destacar que para *Urtica membranacea* nunca tinha sido efectuada uma análise da sua constituição fenólica, sendo por isso a primeira vez que se identificam todos os compostos referidos, que se caracterizam pela diversidade estrutural dos seus flavonóides.

A presença dos fito-constituintes de interesse e as actividades demonstradas pelas espécies, permitem estabelecer uma correlação entre a presença dos compostos, de comprovada acção anti-radicalar, para todas as espécies avaliadas e a forte actividade anti-oxidante demonstrada, para todos os ensaios com base nos radicais DPPH, ABTS e FRAP. Também a actividade anti-inflamatória, avaliada em culturas celulares RAW 264.7, estimuladas com LPS para o aumento da produção de nitritos, foi avaliada para as espécies em estudo; não se encontrou uma relação entre a actividade captadora do radical NO, através da SNAP, e a actividade anti-inflamatória detectada. Nenhuma das amostras referentes às três espécies de urtiga demonstrou afectar a viabilidade celular de acordo com o ensaio MTT, mesmo para as concentrações mais eficazes.

Não só rica em ácidos fenólicos, possuindo também flavonóides, e demonstrando uma forte acção nas actividades biológicas estudadas, procedeu-se à identificação do potencial bioactivo para os diversos órgãos aéreos de *Urtica dioica* (flores, folhas, caules). Os extractos obtidos demonstraram uma forte actividade anti-oxidante/anti-radicalar, superior à da amostra da parte aérea total da mesma espécie, e também actividade anti-inflamatória. A avaliação da citotoxicidade demonstrou que nenhuma das amostras parcelares afecta a viabilidade celular, mesmo nas concentrações mais eficazes.

A amostra correspondente às folhas revelou o maior potencial, para todas as bioactividades estudadas. Deste modo, para futuras estudos, as folhas de *Urtica dioica* são o órgão mais promissor.

De modo a poder viabilizar uma futura aplicação de *Urtica dioica* para fins comerciais, avaliou-se a viabilidade da germinação e cultivo da espécie. A optimização dos métodos de germinação foi efectuada com sucesso, bem como a propagação e aclimatização das urtigas. Confirma-se assim a exequibilidade do cultivo de *Urtica dioica*.

Os usos tradicionais de urtigas destacam esta espécie para estudos de comprovação das actividades e avaliação acerca dos seus mecanismos de actuação. No presente trabalho, *Urtica dioica* revelou ser a espécie mais promissora para futuros estudos, que englobem desde um estudo aprofundado sobre os mecanismos de acção nas bioactividades registadas e a viabilidade celular em várias culturas celulares, de acordo com a aplicação que se pretender dar a esta planta.

6.BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Wahhab, M. A., Said, A., & Huefner, A. (2005). NMR and Radical Scavenging Activities of Patuletin from *Urtica urens* against Aflatoxin B1. *Pharmaceutical Biology*, 43(6), 515–525.
- Akbay, P., Basaran, A. A., Undeger, U., & Basaran, N. (2003). In vitro Immunomodulatory Activity of Flavonoid Glycosides from *Urtica dioica* L. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 17, 34–37.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75, 639–653. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042
- Alam, Z., Ameem, E. S., Muyibi, S. A., & Kabbashi, N. A. (2009). The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol. *Chemical Engineering Journal*, 155(1-2), 191–198.
- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 197–201. doi:10.1016/j.clindermatol.2009.12.005
- Ammarellou, A., Kazemeitabar, K., Najafei, H. Z., Mostazavei, N., & Ammarellou, N. (2012). Effects of different culture media on rooting of *Urtica dioica* L. stem cuttings. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 3(7), 172–175. doi:10.5897/JSSEM11.029
- Arif, T., Bhosale, J. D., Kumar, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., & Dabur, R. (2009). Natural products – antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 7, 621–638.
- Barreca, D., Belloco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosylflavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chemistry*, 124, 576–582.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). *Seeds, Ecology, Biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, USA: Academic Press.
- Beard, J. L. (2001). Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *The Journal of Nutrition*, 568–580.
- Belinati, D. K. (2010). *Efeitos do ácido clorogénico sobre funções de neutrófilos: estudos in vitro*. São Paulo.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bisht, S., Bhandari, S., & Bisht, N. S. (2012). *Urtica dioica* (L): an undervalued, economically important plant. *Agricultural Science Research Journals*, 2(5), 250–252.
- Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M. À., & Vallès, J. (2004). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “

- Serra de São Mamede ” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 89(57), 199–209. doi:10.1016/S0378-8741(03)00270-8
- Canhoto, J. M. (2010). *Biotechnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Univ. de Coimbra.
- Carvalho, A. M. P. (2005). *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J., & Benedí, C. (1997). Urticaceae. *Flora Iberica*.
- Chen, J., Ho, F., Chao, P. L., Chen, C., Jeng, K. G., Hsu, H., ... Lin, W. (2005). Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase , nuclear factor-kappa B and STAT1 , and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *European Journal of Pharmacology*, 521, 9–20. doi:10.1016/j.ejphar.2005.08.005
- Chrubasik, J. E., Roufogalis, B. D., Wagner, H., & Chrubasik, S. A. (2007). A comprehensive review on nettle effect and efficacy profiles , Part I : Herba urticae. *Phytomedicine*, 14, 423–435. doi:10.1016/j.phymed.2007.03.004
- Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MS(n). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3821–32.
- Correia, H., González-Paramás, A., Amaral, M. T., Santos-buelga, C., & Batista, M. T. (2006). Polyphenolic profile characterization of Agrimonia eupatoria L . by HPLC with different detection devices. *Biomedical Chromatography*, 20, 88–94. doi:10.1002/bmc.533
- Coutinho, A. X. P. (1939). *Flora de Portugal*.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- Cuyckens, F., & Clayes, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1–15.
- Dar, S. A., Ganai, F. A., Yousuf, A. R., Balkhi, M., Bhat, T. M., & Sharma, P. (2013). Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 51(12), 170–180. doi:10.3109/13880209.2012.715172
- Deacon, J. W. (2009). *Fungal Biology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Di Donna, L., De Luca, G., Mazzotti, F., Napoli, A., Salerno, R., Taverna, D., & Sindona, G. (2009). Statin-like Principles of Bergamot Fruit (Citrus bergamia): Isolation of 3-Hydroxymethylglutaryl Flavonoid Glycosides. *J. Nat. Prod.*, 72, 1352–1354.

- Dias, G. M. (2009). *Thymbra capitata* (L.) Cav. *Materials as a resource of bioactive polyphenols*.
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736000>
- Emmelin, N., & Feldberg, W. (1947). The Mechanism of the Sting of the Common Nettle (*Urtica urens*). *Journal Fof Physiology*, 106, 440–455.
- Farag, M. A., Weigend, M., Luebert, F., Brokamp, G., & Wessjohann, L. A. (2013). Phytochemical, phylogenetic and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC – Q-TOF-MS metabolomic profiles. *PHYTOCHEMISTRY*. doi:10.1016/j.phytochem.2013.09.016
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Valentao, P., & Tomas-Barberam, F. A. (2007). Characterization of C-glycosylflavones O-glycosylated by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, (1161), 214–223.
- Ferreres, F., Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2003). Approach to the study of C-glycosylflavones by ion trap HPLC–PAD–ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, 14(6), 352–359.
- Figueirinha, A., Cruz, M. T., Francisco, V., Lopes, M. C., & Batista, M. T. (2010). Anti-Inflammatory Activity of *Cymbopogon citratus* Leaf Infusion in Lipopolysaccharide-Stimulated Dendritic Cells: Contribution of the Polyphenols 1,2. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 1–10.
- Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C., & Batista, M. T. (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 110, 718–728.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Neves, B. M., García-rodríguez, C., Lopes, M. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 818–827. doi:10.1016/j.jep.2010.11.018
- Galmés, J., Medrano, H., & Flexas, J. (2006). Germination capacity and temperature dependence in Mediterranean species of the Balearic Islands. *Invest Agrar: Sist. Recur. For*, 15(1), 88–95.
- Gatti, E., Di Virgilio, N., & Baronti, S. (2008). Development of *Urtica dioica* L . Propagation Methods for Organic Production of Fiber. *16th IFOAM Organic World Congress*, pp. 16–17.

- Gatti, E., Di Virgilio, N., Baronti, S., & Bacci, L. (2008). Development of Propagation Methods for Organic Production of Fibre . (*Urtica dioica* L). *International Conference on Flax and Other Bast Plants*, p. 445.
- Geller, D. A., & Billiar, T. R. (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17, 7–23.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Micropropagation : Uses and Methods. Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 29–64).
- Ghaima, K. K., Hashim, N. M., & Ali, S. A. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*), 3(05), 96–99. doi:10.7324/JAPS.2013.3518
- Ghedira, K., Goetz, P., & Jeune, R. Le. (2009). Formation continue ` re me ´ dicale pratique Matie *Urtica dioica* L ., *Urtica urens* et / ou hybrides (*Urticaceae*), 279–285. doi:10.1007/s10298-009-0408-5
- Gil, E. C. (2006). Fitoterapia y reumatismo: principales vías de actación de los principios activos de las plantas medicinales - Ortiga. In *Plantas medicinales para enfermedades reumáticas* (pp. 39–52).
- Gilman, A. (2011). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Medical.
- Golalipour, M. J., Ghafari, S., Kouri, V., & Kestkar, A. A. (2010). Proliferation of the β -Cells of Pancreas in Diabetic Rats Treated with *Urtica dioica*. *Int. J. Morphol.*, 28(2), 399–404.
- Grime, J., Mason, G., Curtis, A., Rodman, J., Band, S., Mowforth, M., ... Shaw, S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69, 1017–1059.
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213–20. doi:10.1016/j.tox.2005.09.011
- Gupta, A. K., & Cooper, E. A. (2008). Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166, 353–367.
- Hajhashemi, V., & Klooshani, V. (2013). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Urtica dioica* leaf extract in animal models. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(2), 193–200.
- Harbaum, B., Hubbermann, E. M., Wolff, C., Herges, R., Zhu, Z., & Schwarz, K. (2007). Identification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Pak Choi Varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC–ESI–MSn and NMR and Their Quantification by HPLC–DAD. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8251–8260.

- Harborne, J. B., & Williams, C. a. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130659>
- Hartl, A., & Vogl, C. R. (2002). Dry matter and fiber yields , and the fiber characteristics of five nettle clones (*Urtica dioica* L .) organically grown in Austria for potential textile use. *American Journal of Alternative Agriculture*, 17(4), 195–200.
- Havlickova, B., Czaika, V. a, & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51 Suppl 4, 2–15. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x
- Jaiswal, R., Kiprotich, J., & Kuhnert, N. (2011). Determination of the Hydroxycinnamate Profile of 12 Members of the Asteraceae Family. *Phytochemistry*, 728.
- Jimoh, F., Adedapo, A., Aliero, A., & Afolayan, A. (2010). Polyphenolic and biological activities of leaves extracts of *Argemone subfusiformis* (Papaveraceae) and *Urtica urens* (Urticaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 58(4), 1517–1531.
- Joffre, R., Rambal, S., & Damesin, C. (1999). Functional attributes in Mediterranean-type ecosystems. In *Handbook of functional plant ecology*.
- Khalili, M., Rezazarandi, M., & Vahidi, S. (2012). Anti-inflammatory effect of alcoholic *Urtica dioica* extract in male NMRI rats. *Basic and Clinical Pathophysiology*, 24–28.
- Kroncke, K. D., Fehsel, K., & Kolb-Bachofen, V. (1998). Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 113, 147–156.
- Lamaison, J. L., & Carnat, A. (1990). Teneur en principaux flavonoides des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. Et de *Crataegus Laevigata* (poiret) DC. (rosaceae). *Pharm. Acta Helv.*, 65(11), 315–320.
- Lamaison, J. L., Petitjean-Freytet, C., & Carnat, A. (1991). Lamiacées médicinales à propriétés antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique. *Pharm. Acta Helv.*, 66(7), 185–188.
- Lee, H. J., Jeong, H. S., Kim, D. J., Noh, Y. H., Yuk, D. Y., & Hong, J. T. (2008). Inhibitory Effect of Citral on NO Production by Suppression of iNOS Expression and NF- κ B Activation in RAW264 . 7 Cells. *Arch. Pharm Res*, 31(3), 342–349. doi:10.1007/s12272-001-1162-0
- Lin, L., & Harnly, J. M. (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, 120, 319–326. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.083

- Lopez-Posada, R., Ballester, I., Abadia-Molina, A. C., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & Sanchez de Medina, F. (2008). Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol*, 76(4), 495–506.
- Lorenzo, C. Di, Dell'agli, M., Badea, M., Dima, L., Colombo, E., Sangiovanni, E., ... Bosisio, E. (2013). Plant Food Supplements with Anti-Inflammatory Properties : A Systematic Review (II) Plant Food Supplements with Anti-Inflammatory Properties : A Systematic Review (II). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 507–516. doi:10.1080/10408398.2012.691916
- Luna, T. (2001). You're Growing that Nasty Plant ? *Native Plants Journal*, 2(2), 110–111.
- Marrassini, C., Acevedo, C., Miño, J., Ferraro, G., & Gorzalczy, S. (2010). Evaluation of Antinociceptive , Antiinflammatory Activities and Phytochemical Analysis of Aerial Parts of *Urtica urens* L . *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 24, 1807–1812.
- Martins, A. P. (2007). Aspectos legais da utilização de plantas aromáticas e medicinais *. INFARMED.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., & Yoshikawa, M. (2003). Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Biorg Med. Chem.*, 11(9), 1995–2000.
- Mehri, A., Hasani-Ranjbar, S., Larijani, B., & Abdollahi, M. (2011). A Sistematic Review od Efficacy and Safety of *Urtica dioica* in the Treatment of Diabetes. *International Journal of Pharmacology*, 7(2), 161–170.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 2(26).
- N.i. (n.d.). Anti-fungal Polyphenols.
- Nagaoka, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2003). Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues : Potent Nitric Oxide Inhibitors from the Netherlands Propolis. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(4), 487–491.
- Namazi, N., Esfanjani, A. T., Heshmati, J., & Bahrami, A. (2011). The Effect of Hydroalcoholic Nettle (*Urtica dioica*) Extracts on Insulin Sensitivity and Some Inflammatory Indicators in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Double-blind Control Trial. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(15), 775–779.
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols : anti-inflammatory , antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*, 307, 71–83. doi:10.1007/s00403-009-1001-3
- Nijveldt, R. J., Nood, E. van, Hoorn, D. E. van, Boelens, P. G., Norren, K. van, & Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids : a review of probable mechanisms of action

- and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–425.
- Okeke, I. N., Laxmaninarayan, R., Bhutta, Z. A., Duse, A. G., Jenkins, P. O. T. F., Pablos-Mendez, A., & Klugman, K. P. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: Recent trends and current status. *Lancet Infect. Dis*, 5, 481–493.
- Pandey, S., Sah, S. P., Sah, M. L., & Mishra, D. (2010). An antioxidant potential of hydro- methanolic extract of *urtica parviflora roxb*. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1(3), 191–196.
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Produ*, 63, 1035–1042.
- Proença da Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. (F. C. Gulbenkian, Ed.).
- Rayburn, K., Fleischbein, E., & Song, J. (2009). Stinging nettle cream for osteoarthritis. *Alternative Therapies in Health*, 15(4), 60–61. Retrieved from <http://www.modernhcp.com/INNO-PDFS/IMCJ-PDFS/D3743899437B460F8C37BD1183A60052.ashx.pdf>
- Re, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. A. (1999). ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(98), 1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, 20(7), 933–956.
- Riehemann, K., Behnke, B., & Schulze-Osthoff, K. (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy , inhibit the proinflammatory transcription factor NF- U B. *Federation of European Biochemical Societies*, 442, 89–94.
- Rodrigues, J. S. C. (2002). *Contributo para o Estudo Etnobotânico das Plantas Mediciniais e Aromáticas na Área Protegida da Serra do Açor*.
- Rutto, L. K., Xu, Y., Ramirez, E., & Brandt, M. (2013). Mineral Properties and Dietary Value of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L .). *International Journal of Food Science*.
- Santos, M. R. M. dos. (2010). *Composição terpénica e actividade anti-oxidante de plantas e infusões*. Aveiro.
- Seeram, N. P., Lee, R., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Food Chemistry Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy, 97, 1–11. doi:10.1016/j.foodchem.2005.02.047

- Sen, A. (2007). Prevention of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity by *Urtica urens* in Rats, *1*(3), 29–32.
- Seyoum, A., Asres, K., & El-fiky, F. K. (2006). Structure – radical scavenging activity relationships of flavonoids, *67*, 2058–2070. doi:10.1016/j.phytochem.2006.07.002
- Shakibaei, M., Allaway, D., Nebrich, S., & Mobasheri, A. (2011). Botanical Extracts from Rosehip (*Rosa canina*), Willow Bark (*Salix alba*), and Nettle Leaf (*Urtica dioica*) Suppress IL-1 β -Induced NF- κ B Activation in Canine Articular Chondrocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*. doi:10.1155/2012/509383
- Shehata, A. S., Mukherjee, P. K., Aboulatta, H. N., El-Akhras, A., Abbadi, S. H., & Ghannoum, M. A. (2008). Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J. Clin. Microbiol.*, *46*(8), 2641–5.
- Shvedova, A. A., Kommineni, C., Jeffries, B. A., Castranova, V., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., ... Kagan, V. E. (2000). Redox Cycling of Phenol Induces Oxidative Stress in Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *114*, 354–364.
- Teixeira, A. C. de J. (2012). *Fitoterapia aplicada à prevenção e tratamento de infecções urinárias*. Universidade Fernando Pessoa.
- Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, *851*(1-2), 51–70.
- Upton, R. (2013). Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L .): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine*, *3*, 9–38. doi:10.1016/j.hermed.2012.11.001
- Vagiri, M., Ekholm, A., Andersson, S. C., Johansson, E., & Rumpunen, K. (2012). An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, *60*, 10501–10510.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry. Phenolic Compound Biochemistry*. Springer.
- Wakefield, D., & Kumar, R. K. (2001). Inflammation: chronic. In *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Wang, C.-K., Lee, W.-H., & Peng, C.-H. (1997). Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *45*(1185).
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *PHYTOCHEMISTRY*, *64*(1), 3–19.

Xie, C., Yu, K., Zhong, D., Yuan, T., Jarrell, J. A., Millar, A., & Chen, X. (2011). Investigation of Isomeric Transformations of Chlorogenic Acid in Buffers and Biological Matrixes by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Hybrid Quadrupole/Ion Mobility/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *59*, 11078–11087.

Zuzarte, R. (2012). *Portuguese lavenders : evaluation of their potential use for health and agricultural purposes.*