

**O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea: avaliação da variabilidade inter-regional em território nacional**

**Carolina Pinho Pires**

Versão final após defesa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Ana Cristina Palmeira de Oliveira  
Coorientador: Mestre Ana Sofia Domingues Oliveira

**dezembro de 2024**

## Folha em branco

## Declaração de Integridade

Eu, Carolina Pinho Pires, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M13587 de Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 15/12/2024



Assinado por: Carolina Pinho  
Pires  
Identificação: BI30682506  
Data: 2024-12-15 às 20:48:02

## Folha em branco

## Agradecimentos

É com reconhecimento que dedico a minha dissertação às pessoas que me acompanharam ao longo desta jornada, contribuindo de forma significativa para a sua realização.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira, pela oportunidade de integrar a equipa, por me permitir desenvolver este projeto de investigação e pelos ensinamentos prestados.

Expresso agradecimento à minha coorientadora, Mestre Ana Sofia Oliveira, pela dedicação, pelo conhecimento transmitido, pela simpatia e pela disponibilidade que sempre demonstrou ao longo do trabalho.

Agradeço também aos membros do grupo pela boa disposição, por toda a entreatajuda prestada, sugestões e críticas construtivas.

Agradeço aos membros que contribuíram para o fornecimento do material essencial vegetal para o estudo: Rui Lopes, António Burnay, Prof. Luís Redondo, Prof. Sónia Tomé, Bioaromas LIIS e ARBUTUS.

Agradeço à Universidade da Beira Interior por ter financiado este trabalho através de verbas do financiamento base (UIDB/00709/2020) e do financiamento programático (UIDP/00709/2020) do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), com fundos nacionais inscritos no orçamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradeço aos meus amigos, a quem me acompanhou ao longo destes anos e aos de sempre, pela companhia e ânimo permanente que tanto contribuiu para fechar este capítulo.

Agradeço à minha família, pelo apoio e incentivo constante em todas as etapas da minha vida e por se preocuparem constantemente comigo.

Agradeço ao meu namorado pela dedicação, amor e determinação que sempre me transmitiu. Por estar sempre do meu lado e por me ajudar a ultrapassar os obstáculos que tantas vezes surgiram.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Por fim, agradeço especialmente aos meus pais e ao meu irmão, pela presença, pela confiança depositada em mim e por me proporcionarem sempre a oportunidade de alcançar os meus objetivos. Um obrigado nunca será suficiente!

A todos,

Muito obrigada.

## Resumo

Na sociedade atual, a sustentabilidade tem sido uma preocupação crescente, refletindo-se nas escolhas de produtos cosméticos, nomeadamente para o cuidado da pele. O uso de extratos de algumas espécies de plantas aromáticas e medicinais têm tido destaque nas indústrias cosmética e farmacêutica devido às propriedades benéficas que possuem, que são valorizadas na saúde humana. Destes, o medronheiro (*Arbutus unedo* L.) ganhou destaque pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e regenerativas. Embora o fruto seja bem conhecido, as folhas são frequentemente consideradas resíduos, apesar de serem ricas em compostos bioativos. Assim, este projeto analisou três extratos aquosos de folhas de *A. unedo*, provenientes de diferentes regiões de Portugal continental (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), com o objetivo de avaliar o seu potencial como ingredientes bioativos para uma possível futura utilização em formulações cosméticas.

Para isso, testou-se a biocompatibilidade dos extratos *in vitro* em células da pele e as propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes dos extratos. Além disso, foi realizada uma caracterização química através das técnicas de UHPLC-PDA-MS/MS e GC-MS, para identificar os compostos bioativos que estão presentes nas folhas e compará-los, de modo a avaliar a possível junção de produções, com o objetivo de escalar a oferta considerando uma futura aplicação em formulações. A atividade antioxidante foi avaliada através do método de captação de radicais livres para o DPPH. A viabilidade celular foi testada em fibroblastos de ratinho, queratinócitos humanos e macrófagos de ratinho, quando expostos aos diferentes extratos aquosos, utilizando o ensaio MTT. A atividade anti-inflamatória foi medida em macrófagos, através da quantificação da produção de óxido nítrico (NO) após a estimulação com lipopolissacarídeo (LPS). A atividade antimicrobiana foi avaliada através do ensaio de microdiluição em caldo contra um painel de bactérias Gram-positivas e negativas, leveduras e fungos, com foco na aplicação cutânea. Foi avaliado também o potencial anti-acne recorrendo a um ensaio enzimático que mediu a atividade da enzima lipase, e o potencial cicatrizante foi analisado em fibroblastos segundo um ensaio de migração celular (*scratch-wound*).

Os resultados indicaram que os principais compostos fenólicos encontrados foram derivados do ácido gálico e flavonoides na sua forma glicosilada (por exemplo, quercetina). Todos os extratos exibiram uma capacidade antioxidante muito forte, com índices de atividade antioxidante entre 4,41 e 6,61. Em termos de atividade antimicrobiana, *Cutibacterium acnes* foi a estirpe mais suscetível a todos os extratos (CMI 0,5 mg/mL). Todos os extratos demonstraram atividade anti-lipase, sendo o extrato de Odemira o mais eficaz na inibição da enzima. Relativamente à viabilidade celular, todos os extratos

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

mostraram ser biocompatíveis a uma concentração máxima de 0,5 mg/mL para todas as linhas celulares testadas. No entanto, nenhum extrato demonstrou atividade anti-inflamatória significativa e não se revelaram potenciais cicatrizantes.

Conclui-se que o estudo dos extratos deve ser aprofundando, especialmente em termos de atividade anti-inflamatória, avaliando por exemplo outras vias para confirmar a ausência deste potencial. Relativamente à diferença entre eles, seria interessante juntar alguns extratos atendendo às características idênticas que apresentaram em determinadas bioatividades. Entretanto, a elevada atividade antioxidante e baixa toxicidade, aliadas à suscetibilidade de *C. acnes* aos extratos e ao potencial anti-lipase, indicam que estes são promissores para uma futura aplicação cutânea, particularmente associada ao tratamento de acne.

## Palavras-chave

*Acne vulgaris*; Atividade anti-inflamatória; Atividade antimicrobiana; Atividade antioxidante; Atividade cicatrizante; Extratos de plantas; Medronheiro; Viabilidade celular

## Abstract

Today, sustainability is a growing concern, especially in the choices of cosmetic products, such as skincare. Extracts from some aromatic and medicinal plants have become popular in the cosmetic and pharmaceutical industries due to their beneficial properties for human health. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) has garnered attention for its antioxidant, anti-inflammatory, and regenerative properties. Despite the well-known fruit, the leaves are often considered a waste product, even though they are rich in bioactive compounds. Thus, the project analyzed three aqueous extracts from *A. unedo* leaves, originating from different regions of mainland Portugal (Proença-a-Nova, Odemira, and Gouveia), to assess their potential to be used as bioactive ingredients in cosmetic formulations.

The extract's biocompatibility with skin cells and its antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and healing properties were tested *in vitro* to achieve this goal. We also performed chemical characterization using UHPLC-PDA-MS/MS and GC-MS techniques to identify the bioactive compounds present in the leaves and compare them to assess their potential for use in formulations, and to evaluate if a possible combination of plants from different origins would be a possibility, aiming for scaling-up the offer. Antioxidant activity was assessed using the DPPH radical scavenging method. Cell viability was tested in mouse fibroblasts, human keratinocytes, and mouse macrophages exposed to different aqueous extracts using the MTT assay. Anti-inflammatory activity was measured in macrophages by quantifying nitric oxide (NO) production after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Antimicrobial activity was evaluated through a broth microdilution assay against a panel of Gram-positive and negative bacteria, yeasts, and fungi, relevant for skin application. We also assessed the anti-acne potential using an enzymatic assay measuring lipase activity, and the healing potential was analyzed in fibroblasts through a scratch-wound assay.

The analysis revealed that the primary phenolic compounds present in the extracts were derivatives of gallic acid and glycosylated flavonoids such as quercetin. All the extracts showed strong antioxidant properties, with antioxidant activity indexes ranging from 4.41 to 6.61. Regarding antimicrobial activity, *Cutibacterium acnes* was the most susceptible strain to all the extracts (MIC 0.5 mg/mL). Additionally, all extracts exhibited anti-lipase activity, with the Odemira extract being the most effective in inhibiting lipase. In terms of cell viability, all extracts were found to be biocompatible, with a maximum concentration of 0.5 mg/mL proving to be compatible with the tested cell lines. However, none of the extracts demonstrated significant anti-inflammatory activity or healing potential.

In conclusion, further studies of the extracts are needed, especially regarding their anti-inflammatory activity to confirm the absence of this property. However, the strong antioxidant activity, low toxicity, susceptibility of *C. acnes* to the extracts, and anti-lipase potential suggest that the extracts hold promise for future topical applications, especially for an anti-acne application.

## **Keywords**

*Acne vulgaris*; Anti-inflammatory activity; Antimicrobial activity; Antioxidant activity; Cell viability; Healing activity; Plant extracts; Strawberry tree

# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>25</b>
1.1 Enquadramento regulamentar .....	26
1.2 Tipologias de cosméticos .....	27
1.3 Funções dos ingredientes nos produtos cosméticos .....	28
1.3.1 Conservantes na Cosmética .....	28
1.3.2 Propriedades Biológicas dos Cosméticos .....	30
1.3.2.1 Propriedades Antimicrobianas .....	30
1.3.2.2 Propriedades Antioxidantes .....	31
1.3.2.2.1 Antienvhecimento .....	32
1.3.2.3 Propriedades Anti-inflamatórias .....	32
1.3.2.4 Atividade Cicatrizante .....	33
1.3.2.5 Citotoxicidade.....	34
1.4 <i>Arbutus unedo</i> L. ....	34
1.4.1 Potencial Ecológico.....	35
1.4.2 Potencial Económico.....	36
1.4.3 Potencial Terapêutico.....	37
1.4.4 Composição Química .....	37
1.4.5 Propriedades Bioativas.....	38
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>41</b>
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>43</b>
3.1 Aquisição das folhas e extrato aquoso .....	43
3.2 Análise Fitoquímica.....	44
3.3 Atividade Antioxidante.....	44
3.3.1 Preparação das soluções.....	44
3.3.2 Determinação da Concentração Inicial da Amostra .....	45
3.3.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante da Amostra .....	45
3.3.4 Tratamento de Resultados.....	48

3.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos extratos.....	48
3.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	49
3.5.1 Microrganismos .....	49
3.5.2 Metodologias para a determinação da atividade antimicrobiana.....	50
3.5.2.1 Contra bactérias aeróbias – <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> .....	50
3.5.2.2 Contra bactéria anaeróbia – <i>C. acnes</i> .....	51
3.5.2.3 Contra levedura – <i>C. albicans</i> .....	52
3.5.2.4 Contra fungo filamentoso – <i>A. brasiliensis</i> .....	53
3.5.3 Tratamento de Resultados.....	56
3.6 Determinação da capacidade de inibição da enzima Lipase .....	56
3.6.1 Metodologia para a determinação da atividade enzimática.....	56
3.6.2 Tratamento de resultados .....	58
3.7 Determinação da viabilidade celular.....	58
3.7.1 Linhas celulares .....	59
3.7.2 Cultura e manutenção das linhas celulares .....	59
3.7.3 Metodologia do ensaio de MTT .....	60
3.7.4 Tratamento de Resultados.....	64
3.8 Determinação da atividade anti-inflamatória.....	64
3.8.1 Produção de Óxido Nítrico .....	64
3.8.1.1 Metodologia do ensaio de quantificação da produção de óxido nítrico.....	65
3.8.1.2 Tratamento de resultados .....	68
3.8.2 Determinação da Atividade <i>Scavenging</i> .....	68
3.8.2.1 Metodologia para a determinação da atividade <i>Scavenging</i> .....	68
3.8.3 Tratamento de Resultados .....	69
3.9 Determinação da atividade cicatrizante.....	69
3.9.1 Metodologia do ensaio de migração celular.....	70
3.9.2 Tratamento de Resultados .....	71
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>73</b>
4.1 Preparação dos extratos aquosos .....	73

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

4.2 Análise Fitoquímica.....	74
4.3 Atividade antioxidante .....	76
4.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos extratos.....	77
4.5 Atividade antimicrobiana .....	78
4.6 Atividade anti-lipase .....	84
4.7 Atividade citotóxica dos extratos aquosos.....	85
4.7.1 Biocompatibilidade em fibroblastos de ratinho (L929) .....	85
4.7.2 Biocompatibilidade em queratinócitos humanos (HaCaT) .....	87
4.7.3 Biocompatibilidade em macrófagos de ratinho (RAW 264.7) .....	88
4.8 Atividade anti-inflamatória dos extratos aquosos .....	89
4.8.1 Influência dos extratos na produção de óxido nítrico.....	89
4.8.2 Atividade <i>Scavenging</i> .....	90
4.9 Comparação dos valores de EC <sub>50</sub> e IC <sub>50</sub> .....	91
5. Migração celular .....	93
<b>7. Conclusão e perspectivas futuras .....</b>	<b>99</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>101</b>
Apêndice I - Concentração de extrato necessária para inibir 50% da atividade enzimática da lipase .....	107
Apêndice II – Concentração de extrato necessária para inibir 50% da viabilidade celular .....	108
Apêndice III – Concentração de extrato que resulta em 50% de inibição da produção de óxido nítrico.....	112
Anexo I – Relatório de Análise Cromatográfica.....	115

## Folha em branco

## Lista de Figuras

*Figura 1* – Imagens ilustrativas de *Arbutus unedo* L., e mapa relativo à distribuição da espécie em Portugal continental, retiradas de [57].

*Figura 2* – Representação esquemática dos ensaios de avaliação de atividade antioxidante, elaborado no programa BioRender.

*Figura 3* – Representação esquemática dos ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana, elaborado no programa BioRender.

*Figura 4* – Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de MTT, elaborado no programa BioRender.

*Figura 5* – Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de quantificação da atividade anti-inflamatória, elaborado no programa BioRender.

*Figura 6* – Representação esquemática dos valores de CMI (mg/mL), correspondentes à resposta dos microrganismos em estudo aos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia). > 4.000 representa a inexistência de CMI, para a gama de concentrações testadas.

*Figura 7* - Representação de um ensaio de determinação de CML, em placas de TSA e BHI, onde foram plaqueadas as suspensões obtidas com as concentrações do extrato imediatamente superiores da CMI, determinada visualmente. Verifica-se que ocorreu crescimento das bactérias *S. epidermidis* e *C. acnes* para algumas concentrações plaqueadas. As concentrações assumidas como CML foram, respetivamente, 2 e 4 mg/mL.

*Figura 8* – Crescimento microbiano (% de Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações dos extratos aquosos de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia. O controlo contém apenas a levedura em meio de cultura (RPMI). Os dados correspondem às médias  $\pm$  DP e são representados como percentagem de crescimento microbiano.

*Figura 9* – Atividade enzimática da enzima lipase (% de controlo), após 60 minutos em contacto com diferentes concentrações do extrato de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia. O controlo positivo de atividade enzimática possui apenas a enzima + substrato (sem inibidor) \*\* e \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$  usando ANOVA unidirecional.

*Figura 10* - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na viabilidade celular de fibroblastos de ratinho (ensaio de MTT). Os fibroblastos (L929) foram expostos a diferentes concentrações de extrato, com meio DMEM como controlo positivo de viabilidade \*\*\*\*, \*\* e \* representam alterações estatisticamente significativas quando comparados com o controlo, conforme determinado pelos valores de  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respetivamente, usando ANOVA unidirecional.

*Figura 11* - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na viabilidade celular de queratinócitos humanos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de extrato, com meio DMEM como controlo positivo de viabilidade. \*\*\*\*, \*\*\*, \*\* e \* representam alterações estatisticamente significativas quando comparados com o controlo, conforme determinado pelos valores de  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respetivamente, usando ANOVA unidirecional.

*Figura 12* - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na viabilidade celular de macrófagos de rato (ensaio do MTT). Os macrófagos (RAW 264.7) foram expostos a diferentes concentrações de extrato, com meio DMEM como controlo positivo de viabilidade. \*\*\*\* e \*\*\* representam uma alteração estatisticamente significativa quando comparado com o controlo, conforme determinado pelos valores de  $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , usando ANOVA unidirecional.

*Figura 13* - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo e a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 µg/mL). Foi utilizado um controlo de eficácia (Dexametasona). Os dados correspondem às médias ± DP e são representados como % de células de controlo expostas ao LPS. Também foi incluído controlo sem LPS para avaliar a produção basal de NO. \* e \*\* e \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$  usando ANOVA unidirecional.

*Figura 14* - Capacidade de eliminação de NO dos extratos das folhas de *Arbutus unedo* L. Os resultados são expressos em percentagem de libertação de nitritos, ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. \* e \*\* e \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$  usando ANOVA unidirecional.

*Figura 15* – Representação gráfica da migração celular (L929), associada aos três extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), na maior concentração biocompatível (0,5 mg/mL) e na concentração dez vezes diluída (0,05 mg/mL). O controlo positivo de migração celular contém meio DMEM. \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,0001$  usando ANOVA unidirecional.

*Figura 16* – Perfil representativo do ensaio de migração celular para o extrato de Proença-a-Nova com L929. A análise foi feita ao fim de zero horas, oito horas e doze horas. PA representa o extrato na maior concentração (0,5 mg/mL) e PB representa o extrato na maior concentração, dez vezes diluída (0,05 mg/mL).

*Figura 17* – Perfil representativo do ensaio de migração celular para o extrato de Odemira com L929. A análise foi feita ao fim de zero horas, oito horas e doze horas. OA representa o

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

extrato na maior concentração (0,5 mg/mL) e OB representa o extrato na maior concentração, dez vezes diluída (0,05 mg/mL).

*Figura 18* – Perfil representativo do ensaio de migração celular para o extrato de Gouveia com L929. A análise foi feita ao fim de zero horas, oito horas e doze horas. GA representa o extrato na maior concentração (0,5 mg/mL) e GB representa o extrato na maior concentração, dez vezes diluída (0,05 mg/mL).

*Figura A1* – Curvas dose-resposta para determinação do  $EC_{50}$  dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), no efeito de inibição da enzima Lipase. Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

*Figura A2* - Curvas de dose-resposta para determinação do  $IC_{50}$  (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular) dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), pela linha celular de fibroblastos de ratinho (L929). Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

*Figura A3* - Curvas de dose-resposta para determinação do  $IC_{50}$  (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular) dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), pela linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT). Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

*Figura A4* - Curvas de dose-resposta para a determinação do  $IC_{50}$  (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular) dos extratos aquosos de Odemira e Gouveia, pela linha celular de macrófagos de ratinho (RAW 264.7). Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

*Figura A5* - Curvas de dose-resposta para a determinação do  $EC_{50}$  dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), pelo efeito anti-inflamatório. Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

## Folha em branco

## Lista de Tabelas

*Tabela 1* – Estirpes microbianas utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, sua classificação e respetivo meio de cultura necessário para promover o seu crescimento em laboratório.

*Tabela 2* – Condições testadas na execução do ensaio para avaliar o potencial anti-lipase dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia).

*Tabela 3* - Constituintes dos meios de cultura celular completos e respetivas concentrações, para as linhas celulares L929 (fibroblastos), HaCaT (queratinócitos) e RAW 264.7 (macrófagos).

*Tabela 4* – Valores de IC<sub>50</sub> e IAA, correspondentes aos três extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) e respetivo potencial antioxidante.

*Tabela 5* – Detecção de bactérias (TSA) e fungos (SDA) presentes nos três extratos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), através da determinação de unidades formadoras de colónias (UFC).

*Tabela 6* – Estirpes microbianas testadas, sua classificação e respetiva relevância.

*Tabela 7* - Tabela representativa dos valores de CMI visual (Concentração Mínima Inibitória) e CML (Concentração Mínima Letal) determinados para os diferentes microrganismos em estudo.

*Tabela 8* – Valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> obtidos no estudo do potencial anti-inflamatório e da viabilidade celular, correspondente aos três extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia). ~ representa um valor aproximado.

*Tabela 9* – Esquema integrativo de todos os resultados obtidos ao longo deste estudo.

*Tabela A1* - Tabela com os valores de EC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso em estudo, associado à capacidade de inibição da enzima Lipase.

*Tabela A2*- Tabela com os valores de IC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da viabilidade celular, na linha celular L929.

*Tabela A3*- Tabela com os valores de IC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da viabilidade celular, na linha celular HaCaT.

*Tabela A4*- Tabela com os valores de IC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da viabilidade celular, na linha celular RAW 264.7.

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

*Tabela A5* - Tabela com os valores de  $EC_{50}$ , intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para cada extrato aquoso no estudo da atividade anti-inflamatória, na linha celular RAW 264.7.

## Lista de Acrónimos

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CML	Concentração Mínima Letal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FBS	Soro Fetal Bovino
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
UHPLC-PDA-MS/MS	Ultra-high performance liquid chromatography
IAA	Índice de atividade antioxidante
ISO	International Standard Organization
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NO	Nitric Oxide
PBS	Solução Salina com Tampão Fosfato
PDA	<i>Potato -Dextrose Agar</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Sabouraud-Dextrose Agar</i>
SNAP	<i>S-Nitroso-N-acetylpenicillamine</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

## Folha em branco

## **Comunicações científicas apresentadas durante a realização da dissertação**

Pires, CP; Oliveira, AS; Gomes, CP; Marengo, A; Rubiolo, P; Palmeira-de-Oliveira, R; Palmeira-de-Oliveira, A, “The potential of *Arbutus unedo* L. leaf extracts as cosmetic ingredients for skin application”. Comunicação em Poster. 3<sup>a</sup> edição COSMETINNOV, Lisboa, Portugal – 10 a 11 de julho de 2024.

Pires, CP; Oliveira, AS; Gomes, CP; Marengo, A; Rubiolo, P; Palmeira-de-Oliveira, R; Palmeira-de-Oliveira, A, “The value of *Arbutus unedo* L. as a bioactive ingredient for skin application: exploring the interregional variability across national territory”. Comunicação Oral. XIX Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal – 16 a 17 de julho de 2024.

## Folha em branco

## 1. Introdução

Na sociedade atual, o consumo de cosméticos é impulsionado por uma variedade de fatores que vão desde a procura pela melhoria estética até benefícios psicológicos e de higiene pessoal (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018).

Um dos principais impulsionadores do interesse por cosméticos é o desejo de aprimoramento estético. Produtos como maquiagem e cuidados capilares desempenham um papel significativo na valorização das características pessoais, contribuindo para o aumento da autoestima (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018).

Além disso, os cosméticos desempenham uma função crucial no cuidado e manutenção da saúde da pele, oferecendo hidratação e proteção contra fatores ambientais adversos.

Paralelamente, o seu uso também está fortemente associado à higiene pessoal e a rituais de autocuidado, ajudando, não só a manter a limpeza e a controlar condições dermatológicas, mas também a promover relaxamento e bem-estar emocional (Ali, S., Halim, F. and Ahmad, N. 2016, Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018).

Também, os fatores sociais e profissionais exercem uma influência significativa na utilização de cosméticos. A pressão para se conformar aos padrões estéticos prevalentes e as expectativas de apresentação pessoal em ambientes profissionais são motivações relevantes para o uso destes produtos, que ajudam a assegurar uma aparência adequada em diversos contextos sociais (Ali, S., Halim, F. and Ahmad, N. 2016).

Por estes motivos, o setor cosmético sempre foi bastante competitivo, sendo a qualidade, eficácia e segurança, pontos fulcrais para atender às expectativas da sociedade. A par disso, a conscientização ambiental e a sustentabilidade têm-se tornado preocupações cada vez mais relevantes entre os consumidores, colocando a preservação do meio ambiente como uma prioridade no desenvolvimento de novos ingredientes para produtos cosméticos (Zappelli, C., Barbulovala, A., Apone, F. and Colucci, G. 2016, Ahmed, I. A., Mikail, M. A., Zamakshshari, N. and Abdullah, A.-S. H. 2020).

Com a prevalência constante de substâncias químicas sintéticas nos cosméticos convencionais, muitas vezes associados a propriedades nocivas para o meio ambiente, os produtos que apresentam alegações como “natural” e/ou “biológico” têm despertado considerável interesse nas indústrias de cosméticos e farmacêutica (Ekiert, H. M. and Szopa, A. 2023, Michalak, M. 2023). Desta forma, compreender as bioatividades associadas aos ingredientes que conferem propriedades ativas a estes cosméticos é fundamental para

garantir uma utilização segura e eficaz dos produtos (Morganti, P., Lohani, A., Gagliardini, A., Morganti, G. and Coltelli, M.-B. 2023).

O reino vegetal oferece uma vasta gama de compostos naturais bioativos, muitos dos quais ainda não foram devidamente explorados. Isso tem gerado um interesse significativo na investigação, com o intuito de identificar novos ingredientes que possuam as propriedades de interesse para a formulação dos cosméticos (Liu, J.-K. 2022).

## **1.1 Enquadramento regulamentar**

A palavra “cosméticos” provém do termo grego “Kosm tikos”, definido por “ter o poder de organizar” (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018). Segundo o regulamento do Conselho da União Europeia (Diretiva 2009/1223/EC), um produto cosmético é “qualquer substância ou mistura destinada ao contacto com partes externas do corpo humano (epiderme, cabelo, unhas, lábios e órgão genitais externos) ou com a cavidade oral, e tem como principal objetivo limpar, perfumar, alterar a aparência, proteger, manter ou corrigir odores corporais” (Couteau, C. and Coiffard, L. 2010). Além dos cosméticos, que são amplamente utilizados no dia a dia para cuidados pessoais e estéticos, é essencial considerar também, e distingui-los, dos fármacos e dispositivos médicos, que desempenham um papel fundamental na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças (Taylor, R. S. and Iglesias, C. P. 2009). Enquanto os cosméticos são regulados principalmente com foco na segurança e na composição dos ingredientes, a legislação que rege fármacos e dispositivos médicos é ainda mais complexa e rigorosa, refletindo a sua importância crítica para a saúde pública (Europeia, C. 2004, Europeia, O. P. E. E. O. C. D. U. 2017). De acordo com a diretiva comunitária no domínio farmacêutico (Diretiva 2004/27/EC, de 31 de março), os medicamentos são definidos como “Toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas relativas a doenças em seres humanos” ou “Toda a substância ou associação de substâncias que possa ser utilizada ou administrada em seres humanos com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ao exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, ou a estabelecer um diagnóstico médico” (Europeia, C. 2004).

Por outro lado, segundo o regulamento europeu, os dispositivos médicos definem-se como “qualquer instrumento, aparelho, software, implante, reagente, material ou outro artigo pretendido, destinado pelo fabricante para uso em humanos, isoladamente ou em combinação, para fins diagnósticos ou terapêuticos, desde que o efeito primário pretendido sobre o corpo humano não seja alcançado apenas por meio de ações farmacológicas,

imunológicas, ou meios metabólicos (embora a sua função possa ser apoiada por estes meios)” (Europeia, O. P. E. E. O. C. D. U. 2017).

Posto isto, cosméticos, fármacos e dispositivos médicos são três categorias distintas de produtos concebidos para abordar diferentes aspetos relativamente ao bem-estar e à saúde humana. Os cosméticos carecem do potencial terapêutico associado aos produtos farmacêuticos, contribuindo apenas com propriedades estéticas que auxiliam nos cuidados pessoais e na aparência de cada indivíduo (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018). Portanto, estes três tipos de produtos têm objetivos, usos e regulamentações distintas, mas interagem e sobrepõem-se em algumas áreas, principalmente na necessidade em termos de inovação e desenvolvimento.

## **1.2 Tipologias de cosméticos**

Os cosméticos são classificados com base na sua aplicação e composição, para proporcionar aos consumidores benefícios específicos, baseados na sua função. A eficácia desses produtos, depende da combinação precisa de ingredientes ativos e da sua aplicação adequada, com vista na melhoria da saúde e da aparência corporal (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018, Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021).

Relativamente à sua aplicação, os cosméticos são divididos em diferentes categorias, nomeadamente para aplicação na pele, cabelo, unhas e cavidade oral (Almukainzi, Alotaibi et al. 2022). No cuidado com a pele, incluem-se hidratantes, que mantêm a hidratação cutânea de peles normais e sensíveis, produtos “anti-aging”, que combatem sinais de envelhecimento, protetores solares, que protegem contra a radiação UV, entre outros (Halla, Fernandes et al. 2018, (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018, Almukainzi, M., Alotaibi, L., Abdulwahab, A., Albukhary, N. and El Mahdy, A. M. 2022). Nos cuidados capilares, inserem-se, por exemplo, os champôs, os condicionadores e as máscaras capilares, com o propósito de limpar, restaurar a suavidade e reparar danos, respetivamente. Associado ao cuidado com as unhas, os vernizes protegem e coloram, e na cavidade oral, as pastas de dentes e os elixires combatem a placa bacteriana, prevenindo cáries e mantendo a saúde oral (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018, Almukainzi, M., Alotaibi, L., Abdulwahab, A., Albukhary, N. and El Mahdy, A. M. 2022).

Em termos de composição, os cosméticos podem dividir-se em convencionais, naturais e biológicos (Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021). Os cosméticos convencionais não necessitam

obrigatoriamente de conter ingredientes naturais, sendo que na sua composição é frequente o uso de produtos químicos. Cosméticos naturais são produtos que devem conter pelo menos um ingrediente derivado de alguma substância natural, extraída diretamente de uma planta ou mineral, em vez de ser sintetizada. Um cosmético biológico deve conter pelo menos 95% de ingredientes orgânicos certificados na sua composição (Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021).

### **1.3 Funções dos ingredientes nos produtos cosméticos**

Um ingrediente cosmético define-se como qualquer substância ou mistura destinada ao fabrico de um produto cosmético, excluindo-se impurezas ou intermediários inerentes ao processo, que estejam ausentes do produto final. Estes podem apresentar diferentes funções: ingrediente específico ou secundário, ingrediente tecnológico ou primário e ingrediente ativo (Oliveira, C., Coelho, C., Teixeira, J. A., Ferreira-Santos, P. and Botelho, C. M. 2022, *Cosméticos.*, P. I. 2024).

O ingrediente específico ou secundário atua como um adjuvante na formulação assegurando a estabilidade física, química e microbiológica do cosmético. Os conservantes, por exemplo, evitam o crescimento de microrganismos, enquanto as fragâncias e os corantes melhoram a experiência sensorial, garantindo que o produto tenha um aroma e aparência agradáveis. Por outro lado, relativamente ao ingrediente tecnológico ou primário, este contribui para a forma física do produto, sendo essencial para a sua textura, consistência e comportamento na pele. Ingredientes como emulsificantes e viscosificantes garantem que o produto tenha uma aplicação agradável e permaneça durante a utilização (Oliveira, C., Coelho, C., Teixeira, J. A., Ferreira-Santos, P. and Botelho, C. M. 2022, *Cosméticos.*, P. I. 2024). Por fim, um ingrediente ativo tem uma ação relevante diretamente relacionada com as funções principais dos produtos cosméticos, nomeadamente a hidratação, ação antirrugas, despigmentação e proteção solar. Esses ingredientes proporcionam o benefício principal que o produto promete ao consumidor. Por exemplo, o ácido hialurónico num creme hidratante ou a vitamina C num sérum anti-manchas (*Cosméticos.*, P. I. 2024).

#### **1.3.1 Conservantes na Cosmética**

Considerando que a maioria dos produtos cosméticos possui uma validade de até 2 anos após o processo de fabrico, torna-se essencial o uso de conservantes (Draelos, Z. D. 2012). Estes são definidos pelo Regulamento Europeu n.º 1223/2009 como “substâncias cuja finalidade principal ou exclusiva consiste em inibir o desenvolvimento de microrganismos no produto cosmético” (Costa, M. and Barbosa, C. M. 2021). Devido ao conteúdo de água e compostos orgânicos ou inorgânicos, os cosméticos são altamente suscetíveis à

contaminação microbiana, o que pode levar à degradação do produto, e comprometer a saúde do consumidor (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018, Almukainzi, M., Alotaibi, L., Abdulwahab, A., Albukhary, N. and El Mahdy, A. M. 2022). Microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, entre outras bactérias, fungos e leveduras, demonstraram ser frequentemente encontrados em produtos cosméticos contaminados (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018, Almukainzi, M., Alotaibi, L., Abdulwahab, A., Albukhary, N. and El Mahdy, A. M. 2022). Para mitigar esses riscos, foi estabelecida a inclusão obrigatória de conservantes, sendo que os compostos autorizados, na União Europeia, para utilização como conservantes químicos sintéticos em produtos cosméticos, encontram-se listados no Anexo V “Lista dos Conservantes Autorizados nos Produtos Cosméticos” do Regulamento Europeu n.º 1223/2009. A escolha de conservantes como sistema de preservação, para além de ter de estar em conformidade com o regulamento, depende da eficácia antimicrobiana, da toxicidade e da compatibilidade com os ingredientes já presentes no produto cosmético (Draelos, Z. D. 2012).

O ensaio de eficácia de conservantes, conhecido como *challenge test*, é um método amplamente utilizado para avaliar a capacidade de compostos atuarem como conservantes em formulações cosméticas (Pharmacopoeia, E. 2005). O objetivo desse teste é verificar se um conservante é eficaz na prevenção ou redução da proliferação de microrganismos, como bactérias e fungos (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *Aspergillus brasiliensis*) que podem contaminar o produto (ISO 2019). Portanto, após a inoculação do produto com os microrganismos e posterior incubação sob condições controladas, em intervalos de 2, 7, 14 e 28 dias, são realizadas contagens microbianas para avaliar a eficácia do sistema conservante. O critério geral exige que não haja aumento no número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), e, em alguns casos, deve ocorrer uma redução significativa da população microbiana, garantindo a segurança e estabilidade do produto (Alshehrei, F. M. 2024). Os padrões de qualidade e segurança são normalmente determinados por uma das principais normas: os critérios descritos na monografia 5.1.3 da Farmacopeia Europeia ou a ISO 11930:2019 (Pharmacopoeia, E. 2005, ISO 2019). As principais diferenças verificadas entre ambos os métodos residem no rigor e nos requisitos específicos. O método ISO 11930:2019 utiliza critérios de aprovação menos rigorosos, comparativamente ao método da Farmacopeia Europeia, tornando-o mais adequado para produtos cosméticos com menor exigência regulatória. O método da monografia 5.1.3 da Farmacopeia Europeia

inclui testes adicionais, como a exigência de testar a *E.coli* para produtos de cuidados orais, algo que não é obrigatório na ISO 11930:2019 (Pharmacopoeia, E. 2005, ISO 2019).

Apesar dos conservantes sintéticos oferecerem compatibilidade com outros ingredientes e possuírem uma ampla atividade contra bactérias e fungos, a preocupação com a toxicidade inerente a esses ingredientes tem impulsionado a pesquisa por alternativas naturais (Kerdudo, A., Burger, P., Merck, F., Dingas, A., Rolland, Y., Michel, T. and Fernandez, X. 2016, Nowak, K., Jabłońska, E. and Ratajczak-Wrona, W. 2021).

Nos últimos anos, a procura por cosméticos livres de químicos sintéticos tem levado à pesquisa de conservantes naturais, como extratos de plantas e óleos essenciais. Contudo, a inserção de conservantes naturais em formulações cosméticas enfrenta desafios significativos, como a estabilidade, a eficácia e a compatibilidade com outros ingredientes. A par disso, estes conservantes muitas vezes não estão listados nas regulamentações em vigor, como o Anexo V, o que impossibilita a sua substituição direta pelos sintéticos já aprovados (Kerdudo, A., Burger, P., Merck, F., Dingas, A., Rolland, Y., Michel, T. and Fernandez, X. 2016, Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021, Nowak, K., Jabłońska, E. and Ratajczak-Wrona, W. 2021).

Assim, apesar do crescente interesse e das vantagens de marketing associadas ao uso de ingredientes naturais, a sua adoção requer uma abordagem rigorosa para garantir que oferecem a mesma proteção e durabilidade que os conservantes sintéticos, sem comprometer a qualidade dos produtos e a saúde dos consumidores (Nowak, K., Jabłońska, E. and Ratajczak-Wrona, W. 2021).

### **1.3.2 Propriedades Biológicas dos Cosméticos**

Até à data, muitos estudos foram feitos que comprovaram a diversidade de propriedades bioativas presentes nos ingredientes de origem natural, demonstrando o seu potencial de aplicação não só como ingrediente de produtos cosméticos, mas também terapêutico, destacando os seus mecanismos de ação e alvos farmacológicos específicos (Reuter, J., Merfort, I. and Schempp, C. M. 2010). Neste subcapítulo apresentamos um resumo da relevância de propriedades biológicas de ingredientes de produtos cosméticos, referindo-nos aquelas que foram alvo de estudo desta dissertação.

#### **1.3.2.1 Propriedades Antimicrobianas**

Além da sua importância como conservantes, as propriedades antimicrobianas dos ingredientes em produtos cosméticos também desempenham um papel relevante na manutenção da saúde da pele (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018). Esta atua como a primeira linha de defesa contra desafios ambientais e microrganismos

patogênicos, sendo densamente colonizada por bactérias, fungos e vírus comensais que normalmente interagem entre si e com nosso sistema imunológico para promover a homeostase (Brown, M. M. and Horswill, A. R. 2020). Diversos compostos naturais, como polifenóis, peptídeos, óleos essenciais e extratos de plantas demonstraram eficácia no tratamento de condições que envolvem uma componente microbiológica como a acne e infecções cutâneas (Rybczyńska-Tkaczyk, K., Grenda, A., Jakubczyk, A., Kiersnowska, K. and Bik-Małodzińska, M. 2023). Por exemplo, o óleo de *Melaleuca alternifolia* destaca-se pela sua eficácia contra *Cutibacterium acnes*, e por apresentar ação antifúngica contra *Candida albicans*, microrganismos envolvidos na acne e em candidoses, respetivamente (Reuter, J., Merfort, I. and Schempp, C. M. 2010).

Ingredientes com propriedades antimicrobianas podem exercer diferentes tipos de funções nos diferentes produtos cosméticos como desodorizantes, shampoos anticasca, sabonetes antibacterianos, pasta de dentes e produtos para a acne. São formulados com ingredientes como álcool, clorhexidina, triclosan e cloreto de belzalcônio, que possuem propriedades antimicrobianas, ampliando a proteção contra microrganismos patogênicos e contribuindo para o cuidado geral da pele e do cabelo (Halla, Fernandes et al. 2018). Por exemplo, os desodorizantes possuem ingredientes com ação antimicrobiana para inibir o crescimento das bactérias responsáveis pelo mau odor associado à transpiração, os shampoos anticasca controlam o crescimento de fungos do género *Malassezia* spp., e os produtos com ação anti-acne ajudam no controlo do crescimento das espécies *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, envolvidos na fisiopatologia da doença. Esses produtos não só protegem contra microrganismos como também auxiliam na manutenção de uma pele saudável, prevenindo inflamações e irritações (Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. 2018).

### **1.3.2.2 Propriedades Antioxidantes**

Sabe-se que o corpo humano é uma estrutura complexa e altamente organizada, dotada de sistemas endógenos de proteção (Kusumawati, I. and Indrayanto, G. 2013). Esses sistemas incluem tanto enzimas antioxidantes quanto moléculas antioxidantes não enzimáticas, que desempenham papéis cruciais na defesa contra os radicais livres (Fang, Y.-Z., Yang, S. and Wu, G. 2002, Oresajo, C., Pillai, S., Manco, M., Yatskayer, M. and McDaniel, D. 2012). As enzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase, o superóxido dismutase e a catalase, são responsáveis por acelerar reações químicas que convertem radicais livres em formas menos reativas (Addor, F. A. S. A. 2017). Paralelamente, o organismo também utiliza moléculas antioxidantes não enzimáticas, nomeadamente a vitamina C, vitamina E, glutathiona e coenzima Q10, que têm a capacidade de neutralizar diretamente os radicais

livres, sem necessidade de atuar como catalisadores nas reações químicas (Oresajo, C., Pillai, S., Manco, M., Yatskayer, M. and McDaniel, D. 2012).

Dado o papel vital dos antioxidantes na neutralização de radicais livres e na redução do stress oxidativo, esses componentes são fundamentais na formulação de produtos cosméticos (Kusumawati, I. and Indrayanto, G. 2013). Ingredientes ricos em antioxidantes são essenciais na proteção contra danos induzidos por radiação ultravioleta (UV) e no combate ao envelhecimento precoce da pele (Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021).

#### **1.3.2.2.1 Anti-envelhecimento**

O envelhecimento faz parte do ciclo biológico dos seres vivos, sendo caracterizado por um processo complexo que resulta da interação de fatores genéticos, ambientais e hormonais. O envelhecimento cutâneo pode ser classificado como envelhecimento intrínseco ou biológico, e envelhecimento extrínseco, sendo que ambos os processos ocorrem em simultâneo (Khavkin, J. and Ellis, D. A. 2011, Oresajo, C., Pillai, S., Manco, M., Yatskayer, M. and McDaniel, D. 2012).

O envelhecimento intrínseco, é um fenómeno natural determinado geneticamente, que ocorre de modo uniforme em todos os indivíduos. Caracteriza-se pela formação de radicais livres, através do metabolismo humano, que conseqüentemente leva a uma redução da produção de colagénio, diminuição da elasticidade da pele e degradação de outras estruturas de suporte (Khavkin, J. and Ellis, D. A. 2011, Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021). Por outro lado, o envelhecimento extrínseco é provocado por fatores exógenos, como a exposição à radiação ultravioleta (UV), a poluição atmosférica, o tabagismo e uma dieta inadequada. Esses fatores aceleram o processo de senescência, resultando no aparecimento de rugas, manchas e outros sinais visíveis de envelhecimento (Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021).

Os cosméticos que retardam o envelhecimento utilizam ingredientes que combatem os sinais visíveis da idade, como rugas, manchas e fluidez. Estes ingredientes promovem a produção de colagénio e elastina, melhoram a hidratação da pele e protegem contra os danos causados por radicais livres e radiação UV. Dos ingredientes comuns estão incluídos retinoides, peptídeos, ácido hialurónico e antioxidantes (Silva, P. M. d., Lima, S. H. P. d. and Siqueira, L. d. P. 2023).

#### **1.3.2.3 Propriedades Anti-inflamatórias**

Os componentes naturais que estão presentes nos extratos de plantas, têm demonstrado um papel significativo como agentes anti-inflamatórios, o que os torna promissores na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias da pele, como a dermatite atópica e a psoríase (Mueller, M., Hobiger, S. and Jungbauer, A. 2010, Reuter, J., Merfort, I. and

Schempp, C. M. 2010). Esses compostos atuam modificando a resposta inflamatória do corpo, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios e o stress oxidativo, que são fatores críticos no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (Reuter, J., Merfort, I. and Schempp, C. M. 2010).

Ingredientes naturais como os extratos de plantas têm evidenciado capacidade em reduzir a expressão de enzimas-chave no processo de inflamação, como óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Por outro lado, demonstram aumentar a produção de IL-10, uma citocina conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias (Mueller, M., Hobiger, S. and Jungbauer, A. 2010, Azab, A., Nassar, A. and Azab, A. N. 2016).

Os cosméticos, por sua vez, podem ajudar no combate à inflamação ao incluir ingredientes com propriedades calmantes e reparadoras, que atuem reduzindo o inchaço, a vermelhidão e a irritação, promovendo assim a regeneração cutânea e o equilíbrio da barreira protetora (Khan, A. D. and Alam, M. N. 2019).

#### **1.3.2.4 Atividade Cicatrizante**

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que restaura a estrutura celular de tecidos lesionados levando-os ao seu estado saudável (Roy, I., Magesh, K. T., Sathyakumar, M., Sivachandran, A., Purushothaman, D. and Aravindhana, R. 2023). O processo de reparação da pele divide-se em quatro etapas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Na primeira etapa ocorre uma resposta imediata por parte dos neurónios sensíveis à lesão, que detetam o dano e iniciam a inflamação (Fernández-Guarino, M., Hernández-Bule, M. L. and Bacci, S. 2023). Durante esta fase o corpo atua para conter o sangramento através da vasoconstrição e formação de coágulos sanguíneos. De seguida, na fase inflamatória ocorre a libertação de mediadores inflamatórios, que atraem células de defesa como neutrófilos e macrófagos, responsáveis por eliminar microrganismos e restos celulares no local da lesão. Na fase proliferativa, o corpo começa a reparar os tecidos danificados, sendo que as células endoteliais formam novos vasos sanguíneos e os fibroblastos produzem colagénio. A última fase é caracterizada pela remodelação do tecido e restauração da integridade da pele (Cañedo-Dorantes, L. and Cañedo-Ayala, M. 2019, Fernández-Guarino, M., Hernández-Bule, M. L. and Bacci, S. 2023).

Para além das propriedades mencionadas, está comprovado que, algumas plantas, como a aloé vera (*Aloe barbadensis*), são amplamente utilizadas na cicatrização de feridas e queimaduras. Os compostos presentes na planta promovem a regeneração tecidual, através de mecanismos que incluem a estimulação da proliferação de fibroblastos e a síntese de colagénio, acelerando o processo de reparação cutânea (Reuter, J., Merfort, I. and Schempp,

C. M. 2010, Mssillou, I., Bakour, M., Slighoua, M., Laaroussi, H., Saghrouchni, H., Ez-Zahra Amrati, F., Lyoussi, B. and Derwich, E. 2022).

Desta forma, os cosméticos podem auxiliar no processo de cicatrização de feridas de diversas formas, nomeadamente através do uso de ingredientes que atuam diretamente nas diferentes fases de reparação, contribuindo para a redução da inflamação, para a estimulação da proliferação celular e para a proteção da barreira cutânea (Gonzalez, A. C. d. O., Costa, T. F., Andrade, Z. d. A. and Medrado, A. R. A. P. 2016).

### **1.3.2.5 Citotoxicidade**

A segurança dos ingredientes naturais nos cosméticos é um tema de grande relevância, atendendo a uma perceção equivocada de que o natural é indicativo de ausência de toxicidade. Embora os ingredientes naturais proporcionem benefícios, também podem provocar reações adversas, como alergias e irritações (Fonseca-Santos, B., Corrêa, M. A. and Chorilli, M. 2015). Dessa forma, segundo a regulamentação em vigor, os ingredientes devem ser isentos de toxicidade e utilizados de acordo com as especificações impostas, que englobam principalmente o modo de aplicação, o pH e a concentração do ingrediente. Portanto, definem que o principal critério de inclusão de um ingrediente num produto cosmético é o seu contributo para um produto final eficaz, estável e com qualidade, que garanta segurança para o consumidor (Shivangi, S., Usama, A., Juber, A., Anas, I., Mohd Muazzam, K. and Naureen, R. 2023, *Cosméticos.*, P. I. 2024).

Apesar disso e numa outra perspetiva, o potencial citotóxico das plantas tem gerado também interesse por parte da comunidade científica, especialmente pela procura por novas terapias anticancerígenas. Muitas pesquisas focam em plantas já utilizadas na medicina tradicional. Avaliam a citotoxicidade de extratos vegetais em diferentes linhas celulares, incluindo células saudáveis e células cancerígenas, para determinar a seletividade dos compostos bioativos (Akter, R., Uddin, S. J., Grice, I. D. and Tiralongo, E. 2014).

## **1.4 *Arbutus unedo* L.**

Dentro das diversas plantas com propriedades notáveis, para este estudo optou-se por umas das doze espécies do género *Arbutus*, o *Arbutus unedo* L. Esta planta, vulgarmente conhecida por medronheiro, é um arbusto frutífero endémico da região do Mediterrâneo que pode ser encontrado em várias localidades portuguesas (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014). Pertencente à família das Ericáceas, esta espécie autóctone possui um papel importante não só a nível ecológico, como também económico e medicinal (Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F. and Duarte, A. P. 2018).

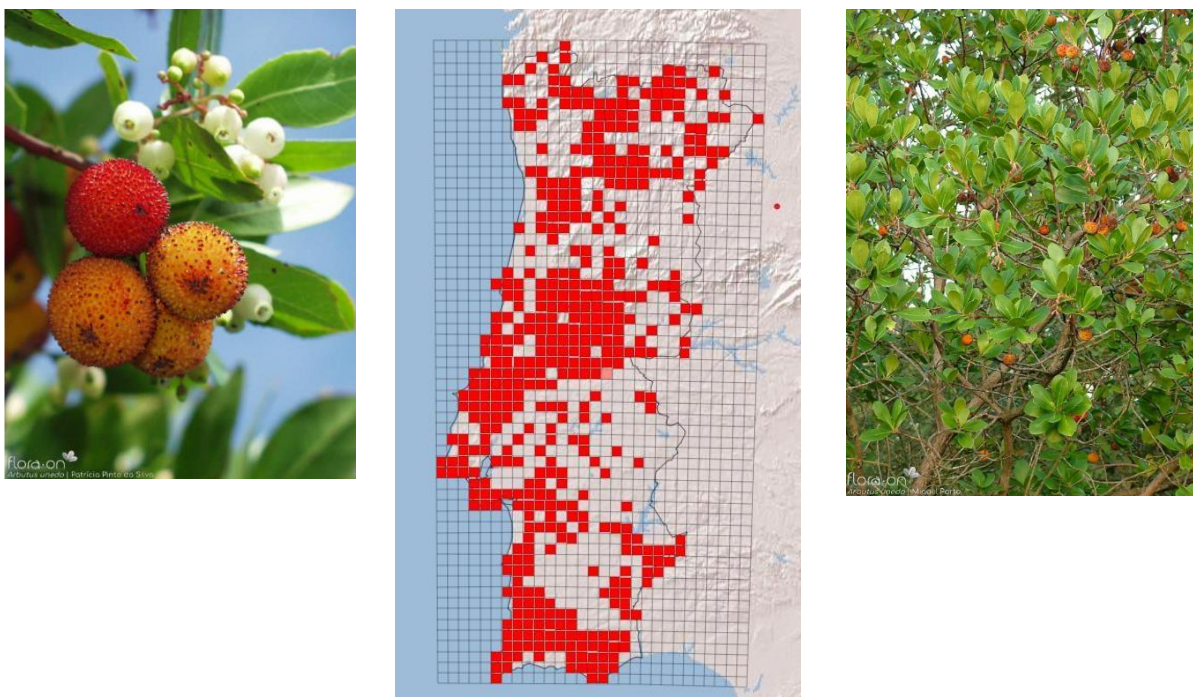


Figura 1 – Imagens ilustrativas de *Arbutus unedo* L., e mapa relativo à distribuição da espécie em Portugal continental, retiradas de (Araújo, P., Clamote, F., Carapeto, A., Almeida, J., Porto, M., Pereira, E., Lourenço, J. and Malveiro, S. 2018).

#### 1.4.1 Potencial Ecológico

No que toca à sua importância a nível ecológico, o medronheiro possui uma resistência ativa a incêndios florestais, dado o seu potencial de regeneração, que ajuda a estabilizar e a prevenir a erosão dos solos, que pode ser agravada quando a cobertura vegetal é destruída pelo fogo (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014). O facto de o arbusto ser capaz de rebrotar vigorosamente após ser queimado, contribuiu para a regeneração da vegetação. Além disso, esta espécie é tolerante a condições adversas que englobam o stress hídrico, adaptando-se facilmente ao clima mediterrânico, caracterizado por temperaturas elevadas, longos períodos de seca no verão e invernos chuvosos (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014). Paralelamente, a planta também contribui para a conservação dos ecossistemas ao fornecer abrigo e alimento para diversas espécies animais (Dias, V. L. A. 2014).

No entanto, apesar dessas adaptações naturais, um estudo já realizado com modelos climáticos projetados até 2070, indica que as futuras mudanças climáticas podem representar desafios significativos para o medronheiro. O aumento acentuado das temperaturas e a maior frequência de eventos climáticos extremos, podem superar a capacidade de adaptação da planta, resultando numa diminuição da adequabilidade ambiental em regiões onde esta espécie atualmente prospera (Almeida, A. M., Martins, M.

J., Campagnolo, M. L., Fernandez, P., Albuquerque, T., Gerassis, S., Gonçalves, J. C. and Ribeiro, M. M. 2022).

As projeções sugerem que, o *A. unedo* poderá perder áreas adequadas de habitat no sul da Europa e no norte de África, que se tornarão excessivamente quentes e áridas. Como consequência, a distribuição geográfica da espécie pode ser deslocada para regiões mais a norte, onde no futuro, as condições climáticas poderão ser mais favoráveis (Almeida, A. M., Martins, M. J., Campagnolo, M. L., Fernandez, P., Albuquerque, T., Gerassis, S., Gonçalves, J. C. and Ribeiro, M. M. 2022).

Geograficamente, em Portugal, a distribuição do medronheiro dá-se ligeiramente por todo o país, desde as regiões norte, a passar pelo centro e destacando-se a zona algarvia como o território com maior área de cultivo (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, A. 2018). Como referência mais recente, através do estudo económico de desenvolvimento da fileira do medronho, estimou-se para o ano de 2022 uma plantação que rondou os 4000 hectares (ha) com produção média de 1.480 kg/ha, ao longo do território nacional (do Lumiar Ramos, A. F. F. 2018).

#### **1.4.2 Potencial Económico**

Economicamente, o medronho, fruto que demora cerca de um ano para amadurecer, e que é colhido entre outubro e dezembro, é amplamente utilizado na gastronomia, principalmente na confeção de doces, como geleias e compotas (Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G. and Leitão, M. C. A. 2001), e no fabrico de bebidas alcoólicas tradicionais, como licores e aguardente (Dias, V. L. A. 2014, Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, A. 2018).

Este fruto, rico em açúcares, fibras, vitaminas e compostos antioxidantes, representa uma das principais fontes de rendimento para muitos agricultores, especialmente em áreas com solos pobres e escassa disponibilidade de água, onde a agricultura convencional enfrenta maiores desafios (Martins, J., Pétriacq, P., Flandin, A., Gómez-Cadenas, A., Monteiro, P., Pinto, G. and Canhoto, J. 2022).

Assim, a exploração económica do fruto é uma estratégia valiosa para o desenvolvimento rural, contribuindo simultaneamente para a preservação da biodiversidade em regiões vulneráveis às mudanças climáticas (Martins, J., Pétriacq, P., Flandin, A., Gómez-Cadenas, A., Monteiro, P., Pinto, G. and Canhoto, J. 2022). Resultante da exploração do fruto, resultam excedentes sem valor económico associado até ao momento, como é o caso das folhas e pequenos ramos.

### 1.4.3 Potencial Terapêutico

Destaca-se esta espécie a nível medicinal, dado o reconhecimento das suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e regenerativas, que têm sido objeto de estudos científicos nos últimos tempos (Dias, V. L. A. 2014, Zitouni, H., Hssaini, L., Messaoudi, Z., Ourradi, H., Viuda-Martos, M., Hernández, F., Ercisli, S. and Hanine, H. 2020). As folhas de medronheiro têm-se mostrado relevantes no uso medicinal, especialmente na região do mediterrâneo, devido aos seus efeitos benéficos no tratamento de doenças inflamatórias, diabetes e hipertensão (Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R. B. and Santos, C. N. 2010, Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Mikolić, A., Milojković-Opsenica, D., Benković, V. and Kopjar, N. 2018).

Para além de estar comprovado que as folhas são a parte mais adequada para estudos farmacológicos, devido à sua riqueza em compostos bioativos e à sua colheita simples (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014), o uso do caule e da raiz do medronheiro também é comum, dada a diversidade de propriedades medicinais existentes (Mrabti, H. N., Bouyahya, A., Ed-Dra, A., Kachmar, M. R., Mrabti, N. N., Benali, T., Shariati, M. A., Ouahbi, A., Doudach, L. and Faouzi, M. E. A. 2021). Por outro lado, a utilização do fruto na medicina é muito limitada, devido essencialmente à sua exploração noutros setores, apesar de possuir compostos bioativos e ter um alto teor de nutrientes (Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., del Castillo, M. D., Cano, M. P. and de Pascual-Teresa, S. 2008, Ruiz-Rodríguez, B.-M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.-C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M. and Tardío, J. 2011).

### 1.4.4 Composição Química

Relativamente à composição química de *A. unedo*, pode variar significativamente de acordo com a região devido a diversos fatores, que incluem variações genéticas, condições climáticas, tipo de solo, exposição a poluentes e fase de desenvolvimento da planta (Li, Kong et al. 2020, Guimarães, Barros et al. 2014). Essas variações influenciam a concentração dos compostos químicos ao longo do ciclo de vida da planta, sendo que certos compostos podem estar mais concentrados durante o crescimento ativo da planta e diminuir à medida que o fruto amadurece (Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R. and Wu, H. 2020, Pant, P., Pandey, S. and Dall'Acqua, S. 2021). Por outro lado, o método de extração associado também interfere na análise dos compostos, sendo que, estudos comparativos de diferentes métodos de extração (refluxo, ultrassom e maceração), utilizando água e metanol como solventes, demonstraram que o extrato aquoso obtido por refluxo apresenta a maior concentração em polifenóis totais, flavonoides e taninos comparativamente aos extratos obtidos com recurso

a solventes orgânicos (Habachi, E., Rebey, I. B., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Sawsen, S., Msaada, K., Merah, O. and Bourgou, S. 2022).

O medronheiro é um arbusto rico em compostos bioativos, que estão presentes em várias partes da planta, nomeadamente folhas e fruto. Entre os principais compostos fenólicos detetados nas folhas, destacam-se a catequina, quercetina e seus derivados (Bento, I. and Pereira, J. A. 2011, Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014). Por outro lado, no fruto do medronheiro há uma diversidade de flavonoides, com destaque para as antocianinas e as proantocianidinas (Bento, I. and Pereira, J. A. 2011). Além dos compostos fenólicos, o fruto do medronheiro é uma fonte de antioxidantes lipossolúveis, como  $\alpha$ -tocoferol e carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina) (Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M.-P. and Motilva, M.-J. 2016). Outros compostos bioativos incluem triterpenos (como  $\sigma$ -amirina, ácido betulínico e lupeol), ácidos orgânicos (atuam como mecanismos de tolerância ao stress ambiental) e o ácido ascórbico (Vitamina C) (Bento, I. and Pereira, J. A. 2011, Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L. and Hornero-Méndez, D. 2016). No fruto maduro, predominam os ácidos gordos insaturados, como o ácido  $\sigma$ -linolénico, linoleico e oleico. Já o ácido palmítico, destacado como o ácido gordo saturado mais comum, também está presente, mas em menor quantidade (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014).

#### **1.4.5 Propriedades Bioativas**

Tal como acontece com muitas plantas, o medronheiro é amplamente reconhecido pelas suas propriedades bioativas, que incluem atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-tirosinase (Habachi, E., Rebey, I. B., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Sawsen, S., Msaada, K., Merah, O. and Bourgou, S. 2022). As folhas têm-se destacado na indústria cosmética devido à capacidade em inibir a enzima tirosinase, uma enzima crucial na produção de melanina (Morales, D. 2022). A inibição desta enzima é essencial para o controlo da hiperpigmentação, um aspeto relevante em tratamentos de cuidados com a pele. A arbutina, composto presente nos extratos das folhas, está amplamente associada a esta atividade reduzindo a formação de manchas escuras na pele, e também a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativas e antimicrobianas (Nahar, L., Al-Groshi, A., Kumar, A. and Sarker, S. D. 2022), esta última associada a um papel importante no tratamento de infeções urinárias (Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Mikolić, A., Milojković-Opsenica, D., Benković, V. and Kopjar, N. 2018, Nahar, L., Al-Groshi, A., Kumar, A. and Sarker, S. D. 2022). Por outro lado, a quercetina, outro composto detetado nas folhas, possui propriedades antioxidantes e atua benéficamente em patologias oncológicas, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M.,

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. C. F. R. 2013). Além da enzima tirosinase, outros componentes como a catequina, ácido tânico e ácido gálico também contribuem para as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Demir, S., Koyu, H., Yilmaz, M. A., Tarhan, A. and Ozturk, S. B. 2024). Relativamente às propriedades bioativas associadas aos compostos presentes no fruto da planta, as antocianinas, referidas anteriormente, são responsáveis pelas cores vibrantes em flores, frutos e vegetais, e desempenham um importante papel antioxidante, sendo relevantes na prevenção de doenças cardiovasculares, neuronais, diabetes e tumores malignos (Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. C. F. R. 2013, Guimarães, R., Barros, L., Calheta, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P. and Ferreira, I. C. F. R. 2014). Paralelamente, as proantocianidinas outro composto presente no fruto está relacionado com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antivirais (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014, Nenadis, N., Llorens, L., Koufogianni, A., Díaz, L., Font, J., Gonzalez, J. A. and Verdaguer, D. 2015). Quanto à presença de ácidos gordos insaturados no fruto maduro, estes são conhecidos pelos seus efeitos benéficos na saúde a nível cardiovascular (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014).

## **Folha em branco**

## 2. Objetivo

O presente trabalho teve como principal objetivo explorar as propriedades bioativas de três extratos aquosos de folhas de *Arbutus unedo* L., provenientes de diferentes regiões de Portugal continental (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), considerando uma possível aplicação em produtos de uso cutâneo. Dessa forma, foram realizados ensaios laboratoriais que procuraram avaliar a eficácia dos extratos sob diferentes perspetivas:

- Determinar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos, como indicador da sua potencialidade em produtos de antienvhecimento;
- Determinar *in vitro* a atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e leveduras, para avaliação do efeito conservante em formulações cosméticas e como ativos contra patógenos da pele;
- Determinar *in vitro* a atividade anti-inflamatória dos extratos, através da utilização da linha celular de macrófagos;
- Determinar *in vitro* a atividade cicatrizante dos extratos, através da utilização da linha celular de fibroblastos;
- Determinar *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos em linhas celulares de fibroblastos, queratinócitos e macrófagos, com vista à avaliação da segurança destes extratos.

Adicionalmente, o estudo pretendeu identificar os principais compostos presentes nos extratos e, dentro deste contexto, determinar qual o extrato que apresenta maior potencial em termos de ingrediente bioativo, correlacionando os compostos com as atividades observadas, com o intuito de fornecer uma base científica sólida para futuras aplicações na pele.

Por fim, pretendeu-se comparar os extratos entre si, ao nível da sua composição química e do seu potencial bioativo, avaliando a variabilidade a nível nacional no seu perfil de eficácia. Esta comparação teve como objetivo avaliar a possibilidade de junção de produções de diferentes regiões, permitindo um aumento da escala da oferta considerando uma possível aplicação cosmética.

## **Folha em branco**

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Aquisição das folhas e extrato aquoso**

As folhas de *Arbutus unedo* L. foram colhidas em novembro de 2023 em Portugal continental, com origem em três regiões geográficas diferentes, nomeadamente, Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia. Antes de serem enviadas para a Universidade da Beira Interior sofreram o procedimento de secagem em novembro de 2023 no Centro Ciência Viva da Floresta, em Proença-a-Nova. Durante o processo de secagem, as folhas foram separadas individualmente e dispostas sobre tabuleiros perfurados antes de iniciarem os ciclos de desidratação. Ao longo do processo, a temperatura máxima registada foi de 60°C, enquanto a humidade variou entre 25- 50% durante todo o ciclo. Relativamente ao tempo de secagem, as folhas provenientes de Proença-a-Nova e de Odemira levaram 48 horas para secar completamente, enquanto as folhas de Gouveia necessitaram de 72 horas. Após a secagem, as folhas foram armazenadas em caixas de cartão Kraft.

Para a preparação individual dos extratos, recorreu-se ao método de extração aquosa, onde 10 g das folhas previamente trituradas, foram imersas em 1 litro de água destilada a 97°C, para facilitar a extração dos componentes ativos. Após um período de infusão de 30 minutos, o conteúdo foi filtrado em vácuo, de modo a remover qualquer resíduo sólido, e posteriormente, foi distribuído por tubos Falcon de 25 mL, que mais tarde foram armazenados a -18°C, inclinados, para facilitar no processo de liofilização que se seguiu. Cerca de 3 horas antes do processo de sublimação, os tubos Falcon que já estavam congelados foram colocados a uma temperatura de -80°C, para garantir o seu estado sólido. Após a etapa de congelamento, os tubos Falcon foram transferidos para um liofilizador CoolSafe™, onde foram submetidos a vácuo e a uma temperatura de -108°C, durante 5 dias. Passado esse período, os extratos secos obtidos foram armazenados, protegidos da luz e da humidade (gel de sílica), para garantir a estabilidade e a conservação dos seus compostos. Cada tubo de Falcon com o material seco, foi pesado para determinação do rendimento de extração.

À medida que o extrato seco foi necessário para a realização dos ensaios, preparou-se o extrato aquoso dissolvendo o conteúdo em água estéril e esterilizando com filtro de 0,22 µm, de forma a obter um extrato estéril, sem resíduos, e de concentração conhecida. Prepararam-se também extratos não filtrados, para efeitos de comparação de bioatividade, conforme indicação nas seguintes secções.

### 3.2 Análise Fitoquímica

A caracterização fitoquímica foi realizada com o propósito de verificar quais os compostos majoritários que estavam presentes nos diferentes extratos aquosos em estudo.

A caracterização foi obtida através de uma parceria com o Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, University of Turin, Turin, Italy.

Os extratos foram avaliados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a dois detetores (UHPLC-PDA-MS/MS): um detetor de arranjo de fotodiodos (PDA) e um espectrómetro de massa triplo quadrupolo com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI).

### 3.3 Atividade Antioxidante

Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos filtrados e não filtrados das folhas liofilizadas de *Arbutus unedo* L., recorreu-se ao método de captação de radicais livres DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila).

Este método consiste em avaliar a capacidade antioxidante através da redução do DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila), que possui coloração púrpura e absorve a 517<sub>nm</sub>. Na presença de um composto com ação antioxidante, ocorre a transferência de um átomo de hidrogénio para o átomo de azoto do radical livre DPPH, que possui um eletrão desemparelhado. Isso resulta na redução do composto a nível molecular, ficando o DPPH na sua forma reduzida, de coloração amarela (Gulcin, İ. and Alwasel, S. H. 2023). Como consequência, observa-se uma diminuição no valor da absorvância, indicando a capacidade antioxidante da amostra em estudo.

Para o tratamento de resultados, calculou-se o IC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração de extrato necessária para ocorrer 50% da inibição. Quanto menor for o valor de IC<sub>50</sub> mais potente é o efeito antioxidante do extrato. Além disso, também se determinou o índice de atividade antioxidante (IAA), através da divisão da concentração final de DPPH pelo IC<sub>50</sub> obtido para cada extrato. Neste teste, um índice inferior a 0,5 indica uma atividade antioxidante fraca, entre 0,5 e 1 é considerada moderada, de 1 a 2 é forte e acima de 2 é muito forte (Kachkoul, R., Squalli Housseini, T., Mohim, M., El Habbani, R., Miyah, Y. and Lahrichi, A. 2019).

#### 3.3.1 Preparação das soluções

Para a execução dos ensaios, num balão volumétrico, foi preparada uma solução de 2,5 mg de DPPH em 50 mL de metanol e uma solução de 2,5 mg de ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) em 50 mL de metanol, que serviu como controlo positivo para o potencial antioxidante. No final, ambas as soluções foram envolvidas em papel de alumínio para evitar a sua

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

degradação, e, conseqüentemente, foram armazenadas no frigorífico a 4°C até à sua utilização.

### **3.3.2 Determinação da Concentração Inicial da Amostra**

De modo a perceber qual a melhor concentração inicial para se ter uma dose-resposta, foi realizado um pré-teste onde foram preparadas sucessivas diluições dos extratos em tubos de *ependorf* de 0,5 mL. Foram preparados 6 tubos com 450 µL de metanol e, de seguida foram adicionados 50 µL de extrato no primeiro tubo, que possuía uma concentração de 10 mg/mL. A amostra foi diluída cinco vezes em diluição de 1:10.

Posteriormente, prepararam-se 6 novos tubos de *ependorf* de 0,5 mL onde se juntaram 50 µL de cada diluição de extrato com 50 µL de DPPH. Envolveram-se os tubos em papel de alumínio e incubaram-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Com isto, verificou-se que a diluição a partir da qual se observou uma perda gradual da cor púrpura para amarelo foi 1:100 (0,1 mg/mL), pelo que a conclusão para o valor da concentração inicial a utilizar foi de 0,2 mg/mL, considerando uma diluição de 1:2 inerente ao método.

### **3.3.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante da Amostra**

Para cada extrato de *A. unedo* foram utilizadas 3 placas de 96 poços, que corresponderam sucessivamente à placa controlo, contendo apenas DPPH e ácido ascórbico, à placa com o extrato filtrado e à placa com o extrato não filtrado.

Na placa controlo, subdividiu-se por linhas: a construção da reta de calibração do DPPH (linhas A, B e C); o controlo da cor de ácido ascórbico (linhas D e E); e a conjugação dos dois compostos onde se deu a reação (linhas F, G e H). A representação esquemática das placas encontra-se representada na Figura 2.

Inicialmente foram adicionados 100 µL de metanol a todos os poços, com exceção da primeira coluna, onde foram pipetados 300 µL de DPPH aos poços A1, B1 e C1 e 300 µL de ácido ascórbico aos poços D1, E1, F1, G1 e H1. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, diluíram-se, seriadamente, 200 µL desde a primeira coluna até à última. De forma a obter um volume final de 200 µL, foram adicionados 100 µL de metanol aos poços A, B, C, D e E, e por outro lado, foram adicionados 100 µL de DPPH aos poços F, G e H, onde se deu a reação. Envolveram-se as placas em papel de alumínio e reservou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Para as restantes placas que avaliaram o poder antioxidante do extrato filtrado e não filtrado, o procedimento iniciou-se também com a adição de 100 µL de metanol a todos os

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

poços, exceto aos da primeira coluna. De seguida, foram adicionados 300 µL de extrato filtrado e não filtrado, em placas independentes, nos poços A1, B1, C1, F1, G1 e H1 e, realizou-se a diluição com 200 µL desde a primeira coluna até à última. Consecutivamente, foram adicionados 100 µL de metanol aos poços F, G e H, que funcionaram como o controlo de cor dos extratos, e 100 µL de DPPH aos poços A, B e C onde ocorreu a reação. Envolveram-se as placas em papel de alumínio e procedeu-se da mesma forma que a placa controlo. Após o período de incubação, verificou-se se havia a transição da tonalidade púrpura para amarela, que indica a redução de DPPH, e fez-se a leitura das absorvância a um comprimento de onda de 517<sub>nm</sub>.

**Esquema representativo da metodologia aplicada durante o ensaio de avaliação da atividade antioxidante**

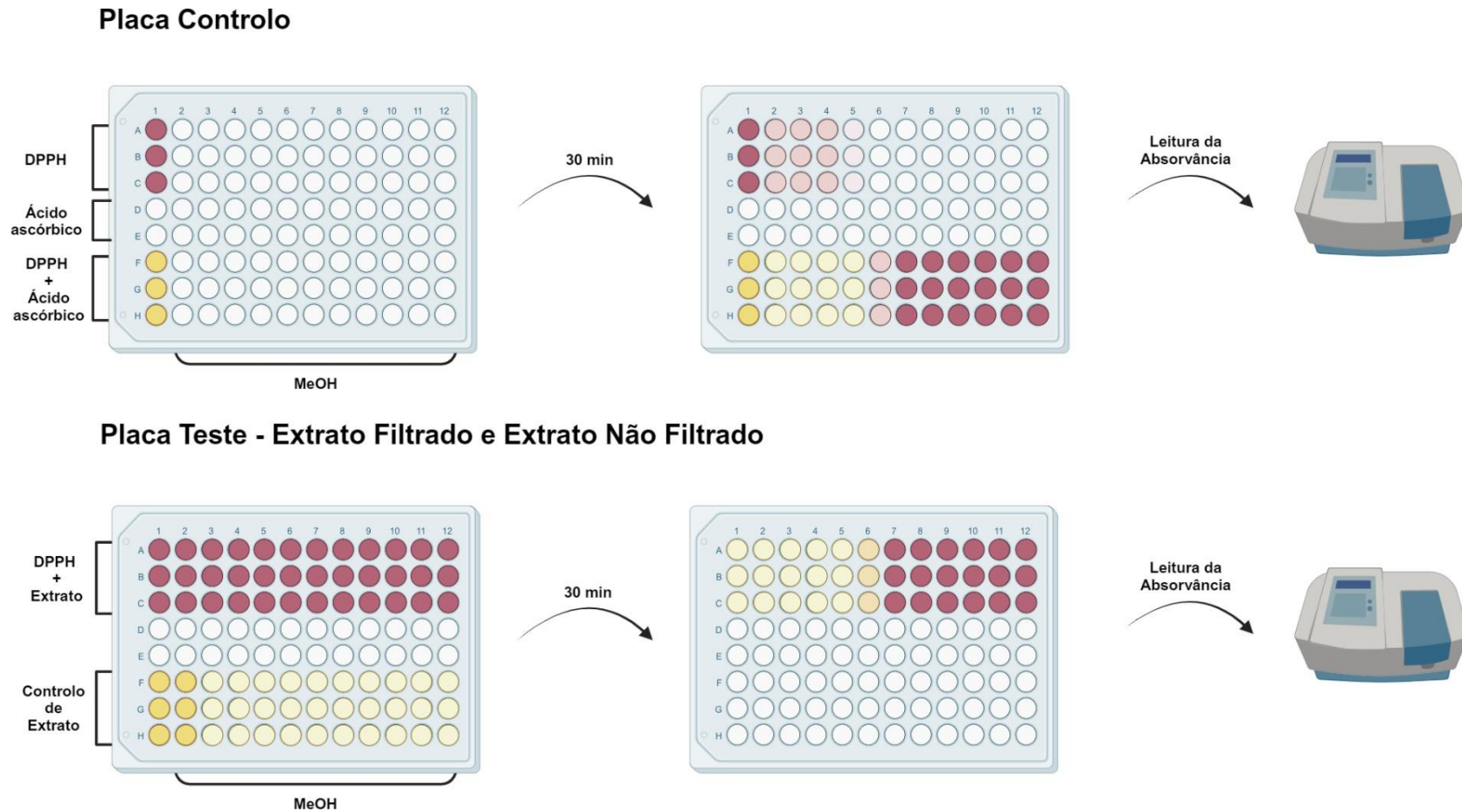


Figura 2 – Representação esquemática dos ensaios de avaliação de atividade antioxidante, elaborado no programa BioRender.

### 3.3.4 Tratamento de Resultados

Foram executados pelos menos três ensaios independentes para cada extrato. O tratamento dos valores das absorvâncias lidas a 517<sub>nm</sub> permitiram determinar o IC<sub>50</sub> e o IAA para cada extrato em estudo, bem como para o controlo positivo ácido ascórbico, através da seguinte fórmula (1):

$$IAA = \frac{\text{Concentração final de DPPH(mg/mL)}}{IC_{50} \text{ (mg/mL)}} \quad (1)$$

## 3.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos extratos

Para a realização do teste de qualidade microbiológica dos extratos, procedeu-se à incorporação dos três extratos das folhas de *A. unedo* (filtrados e não filtrados) em diferentes meios de cultura, nomeadamente TSA (Tryptic Soy Agar) e SDA (Sabouraud Dextrose Agar), de modo a verificar a presença de crescimento microbiano.

Para a realização do ensaio utilizou-se o extrato na sua concentração inicial de 8 mg/ mL e na sua forma diluída (1:10). Para a diluição, adicionaram-se separadamente a dois tubos Falcon® previamente esterilizados, 500 µL de extrato (filtrado e não filtrado), juntamente com 4500 µL de água peptonada tamponada estéril.

As placas de Petri foram identificadas, de forma a diferenciar o extrato filtrado do não filtrado, o extrato diluído do não diluído e o tipo de meio de cultura em teste. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta e de uma pipeta serológica adicionou-se 1 mL de extrato com 20 mL de meio de cultura fundido, em cada placa de Petri.

Após este procedimento, as placas que continham o meio de cultura associado ao crescimento de bactérias (TSA) foram incubadas a 37°C, durante 3 a 5 dias. As placas que continham o meio de cultura associado ao crescimento de fungos (SDA) foram incubadas a 25°C, durante um intervalo de tempo de 5 a 7 dias. Terminado o período de incubação, calculou-se o número de UFC por mililitro, recorrendo a um contador de colónias (Digital Sp Collector).

Os resultados obtidos, foram depois comparados com a monografia 5.1.4 da Farmacopeia Europeia, relativa aos ensaios de qualidade microbiológica (Pharmacopoeia, E. 2011).

## **3.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

### **3.5.1 Microrganismos**

A atividade antimicrobiana dos extratos da planta *A. unedo* foi determinada através da utilização de um painel de microorganismos (estirpes de coleção), composto por bactérias, fungos e leveduras. As estirpes utilizadas foram adquiridas de coleções de culturas internacionais ATCC (American Type Culture Collection) e DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH), e foram selecionadas de acordo com os microrganismos relevantes para a microbiota da pele e os que fazem parte do “challenge test” para produtos cosméticos (Tabela 1).

A ação antimicrobiana foi determinada através do método de microdiluição em caldo, por adaptação das normas M07-A10, M11-A8, M27-A3 e M38-A2 da “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), para testar bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias, leveduras e fungos filamentosos, respetivamente.

A atividade antimicrobiana foi determinada através de dois ensaios, especificamente, a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), definida como a concentração mínima capaz de inibir o crescimento de um microrganismo determinada visualmente, e a determinação da concentração mínima letal (CML), que corresponde à menor concentração em que o extrato é capaz de provocar a morte, na totalidade, do microrganismo em estudo. A CML é realizada posteriormente à determinação da CMI.

A avaliação iniciou-se pela cultura de bactérias aeróbias em meio sólido TSA, bactérias anaeróbias em meio sólido BHI (Brain Heart Infusion) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 15 g/L de agar e 5% de glicose, leveduras em meio sólido SDA e fungos em meio sólido PDA (Potato -Dextrose Agar) (Sigma-Aldrich®). As bactérias e leveduras foram incubadas a 37°C, enquanto os fungos filamentosos foram incubados à temperatura ambiente (25°C). Para o crescimento das bactérias anaeróbias foi gerado um ambiente anaeróbio recorrendo ao sistema Anaerocult® (Tabela 1).

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Tabela 1 – Estirpes microbianas utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, sua classificação e respectivo meio de cultura necessário para promover o seu crescimento em laboratório.

Espécie	Estirpe	Classificação	Meio de cultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Bactéria aeróbia Gram-positiva	Tryptic Soy Agar, TSA (VWR Chemicals)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 28764	Bactéria aeróbia Gram-positiva	Tryptic Soy Agar, TSA (VWR Chemicals)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Bactéria aeróbia Gram-negativa	Tryptic Soy Agar, TSA (VWR Chemicals)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Bactéria aeróbia Gram-negativa	Tryptic Soy Agar, TSA (VWR Chemicals)
<i>Cutibacterium acnes</i>	DSM 1897	Bactéria anaeróbia Gram-positiva	Brain Heart Infusion, BHI (VWR Chemicals)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levedura	Sabouraud-Dextrose Agar, SDA (VWR Chemicals)
<i>Apergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Fungo filamentosos	Potato-Dextrose Agar, PDA (VWR Chemicals)

Posteriormente, para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, foram utilizados diversos meios de cultura líquidos associados às diferentes espécies em estudo.

No que diz respeito a avaliação das bactérias aeróbicas, foi utilizado o meio MHB (Mueller-Hinton Broth) (Sigma-Aldrich®).

Para o estudo da bactéria anaeróbia, utilizou-se o meio BHI, suplementado com glucose a 5 %. Para a análise da levedura e do fungo filamentosos, foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich®).

### 3.5.2 Metodologias para a determinação da atividade antimicrobiana

#### 3.5.2.1 Contra bactérias aeróbicas – *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*

##### Preparação do inóculo

Para a realização do ensaio, a cultura de cada microrganismo foi repicada 24 horas antes numa placa de TSA e incubada numa estufa (BINDER) a 37°C, de forma a garantir o crescimento do microrganismo. Durante a preparação do inóculo, diferentes colónias isoladas foram selecionadas e suspensas numa solução salina estéril de NaCl a 0,85% (m/v), com posterior agitação durante 15 segundos. A densidade ótica (DO) acertou-se a 0.5 Macfarland (1-2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL), recorrendo a um densitómetro de bancada (Grant-bio). Seguidamente realizou-se uma diluição 1:100 (100 µL de suspensão com 9900 µL de MHB) de forma a obter uma solução com 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL.

### **Preparação da microplaca**

Para a preparação da placa de 96 poços, foram pipetados 100 µL de cada extrato filtrado, em duplicado, nos primeiros poços (coluna 1), e 50 µL de MHB para os seguintes poços (colunas 2-10), tal como demonstrado na Figura 3. A coluna 11 representou o controlo negativo do crescimento microbiano, constituído apenas por 100 µL de meio de cultura, sem adição do microrganismo. De seguida, 50 µL de extrato dos poços da primeira coluna foram diluídos sequencialmente pelos restantes poços, com o auxílio de uma multicanal, de modo a apresentar diferentes concentrações (8,000, 4,000, 2,000, 1,000, 0,500, 0,250, 0,125 e 0,030 mg/mL). Por fim, foram adicionados 50 µL da suspensão microbiana em cada poço que continha as diluições, inclusive no controlo positivo de crescimento do microrganismo e incubou-se a placa a 37°C durante 16-20 horas.

### **Avaliação dos Resultados**

Após 16-20 horas de incubação, recorrendo a uma multicanal, fez-se a ressuspensão do conteúdo dos poços de forma a avaliar visualmente a CMI e, de seguida, foi feita uma leitura das absorvâncias da placa a 600<sub>nm</sub>. Consecutivamente, procedeu-se à determinação da CML, onde se transferiu cerca de 4 µL de cada suspensão que não apresentava crescimento microbiano para uma placa de Petri contendo meio TSA. As placas foram incubadas 16-20 horas a 37°C e após esse tempo foram avaliadas. A concentração mais baixa onde não se verificou o crescimento de colónias, após as 16-20 horas de incubação, foi definida como a CML.

#### **3.5.2.2 Contra bactéria anaeróbia – *C. acnes***

##### **Preparação do inóculo**

Previamente à inoculação, foi feita a repicagem da estirpe *Cutibacterium acnes* DSM 1897 em placa de BHI, que posteriormente foi incubada numa jarra de anaerobiose a 37°C durante 72 horas. Após esse período, foram escolhidas colónias isoladas que foram suspensas numa solução de NaCl a 0,85%, seguindo de agitação durante 15 segundos. A densidade ótica (DO) foi acertada a 0.5 Macfarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), recorrendo a um densitómetro de bancada (Grant-bio). Seguidamente, realizou-se uma diluição 1:75 (25 µL de suspensão com 1850 µL de BHI), obtendo uma solução com  $2 \times 10^6$  UFC/mL.

### **Preparação da microplaca**

Estruturalmente, as placas de 96 poços foram preparadas tal como descrevi para as bactérias aeróbicas (Figura 3), variando apenas os meios de cultura e volume. Assim sendo, inicialmente foram adicionados 100 µL do meio de cultura líquido BHI em todos os poços, com exceção da primeira coluna, onde se adicionaram 200 µL de cada extrato filtrado em estudo, e do controlo negativo, onde foram adicionados 200 µL de meio. Posteriormente, a suspensão com o microrganismo foi adicionada na quantidade de 100 µL em todos os poços referentes, e para o controlo de extrato foram adicionados mais 100 µL de meio, de forma a completar os 200 µL. A placa foi incubada novamente em jarra de anaerobiose durante 72 horas a 37°C.

### **Avaliação dos Resultados**

Após 72 horas, foi avaliado o CMI visual e foram lidas as absorvâncias no mesmo comprimento de onda (600<sub>nm</sub>). Detetado o CMI, determinou-se a CML, transferindo cerca de 4 µL de cada poço onde se verificou a ausência de crescimento, para uma placa de BHI. A placa foi incubada novamente durante 72 horas em anaerobiose a 37°C. Após o período de incubação foi observado o crescimento microbiano.

#### **3.5.2.3 Contra levedura – *C. albicans***

##### **Preparação do inóculo**

A repicagem da estirpe ocorreu aproximadamente 24 horas antes do ensaio, na qual a *Candida albicans* ATCC 10231 foi transferida para uma placa de SDA e incubada a 37°C em condições de aerobiose. Para a preparação do inóculo, foram selecionadas colónias isoladas que foram suspensas numa solução de NaCl a 0,85%, seguida de agitação durante 15 segundos. A densidade ótica (DO) foi ajustada para 0,5 Macfarland (1-5 x 10<sup>6</sup> CFU/mL) utilizando um densitómetro de bancada (Grant-bio). Posteriormente, foram realizadas duas diluições sucessivas, primeiramente diluição 1:50 onde se utilizou um tubo de *eppendorf* de 1mL para adicionar 20 µL da suspensão e 980 µL de RPMI, e de seguida 1:20 onde se adicionou 500 µL da suspensão diluída anteriormente com 9500 µL de RPMI num tubo Falcon.

### **Preparação da microplaca**

Na placa de 96 poços foram adicionados 100 µL do meio de cultura líquido RPMI em todos os poços, exceto nos que correspondiam à primeira coluna, onde mais tarde foram adicionados 200 µL de extrato filtrado (Figura 3). O controlo negativo foi preparado como descrito anteriormente, tendo apenas variado o tipo de meio. Da mesma forma que também foram adicionados 100 µL da suspensão com o microrganismo em todos os poços específicos. Por fim, incubou-se a placa a 37°C durante 48 horas.

### **Avaliação dos Resultados**

Passado o período de incubação de 48 horas, avaliou-se a CMI e leu-se as absorvâncias no comprimento de onda de 600<sub>nm</sub>. Posteriormente, executou-se o ensaio para verificar a CML, transferindo 4 µL de cada poço, onde se verificou a ausência de crescimento, para uma placa de SDA. Incubou-se a placa por mais 48 horas a 37°C e após essa etapa fez-se a análise do crescimento microbiano.

#### **3.5.2.4 Contra fungo filamentoso – *A. brasiliensis***

##### **Preparação do inóculo**

O ensaio foi realizado após a repicagem para uma placa de PDA, a cultura de *Apergillus brasiliensis* ATCC 16404, que ocorreu 4 a 7 dias antes do ensaio. As placas foram armazenadas numa estufa (NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator) a 25°C, proporcionando as condições ideais para o crescimento do microrganismo.

Para a preparação do inóculo, o micélio foi coberto com 1mL de PBS estéril, de forma a possibilitar a preparação de uma suspensão em meio líquido. Para isso, incorporou-se o PBS com o microrganismo através de uma ansa, transferiu-se o conteúdo para um tubo de *ependorf* estéril de 1,5mL e esperou-se que as partículas de maiores dimensões se depositassem no fundo. Da suspensão, foram retirados 200 µL para um tubo de *ependorf* de 2 mL e foram adicionados 1800 µL de RPMI, de modo a permitir a leitura da DO a um comprimento de onda de 600<sub>nm</sub>.

A suspensão foi acertada para um valor de DO<sub>600</sub> entre 0,09 e 0,11, através da seguinte fórmula:  $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ . A partir desta suspensão foi realizada uma última diluição 1:50, obtendo-se um valor final médio de  $0,4 - 5 \times 10^4$  CFU/mL.

### **Preparação da microplaca**

Foram adicionados 100 µL do meio de cultura líquido RPMI em todos os poços correspondentes da placa de 96 poços, exceto nos da primeira coluna, onde foram adicionados 200 µL de extrato filtrado (Figura 3). O controlo negativo foi preparado como descrito para o ensaio relativo ao microrganismo *Candida albicans*. Por último, foram adicionados 100 µL da suspensão com o microrganismo *Apergillus brasiliensis* e levou-se a placa a incubar durante 48 horas, a 37°C.

### **Avaliação dos Resultados**

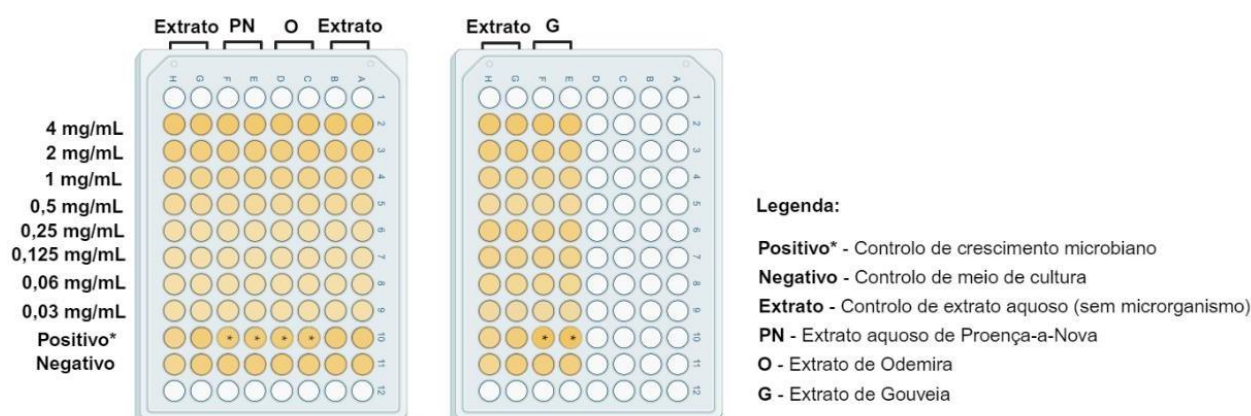
Passado 48h horas, avaliou-se a CMI visual e foram lidas as absorvâncias no mesmo comprimento de onda aplicado às restantes espécies. Detetada a CMI, determinou-se a CML, transferindo cerca de 4 µL de cada poço onde se verificou a ausência de crescimento, para uma placa de PDA. A placa foi incubada novamente durante 48 horas a 37°C. Após o período de incubação foi observado o crescimento microbiano, tal como demonstrado na Figura 3.

## Esquema representativo da metodologia aplicada durante o ensaio de determinação da atividade antimicrobiana

### Preparação do Inóculo



### Inoculação da Placa



### Avaliação dos Resultados

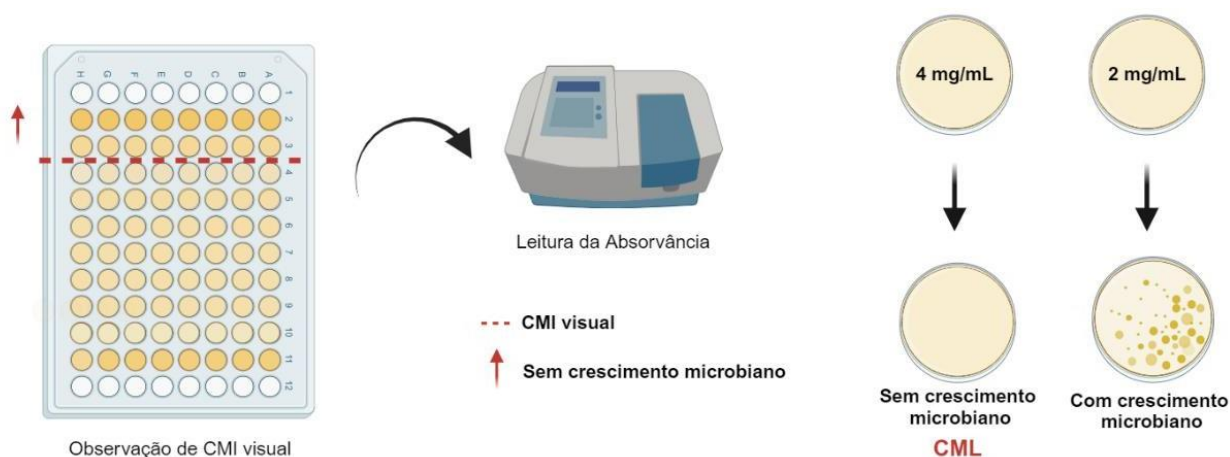


Figura 3 – Representação esquemática dos ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana, elaborado no programa BioRender.

### **3.5.3 Tratamento de Resultados**

Foram realizados pelo menos três ensaios independentes para cada extrato, associados a cada espécie em estudo, em duplicado. Para validar os resultados, os valores de CMI teriam de ser concordantes em 2 ou mais ensaios, com um desvio padrão inferior a 20% em todas as condições testadas nas leituras de absorvância.

No que diz respeito ao tratamento de dados, recorreu-se ao programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e GraphPad (Prism 8.0.1, GraphPad Software) para proceder à análise estatística e elaboração de gráficos.

Os valores obtidos da absorvância foram normalizados ao controlo positivo de crescimento microbiano (microrganismos em meio de cultura).

## **3.6 Determinação da capacidade de inibição da enzima Lipase**

### **3.6.1 Metodologia para a determinação da atividade enzimática**

Várias enzimas produzidas pela *C. acnes*, como a lipase, protéase e hialuronidase, contribuem para a progressão da acne (Jappe, U. 2003, Patil, V., Bandivadekar, A. and Debjani, D. 2012). A lipase é um dos fatores de virulência, sendo uma enzima que degrada os lípidos em ácidos gordos e glicerol, libertando-os nos folículos polissebáceos, onde o glicerol é utilizado pela bactéria como fonte energética (Jappe, U. 2003, Nakase, K., Momose, M., Yukawa, T. and Nakaminami, H. 2022).

O potencial anti-lipase dos extratos foi avaliado através do ensaio colorimétrico de inibição da enzima lipase com origem na *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich®), com base na reação entre o DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (Reagente de Ellman) e o produto de hidrólise do DMPTB (tributirato de 2,3-dimercapto-1-propanol), um tioéster que se assemelha estruturalmente aos triacilglicerídeos (TAG's), reconhecidos por serem um substrato natural da enzima lípase (Choi, S.-J., Hwang, J.-M. and Kim, S.-I. 2003, De Canha, M. N., Komarnytsky, S., Langhansova, L. and Lall, N. 2020).

### **Preparação das soluções**

Inicialmente, preparou-se o Reagente de Ellman (DTNB) a uma concentração de 40mM, dissolvendo DTNB em isobutanol, e o substrato DMPTB a uma concentração de 10 mM. Estas soluções foram armazenadas a -20°C, até à realização do ensaio.

Para permitir a dissolução da enzima, preparou-se o tampão da enzima lipase com 10 mM KCl e 10 mM Tris-HCl a um pH de 7,5. Para o tampão do substrato preparou-se uma solução de 50 mM de Tris-Cl e Triton™ X-100 6% (v/v) a pH de 7,2. Para a mistura reacional,

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

essencial no ensaio, foram também preparadas as soluções de 0,5 M EDTA, Triton™ X-100 10% (v/v) e 1 M Tris-Cl.

Numa balança analítica, pesou-se 1,43 mg de enzima, incorporou-se em 10 mL de tampão da enzima e reservou-se a 4°C, até à sua utilização. De seguida, prepararam-se as diluições correspondentes aos extratos em estudo (1,00, 0,500, 0,250, 0,125, 0,063, 0,031, 0,016 e 0,008 mg/mL) e, posteriormente, preparou-se a mistura reacional, onde num tubo Falcon de 15 mL foram adicionados 240 µL de 40 mM DTNB, 24 µL de 0,5 M EDTA, 60 µL de Triton™ X-100 (10% v/v) e 600 µL de 1 M Tris-HCl. O volume foi ajustado para 1800 µL com água desmineralizada. Por fim, num tubo *ependorf* de 1,5 mL, preparou-se a solução de substrato com 400 µL de DMPTB (4 mM) incorporado em 600 µL de água estéril.

### Execução do ensaio

Para o ensaio de inibição da enzima, 160 µL da mistura reacional foram adicionados a uma placa de 96 poços com 10 µL de inibidor (extrato aquoso) e 20 µL de solução da enzima (a 10 U/ml). A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos, para permitir a interação inibidor-enzima. Após esse tempo, foram adicionados 10 µL de substrato (DMPTB), que permitiu iniciar a reação, gerando os grupos -tiol. A capacidade de inibição foi calculada após incubação da placa a 37°C durante 60 minutos, através de uma leitura de absorvância a 405nm. Ao fim desse tempo, verificou-se a redução do DTNB, devido a reação do mesmo com os grupos -tiol, que gerou um composto amarelo.

Os controlos aplicados no ensaio e respetivos constituintes estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições testadas na execução do ensaio para avaliar o potencial anti-lipase dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia).

<b>Reação</b>	<b>Controlo Positivo</b>	<b>Controlo Solvente</b>
160 µL mistura reacional	160 µL mistura reacional	160 µL mistura reacional
10 µL extrato aquoso	10 µL tampão lipase	10 µL água estéril
20 µL enzima	20 µL enzima	20 µL enzima
10 µL substrato	10 µL substrato	10 µL substrato
<b>Controlo (sem Substrato)</b>	<b>Controlo (sem Enzima)</b>	<b>Controlo de cor</b>
160 µL mistura reacional	160 µL mistura reacional	160 µL mistura reacional
10 µL tampão lipase	10 µL tampão lipase	10 µL extrato aquoso
20 µL enzima	20 µL tampão lipase	20 µL tampão lipase
10 µL tampão substrato	10 µL substrato	10 µL substrato

### 3.6.2 Tratamento de resultados

Foram realizados pelo menos três ensaios independentes, para cada extrato aquoso, com as condições em triplicado. Relativamente ao tratamento de dados, recorreu-se ao programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e GraphPad (Prism 8.0.1, GraphPad Software) para proceder à análise estatística e elaboração de gráficos. Às absorvâncias obtidas foram descontados os brancos relativos à cor do extrato em cada concentração e os resultados obtidos foram normalizados ao controlo positivo de atividade enzimática (enzima + substrato). A presença de alterações significativas na atividade da enzima foi avaliada através da análise estatística, utilizando o teste ANOVA unidirecional. Através da percentagem de inibição da enzima, para cada concentração, construiu-se uma curva sigmoideal e determinou-se o EC<sub>50</sub> de cada extrato.

### 3.7 Determinação da viabilidade celular

No decorrer do estudo, foi feita avaliação da viabilidade celular de três linhas celulares distintas, nomeadamente fibroblastos de ratinho, queratinócitos humanos e macrófagos de ratinho, de forma a perceber como respondem aos extratos aquosos em análise. Para avaliar o potencial citotóxico, recorreu-se ao ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio, também designado de ensaio MTT - *Microculture Tetrazolium Assay*.

O ensaio MTT é uma técnica onde células nucleadas convertem um composto amarelo, sal de tetrazólio, em cristais de formazano, de cor roxa, através de uma enzima presente na mitocôndria. Esses cristais são insolúveis em meio aquoso e acumulam-se no interior das células, pelo que para quantificá-los é necessário utilizar um solvente que os extraia (isopropanol). A intensidade de cor está diretamente relacionada com a quantidade de células viáveis, dado que apenas as células metabolicamente ativas são capazes de converter o MTT em cristais de formazano (Tolosa, L., Donato, M. T. and Gómez-Lechón, M. J. 2015). Posto isto, uma maior intensidade de cor roxa indica um maior número de células metabolicamente ativas. Por outro lado, uma redução na intensidade da cor está associada a uma diminuição na viabilidade celular. A quantificação da intensidade de cor roxa é realizada por meio de leituras de absorvância num espectrofotómetro, em dois comprimentos de onda específicos: 570<sub>nm</sub> (teste) e 650<sub>nm</sub> (referência) (Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. and Blázquez-Castro, A. 2018).

Os ensaios foram realizados de acordo com a ISO/EN 10993-5 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity (ISO 2009).

### 3.7.1 Linhas celulares

Foram utilizadas linhas celulares de queratinócitos humanos (HaCaT ATCC-CCS-300493) característicos da epiderme, fibroblastos de ratinho (L929 ATCC-CCL-1), presentes em camadas mais profundas da pele e envolvidos em processos de cicatrização, e macrófagos de ratinho (RAW 264.7 ATCC® TIB-71™), que são células do sistema imunitário, utilizadas em modelos *in vitro*, para determinação do potencial anti-inflamatório.

### 3.7.2 Cultura e manutenção das linhas celulares

Apesar das linhas celulares em estudo diferirem no tipo de suplementação a utilizar (Tabela 3), o meio completo onde foram cultivadas (DMEM (Life technologies)) foi o mesmo para todas. Durante a preparação do meio, foi acertado o pH a 7,2-7,4 em todos os meios de cultura, e posteriormente, foram esterilizados por filtração, recorrendo a uma unidade de filtração com membrana de 0,22µm. As linhas celulares foram mantidas em cultura numa incubadora (NUAIRE, DHD AUTOFLOW, CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator) a 37°C, 95 % de humidade e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Tabela 3 - Constituintes dos meios de cultura celular completos e respetivas concentrações, para as linhas celulares L929 (fibroblastos), HaCaT (queratinócitos) e RAW 264.7 (macrófagos).

	Fibroblastos	Queratinócitos	Macrófagos
<b>Bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América)</b>	1,5 g/L	3,02 g/L	1,5 g/L
<b>D-glucose (Sigma-aldrich®)</b>	-	4,5 g/L	4,5 g/L
<b>Penicilina (Sigma- Aldrich®)</b>	100 UI/mL	100 UI/mL	100 UI/mL
<b>Estreptomina (Sigma- Aldrich®)</b>	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL
<b>FBS não inativado (Life Technologies - Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos da América)</b>	-	-	10%
<b>FBS inativado (Life technologies)</b>	10%	10%	-

No que diz respeito às células HaCaT, quando atingiram uma confluência entre 70-80%, foram submetidas à tripsinização, utilizando uma solução de Tripsina-EDTA [solução de protease com tripsina a 0,05% m/v e EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) a 0,2 g/L – HyClone™]. Para este fim, inicialmente o meio de cultura contido no frasco de 75 cL foi retirado e as células foram lavadas com PBS estéril pré-aquecido, de modo a eliminar qualquer vestígio de soro ainda presente.

De seguida, foram adicionados 4 mL de tripsina, para permitir que as células se soltassem, e o frasco foi incubado a 37°C, durante 20 minutos. Após a verificação ao microscópio de

que as células estavam destacadas do frasco e individualizadas, adicionou-se 8 mL de meio de cultura completo para neutralizar a ação da trispina. Posteriormente, procedeu-se a uma leve ressuspensão em todo o frasco, seguido da transferência para um tubo Falcon e subsequente centrifugação a 200 RCF (Força Centrífuga Reativa), durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* composto pelas células recolhidas foi ressuspendido em 10 mL de meio, e uma porção da suspensão foi transferida para um novo frasco de cultura de 75 cL, iniciando uma nova passagem. Para os ensaios, as células foram utilizadas entre as passagens 40 e 60.

Relativamente às células L929, o processo aplicado é muito idêntico ao da linha celular anterior, variando apenas no facto de não ser necessário o uso de PBS estéril para a limpeza do excedente de soro, o tempo de tripsinização ser reduzido para metade e a centrifugação ser a 125 RCF, durante 5 minutos.

Relativamente às células RAW 264.7, estas foram regularmente subcultivadas, ou a cada dois dias ou quando atingissem um nível de confluência entre 50-80%, segundo as normas sugeridas pela ATCC. Durante o processo, o meio de cultura antigo foi removido e substituído por meio novo, as células foram desprendidas com o auxílio de um raspador celular, sendo posteriormente transferidas para um novo frasco de cultura. Para os experimentos conduzidos, as células foram utilizadas entre as passagens 10 e 25. Assim que o número de passagens atingisse o limite, um novo crioval com uma passagem mais baixo era descongelado.

### **3.7.3 Metodologia do ensaio de MTT**

#### **Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços**

O procedimento iniciou-se após verificar que os frascos de cultura, previamente cultivados, estavam no estado de confluência ideal. Seguidamente ao processo de recolha das células, descrito anteriormente, a suspensão celular correspondente às três linhas celulares foi quantificada (Figura 4). Para tal, 10  $\mu$ L da suspensão foram misturados com 10  $\mu$ L de azul tripano a 0,4% (Merk® - Darmstadt, Alemanha) num tubo de *ependorf*, permitindo a sinalização das células vivas. Após a ressuspensão, 10  $\mu$ L da mistura foram transferidos para uma câmara de *Neubauer* e procedeu-se à contagem, determinando o número de células presente num mililitro.

De acordo com a linha celular em análise, diluiu-se a suspensão, de forma a obter a densidade celular desejada, garantindo que cada poço de uma placa de 96 poços contivesse, para as células L929, HaCaT e RAW 264.7, respetivamente,  $1,0 \times 10^4$  células,  $2,0 \times 10^4$

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

células e  $2,5 \times 10^4$  células, em 100  $\mu\text{L}$  de suspensão. Para cada linha celular, foram semeadas três placas estéreis de 96 poços, correspondentes aos três extratos em estudo, e incubaram-se durante 24 horas a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **Exposição das células aos diferentes estímulos**

Após o período de incubação, foram preparadas as concentrações correspondentes a cada um dos extratos em estudo, por meio de diluições sucessivas 1:2. As diluições foram realizadas em tubos de *ependorf* de 1,5 mL, sendo que, no primeiro foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 700  $\mu\text{L}$  de extrato. Nos restantes tubos, foram colocados apenas 700  $\mu\text{L}$  de meio, tal como demonstrado na representação esquemática do ensaio na Figura 4.

Consequentemente, fez-se a homogeneização do conteúdo presente no primeiro tubo e transferiu-se 700  $\mu\text{L}$  da mistura para o segundo tubo. Este procedimento foi repetido para obter oito concentrações, variando de 4,0 a 0,03 mg/mL, com a adição de dois controlos: o controlo de solvente na maior concentração utilizada, que conteve água estéril e meio de cultura, e o controlo negativo de citotoxicidade, constituído na sua totalidade por meio de cultura.

Após a preparação dos estímulos, removeu-se o meio das placas semeadas, mantendo as células aderidas no fundo. Por fim, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  dos respetivos estímulos e controlos previamente preparados e incubou-se a placa durante 24 horas a 37°C com 95% de humidade e 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **Preparação e colocação do MTT nas células**

No terceiro e último dia do ensaio, os estímulos foram removidos e de seguida, fez-se uma lavagem das células com 150  $\mu\text{L}$  de PBS, (solução salina com tampão fosfato), [1,37 M de NaCl (FisherChemical - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América) com 27 mM de KCl (ChemLab - Zedelgem, Bélgica), 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (FisherChemical) e 20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (ChemLab)], para garantir que nenhum resíduo de extrato pudesse interferir com a conversão do MTT.

Seguidamente, adicionou-se em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de MTT (Alfa Aesa®- Haverhill, Massachusetts, EUA), previamente preparado em meio incompleto e na concentração final de 1 mg/mL, e colocaram-se as placas a incubar, revestidas com papel de alumínio, durante 3 horas a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$ .

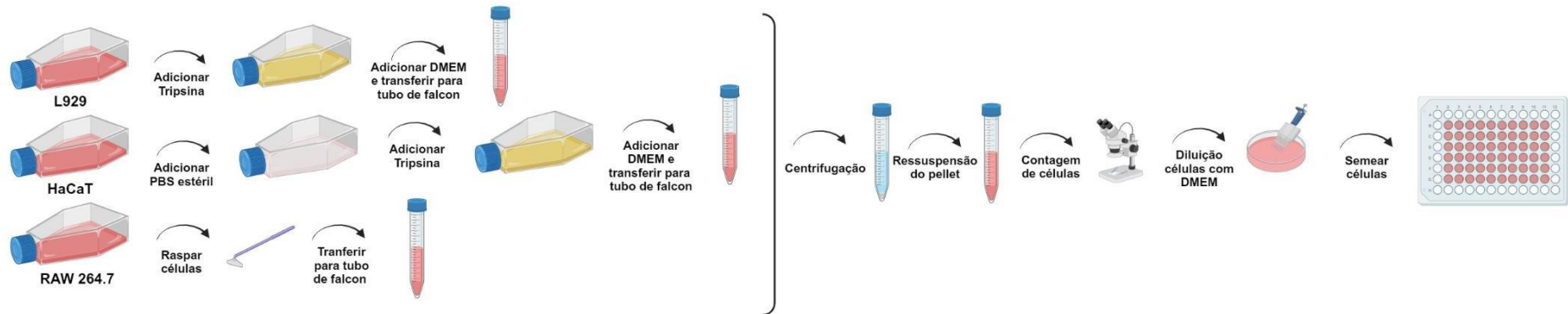
Terminado o período de incubação, removeu-se a solução de MTT e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol (FisherChemical) em cada poço, que foi posteriormente ressuspendido, de

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

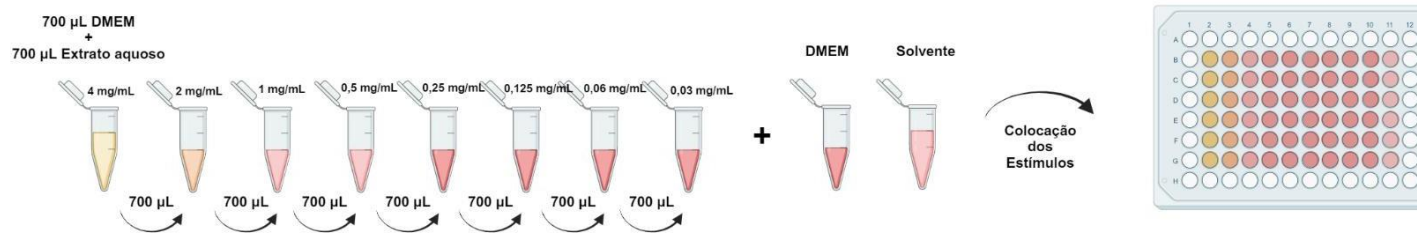
forma a promover a solubilização dos cristais de formazano. No final, recorrendo a um espectrofotómetro, fez-se a leitura das absorvâncias a um comprimento de onda específico, nomeadamente 570<sub>nm</sub> e 650<sub>nm</sub>.

## Esquema representativo da metodologia aplicada no ensaio de citotoxicidade

### Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços



### Colocação dos estímulos nas células



### Preparação e colocação do MTT nas células

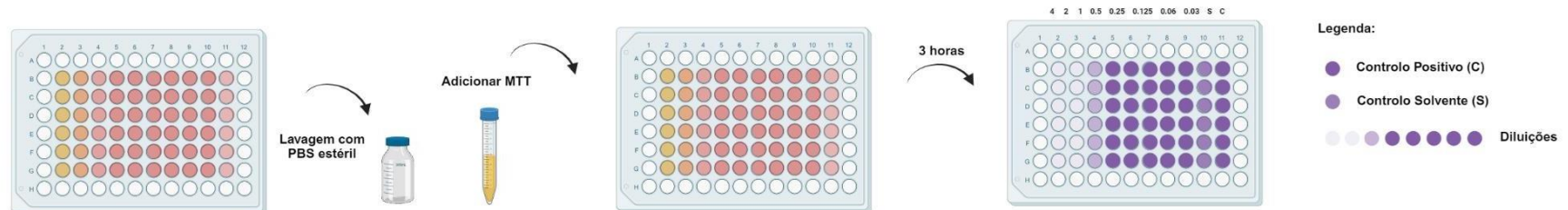


Figura 4 – Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de MTT, elaborado no programa BioRender.

### **3.7.4 Tratamento de Resultados**

Para cada ensaio realizado, foram semeadas três placas de 96 poços, correspondentes aos três extratos em estudo. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes para cada extrato, em sextuplicado. De forma a validar os resultados, o desvio padrão teve de se apresentar inferior a 20% em todas as condições testadas.

Relativamente ao tratamento de dados, recorreu-se ao programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e GraphPad (Prism 8.0.1, GraphPad Software) para proceder à análise estatística e elaboração de gráficos. Os resultados foram normalizados ao controlo negativo (células mantidas apenas em meio de cultura), onde a viabilidade celular é máxima, e apresentados em gráficos de barras, que relacionou a percentagem de viabilidade celular obtida para cada condição experimental, com as diferentes concentrações do extrato em estudo.

Com base no gráfico obtido, realizou-se uma análise estatística, utilizando ANOVA unidirecional. Por fim, a partir da percentagem de viabilidade celular para cada concentração, foi gerada uma curva sigmoideal, que permitiu a determinação da concentração inibitória capaz de inibir 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>), para cada extrato.

## **3.8 Determinação da atividade anti-inflamatória**

### **3.8.1 Produção de Óxido Nítrico**

Ao longo do trabalho prático foi também avaliada a atividade anti-inflamatória dos três extratos aquosos em estudo, quantificando a produção de óxido nítrico produzido pela linha celular de macrófagos de ratinho (RAW 264.7 ATCC® TIB-71™).

Esta avaliação baseia-se na capacidade de as células em estudo produzirem uma resposta pró-inflamatória, após exposição ao lipopolissacarídeo (LPS).

A quantificação de óxido nítrico foi realizada utilizando o reagente de Griess, que é composto pela combinação de dois reagentes distintos (A+B):

O reagente A é uma solução de sulfanilamida a 1 % (p/v) (Sigma-Aldrich®) em ácido Fosfórico a 5% (v/v) (Sigma-Aldrich®).

O reagente B é uma solução de N-1-naftilenodiamina a 0,1% (p/v), preparada em água desmineralizada. Ambas as soluções foram armazenadas a 4°C num frasco envolvido em papel de alumínio, até à sua utilização.

A quantificação de nitritos foi realizada através da medição da absorvância a 550nm, tendo como padrão uma reta de calibração obtida com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>).

### **3.8.1.1 Metodologia do ensaio de quantificação da produção de óxido nítrico**

#### **Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços**

À medida que as células atingiam o seu ponto de confluência, estavam aptas para a realização do ensaio. No primeiro dia, as placas de 96 poços foram preparadas com uma densidade correspondente a  $1,0 \times 10^5$  células por poço e foram incubadas durante 24h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **Exposição das células aos diferentes estímulos**

Decorridas as 24 horas, procedeu-se à elaboração das sucessivas diluições com concentrações entre 0,06 a 4,0 mg/mL, com um volume final de 350 µL, e fez-se a preparação correspondente ao controlo positivo de produção de óxido nítrico (meio DMEM com adição de LPS), controlo negativo (meio DMEM), controlo de solvente (meio DMEM + LPS com adição de H<sub>2</sub>O) e controlo de eficácia (meio DMEM + LPS com adição de Dexametasona (10 µM), um corticoide com ação anti-inflamatória), tal como demonstrado na Figura 5.

De seguida, em 3 placas de 96 poços, foram adicionados os estímulos (100 µL por poço), correspondentes a cada extrato aquoso de folha de medronheiro, e respetivos controlos. Incubaram-se as placas durante 10 minutos, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, de modo a permitir a exposição das células aos estímulos e criar um ambiente propício para induzir a inflamação. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de LPS ficando na concentração final de 1 µg/mL em todos os poços, com exceção do controlo negativo, e incubaram-se novamente as placas por 24 horas.

#### **Ensaio colorimétrico de Griess**

No último dia de ensaio, o sobrenadante foi recolhido para poços vazios da placa de 96 e fez-se uma primeira leitura das placas a uma absorvância de 550<sub>nm</sub>, de modo a descartar a interferência da cor do extrato no tratamento de resultados. Após essa análise, e já com o reagente de Griess à temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL do mesmo aos sobrenadantes recolhidos. Depois de reservar as placas em papel de alumínio e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos, fez-se novamente a leitura no espectrofotómetro nas mesmas condições de absorvância definidas anteriormente.

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

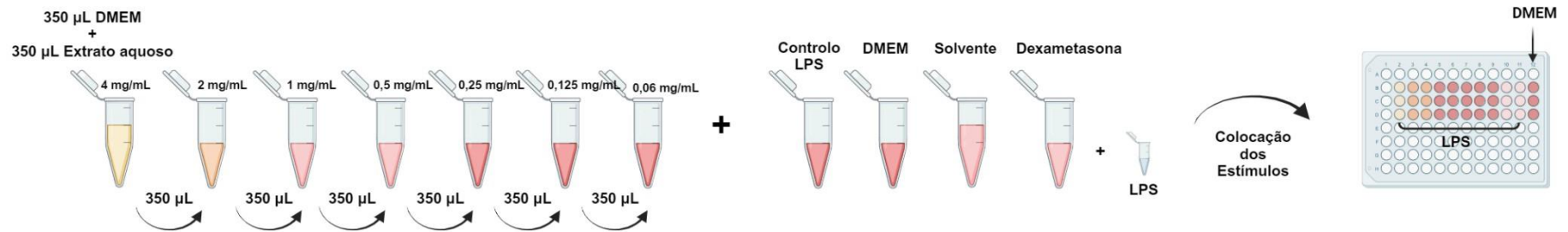
Os níveis de nitritos presentes no sobrenadante foram quantificados recorrendo a uma reta de calibração, previamente construída através da adição do reagente de Griess ao padrão  $\text{NaNO}_2$  a diferentes concentrações.

## Esquema representativo da metodologia aplicada no ensaio de determinação da atividade anti-inflamatória

### Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços



### Colocação dos estímulos nas células



### Ensaio Colorimétrico de Griess

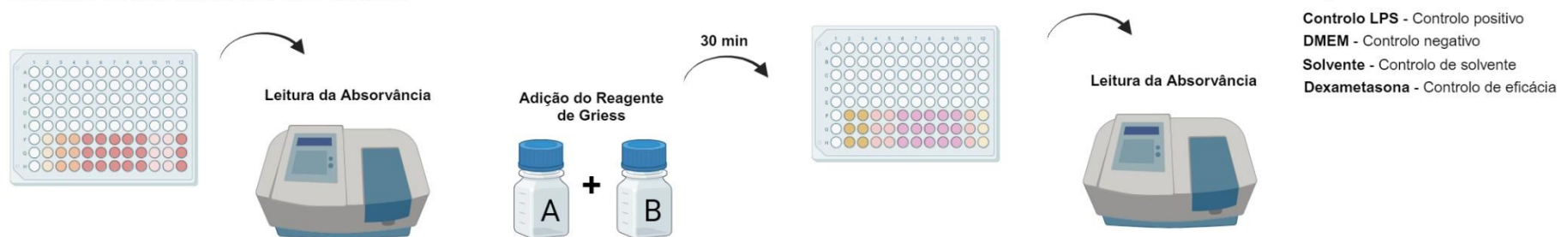


Figura 5 – Representação esquemática da metodologia aplicada durante a realização do ensaio de quantificação da atividade anti-inflamatória, elaborado no programa BioRender.

### **3.8.1.2 Tratamento de resultados**

Os resultados foram obtidos através da realização de pelo menos três ensaios independentes, com obtenção de desvio padrão inferior a 20 % em todos os parâmetros. Cada condição foi testada em triplicado em cada ensaio. Os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365), enquanto a análise estatística e a construção de gráficos foram efetuadas através do programa GraphPad (Prism 8.0.1, GraphPad Software). Os resultados foram normalizados ao controlo positivo (onde a produção de óxido nítrico é máxima) e o respetivo gráfico relacionou a percentagem de produção de óxido nítrico com as diferentes concentrações de extrato testadas. Foi ainda feita uma análise estatística (ANOVA unidirecional) para avaliar alterações significativas na produção de óxido nítrico após exposição aos extratos. Através da percentagem de produção de óxido nítrico, construiu-se uma curva sigmoideal e determinou-se a concentração necessária para reduzir, em metade, a produção máxima de óxido nítrico, ou seja, o EC<sub>50</sub> de cada extrato.

### **3.8.2 Determinação da Atividade *Scavenging***

Ao verificar uma redução na quantidade de óxido nítrico produzido, foi realizada uma avaliação adicional, denominada de atividade *Scavenging*. Neste ensaio *in chemico* (sem o uso de células), foi medida a capacidade dos extratos aquosos em estudar de captarem o óxido nítrico do meio, que foi libertado por um dador externo, S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, Sigma-Aldrich).

Ao comparar estes resultados com os obtidos no ensaio celular, pode-se determinar se a redução dos níveis de óxido nítrico se deve apenas à capacidade dos extratos em removê-lo do meio, ou se a diminuição é realmente causada pela inibição da sua produção.

#### **3.8.2.1 Metodologia para a determinação da atividade *Scavenging***

##### **Preparação das diluições**

Tal como no ensaio celular anterior, foram preparadas sete diluições sucessivas, com concentrações entre 0,06 e 4,0 mg/mL, e três controlos, que corresponderam ao controlo negativo, composto apenas por meio de cultura; ao controlo positivo, que conteve meio de cultura e reagente SNAP, e por fim, um controlo de solvente, constituído por meio de cultura e água juntamente com o reagente SNAP.

Para a preparação das diluições, foram colocados 350 µL de meio e 350 µL de extrato no primeiro tubo de *ependorf*, a solução foi agitada e, posteriormente, foram transferidos 350

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

$\mu\text{L}$  para o segundo tubo e assim sucessivamente para as restantes diluições. Numa placa de 96 poços, foram pipetados 300  $\mu\text{L}$  em cada poço, correspondentes a cada diluição e controlo, e, de seguida, foi adicionado 1,8  $\mu\text{L}$  de reagente SNAP a cada diluição e controlo positivo. Por fim, a placa foi incubada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 3 horas.

### **Ensaio colorimétrico de Griess**

Após 3 horas, os 300  $\mu\text{L}$  correspondentes a cada poço foram distribuídos por três poços (100  $\mu\text{L}$  em cada poço) e foi feita uma leitura da absorvância no espectrofotómetro de microplacas a um comprimento de onda de 550<sub>nm</sub>, para verificar a interferência de cor dos extratos. Feita essa análise, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess em cada poço, e incubou-se as placas à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos. Após esse tempo, fez-se novamente uma leitura no espectrofotómetro a 550<sub>nm</sub>.

### **3.8.3 Tratamento de Resultados**

Os resultados foram obtidos através da realização de dois ensaios independentes em triplicado, os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365), enquanto a análise estatística e a construção de gráficos foram efetuadas através do programa GraphPad (Prism 8.0.1, GraphPad Software).

Os valores obtidos durante a leitura espectrofotométrica na absorvância a 550<sub>nm</sub> foram aplicados na reta de calibração padrão de NaNO<sub>2</sub>.

De seguida, os valores foram normalizados pelo controlo positivo (com reagente SNAP), e foram utilizados para a construção de um gráfico de barras que relacionava a percentagem de nitritos presentes por adição do dador SNAP, com as diferentes concentrações dos extratos em estudo. Diferenças significativas nos níveis de nitritos foram avaliados através de análise estatística (ANOVA unidirecional).

### **3.9 Determinação da atividade cicatrizante**

Para a avaliação do potencial de cicatrização, foi avaliada a migração celular pelo ensaio “*scratch-wound*”, utilizando a linha celular de fibroblastos de rato (L929 ATCC-CCL-1).

### **3.9.1 Metodologia do ensaio de migração celular**

#### **Tratamento das células e preparação da placa de 12 poços**

Antes de iniciar o ensaio, foram traçadas duas linhas paralelas no fundo de cada poço de placas de 12 poços, com um bisturi, atuando como eixo de orientação para a aquisição de imagens. O procedimento iniciou-se após verificar que o frasco de cultura, previamente cultivado, estava no estado de confluência desejado. Seguidamente, após o processo de tripsinização das células, a suspensão celular foi quantificada e preparadas as placas de 12 poços com uma densidade celular de  $2,5 \times 10^5$  células por poço, em meio de cultura completo, sendo que, cada poço conteve 1 mL de suspensão. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **Preparação dos estímulos**

Para preparar os estímulos, foi necessário utilizar meio com baixo teor de soro (2% de FBS), porque neste ensaio o objetivo era analisar apenas o efeito de migração, e não da proliferação celular. Foram testadas duas concentrações por extrato, em duplicado, correspondentes à primeira concentração que se mostrou biocompatível nos ensaios de avaliação da citotoxicidade (0,5 mg/mL) e à sua diluição de 10x (0,05 mg/mL). Foram também preparados controlos de meio (só com meio DMEM) e controlos de solvente (meio DMEM com H<sub>2</sub>O correspondente ao volume da maior concentração de extrato testada). Após este processo, reservaram-se os estímulos no frigorífico a 4°C até à sua utilização.

#### **Exposição das células aos diferentes estímulos**

No segundo dia de ensaio, já com as placas no seu ponto ideal de confluência, foi feita uma ferida artificial, arranhando perpendicularmente as células com uma ponta de pipeta de 20 µL. As células foram cuidadosamente lavadas com PBS estéril pré-aquecido, de forma a remover os detritos celulares e, posteriormente, foram expostas às diluições dos extratos e controlos, previamente aquecidos a 37°C.

Após a adição dos estímulos, e contabilizando o tempo a zero horas, foram tiradas quatro fotografias representativas por poço, recorrendo a um microscópio invertido (Olympus Model IX51) com ampliação 5x. Passadas oito horas e doze horas, a mesma área foi fotografada, utilizando o eixo traçado como guia. Contudo, após o primeiro ensaio verificou-se que ao fim das 12 horas, muitas feridas já se encontravam completamente fechada, o que

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

impediu a contabilização da área de migração celular. Assim, foi escolhido o tempo de 8 horas para avaliação do potencial de migração celular.

### 3.9.2 Tratamento de Resultados

A área da ferida foi quantificada através do software FIJI (ImageJ), os dados foram tratados no programa Microsoft Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365) e a análise estatística e a construção de gráficos foram efetuadas através do programa GraphPad (Prism 8.0.1, GraphPad Software). Para a quantificação da área da ferida, após fotografar as quatro secções por poço de todos os extratos e controlos ao fim de zero horas e oito horas, o tratamento das imagens foi feito através do programa ImageJ, e a área da ferida foi contabilizada. Posteriormente, a percentagem de cicatrização da ferida foi normalizada em relação ao controlo de meio e foi determinada através da seguinte equação (2):

$$\text{Migração celular (\%)} = [100 - \left(\frac{\text{área da ferida } t = 8h}{\text{área da ferida } t = 0h}\right) \times 100] \quad (2)$$

No programa GraphPad foi elaborado um gráfico de barras que relacionava a percentagem de migração celular com as diferentes concentrações testadas. Diferenças significativas na migração celular foram avaliadas através de análise estatística (ANOVA unidirecional).

## Folha em branco

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Preparação dos extratos aquosos

A crescente procura por cosméticos mais eficazes, seguros e sustentáveis motiva o estudo de novos ingredientes na indústria cosmética e/ou farmacêutica. O mercado procura inovações que ofereçam melhores resultados, atendam a regulamentações mais rigorosas e satisfaçam o consumidor moderno, que está mais consistente sobre os impactos ambientais e a composição dos produtos. Nesse contexto, os ingredientes naturais destacam-se pela sua percepção de segurança, benefícios tradicionais e apelo sustentável (Michalak, M. 2023).

Posto isto, existem diversos métodos para obter os ingredientes naturais de plantas através da infusão, decocção, maceração, destilação ou prensagem. A infusão envolve a imersão das partes suaves da planta, nomeadamente folhas e flores, em água enquanto a decocção é aplicada às partes mais duras da planta, como raízes e cascas. A maceração utiliza solventes orgânicos para extrair compostos que não são solúveis em água, a destilação serve para obter óleos essenciais e a prensagem é utilizada para extrair óleos de frutas e sementes, através da aplicação de pressão. Dessa forma, os extratos obtidos podem ser classificados em aquosos, etanólicos, glicólicos, oleosos ou secos (Nortjie, E., Basitere, M., Moyo, D. and Nyamukamba, P. 2022).

Muitos investigadores estão atualmente focados na substituição de solventes nocivos por solventes ecológicos. O etanol é reconhecido como um solvente “verde” e oferece maior segurança industrial. Por outro lado, a água apresenta um impacto ambiental reduzido e é barata em termos de produção, transporte e descarte. Assim, a possibilidade de modificar as propriedades físico-químicas da água, variando condições como a temperatura e a pressão, aumentou o interesse no seu uso como solvente de extração (Habachi, E., Rebey, I. B., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Sawsen, S., Msaada, K., Merah, O. and Bourgou, S. 2022). E por esse motivo, os extratos em estudo foram obtidos através do método de extração aquosa, com filtração a vácuo, seguido de um processo de liofilização.

A percentagem de liofilização calculada com base no conteúdo líquido antes de sofrer o processo de liofilização e no extrato seco obtido após o processo, foi a mesma para os três extratos em estudo (99,7%), enquanto o rendimento de extração para o extrato de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia, foi respetivamente 13,7%, 12,7% e 10,4%. A ligeira diferença nos rendimentos entre os três extratos, pode estar relacionada com a fase de desenvolvimento em que a planta se encontrava, as condições ambientais a que esteve sujeita durante o seu crescimento, e o método de secagem adotado antes da extração.

Estes resultados mostraram-se consistentes com a literatura para espécies similares, onde se obtiveram rendimentos de 12,5% e 18%, indicando uma eficiência adequada do processo de extração utilizado (Mekhfí, H., ElHaouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A. and Legssyer, A. 2006, Kachkoul, R., Squalli Housseini, T., Mohim, M., El Habbani, R., Miyah, Y. and Lahrichi, A. 2019).

## 4.2 Análise Fitoquímica

Os compostos maioritários presentes nos extratos têm um papel relevante para a sua bioatividade, e por esse motivo, começámos por obter a caracterização do perfil fitoquímico de três extratos aquosos de folhas de *A. unedo*, recorrendo às técnicas de HPLC-PDA-MS/MS e GC-MS, através de uma parceria com a Universidade de Turim. Os perfis cromatográficos de cada extrato, bem como a lista de compostos identificados em cada extrato pelas diferentes técnicas encontra-se no Anexo I.

Relativamente à análise por HPLC-PDA-MS/MS, o cromatograma apresenta 45 picos, onde dentro destes, alguns compostos estiveram presentes em co-eluições, obtendo um total de 51, 49 e 50 compostos para o extrato de Odemira, Gouveia e Proença-a-Nova, respetivamente. Dos 51 compostos identificados, 8 foram confirmados por padrões comerciais, 11 não foram identificados e os restantes foram identificados presuntivamente através da literatura. Verificou-se que os extratos analisados são constituídos principalmente por ácidos fenólicos, catequinas e flavonoides, nomeadamente: ácido galoilquínico, procianidina B1, (+)-catequina, miricetina-3-O-glicosídeo, quercetina - 3 - glicosídeo, kaempferol - 3 - O - rutinoside, quercetina-3 - O - ramnosídeo, kaempferol - 3-O-rhamnosídeo e ácido elágico.

Dentro destes compostos, galloyl-hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-glucose (identificação presuntiva) e quercetina-3 - O - ramnosídeo (quercitrina, confirmada por padrão comercial), foram os mais característicos.

Para complementar estes resultados, foi realizada uma análise por GC-MS dos extratos aquosos. Um total de 16 picos foram identificados no perfil cromatográfico.

Como composto típico do género *Arbutus*, também se verificou a presença de um derivado glicosilado da hidroquinona (hidroquinona-O-glicosídeo). O facto de este composto estar presente nos extratos aquosos em estudo, indica provavelmente a presença de arbutina na amostra original, um ingrediente bastante relevante em aplicações cosméticas (Morales, D. 2022), que pode contribuir para a forte atividade antioxidante demonstrada por estes extratos e que será apresentada e discutida abaixo (Pavlović, D. R., Branković, S., Kovačević, N., Kitić, D. and Veljković, S. 2011).

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

A composição fitoquímica dos extratos das folhas de *A. unedo* encontrada na literatura, apresenta semelhanças com as amostras em estudo, com a presença principal de compostos polifenólicos, tais como ácidos fenólicos e flavonoides, onde os principais componentes encontrados nas folhas foram arbutina, seguido da catequina e galato de etila (Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P. and Carvalho, M. 2011, Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C. and Miguel, M. G. 2013, Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F. and Duarte, A. P. 2018, Kachkoul, R., Squalli Housseini, T., Mohim, M., El Habbani, R., Miyah, Y. and Lahrichi, A. 2019). Os polifenóis, em particular, são mencionados como os principais componentes fitoquímicos, que conferem ao medronheiro o seu potencial farmacológico (Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F. and Duarte, A. P. 2018). Contudo, segundo um estudo efetuado, os autores relataram que a concentração dos compostos varia ao longo do ano, sendo que em janeiro verificaram as maiores concentrações de quercitrina e em junho, julho e outubro, verificaram as concentrações mais elevadas de ácido clorogénico (Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. 2014). As amostras para este estudo foram colhidas em novembro. Isto indica que, o mês de colheita influenciou os compostos encontrados, e pode justificar as diferenças encontradas comparativamente com os extratos descritos na literatura.

Até à data, houve um estudo em que se analisaram extratos metanólicos por recurso a GC-MS que descreveu a presença de arbutina e hidroquinona (Jurica, K., Karačonji, I. B., Šegan, S., Opsenica, D. M. and Kremer, D. 2015). No presente estudo, a arbutina foi potencialmente identificada por GC-MS. Não foi detetada por HPLC-PDA-MS/MS possivelmente devido à polaridade do composto e do sistema cromatográfico utilizado, de fase reversa, que faz com que os compostos mais polares eluam primeiro a baixos tempos de retenção, sugerindo que o composto possa ter eluído logo ao início da corrida.

A partir da comparação dos cromatogramas de HPLC, pode-se sugerir que existem algumas diferenças quantitativas entre as três amostras, mas uma análise quantitativa mais precisa deve ser realizada, utilizando um método de calibração com padrões externos. Contudo, as amostras são qualitativamente semelhantes

Outra descoberta relevante, refere-se à falta de estabilidade dos extratos à temperatura ambiente, confirmada pelas diferenças nos perfis cromatográficos obtidos com o mesmo extrato, após ter sido mantido a 25°C, durante uma semana. Essas análises mostraram a perda de alguns compostos, possivelmente significativos em termos de potencial bioativo. Curiosamente, os extratos não seguiram o mesmo perfil quanto à perda de estabilidade, pois os compostos perdidos não foram os mesmos entre os três extratos. A preparação de extratos aquosos e o seu uso extemporâneo durante o processo de produção de cosméticos pode ser uma alternativa para garantir a qualidade e a estabilidade química dos mesmos.

### 4.3 Atividade antioxidante

Para avaliar o potencial antioxidante correspondente aos três extratos em estudo, começamos por testar os extratos filtrados e não filtrados, com doze diluições em metanol, com concentrações compreendidas entre 0,1 e 0,001 mg/mL.

Os resultados obtidos, revelaram um potencial antioxidante muito forte em todos os extratos, com valores de IC<sub>50</sub> entre 0,004 e 0,006 mg/mL, e com um IAA entre 5,00 e 6,00, tal como demonstrado na Tabela 4.

Segundo a literatura, a atividade antioxidante depende muito da composição dos extratos e das condições de teste, mas ainda assim, estudos já efetuados, revelaram que os extratos nestas condições geralmente apresentam potencial antioxidante forte ou muito forte, com valores de IC<sub>50</sub> entre 0,017 mg/mL, e 0,487 mg/mL, (Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A. and Baptista, P. 2009, Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T. and Ekinçi, N. 2011, Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F. and Duarte, A. P. 2018, Habachi, E., Rebey, I. B., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Sawsen, S., Msaada, K., Merah, O. and Bourgou, S. 2022). Os valores obtidos neste estudo são mais baixos, possivelmente devido à composição química dos extratos que varia em termos de região. Na literatura as folhas estudadas são provenientes da Turquia, sendo que as deste estudo provêm de Portugal (Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T. and Ekinçi, N. 2011).

Tabela 4 – Valores de IC<sub>50</sub> e IAA, correspondentes aos três extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) e respetivo potencial antioxidante.

Extrato	IC <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	IAA	Capacidade Antioxidante
<b>Proença-a-Nova - Filtrado</b>	0,0049	5,0663	Muito forte
<b>Proença-a-Nova – Não Filtrado</b>	0,0042	6,0097	Muito forte
<b>Odemira - Filtrado</b>	0,0057	4,4119	Muito forte
<b>Odemira – Não filtrado</b>	0,0043	5,8219	Muito forte
<b>Gouveia - Filtrado</b>	0,0040	6,4235	Muito forte
<b>Gouveia – Não filtrado</b>	0,0038	6,6146	Muito forte
<b>Ácido ascórbico</b>	0,0019	14,870	Muito forte

Verifica-se desta forma, que os extratos possuem um potencial significativo em neutralizar radicais livres. Este efeito é particularmente relevante para a aplicação dos extratos em produtos cosméticos, onde a proteção contra o stress oxidativo é desejada, para prevenir o envelhecimento celular e outros danos associados aos radicais livres (Gonçalves, S. and Gaivão, I. 2021).

O nível de capacidade antioxidante verificado, é um indicativo da presença de compostos bioativos, como flavonoides, catequinas e ácidos fenólicos, que foram encontrados na caracterização química efetuada, e são reconhecidos por possuírem propriedades antioxidantes.

A comparação entre os extratos na sua forma filtrada (por recurso a filtro de acetato de celulose de 0,22 µm) e não filtrada, deveu-se ao facto da utilização do extrato não filtrado apresentar, teoricamente, algumas vantagens. O processo de filtração pode reter no filtro e por isso levar à perda de possíveis compostos com bioatividade associada, comparativamente com o extrato não filtrado. E por outro lado, a nível industrial, a não utilização do filtro torna o processo menos dispendioso, porque implica o uso de menos material, mais rentável e mais ecológico.

Na análise efetuada, verificou-se que os extratos não filtrados possuem um IAA ligeiramente maior, quando comparado aos extratos filtrados (Tabela 4). Isto comprova que a filtração teve um ligeiro impacto na composição química dos extratos, removendo não só os microrganismos, mas levando à possível retenção de compostos com bioatividade associada. Contudo, os valores de IC<sub>50</sub> são praticamente os mesmos para ambos os extratos e o nível de atividade antioxidante mantém-se.

Mais ainda, a possível perda de alguns compostos deve ser equilibrada com a necessidade de assegurar a qualidade microbiológica, especialmente quando os extratos são destinados a produtos de uso cutâneo. E por esse motivo, optou-se por realizar um ensaio de qualidade microbiológica, para verificar se seria viável utilizar os extratos não filtrados nos ensaios biológicos que se seguiam, que ao nível de eficácia antioxidante se mostraram similares.

#### **4.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos extratos**

Os resultados obtidos no ensaio de qualidade microbiológica para os extratos filtrados e não filtrados, revelaram diferenças significativas na presença de microrganismos, tendo sido observado, nos extratos não filtrados, a presença de bactérias e fungos (Tabela 5).

O extrato de Odemira, não filtrado, não foi concordante com os critérios máximos descritos na monografia 5.1.4 da Farmacopeia Europeia, para a presença de bactérias, tendo apresentado um número de colónias superior ao valor máximo aceite para a tipologia de produtos para uso cutâneo (100), sendo que apresentou 124 UFC, tal como descrito na Tabela 5. Contrariamente, os extratos filtrados não apresentaram UFC, demonstrando assim, a eficácia da filtração em remover partículas e microrganismos que possam estar presentes no extrato bruto.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Tabela 5 – Detecção de bactérias (TSA) e fungos (SDA) presentes nos três extratos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), através da determinação de unidades formadoras de colónias (UFC/mL).

Extrato aquoso	UFC TSA	UFC SDA
<b>Proença-a-Nova - Filtrado</b>	0	0
<b>Proença-a-Nova - Não filtrado</b>	1	0
<b>Odemira - Filtrado</b>	0	0
<b>Odemira - Não filtrado</b>	124	3
<b>Gouveia - Filtrado</b>	0	0
<b>Gouveia - Não filtrado</b>	6	1

Portanto, verifica-se que durante o processo de extração, houve a introdução ou crescimento de microrganismos, possivelmente devido a fatores como contaminação inicial das folhas, condições inadequadas de manuseamento, ou proliferação microbiana durante o armazenamento. Sabendo que a presença destes contaminantes representa um risco para a segurança e qualidade dos produtos que utilizariam este extrato, especialmente em aplicações cosméticas, onde a qualidade microbiológica é crucial, a hipótese da utilização dos extratos não filtrados nos ensaios biológicos posteriores foi anulada.

### 4.5 Atividade antimicrobiana

De modo a aprofundar o conhecimento sobre o potencial bioativo dos extratos em estudo, avaliou-se também a eficácia dos mesmos contra um painel de microrganismos representativos, relevantes para aplicação cutânea. (Tabela 6). Este painel inclui bactérias, fungos e leveduras com relevância para a microbiota da pele e que geralmente podem representar riscos de contaminação, incluindo os microrganismos indicadores do ensaio de eficácia de conservantes (*challenge test*).

Tabela 6 – Estirpes microbianas testadas, sua classificação e respetiva relevância.

Estirpes microbianas	Classificação	Relevância
<b><i>S. aureus</i> ATCC 6538</b>	Bactéria aeróbia Gram +	<i>Challenge test</i>
<b><i>S. epidermidis</i> DSM 28764</b>	Bactéria aeróbia Gram +	Microbiota da pele
<b><i>C. acnes</i> DSM 1897</b>	Bactéria anaeróbia Gram +	Microbiota da pele
<b><i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027</b>	Bactéria aeróbia Gram -	<i>Challenge test</i>
<b><i>E. coli</i> ATCC 8739</b>	Bactéria aeróbia Gram -	<i>Challenge test</i>
<b><i>C. albicans</i> ATCC 10231</b>	Levedura	<i>Challenge test</i>
<b><i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404</b>	Fungo filamentoso	<i>Challenge test</i>

Durante o ensaio, foi avaliado o crescimento dos microrganismos visualmente, através da visualização da turvação presente nos poços, e determinação da CMI visual. Por outro lado, também se avaliou o crescimento através dos gráficos obtidos pela leitura de absorvância

(Figura 8). Foi avaliado também o crescimento posterior dos microrganismos em meio de cultura sólido, para avaliar a CML (Tabela 7).

Tabela 7 - Tabela representativa dos valores de CMI visual (Concentração Mínima Inibitória) e CML (Concentração Mínima Letal) determinados para os diferentes microrganismos em estudo.

	Proença-a-Nova		Odemira		Gouveia	
	CMI (mg/mL)	CML (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CML (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CML (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	2	>4	2	>4	2	>4
<i>S. epidermidis</i>	0.125	2	1	4	1	2
<i>C. acnes</i>	0.5	4	0.5	4	0.5	4
<i>P. aeruginosa</i>	2	4	2	4	1	4
<i>E. coli</i>	>4	>4	>4	>4	>4	>4
<i>C. albicans</i>	4	>4	4	>4	>4	>4
<i>A. brasiliensis</i>	>4	>4	>4	>4	>4	>4

De forma a comparar a atividade dos três extratos, construiu-se um gráfico de barras que relacionou o CMI visual obtido nos diferentes microrganismos em estudo com os extratos de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia (Figura 6).

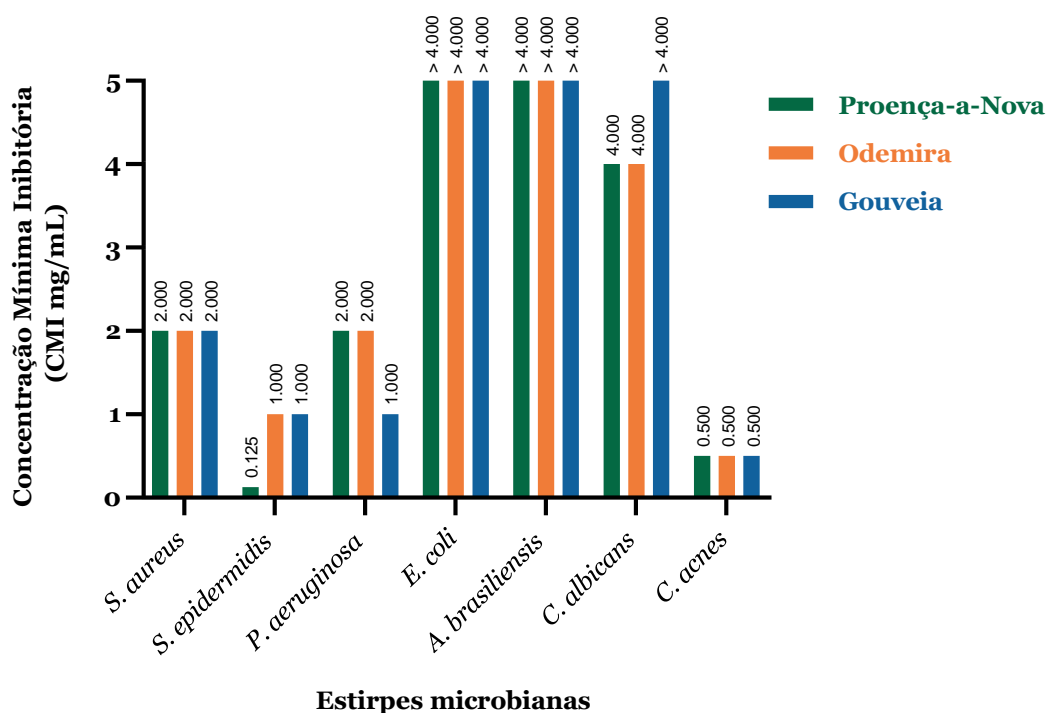


Figura 6 – Representação esquemática dos valores de CMI (mg/mL), correspondentes à resposta dos microrganismos em estudo aos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia). > 4.000 representa a inexistência de CMI, para a gama de concentrações testadas.

Dos resultados obtidos, o *S. epidermidis* DSM 28764 e o *C. acnes* DSM 1897, destacam-se como microrganismos comensais da pele humana (Brown, M. M. and Horswill, A. R. 2020,

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Boyanova, L. 2023) e, foram os que se mostraram mais suscetíveis aos extratos aquosos, apresentando CMI entre 0,125 e 1 mg/mL para os extratos de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia. Verifica-se que o extrato de Proença-a-Nova é o mais ativo (CMI 0,125 mg/mL) quando comparado aos extratos de Odemira e Gouveia, para *S. epidermidis*, apresentando um CMI 8 vezes inferior comparativamente aos restantes extratos.

No que diz respeito à bactéria *S. epidermidis*, esta tem um papel na defesa contra patogénicos e na manutenção da homeostase, desempenhando uma função crucial na modulação da resposta imune inata e no desenvolvimento do sistema imune adaptativo (Brown, M. M. and Horswill, A. R. 2020). Portanto, ao inibir completamente a bactéria, o microbioma cutâneo pode ser alterado, o que pode levar a infeções e, conseqüentemente à obtenção de uma resposta imune menos eficaz (Chandrangsu, P., Rensing, C. and Helmann, J. D. 2017). Por este motivo, dos 3 extratos, o de Proença-a-Nova terá menos interesse para uma possível aplicação na pele por ser menos compatível com a microbiota comensal. Por outro lado, relativamente ao *C. acnes* todos os extratos estão em equilíbrio em termos de inibição.

Os extratos também demonstraram eficácia significativa contra o *S. aureus* ATCC 6538 e a *P. aeruginosa* ATCC 9027, mas com um valor de CMI um pouco mais alto, que variou entre 1 e 2 mg/mL

Em contraste, a *E. coli* ATCC 8739 e o *A. brasiliensis* ATCC 16404, evidenciaram ser os microrganismos mais resistentes aos extratos, apresentando um CMI acima de 4 mg/mL. A *C. albicans* ATCC 10231 não foi afetada pelo extrato de Gouveia, contudo, para os extratos de Proença-a-Nova e Odemira obteve-se um CMI de 4 mg/mL.

Na Tabela 7, estão também representados os resultados obtidos para o ensaio seguinte relativo à determinação da CML. Para os microrganismos representantes da microbiota da pele (*S. epidermidis* e *C. acnes*), os valores de CML corresponderam na sua maioria a três vezes o valor verificado de CMI, o que indica que a concentração necessária para matar os microrganismos é três vezes maior que a concentração necessária para os inibir.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

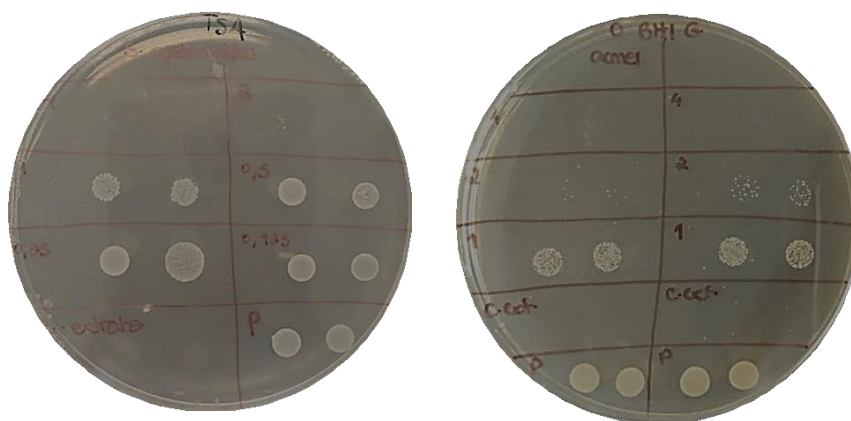
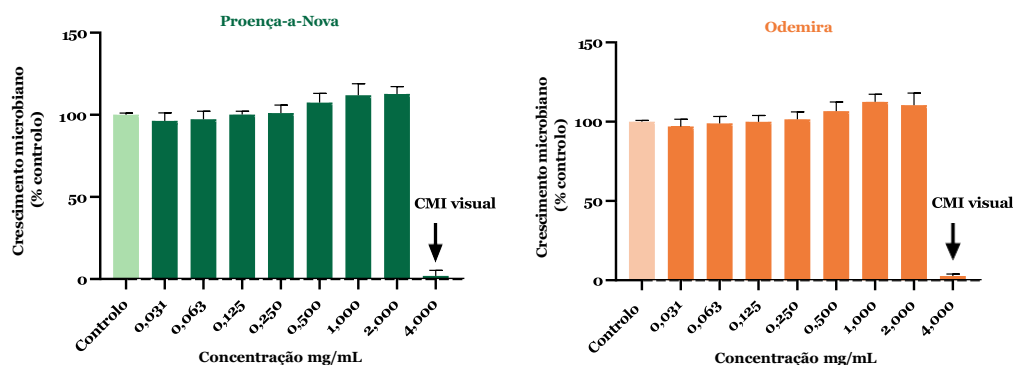


Figura 7 - Representação de um ensaio de determinação de CML, em placas de TSA e BHI, onde foram plaqueadas as suspensões obtidas com as concentrações do extrato imediatamente superiores da CMI, determinada visualmente. Verifica-se que ocorreu crescimento das bactérias *S. epidermidis* e *C. acnes* para algumas concentrações plaqueadas. As concentrações assumidas como CML foram, respetivamente, 2 e 4 mg/mL.

De acordo com a norma M27-A3 relativa ao método de referência para testes de microdiluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras, verifica-se a recomendação da avaliação espectralométrica da inibição da *Candida albicans*, sendo que a norma contempla, para alguns compostos, “uma diminuição proeminente de turbidez” que corresponde a aproximadamente 50% da inibição do crescimento, determinado em espectrofotómetro” (Pfaller, M. A., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Walsh, T. J. and Warnock, D. W. 2002).

Como é visível nos gráficos associados à reação de *C. albicans* ATCC 10231 aos extratos aquosos (Figura 8), o crescimento microbiano ocorreu em todas as concentrações estudadas com exceção da correspondência à CMI, o que corroborou os resultados determinados por inspeção visual da placa (Tabela 7).



## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

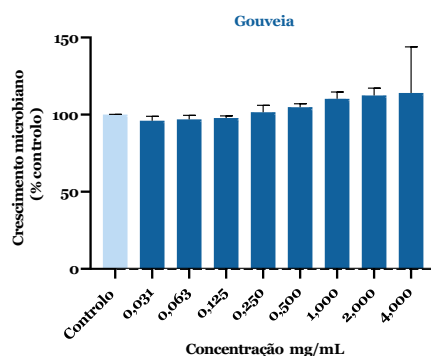


Figura 8 – Crescimento microbiano (% de Controlo) de *Candida albicans* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações dos extratos aquosos de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia. O controlo contém apenas a levedura em meio de cultura (RPMI). Os dados correspondem às médias  $\pm$  DP e são representados como percentagem de crescimento microbiano.

De um modo geral, é perceptível que houve uma diferença significativa entre a suscetibilidade das bactérias Gram-positivas e gram-negativas aos diferentes extratos em estudo.

A atividade antimicrobiana dos extratos contra o *S. aureus* e a *E. coli*, por exemplo, ilustra bem as distinções estruturais e funcionais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A eficácia dos extratos em inibir a *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. acnes* pode ser atribuída à estrutura celular das bactérias Gram-positivas, constituídas por uma camada espessa de peptidoglicanos que, embora seja crucial para a manutenção da integridade celular, oferece uma barreira de permeabilidade limitada, permitindo que compostos antibacterianos penetrem e atuem de modo eficaz (Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F. and Aouni, M. 2007). Em contrapartida, a *E. coli*, que é uma bactéria Gram-negativa comumente encontrada no trato gastrointestinal, não foi afetada pelos extratos. Essa resistência pode dever-se ao facto de as bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa bastante complexa, constituída por uma bicamada fosfolipídica e lipopolissacarídeos. Esta membrana funciona como uma barreira eficaz contra muitas substâncias antibacterianas, especialmente aquelas que são lipofílicas, devido à sua impermeabilidade (Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. and Vuorela, P. 2000).

Relativamente aos resultados obtidos para o *A. brasiliensis*, um fungo omnipresente no solo e um contaminante alimentar muito comum, este não se mostrou sensível à atividade dos extratos aquosos. Este microrganismo apresenta-se como um fungo oportunista, tornando-se causador de doença quando o sistema imunológico se encontra comprometido, e a sua transmissão é feita através de esporos (Patterson, T. F., Thompson, G. R., III, Denning, D. W., Fishman, J. A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Morrison, V. A., Nguyen, M. H., Segal, B. H., Steinbach, W. J., Stevens, D. A., Walsh, T. J., Wingard, J. R., Young, J.-A. H. and Bennett, J. E. 2016, Merad, Y., Derrar, H., Belmokhtar, Z. and

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Belkacemi, M. 2021). O facto de, juntamente com a *E. coli*, se mostrar resistente à atividade dos extratos em estudo implica limitações no seu uso como possíveis agentes conservantes.

Relativamente à *C. albicans*, esta caracteriza-se como sendo um dos patógenos mais prevalentes nos humanos, que prolifera tanto na forma de levedura como em forma de hifa (fungo dimórfico) (Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. 2001, Frazer, C., Joshi, M., Delorme, C., Davis, D., Bennett, R. J. and Allingham, J. S. 2015). A *C. albicans* pode causar infeções superficiais como a candidose oral ou vaginal e/ou infeções sistémicas, descritas como quadros clínicos graves. Os episódios provocados por esta levedura tendem a ocorrer nas áreas húmidas na pele, causando erupções cutâneas, prurido e descamação da pele (Mayer, F. L., Wilson, D. and Hube, B. 2013).

Este microrganismo mostrou-se pouco sensível para os extratos de Proença-a-Nova e Odemira, e revelou-se resistente para o extrato de Gouveia. Isto impede a aplicação dos extratos, para além da aplicação como ativos com atividade conservante, como tratamentos alternativos ou complementares para a candidíase, especialmente em infeções crónicas ou recorrentes.

Da escassa literatura relativa ao efeito antimicrobiano das folhas de *A. unedo*, verifica-se no geral que os perfis antimicrobianos não variam dos aqui reportados, quanto à maior suscetibilidade de bactérias Gram-positivas aos extratos, nomeadamente do género *Staphylococcus* (Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F. and Aouni, M. 2007, Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T. and Ekinci, N. 2011, Coimbra, A. T., Luís, Â. F. S., Batista, M. T., Ferreira, S. M. P. and Duarte, A. P. C. 2020).

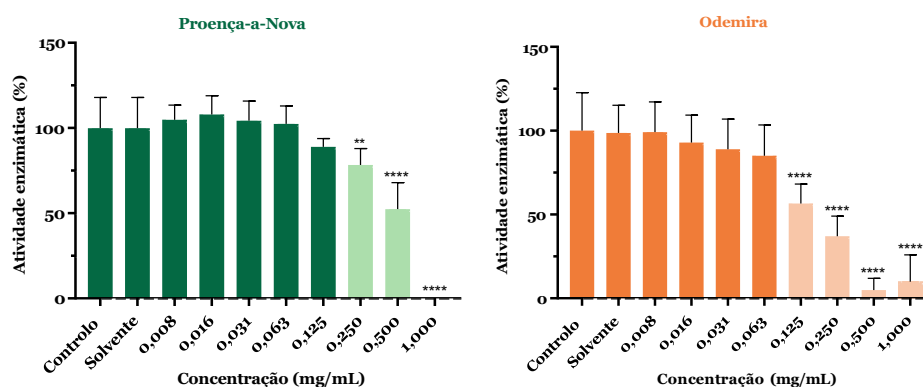
Comprova-se também a baixa atividade contra bactérias Gram-negativas, onde se verificou na literatura que extratos de *A. unedo* não inibiram *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Helicobacter pylori* e *Escherichia coli* (Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T. and Ekinci, N. 2011, Coimbra, A. T., Luís, Â. F. S., Batista, M. T., Ferreira, S. M. P. and Duarte, A. P. C. 2020). Contudo, há variações relativamente à atividade de fungos e leveduras, sendo que alguns estudos comprovam a eficácia de extratos em afetar certos microrganismos, como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Aspergillus parasiticus* (Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T. and Ekinci, N. 2011), enquanto outros revelam inatividade dos extratos contra *C. albicans* (Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F. and Aouni, M. 2007, Coimbra, A. T., Luís, Â. F. S., Batista, M. T., Ferreira, S. M. P. and Duarte, A. P. C. 2020). Atendendo ao facto de não se tratar de métodos de extração aquosos, o tipo de extração pode estar a contribuir para esta variabilidade de resultados.

Atendendo a estes resultados, verificou-se que em termos de atividade antimicrobiana, apesar de os extratos não terem potencial para uma ação conservante, porque não são eficazes contra uma grande maioria do painel de microrganismos do *challenge test*, têm ação contra microrganismos da microbiota da pele, nomeadamente a *C. acnes*.

A *C. acnes* (anteriormente conhecida como *Propionibacterium acnes*), é uma das bactérias mais abundantes na pele, particularmente em regiões sebáceas, como o rosto. A desregulação do crescimento desta bactéria é um dos mecanismos envolvidos na progressão da doença *acne vulgaris*, comumente conhecida por acne. E embora quase todos os adultos sejam colonizados por esta bactéria, apenas uma minoria desenvolve acne, sugerindo que fatores adicionais como a genética, imunidade ou defeitos na barreira cutânea, também desempenhem um papel na progressão da acne (Chandrangsu, P., Rensing, C. and Helmann, J. D. 2017). Do nosso conhecimento não existem ainda na literatura, artigos que tenham estudado a atividade de *A. unedo*, contra *C. acnes*.

#### 4.6 Atividade anti-lipase

Devido à importância da enzima lipase na virulência da bactéria *Cutibacterium acnes*, utilizou-se um modelo *in chemico* com lipase (origem *Candida rugosa*) para prever o potencial anti-lipase dos extratos. A partir dos gráficos obtidos (Figura 9), verificou-se que todos os extratos inibem a enzima, sendo que, através das curvas dose-resposta obtidas para este ensaio (Apêndice I - Concentração de extrato necessária para inibir 50% da atividade enzimática da lipase), o extrato de Odemira destacou-se significativamente, apresentando um maior potencial para inibir a enzima ( $EC_{50}=0,1663$  mg/mL), comparativamente ao extrato de Proença-a-Nova ( $EC_{50}=0,4374$  mg/mL) e ao extrato de Gouveia ( $EC_{50}=0,3915$  mg/mL). Prevê-se assim, um maior potencial do extrato de Odemira para esta bioatividade.



## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

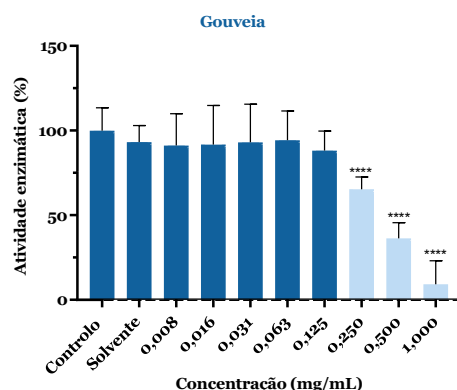


Figura 9 – Atividade enzimática da enzima lipase (% de controlo), após 60 minutos em contacto com diferentes concentrações do extrato de Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia. O controlo positivo de atividade enzimática possui apenas a enzima + substrato (sem inibidor) \*\*\*\* e \*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$  usando ANOVA unidirecional.

Apesar de não existir descrito esta atividade para a espécie de *A. unedo*, várias espécies de plantas apresentam capacidade de inibir esta enzima. Segundo a literatura, a partir de um estudo com diversos extratos de plantas indianas, verificou-se que todas têm capacidade em inibir a enzima lipase, sendo que algumas conseguiram inibi-la na totalidade (Patil, V., Bandivadekar, A. and Debjani, D. 2012).

### 4.7 Atividade citotóxica dos extratos aquosos

A avaliação do potencial citotóxico dos extratos aquosos em estudo foi realizada em três linhas celulares distintas. Inicialmente a viabilidade celular foi testada em fibroblastos de rato, para identificar as concentrações biocompatíveis adequadas para o ensaio de cicatrização, e por ser uma das linhas recomendadas pela ISO/EN 10993-5 como para avaliação da citotoxicidade aguda (ISO 2009). De seguida, a citotoxicidade foi analisada em queratinócitos humanos, modelo que simula o alvo de aplicação dos extratos, considerando um futuro uso tópico. Por último, foi avaliada a toxicidade numa linha celular de macrófagos de rato, com o objetivo de determinar a gama de concentrações biocompatíveis, com vista nos estudos subsequentes de atividade anti-inflamatória.

#### 4.7.1 Biocompatibilidade em fibroblastos de rato (L929)

Relativamente aos resultados obtidos para a linha celular de fibroblastos de rato, dentro da gama de concentrações que foi testada, todos os extratos apresentaram biocompatibilidade abaixo da concentração de 0,5 mg/mL, dado os valores de viabilidade celular se apresentarem acima dos 70%, de acordo com a ISO/EN 10993-5. Com isto, as concentrações entre 1,0 e 4,0 mg/mL revelaram ser citotóxicas. Os extratos de Proença-a-

Nova e Odemira destacam-se nas concentrações mais baixas por apresentaram um aumento na viabilidade celular, em relação ao controlo.

De forma a testar se a citotoxicidade avaliada foi devido ao efeito citotóxico do extrato e não apenas ao efeito da privação do meio de cultura, foi feita uma análise do solvente utilizado na maior concentração, substituindo os extratos por 50 % de água ultrapura.

Através da observação dos gráficos representativos dos valores de viabilidade celular (Figura 10), para o controlo de solvente, verificou-se que na linha celular de fibroblastos, a privação de 50% de meio DMEM afetou as células, reduzindo a viabilidade para valores que variaram entre 56% e 76% quando exposta a este controlo. Ainda assim, o potencial citotóxico de todos os extratos quando utilizados numa proporção de 50% (v/v) mostra-se superior ao do solvente na mesma proporção, pelo que se considera que o efeito se deve à citotoxicidade dos extratos e não ao fator de diluição. Até ao momento, não há relatos na literatura que permitam comparação direta dos efeitos observados, o que reforça a importância deste estudo para a caracterização do efeito citotóxico dos extratos testados.

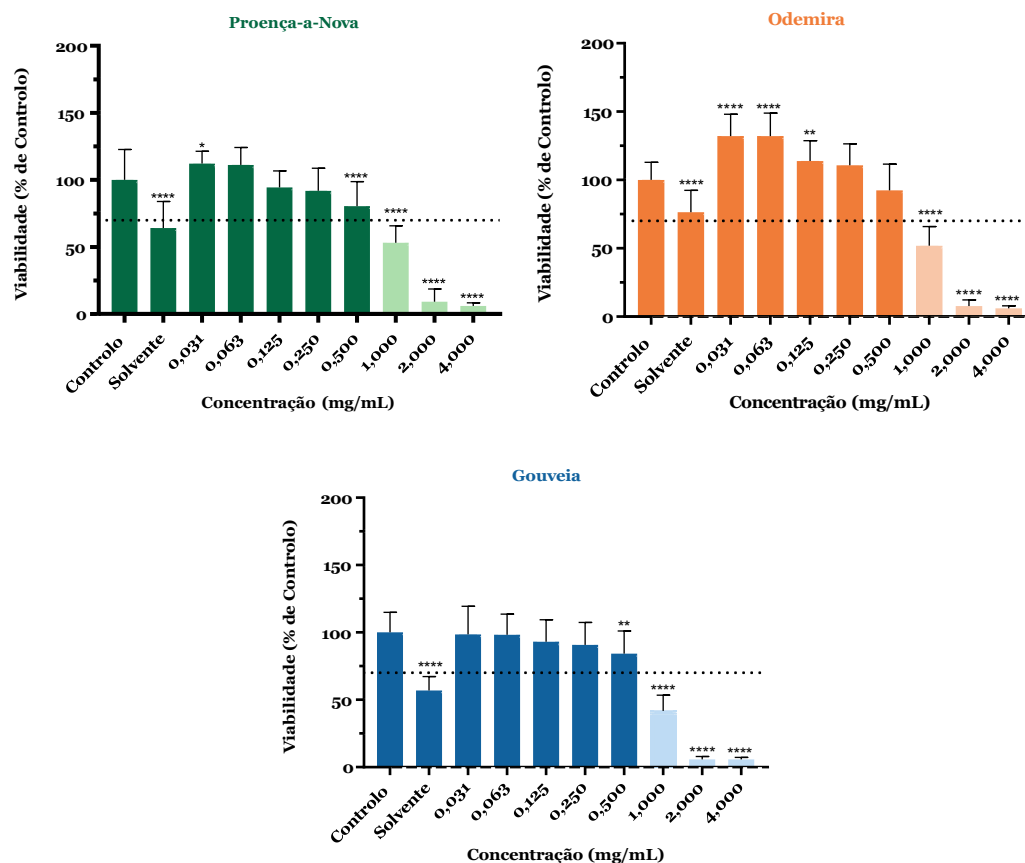


Figura 10 - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na viabilidade celular de fibroblastos de ratinho (ensaio de MTT). Os fibroblastos (L929) foram expostos a diferentes concentrações de extrato, com meio DMEM como controlo positivo de viabilidade \*\*\*\*, \*\* e \* representam alterações

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

estatisticamente significativas quando comparados com o controlo, conforme determinado pelos valores de  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respetivamente, usando ANOVA unidirecional.

### 4.7.2 Biocompatibilidade em queratinócitos humanos (HaCaT)

Para a linha celular de queratinócitos humanos, a conclusão em termos de viabilidade celular foi a mesma que para a linha celular L929, sendo a concentração a 0,5 mg/mL, a primeira biocompatível, para todos os extratos em estudo. Os extratos de Odemira e Gouveia destacam-se por apresentarem um aumento na viabilidade celular, em relação ao controlo, em diversas concentrações biocompatíveis.

Avaliou-se também o efeito gerado pela privação de metade do meio de cultura na linha celular de queratinócitos humanos. Através da observação do gráfico representativo dos valores de viabilidade (Figura 11), para o controlo de solvente, verificou-se que na linha celular em questão, tal como nos fibroblastos a citotoxicidade é causada pelo extrato em si e não pela privação de metade do meio de cultura.

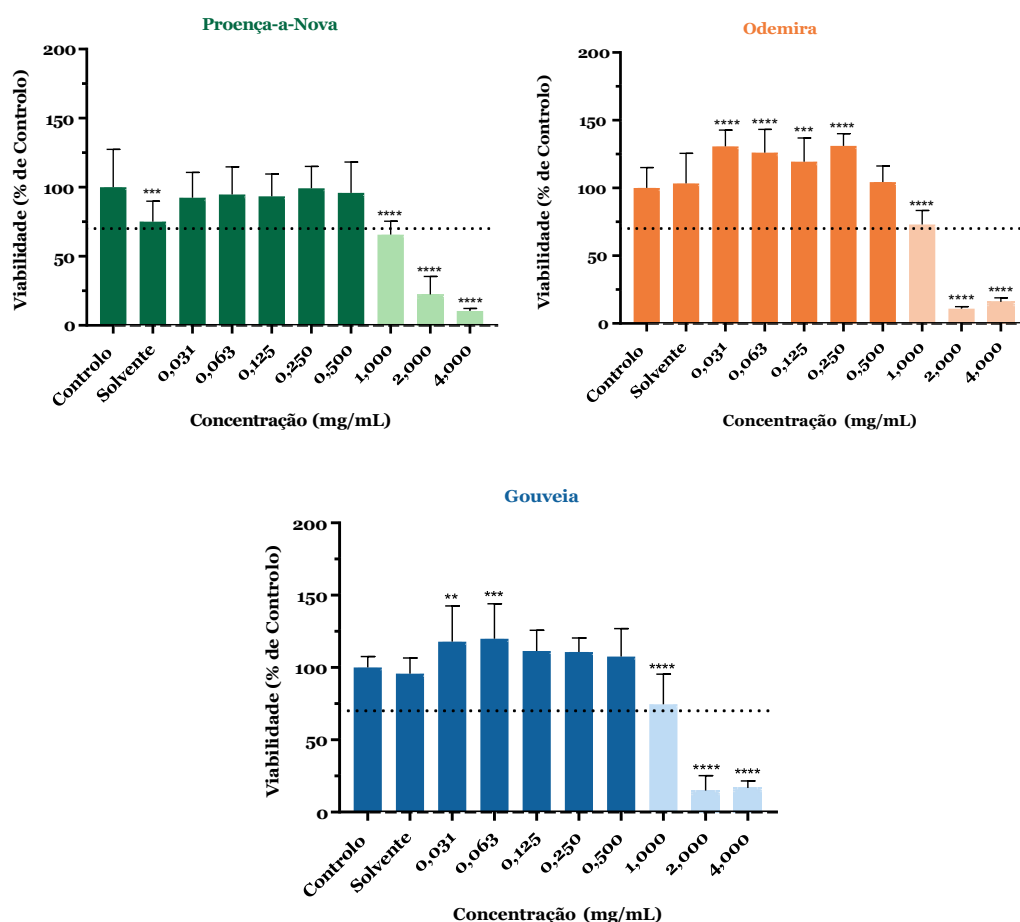


Figura 11 - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na viabilidade celular de queratinócitos humanos (ensaio do MTT). Os queratinócitos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de extrato, com meio DMEM como controlo positivo de viabilidade \*\*\*\*, \*\*\*, \*\* e \* representam

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

alterações estatisticamente significativas quando comparados com o controlo, conforme determinado pelos valores de  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respetivamente, usando ANOVA unidirecional.

### 4.7.3 Biocompatibilidade em macrófagos de ratinho (RAW 264.7)

Quanto à linha celular de macrófagos de ratinho, o perfil também foi muito idêntico ao das linhas celulares HaCaT e RAW 264.7, com a concentração 0,5 mg/mL a ser a primeira biocompatível em todos os extratos aquosos. Para esta linha celular, todos os extratos se destacam por apresentarem um aumento da viabilidade celular em relação ao controlo, em todas as concentrações verificadas como biocompatíveis.

Analisou-se o efeito gerado pela privação de metade do meio de cultura na linha celular, e através da observação dos gráficos representativos dos valores de viabilidade celular (Figura 12), verifica-se que as concentrações citotóxicas dos extratos apresentam valores bem mais reduzidos de viabilidade do que para o solvente, considerando assim que não há influência do solvente para a citotoxicidade e apenas se deve à ação dos extratos.

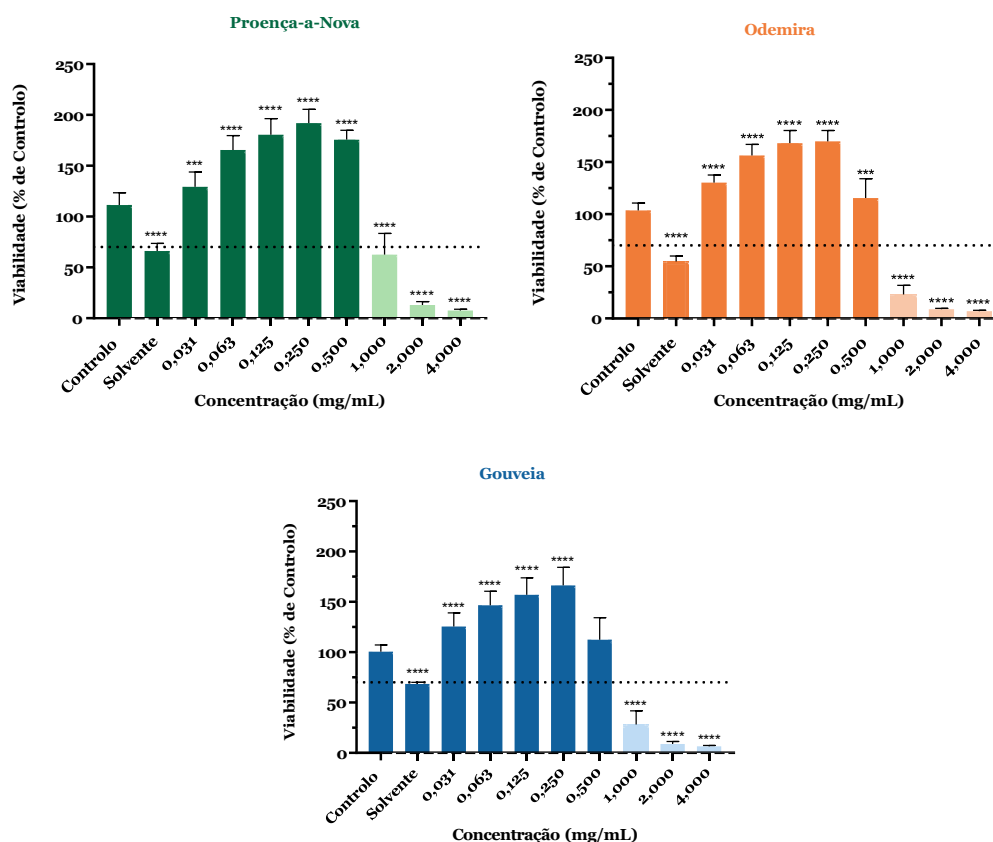


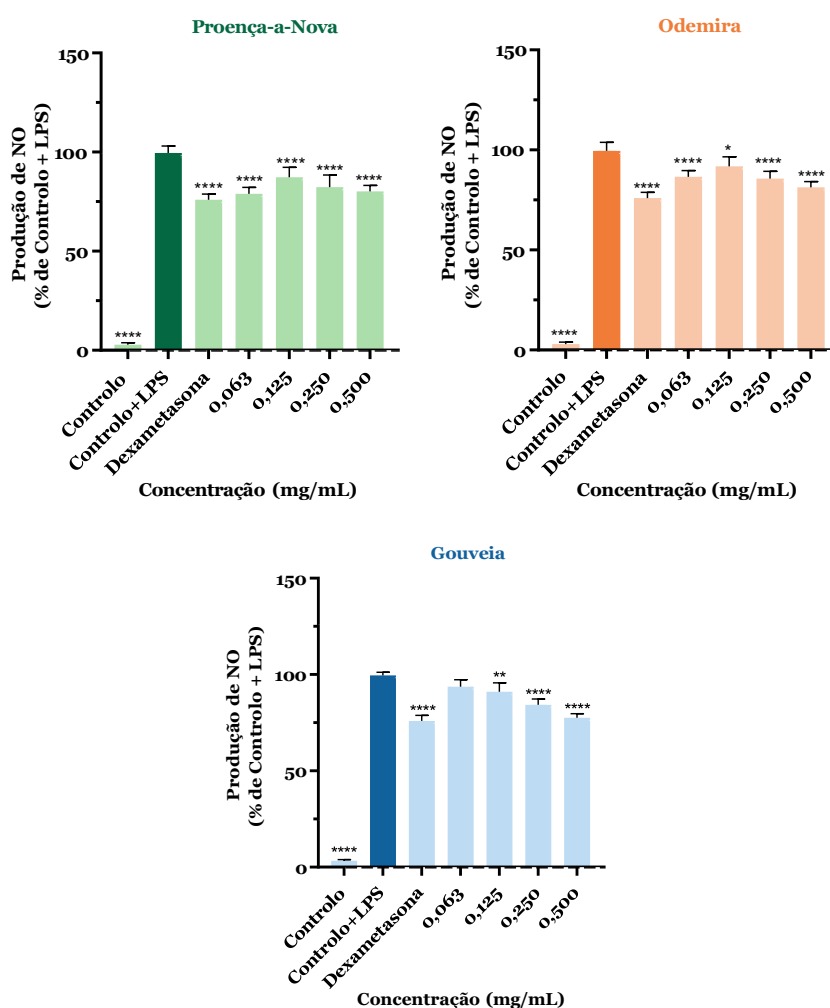
Figura 12 - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na viabilidade celular de macrófagos de ratinho (ensaio do MTT). Os macrófagos (RAW 264.7) foram expostos a diferentes concentrações de extrato, com meio DMEM como controlo positivo de viabilidade. \*\*\*\* e \*\*\* representam uma alteração estatisticamente significativa quando comparado com o controlo, conforme determinado pelos valores de  $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , usando ANOVA unidirecional.

## 4.8 Atividade anti-inflamatória dos extratos aquosos

O potencial anti-inflamatório dos extratos em estudo foi avaliado na linha celular RAW 264.7. Os macrófagos de ratinho foram expostos a um estímulo pró-inflamatório (LPS) na presença dos diferentes extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia). Através da adição dos extratos, foi possível observar a diminuição da produção de NO provocada pelos extratos. O estudo da atividade citotóxica e anti-inflamatória nas células RAW 264.7, permitiu obter uma comparação entre ambos os resultados, de modo a perceber se a diminuição da produção de NO foi influenciada pela viabilidade celular na concentração de extrato utilizada.

### 4.8.1 Influência dos extratos na produção de óxido nítrico

Os gráficos seguintes (Figura 13), são referentes à produção de óxido nítrico pelos macrófagos de ratinho, quando expostos às concentrações biocompatíveis dos extratos aquosos e após a estimulação com LPS, um indutor de resposta inflamatória a nível celular.



## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

*Figura 13* - Efeito dos extratos aquosos (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia) na produção de NO pelas células RAW 264.7. As células foram expostas a meio completo e a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 µg/mL). Foi utilizado um controlo de eficácia (Dexametasona). Os dados correspondem às médias ± DP e são representados como % de células de controlo expostas ao LPS. Também foi incluído controlo sem LPS para avaliar a produção basal de NO. \* e \*\* e \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$  usando ANOVA unidirecional.

De um modo geral, verificou-se que os macrófagos apresentam pouca redução na sua produção de NO, comparativamente aos valores de controlo quando expostos às concentrações biocompatíveis, havendo uma redução de aproximadamente 20% em todos os extratos.

Estudos anteriores relataram que os extratos aquosos das folhas de *A. unedo* são eficazes na redução de marcadores inflamatórios, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , e na diminuição da expressão de iNOS e COX-2, implicando um potencial anti-inflamatório (Mariotto, S., Ciampa, A. R., de Prati, A. C., Darra, E., Vincenzi, S., Segal, M., Cavalieri, E., Shoji, K. and Suzuki, H. 2008). Além disso, indicaram que os extratos podem diminuir a hiperagregabilidade plaquetária, um fator relevante na inflamação (Mekhfí, H., ElHaouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A. and Legssyer, A. 2006, El Haouari, M., López, J. J., Mekhfí, H., Rosado, J. A. and Salido, G. M. 2007). Esses estudos destacam que a planta pode ter efeitos anti-inflamatórios em contextos específicos, que não foram avaliados apenas pela avaliação de nitritos. A ausência de atividade anti-inflamatória nos extratos em estudo pode ter sido influenciada pelo método de extração e pela baixa concentração de compostos bioativos, como o ácido gálico, descritos como responsáveis por desempenhar um papel importante nessa atividade.

### **4.8.2 Atividade Scavenging**

Devido à diminuição da produção de NO verificada no ensaio de atividade anti-inflamatória, recorreu-se a análise complementar da atividade *Scavenging*, de modo a comprovar se a redução observada anteriormente foi devida à diminuição na produção celular de NO, ou se os extratos estavam a interferir diretamente na quantificação de nitritos, captando-os do meio de cultura. Foi realizada uma reação entre um doador de NO (reagente SNAP) e as diferentes concentrações dos extratos aquosos.

Através dos gráficos obtidos (*Figura 14*), verificou-se que os extratos em estudo não apresentaram atividade *Scavenging* na maioria das concentrações testadas.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

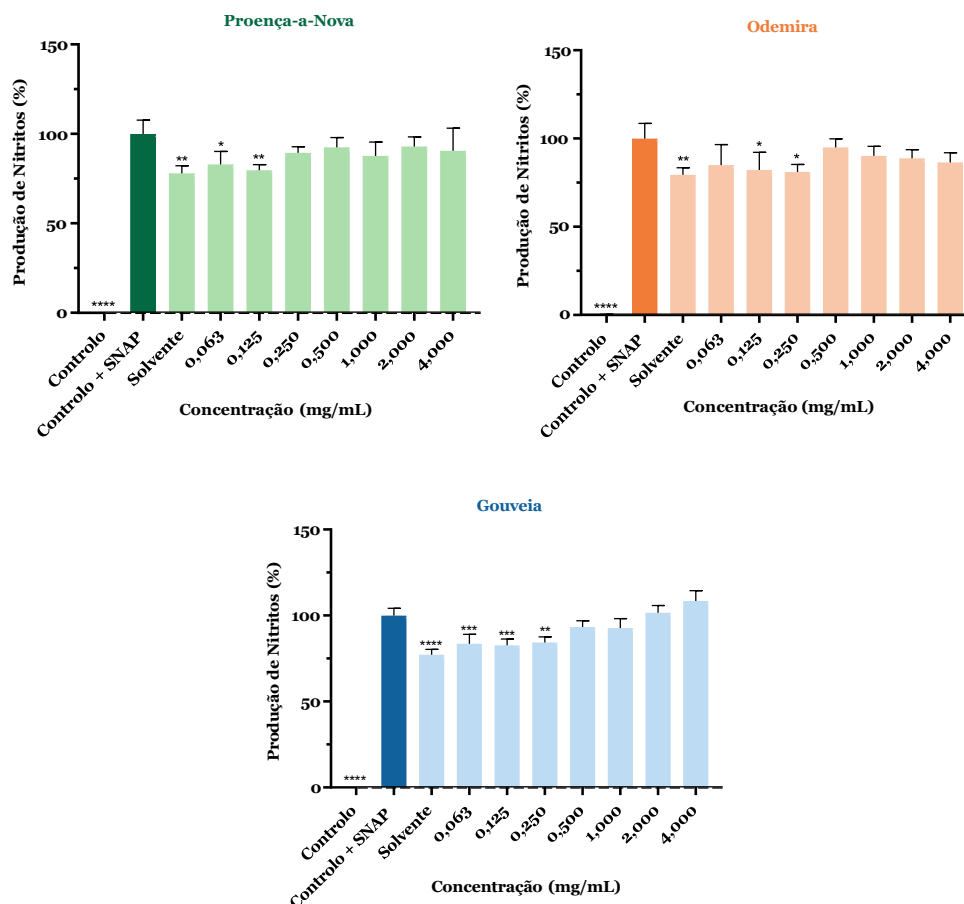


Figura 14 - Capacidade de eliminação de NO dos extratos das folhas de *Arbutus unedo* L. Os resultados são expressos em percentagem de libertação de nitritos, ativada pelo reagente SNAP, comparativamente ao controlo. \* e \*\* e \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$  usando ANOVA unidirecional.

### 4.9 Comparação dos valores de $EC_{50}$ e $IC_{50}$

Com o propósito de perceber qual o extrato aquoso que se mostrou mais eficaz para uso em aplicações cosméticas, fez-se uma comparação entre os valores de  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  obtidos nos ensaios realizados para avaliar a viabilidade celular aliada a uma redução da produção de NO (Tabela 8).

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Tabela 8 – Valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> obtidos no estudo do potencial anti-inflamatório e da viabilidade celular, correspondente aos três extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia). ~ representa um valor aproximado.

Extratos aquosos	Produção NO		Viabilidade celular	
	EC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> L929	IC <sub>50</sub> HaCaT	IC <sub>50</sub> RAW 264.7
Proença-a-Nova	1,984	0,8900	1,348	~ 0,9625
Odemira	1,517	0,7860*	1,026*	0,6046
Gouveia	1,184*	0,9184	1,194	0,6282

\*representam um valor estatisticamente significativo dos restantes valores, dentro da mesma coluna, através do teste de comparação de ajustes em regressão não linear com função sigmoide.

No que diz respeito a viabilidade celular, quanto menor for a concentração necessária para inibir 50 % da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) mais citotóxico é o extrato. Analisando os gráficos de curva dose-resposta (Apêndice II – Concentração de extrato necessária para inibir 50 % da viabilidade celular), verifica-se que o extrato de Odemira é significativamente menos biocompatível comparado aos extratos de Proença-a-Nova e Gouveia, para as linhas celulares L929 e HaCaT com os valores de IC<sub>50</sub> mais baixos (0,7860 mg/mL, 1,026 mg/mL e 0,6046 mg/mL, respetivamente). Relativamente ao potencial citotóxico na linha celular RAW 264.7, para o extrato aquoso de Proença-a-Nova, não foi possível determinar com exatidão o valor de IC<sub>50</sub>, uma vez que a curva dose-resposta se encontra muito acima do valor máximo do controlo. Deste modo não foi possível determinar existência de diferenças significativa, entre os valores de IC<sub>50</sub> (Apêndice II - Concentração Inibitória Média na linha celular RAW 264.7). Paralelamente, para os extratos de Odemira e Gouveia, não houve diferenças em termos significativos entre eles (Figura A4).

Relativamente à atividade anti-inflamatória, quanto menor for o valor de EC<sub>50</sub> (concentração para qual 50 % da população mostra resposta após um período especificado) maior é a capacidade do extrato em reduzir a produção de NO. Analisando os gráficos de curva dose-resposta (Apêndice III – Concentração de extrato que resulta em 50% de inibição da atividade inflamatória) verifica-se que não houve grande redução na produção de nitritos, ainda assim, o extrato de Gouveia foi quem revelou maior capacidade em reduzir o óxido nítrico (1,184 mg/mL), sendo este resultado significativamente diferente dos restantes. Contudo, sendo que os valores de EC<sub>50</sub> para a redução de produção de NO são maiores que os valores de IC<sub>50</sub> para a citotoxicidade nesta linha celular, isto significa que os extratos necessitam de uma concentração mais alta para reduzir a produção de NO do que para causar toxicidade nas células. Portanto, existiu uma influência da viabilidade celular na redução de NO.

Atendendo aos resultados presentes na Tabela 8, conclui-se que o extrato aquoso que demonstra melhor perfil é o de Gouveia, porque é o único que, apesar de não ser o que possui melhores resultados em termos de viabilidade celular para todas as linhas, destaca-se perante os outros extratos relativamente ao seu potencial anti-inflamatório.

Contrariamente, o extrato que se destaca é o de Odemira, atendendo ao seu maior potencial citotóxico presente em todas as linhas celulares e à escassa redução na produção de NO, que poderá ter sido influenciado pelo facto de ser o extrato que possui a maior quantidade de compostos, verificados na caracterização química efetuada

Relativamente à citotoxicidade, verifica-se que a viabilidade após exposição aos extratos não é consistente com os resultados obtidos na literatura, sendo que, um estudo numa linha celular de fibroblastos humanos concluiu que o medronheiro está associado à diminuição da viabilidade celular, independentemente do solvente utilizado para a extração (Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F. and Duarte, A. P. 2009). Neste estudo, das concentrações biocompatíveis muitas até mostraram estar acima do controlo, o que pode estar relacionado com a elevada quantidade de açúcares que se verificou na caracterização química.

## **5. Migração celular**

A migração celular é um fator chave no processo de cicatrização de feridas, e a sua avaliação em *in vitro* é uma ferramenta conveniente e de baixo custo para a obtenção dos primeiros resultados relativos ao potencial cicatrizante dos extratos (Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S. and Merfort, I. 2009).

No que diz respeito ao ensaio realizado, através da linha celular de fibroblastos de ratinho, os resultados obtidos (Figura 15) mostraram que todos os extratos, na sua maior concentração (0,5 mg/mL), não possuem atividade cicatrizante, devido ao facto de as células não migrarem ao longo de doze horas. O controlo de solvente, onde a concentração de meio DMEM é reduzida a 50%, não teve qualquer efeito na capacidade de migração celular.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

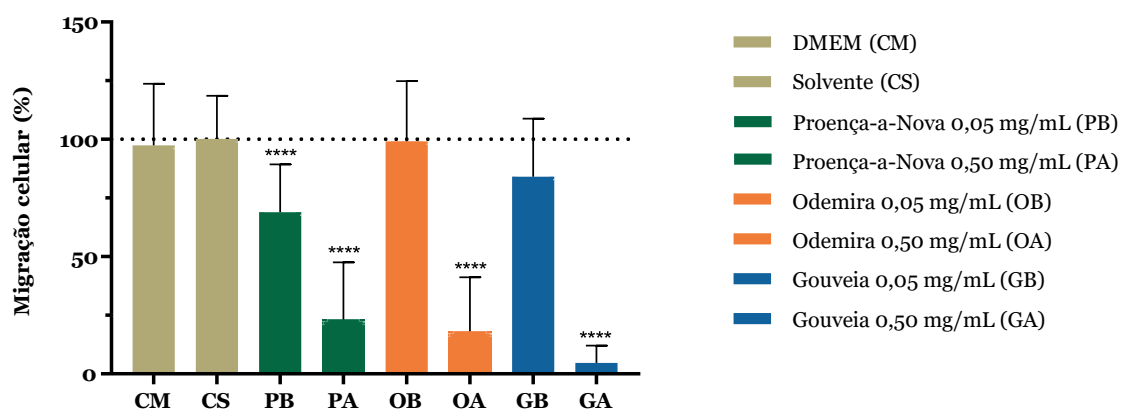


Figura 15 – Representação gráfica da migração celular (L929), associada aos três extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), na maior concentração biocompatível (0,5 mg/mL) e na concentração dez vezes diluída (0,05 mg/mL). O controlo positivo de migração celular contém meio DMEM. \*\*\*\* representam significância estatística quando comparados com o controlo, conforme determinado pelo valor de  $p < 0,0001$  usando ANOVA unidirecional.

Nas seguintes figuras, estão demonstradas as imagens relativas ao ensaio de migração celular realizado para os três extratos aquosos em estudo, num período de doze horas.

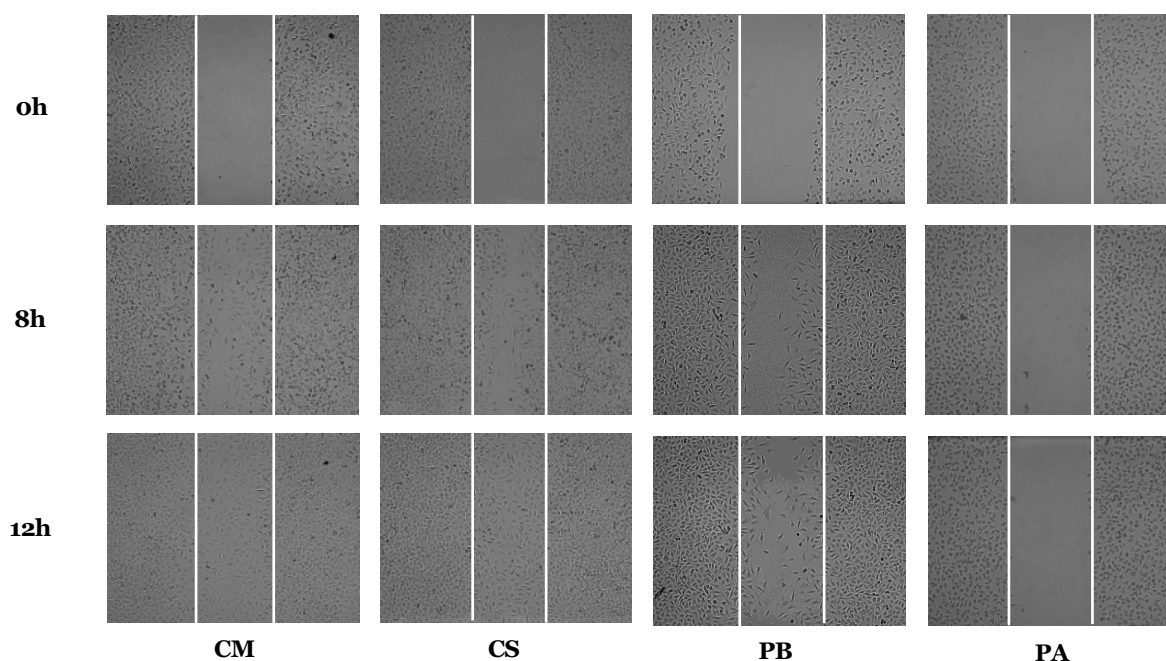


Figura 16 – Perfil representativo do ensaio de migração celular para o extrato de Proença-a-Nova com L929. A análise foi feita ao fim de zero horas, oito horas e doze horas. PA representa o extrato na maior concentração (0,5 mg/mL) e PB representa o extrato na maior concentração, dez vezes diluída (0,05 mg/mL).

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

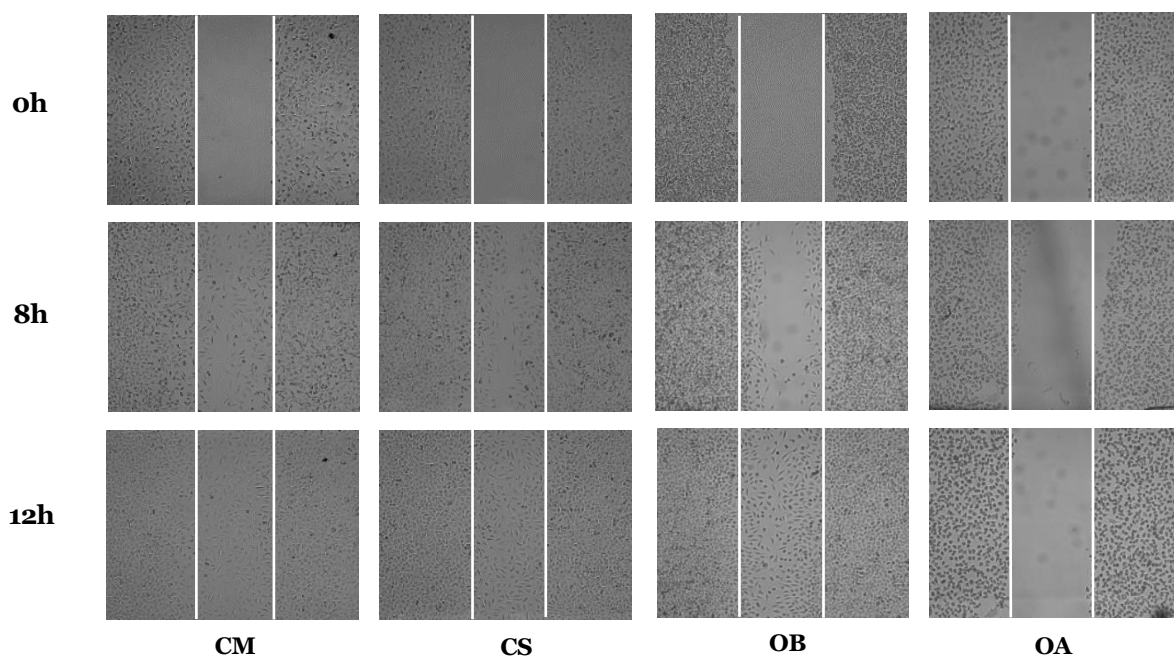


Figura 17 – Perfil representativo do ensaio de migração celular para o extrato de Odemira com L929. A análise foi feita ao fim de zero horas, oito horas e doze horas. OA representa o extrato na maior concentração (0,5 mg/mL) e OB representa o extrato na maior concentração, dez vezes diluída (0,05 mg/mL).

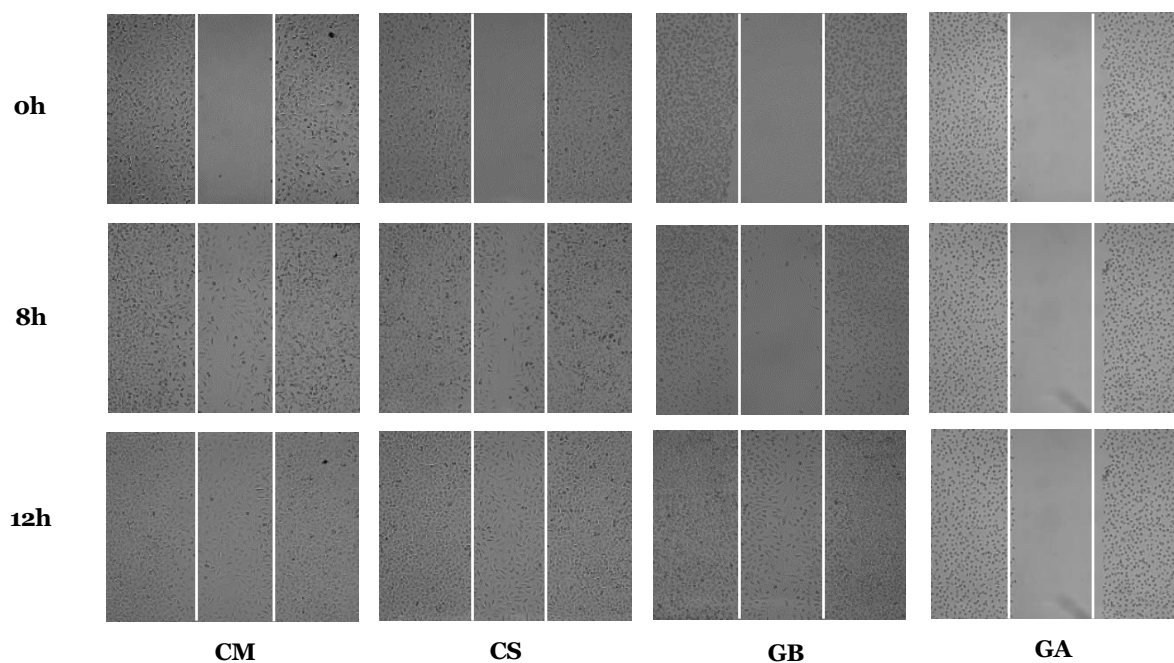


Figura 18 – Perfil representativo do ensaio de migração celular para o extrato de Gouveia com L929. A análise foi feita ao fim de zero horas, oito horas e doze horas. GA representa o extrato na maior concentração (0,5 mg/mL) e GB representa o extrato na maior concentração, dez vezes diluída (0,05 mg/mL).

Verifica-se que os extratos não têm potencial como adjuvantes na cicatrização, possivelmente devido ao perfil fitoquímico verificado pelas concentrações elevadas de determinados compostos maioritários, que a certo ponto podem não ser benéficas.

Atendendo aos resultados obtidos pela literatura, não existem estudos que permitam comparações com o estudo efetuado. Contudo, um estudo que avaliou o potencial cicatrizante de quercetina-3 - O – ramnosídeo e miricetina-3- O -ramnosídeo, como isolados de folhas destiladas de *Pistacia lentiscus* L., reportou que os mesmos têm efeitos benéficos na rápida cicatrização de lesões cutâneas (Elloumi, W., Mahmoudi, A., Ortiz, S., Boutefnouchet, S., Chamkha, M. and Sayadi, S. 2022). Isto comprova que, apesar de o composto quercetina-3 - O – ramnosídeo se destacar como maioritário no perfil dos extratos em estudo, a sua concentração pode não ser suficiente ou estar em excesso a ponto de não provocar migração celular. Por outro lado, outros compostos detetados que não são maioritários também podem estar a interferir na atividade dos extratos.

Apesar dos extratos não apresentarem potencial como adjuvantes na cicatrização, com base nos resultados obtidos, um aspeto relevante que se observou na atividade dos extratos ao longo do tempo foi a ausência completa de migração na primeira concentração biocompatível. Isto levanta questões relativamente a futuros estudos com outras aplicações nomeadamente com células cancerígenas, uma vez que estas estão associadas não só a uma excessiva taxa de proliferação, mas também a um aumento da migração e à sua capacidade de invasão.

Estudos relativos à citotoxicidade da planta *A. unedo* estão frequentemente associados a efeitos antitumorais. Segundo a literatura, um estudo já realizado para avaliar as propriedades citotóxicas do mel de medronheiro, contra uma linha celular associada ao cancro do colón (HCT-116), mostrou que após o tratamento das células com diferentes concentrações de mel, ocorreu uma diminuição da viabilidade celular e pode ser uma ferramenta útil no combate ao cancro colorretal (Afrin, S., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparri, M., Bompadre, S., Quiles, J. L., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F. and Battino, M. 2017).

## **6. Resumo integrativo dos resultados obtidos**

Na seguinte tabela estão demonstrados os ensaios realizados ao longo deste projeto. Em função dos resultados obtidos, foram classificados como positivos, médios e negativos para cada bioatividade testada, representados com as cores verde, amarelo e vermelho, respetivamente. Diferenças significativas entre os extratos para cada atividade e o sentido da diferença (melhor ou pior perfil), estão assinadas com uma seta no sentido correspondente.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Tabela 9 – Esquema integrativo de todos os resultados obtidos ao longo deste estudo.

	Proença-a-Nova	Odemira	Gouveia
Atividade antioxidante	■	■	■
Atividade antimicrobiana - <i>Challenge test</i>	■	■	■
Atividade antimicrobiana – Microbiota da pele	■	■	■
Inibição da Lipase	■	■	■
Biocompatibilidade - Fibroblastos	■	↓	■
Biocompatibilidade - Queratinócitos	■	↓	■
Biocompatibilidade - Macrófagos	■	↓	■
Atividade anti-inflamatória	■	■	↑
Potencial como adjuvante na cicatrização	■	■	■

Legenda: (↓) pior perfil (↑) melhor perfil ■ resultado positivo ■ resultado médio ■ resultado negativo

## **Folha em branco**

## 7. Conclusão e perspectivas futuras

Os extratos de plantas têm despertado um interesse crescente ao longo dos anos na área cosmética e farmacêutica. Entre as diferentes características que podem ser atribuídas a estes produtos, a elevada biocompatibilidade, aliada ao potencial bioativo tornam-nos ingredientes promissores em formulações de aplicação cutânea, nomeadamente em produtos cosméticos. Do estudo efetuado, todos os extratos destacaram-se pelo seu potencial como antioxidantes naturais, sugerindo assim novas pesquisas voltadas para a identificação e caracterização de compostos específicos que sejam responsáveis por essa atividade. A compreensão detalhada desses compostos pode otimizar o uso dos extratos em formulações, que visam prevenir ou retardar os efeitos do stress oxidativo, nomeadamente no combate ao envelhecimento. Os resultados obtidos revelaram também que todos os extratos apresentaram capacidade em reduzir a viabilidade celular, porém, todos possuem uma gama de concentrações em que são biocompatíveis. Comparando os três extratos em estudo, verificou-se que o menos biocompatível foi o de Odemira, apresentando valores mais baixos de IC<sub>50</sub>. Das concentrações que se mostraram biocompatíveis, muitas revelaram promover a viabilidade celular. Paralelamente, o facto de se verificar uma grande quantidade de açúcares na análise por espectrometria de massa poderá estar a contribuir para esse efeito.

A reduzida atividade anti-inflamatória, apesar do alto poder antioxidante, sugere que os extratos poderão ser uteis para condições onde o stress oxidativo é o fator predominante, mas não para inflamações que dependem de outros mecanismos.

A resistência de certos microrganismos aos extratos limita o uso dos mesmos como agentes conservantes. Contudo, sendo que apresentou eficácia para alguns deles, poderá ajudar no desempenho do sistema conservante das formulações. Porém, no seguimento do destaque dos extratos contra microrganismos da microbiota da pele, nomeadamente *Cutibacterium acnes*, concluiu-se que estes poderão ser promissores para atuarem como agentes anti-acne, através do desenvolvimento de formulações tópicas que possam ser aplicadas no tratamento da acne e de outras condições dermatológicas relacionadas com a disbiose do microbioma cutâneo. Para além da atividade enzimática da lipase que foi avaliada e se mostrou promissora, outros ensaios como a análise do potencial para inibir a produção de lípidos faria sentido ser avaliado, e assim avaliar o efeito noutros eventos chave que contribuam para a progressão da doença, corroborando o potencial para esta aplicação. Por fim, relativamente ao potencial cicatrizante, a atividade dos extratos sobre a migração celular não demonstrou relevância. Como neste estudo, realizado com células não cancerígenas, observou-se a inibição dessa atividade, seria interessante avaliar os mesmos extratos numa

linha celular cancerígena, associada a tumores por exemplo da pele, para perceber se o efeito se mantém, considerando outras perspectivas de aplicação destes extratos.

Deste modo, é indispensável a realização de mais estudos de segurança e eficácia para corroborar o interesse destes extratos enquanto potenciais ingredientes cosméticos e obter uma compreensão mais ampla relativa a outras aplicações, nomeadamente o potencial terapêutico das folhas de *A. unedo*, e/ou dos seus compostos maioritários. Estudos adicionais como a análise de outros marcadores inflamatórios, a exploração de outros métodos de extração e a utilização de outros modelos experimentais, seriam interessantes para explorar este potencial.

A variação na composição química dos extratos pode ocorrer devido a diversos fatores ambientais como tipo de solo, clima e estação do ano em que a planta é colhida. Esses fatores afetam a biossíntese dos compostos bioativos, alterando a sua concentração e, conseqüentemente, a eficácia dos extratos. Além disso, o método de extração utilizado pode influenciar na quantidade e no perfil de compostos extraídos, uma vez que diferentes solventes, temperaturas e tempos de extração podem priorizar certos compostos sobre outros. Essa variação afeta diretamente a reprodutibilidade e comparação dos resultados, tornando difícil assegurar que os compostos responsáveis pela atividade estejam presentes em quantidades adequadas em cada extrato. Portanto, a padronização da produção dos extratos é essencial para garantir que contenham a quantidade necessária de compostos que realmente têm o efeito pretendido. A comparação dos extratos é crucial para perceber as diferenças ou semelhanças entre eles ao nível da eficácia e segurança, sendo que se forem pouco variáveis garantem maior oferta para a indústria.

## 8. Referências Bibliográficas

- Addor, F. A. S. A. (2017). "Antioxidants in dermatology." *Anais brasileiros de dermatologia* 92: 356-362.
- Afrin, S., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Bompadre, S., Quiles, J. L., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F. and Battino, M. (2017). "Strawberry-Tree Honey Induces Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells and Increases ROS Generation: A Comparison with Manuka Honey." *International Journal of Molecular Sciences* 18(3): 613.
- Ahmed, I. A., Mikail, M. A., Zamakshshari, N. and Abdullah, A.-S. H. (2020). "Natural anti-aging skincare: role and potential." *Biogerontology* 21(3): 293-310.
- Akter, R., Uddin, S. J., Grice, I. D. and Tiralongo, E. (2014). "Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts." *Journal of natural medicines* 68: 246-252.
- Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G. and Leitão, M. C. A. (2001). "The *Arbutus* Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages." *Journal of Food Composition and Analysis* 14(1): 27-35.
- Ali, S., Halim, F. and Ahmad, N. (2016). "Beauty premium and halal cosmetics industry." *Journal of Marketing Management and Consumer Behavior* 8(4-2): 52-63.
- Almeida, A. M., Martins, M. J., Campagnolo, M. L., Fernandez, P., Albuquerque, T., Gerassis, S., Gonçalves, J. C. and Ribeiro, M. M. (2022). "Prediction scenarios of past, present, and future environmental suitability for the Mediterranean species *Arbutus unedo* L." *Scientific Reports* 12(1): 84.
- Almukainzi, M., Alotaibi, L., Abdulwahab, A., Albukhary, N. and El Mahdy, A. M. (2022). "Quality and safety investigation of commonly used topical cosmetic preparations." *Scientific Reports* 12(1): 18299.
- Alshehrei, F. M. (2024). "Microbiological Quality Assessment of Skin and Body care Cosmetics by using Challenge test." *Saudi Journal of Biological Sciences* 31(4): 103965.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F. and Duarte, A. P. (2009). "Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L." *Industrial Crops and Products* 30(1): 165-167.
- Araújo, P., Clamote, F., Carapeto, A., Almeida, J., Porto, M., Pereira, E., Lourenço, J. and Malveiro, S. (2018). "Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. Sociedade Portuguesa de Botânica."
- Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, A. (2018). *Manual competitividade e mercados para culturas emergentes A cultura do medronho*. Lisboa: 1-52.
- Azab, A., Nassar, A. and Azab, A. N. (2016). "Anti-Inflammatory Activity of Natural Products." *Molecules* 21(10): 1321.
- Bento, I. and Pereira, J. A. (2011). "*Arbutus unedo* L. and its benefits on human health." *J. Food Nutr. Res* 50: 73-85.
- Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C. and Miguel, M. G. (2013). "Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils." *Industrial Crops and Products* 46: 85-96.
- Boyanova, L. (2023). "Cutibacterium Acnes (Formerly Propionibacterium Acnes): Friend or Foe?" *Future Microbiology* 18(4): 235-244.
- Brown, M. M. and Horswill, A. R. (2020). "*Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe?" *PLOS Pathogens* 16(11): 1009026.
- Calderone, R. A. and Fonzi, W. A. (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." *Trends in Microbiology* 9(7): 327-335.
- Cañedo-Dorantes, L. and Cañedo-Ayala, M. (2019). "Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review." *International Journal of Inflammation* 2019(1): 3706315.
- Chandrangsu, P., Rensing, C. and Helmann, J. D. (2017). "Metal homeostasis and resistance in bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 15(6): 338-350.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

- Choi, S.-J., Hwang, J.-M. and Kim, S.-I. (2003). "A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity." *BMB Reports* 36(4): 417-420.
- Coimbra, A. T., Luís, Â. F. S., Batista, M. T., Ferreira, S. M. P. and Duarte, A. P. C. (2020). "Phytochemical Characterization, Bioactivities Evaluation and Synergistic Effect of *Arbutus unedo* and *Crataegus monogyna* Extracts with Amphotericin B." *Current Microbiology* 77(9): 2143-2154.
- Cosméticos., P. I. (2024). Que tipos de ingredientes são utilizados em produtos cosméticos? , Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto
- Costa, M. and Barbosa, C. M. (2021). "Aspectos Práticos da Regulamentação dos Produtos Cosméticos na UE." *Cosmetics & Toiletries (Brasil)* 33: 1-12.
- Couteau, C. and Coiffard, L. (2010). "Regulation (EC) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products." *Nouv. Dermatologiq* 29: 59.
- De Canha, M. N., Komarnytsky, S., Langhansova, L. and Lall, N. (2020). "Exploring the Anti-Acne Potential of *Impepho* [*Helichrysum odoratissimum* (L.) Sweet] to Combat *Cutibacterium acnes* Virulence." *Frontiers in Pharmacology* 10: 1559.
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L. and Hornero-Méndez, D. (2016). "Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits." *Food Chemistry* 199: 165-175.
- Demir, S., Koyu, H., Yilmaz, M. A., Tarhan, A. and Ozturk, S. B. (2024). "Antityrosinase activity and LC-MS/MS analysis of optimized ultrasound-assisted condition extracts and fractions from strawberry tree (*Arbutus unedo* L.)." *J Food Drug Anal* 32(2): 194-212.
- Dias, V. L. A. (2014). Estruturas secretoras em medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica, estrutural e histoquímica e avaliação da atividade proteásica da secreção.
- do Lumiar Ramos, A. F. F. (2018). Plano de Negócio: Exploração do Fruto do Medronheiro em Diferentes Aplicações, ISCTE-Instituto Universitario de Lisboa (Portugal).
- Draelos, Z. D. (2012). "Cosmetics, categories, and the future." *Dermatologic Therapy* 25(3): 223-228.
- Ekiert, H. M. and Szopa, A. (2023). "Biological Activities of Natural Products III." *Molecules* 28(12): 4854.
- El Haouari, M., López, J. J., Mekhfi, H., Rosado, J. A. and Salido, G. M. (2007). "Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets." *Journal of Ethnopharmacology* 113(2): 325-331.
- Elloumi, W., Mahmoudi, A., Ortiz, S., Boutefnouchet, S., Chamkha, M. and Sayadi, S. (2022). "Wound healing potential of quercetin-3-O-rhamnoside and myricetin-3-O-rhamnoside isolated from *Pistacia lentiscus* distilled leaves in rats model." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 146: 112574.
- Europeia, C. (2004). Diretiva 2004/27/CE de 31 de Março de 2004, *Jornal Oficial Da União Europeia*: 34-57.
- Europeia, O. P. E. E. O. C. D. U. (2017). Regulamento (UE) 2017/745 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de abril de 2017, relativo aos dispositivos médicos, que altera a Diretiva 2001/83/CE, o Regulamento (CE) n.º 178/2002 e o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 e que revoga as Diretivas 90/385/, *Jornal Oficial Da União Europeia*: 1-175.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." *Nutrition* 18(10): 872-879.
- Fernández-Guarino, M., Hernández-Bule, M. L. and Bacci, S. (2023). "Cellular and Molecular Processes in Wound Healing." *Biomedicines* 11(9): 2526.
- Fonseca-Santos, B., Corrêa, M. A. and Chorilli, M. (2015). "Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 51(1): 17-26.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R. B. and Santos, C. N. (2010). "Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo*)." *Nutrients* 2(2): 214-229.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

- Frazer, C., Joshi, M., Delorme, C., Davis, D., Bennett, R. J. and Allingham, J. S. (2015). "Candida albicans Kinesin Kar3 Depends on a Cik1-Like Regulatory Partner Protein for Its Roles in Mating, Cell Morphogenesis, and Bipolar Spindle Formation." *Eukaryotic Cell* 14(8): 755-774.
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S. and Merfort, I. (2009). "Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts." *Journal of Ethnopharmacology* 126(3): 463-467.
- Gonçalves, S. and Gaivão, I. (2021). "Natural Ingredients Common in the Trás-os-Montes Region (Portugal) for Use in the Cosmetic Industry: A Review about Chemical Composition and Antigenotoxic Properties." *Molecules* 26(17): 5255.
- Gonzalez, A. C. d. O., Costa, T. F., Andrade, Z. d. A. and Medrado, A. R. A. P. (2016). "Wound healing-A literature review." *Anais brasileiros de dermatologia* 91(5): 614-620.
- Guimarães, R., Barros, L., Calhela, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P. and Ferreira, I. C. F. R. (2014). "Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study." *Plant Foods for Human Nutrition* 69(1): 37-42.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. C. F. R. (2013). "Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal." *Food Chemistry* 141(4): 3721-3730.
- Gulcin, İ. and Alwasel, S. H. (2023). "DPPH Radical Scavenging Assay." *Processes* 11(8): 2248.
- Habachi, E., Rebey, I. B., Dakhlaoui, S., Hammami, M., Sawsen, S., Msaada, K., Merah, O. and Bourgo, S. (2022). "Arbutus unedo: Innovative Source of Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Tyrosinase Phenolics for Novel Cosmeceuticals." *Cosmetics* 9(6): 143.
- Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R. and Barreiro, M. F. (2018). "Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies." *Molecules* 23(7): 1571.
- ISO (2009). Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, International Organization for Standardization. ISO 10993-5: 2009.
- ISO (2019). Cosmetics-Microbiology-Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product Cosmétiques-Microbiologie-Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique-ISO 11930:2019.
- Jappe, U. (2003). "Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy." *Acta dermato-venereologica* 83(4): 241-248.
- Jurica, K., Brčić Karačonji, I., Mikolić, A., Milojković-Opsenica, D., Benković, V. and Kopjar, N. (2018). "In vitro safety assessment of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin in human peripheral blood lymphocytes." *Cytotechnology* 70(4): 1261-1278.
- Jurica, K., Karačonji, I. B., Šegan, S., Opsenica, D. M. and Kremer, D. (2015). "Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) leaves by gas chromatography-mass spectrometry/Kvantitativna analiza arbutina i hidrokina u listovima obične planike (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) plinskromatografskom metodom uz detekciju masenim spektrometrom." *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 66(3): 197-202.
- Kachkoul, R., Squalli Housseini, T., Mohim, M., El Habbani, R., Miyah, Y. and Lahrichi, A. (2019). "Chemical compounds as well as antioxidant and litholytic activities of *Arbutus unedo* L. leaves against calcium oxalate stones." *Journal of Integrative Medicine* 17(6): 430-437.
- Kerdudo, A., Burger, P., Merck, F., Dingas, A., Rolland, Y., Michel, T. and Fernandez, X. (2016). "Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study." *Comptes Rendus. Chimie* 19(9): 1077-1089.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

- Khan, A. D. and Alam, M. N. (2019). "Cosmetics and their associated adverse effects: A review." *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*: 1-6.
- Khavkin, J. and Ellis, D. A. (2011). "Aging skin: histology, physiology, and pathology." *Facial Plastic Surgery Clinics* 19(2): 229-234.
- Kusumawati, I. and Indrayanto, G. (2013). Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics. *Studies in Natural Products Chemistry*. R. Atta ur, Elsevier. 40: 485-505.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R. and Wu, H. (2020). "The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 148: 80-89.
- Liu, J.-K. (2022). "Natural products in cosmetics." *Natural Products and Bioprospecting* 12(1): 40.
- Mariotto, S., Ciampa, A. R., de Prati, A. C., Darra, E., Vincenzi, S., Sega, M., Cavalieri, E., Shoji, K. and Suzuki, H. (2008). "Aqueous Extract of *Arbutus unedo* Inhibits STAT1 Activation in Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 and Human Fibroblasts Through SHP2 Activation." *Medicinal Chemistry* 4(3): 219-228.
- Martins, J., Pétriacq, P., Flandin, A., Gómez-Cadenas, A., Monteiro, P., Pinto, G. and Canhoto, J. (2022). "Genotype determines *Arbutus unedo* L. physiological and metabolomic responses to drought and recovery." *Frontiers in Plant Science* 13: 1011542.
- Mayer, F. L., Wilson, D. and Hube, B. (2013). "Candida albicans pathogenicity mechanisms." *Virulence* 4(2): 119-128.
- Mekhfi, H., ElHaouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A. and Legssyer, A. (2006). "Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation." *Phytotherapy Research* 20(2): 135-139.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P. and Carvalho, M. (2011). "Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit." *Food and Chemical Toxicology* 49(9): 2285-2291.
- Merad, Y., Derrar, H., Belmokhtar, Z. and Belkacemi, M. (2021). "*Aspergillus Genus* and Its Various Human Superficial and Cutaneous Features." *Pathogens* 10(6): 643.
- Michalak, M. (2023). "Plant Extracts as Skin Care and Therapeutic Agents." *International Journal of Molecular Sciences* 24(20): 15444.
- Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C. and Antunes, M. D. (2014). "*Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties." *Molecules* 19(10): 15799-15823.
- Morales, D. (2022). "Use of Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) as a Source of Functional Fractions with Biological Activities." *Foods* 11(23): 3838.
- Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F. and Duarte, A. P. (2018). "*Arbutus unedo* L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy." *Journal of Ethnopharmacology* 225: 90-102.
- Morganti, P., Lohani, A., Gagliardini, A., Morganti, G. and Coltelli, M.-B. (2023). "Active Ingredients and Carriers in Nutritional Eco-Cosmetics." *Compounds* 3(1): 122-141.
- Mosele, J. I., Macià, A., Romero, M.-P. and Motilva, M.-J. (2016). "Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation." *Food Chemistry* 201: 120-130.
- Mrabti, H. N., Bouyahya, A., Ed-Dra, A., Kachmar, M. R., Mrabti, N. N., Benali, T., Shariati, M. A., Ouahbi, A., Doudach, L. and Faouzi, M. E. A. (2021). "Polyphenolic profile and biological properties of *Arbutus unedo* root extracts." *European Journal of Integrative Medicine* 42: 101266.
- Mssillou, I., Bakour, M., Slighoua, M., Laaroussi, H., Saghrouchni, H., Ez-Zahra Amrati, F., Lyoussi, B. and Derwich, E. (2022). "Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review." *Journal of Ethnopharmacology* 298: 115663.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

- Mueller, M., Hobiger, S. and Jungbauer, A. (2010). "Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices." *Food Chemistry* 122(4): 987-996.
- Nahar, L., Al-Groshi, A., Kumar, A. and Sarker, S. D. (2022). "Arbutin: Occurrence in Plants, and Its Potential as an Anticancer Agent." *Molecules* 27(24): 8786.
- Nakase, K., Momose, M., Yukawa, T. and Nakaminami, H. (2022). "Development of skin sebum medium and inhibition of lipase activity in *Cutibacterium acnes* by oleic acid." *Access Microbiology* 4(10).
- Nenadis, N., Llorens, L., Koufogianni, A., Díaz, L., Font, J., Gonzalez, J. A. and Verdaguer, D. (2015). "Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 153: 435-444.
- Nortjie, E., Basitere, M., Moyo, D. and Nyamukamba, P. (2022). "Extraction Methods, Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles: A Review." *Plants* 11(15): 2011.
- Nowak, K., Jabłońska, E. and Ratajczak-Wrona, W. (2021). "Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products." *Environmental Research* 198: 110488.
- Oliveira, C., Coelho, C., Teixeira, J. A., Ferreira-Santos, P. and Botelho, C. M. (2022). "Nanocarriers as Active Ingredients Enhancers in the Cosmetic Industry—The European and North America Regulation Challenges." *Molecules* 27(5): 1669.
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A. and Baptista, P. (2009). "Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals." *Food and Chemical Toxicology* 47(7): 1507-1511.
- Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T. and Ekinçi, N. (2011). "Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf." *Food Science and Biotechnology* 20(5): 1249.
- Oresajo, C., Pillai, S., Manco, M., Yatskayer, M. and McDaniel, D. (2012). "Antioxidants and the skin: Understanding formulation and efficacy." *Dermatologic Therapy* 25(3): 252-259.
- Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., del Castillo, M. D., Cano, M. P. and de Pascual-Teresa, S. (2008). "Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits." *Journal of Food Composition and Analysis* 21(4): 273-281.
- Pant, P., Pandey, S. and Dall'Acqua, S. (2021). "The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review." *Chemistry & Biodiversity* 18(11): 2100345.
- Patil, V., Bandivadekar, A. and Debjani, D. (2012). "Inhibition of *Propionibacterium acnes* lipase by extracts of Indian medicinal plants." *International Journal of Cosmetic Science* 34(3): 234-239.
- Patterson, T. F., Thompson, G. R., III, Denning, D. W., Fishman, J. A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Morrison, V. A., Nguyen, M. H., Segal, B. H., Steinbach, W. J., Stevens, D. A., Walsh, T. J., Wingard, J. R., Young, J.-A. H. and Bennett, J. E. (2016). "Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases* 63(4): 1-60.
- Pavlović, D. R., Branković, S., Kovačević, N., Kitić, D. and Veljković, S. (2011). "Comparative Study of Spasmolytic Properties, Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece." *Phytotherapy Research* 25(5): 749-754.
- Pfaller, M. A., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Walsh, T. J. and Warnock, D. W. (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos. NCCLS document M38-A 22.
- Pharmacopoeia, E. (2005). Efficacy of antimicrobial preservation., *European Pharmacopoeia* 5.1.3. : 447-449.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

- Pharmacopoeia, E. (2011). Microbiological quality of non-sterile products for pharmaceutical use, European Pharmacopoeia 5.1.4: 507.
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. and Vuorela, P. (2000). "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds." *International Journal of Food Microbiology* 56(1): 3-12.
- Reuter, J., Merfort, I. and Schempp, C. M. (2010). "Botanicals in dermatology: an evidence-based review." *American journal of clinical dermatology* 11: 247-267.
- Roy, I., Magesh, K. T., Sathyakumar, M., Sivachandran, A., Purushothaman, D. and Aravindhan, R. (2023). "Evaluation of Wound Healing Property of the Ethanolic Extract of Glycyrrhiza Glabra on Vero Cell Lines Using *In Vitro* Scratch Assay Test." *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 15(Suppl 1): S630-S635.
- Ruiz-Rodríguez, B.-M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.-C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M. and Tardío, J. (2011). "Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data." *Food Research International* 44(5): 1244-1253.
- Rybczyńska-Tkaczyk, K., Grenda, A., Jakubczyk, A., Kiersnowska, K. and Bik-Małodzińska, M. (2023). "Natural Compounds with Antimicrobial Properties in Cosmetics." *Pathogens* 12(2): 320.
- Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F. and Aouni, M. (2007). "Investigation of Some Medicinal Plants from Tunisia for Antimicrobial Activities." *Pharmaceutical Biology* 45(5): 421-428.
- Shivangi, S., Usama, A., Juber, A., Anas, I., Mohd Muazzam, K. and Naureen, R. (2023). *The Art and Science of Cosmetics: Understanding the Ingredients. Cosmetic Products and Industry.* A. Usama and A. Juber. Rijeka, IntechOpen: Ch. 1.
- Silva, P. M. d., Lima, S. H. P. d. and Siqueira, L. d. P. (2023). "The use of phytocosmetics for the treatment of melasma: a literature review." *Research, Society and Development* 12(6): 12312642040.
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. and Blázquez-Castro, A. (2018). "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives." *Acta Histochemica* 120(3): 159-167.
- Taylor, R. S. and Iglesias, C. P. (2009). "Assessing the Clinical and Cost-Effectiveness of Medical Devices and Drugs: Are They That Different?" *Value in Health* 12(4): 404-406.
- Tolosa, L., Donato, M. T. and Gómez-Lechón, M. J. (2015). *General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. Protocols in In Vitro Hepatocyte Research.* M. Vinken and V. Rogiers. New York, NY, Springer New York: 333-348.
- Zappelli, C., Barbulova, A., Apone, F. and Colucci, G. (2016). "Effective Active Ingredients Obtained through Biotechnology." *Cosmetics* 3(4): 39.
- Zitouni, H., Hssaini, L., Messaoudi, Z., Ourradi, H., Viuda-Martos, M., Hernández, F., Ercisli, S. and Hanine, H. (2020). "Phytochemical Components and Bioactivity Assessment among Twelve Strawberry (*Arbutus unedo* L.) Genotypes Growing in Morocco Using Chemometrics." *Foods* 9(10): 1345.

## Apêndice I - Concentração de extrato necessária para inibir 50% da atividade enzimática da lipase

EC<sub>50</sub> – Concentração de extrato que reduz para metade (50%) o efeito máximo da enzima lipase

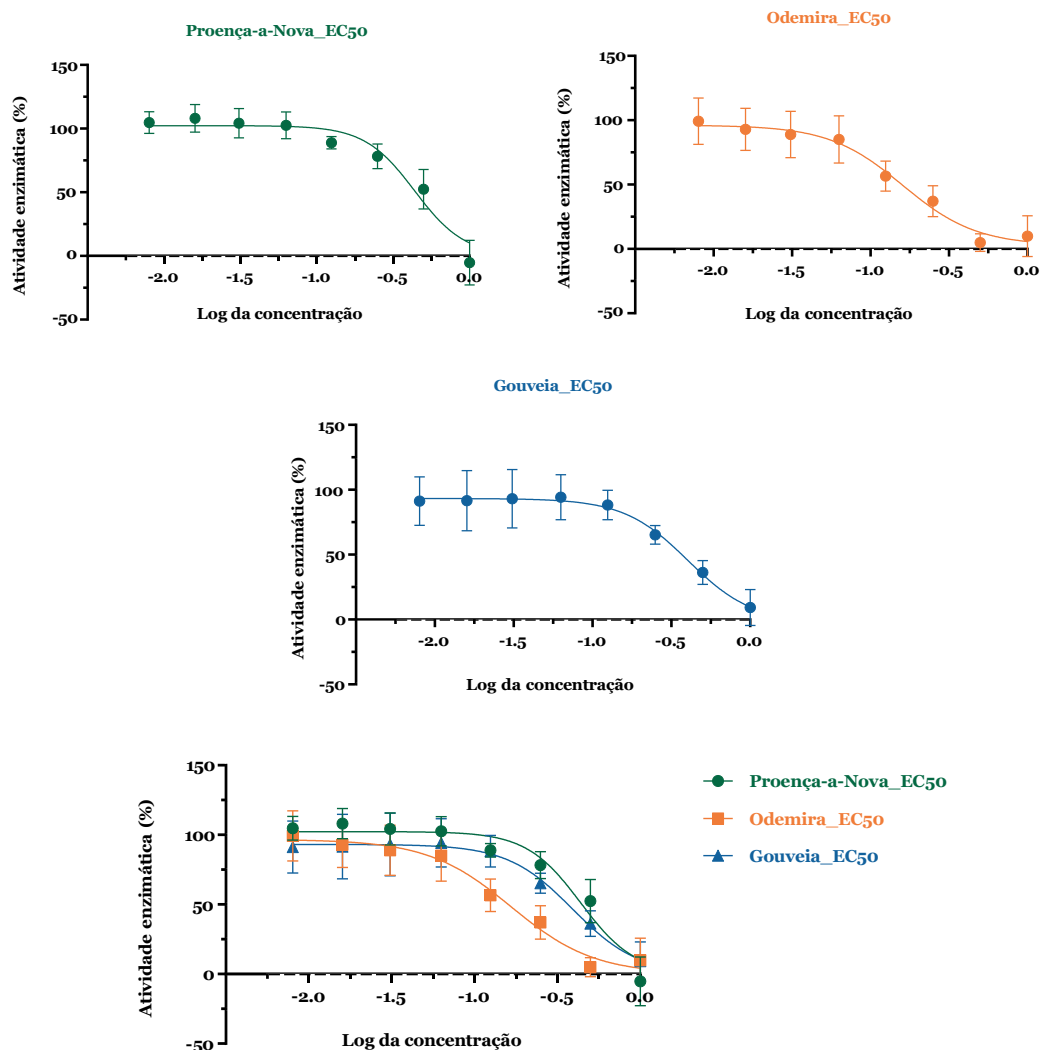


Figura A1 – Curvas dose-resposta para determinação do EC<sub>50</sub> dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), no efeito de inibição da enzima Lipase. Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

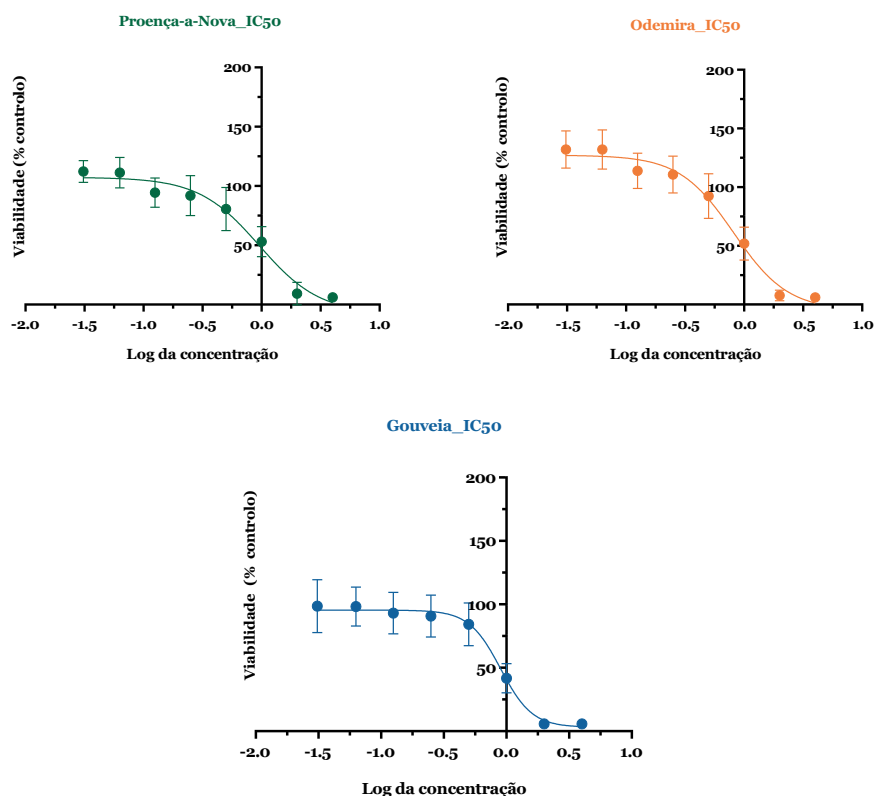
Tabela A1 - Tabela com os valores de EC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso em estudo, associado à capacidade de inibição da enzima Lipase.

	Proença-a-Nova	Odemira	Gouveia
EC <sub>50</sub>	0,4374	0,1663*	0,3915
Intervalo de confiança	0,2735 – 0,6270	0,1174 - 0,2229	0,3524 - 0,4347
R <sup>2</sup>	0,9515	0,9840	0,9958

\*representa uma diferença significativa para os valores de EC<sub>50</sub>, através do teste de comparação de ajustes em regressão não linear com função sigmoide.

## Apêndice II – Concentração de extrato necessária para inibir 50% da viabilidade celular

### IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular na linha celular L929



## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

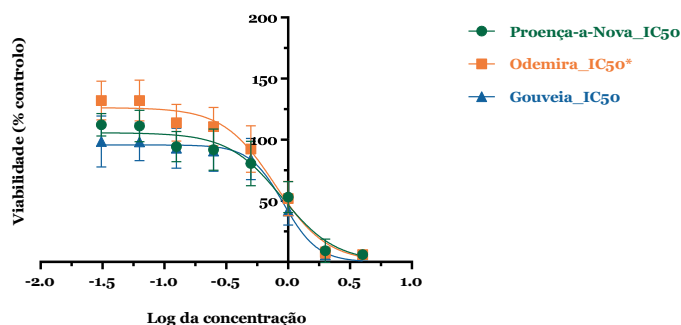


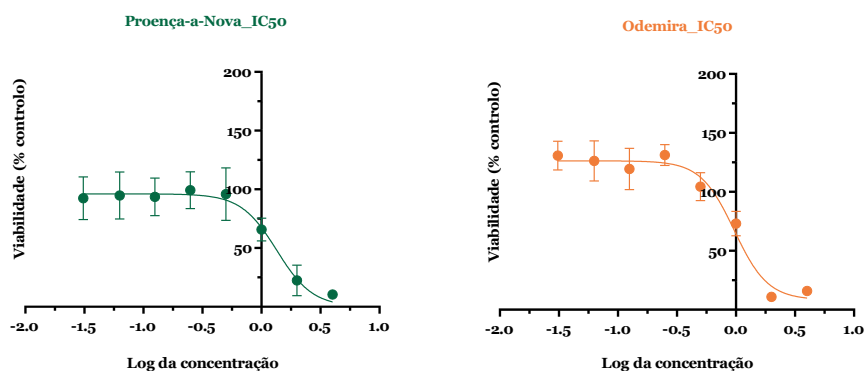
Figura A2 - Curvas de dose-resposta para determinação do IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular) dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), pela linha celular de fibroblastos de ratinho (L929). Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

Tabela A2- Tabela com os valores de IC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da viabilidade celular, na linha celular L929.

	Proença-a-Nova	Odemira	Gouveia
IC <sub>50</sub>	0,8900	0,7860*	0,9184
Intervalo de confiança	0,8011 – 0,9809	0,7170 - 0,85664	0,8499 - 0,9888
R <sup>2</sup>	0,8922	0,9158	0,8766

\*representa uma diferença significativa para os valores de IC<sub>50</sub>, através do teste de comparação de ajustes em regressão não linear com função sigmoide para a linha celular L929.

### IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular na linha celular HaCaT



## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

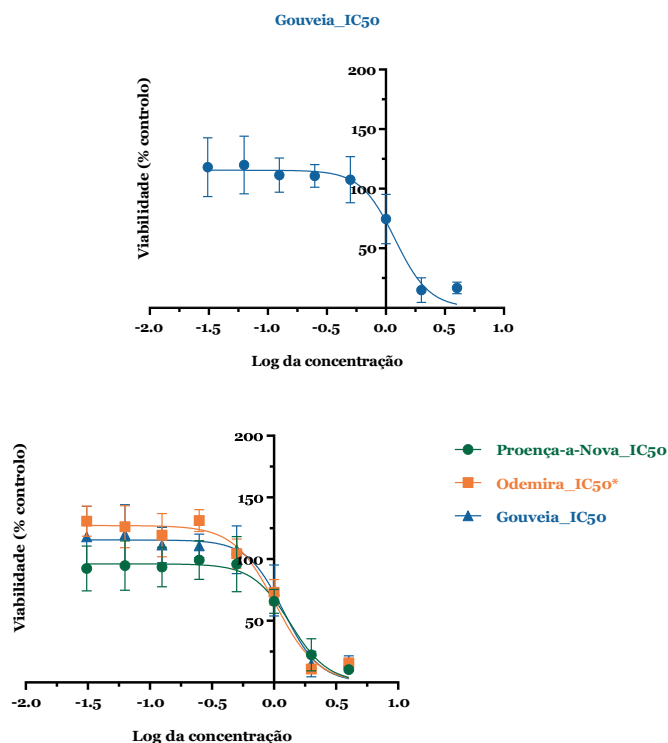


Figura A3 - Curvas de dose-resposta para determinação do IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular) dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), pela linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT). Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

Tabela A3- Tabela com os valores de IC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da viabilidade celular, na linha celular HaCaT.

	Proença-a-Nova	Odemira	Gouveia
IC <sub>50</sub>	1,348	1,026*	1,194
Intervalo de confiança	1,219 - 1,495	0,9469 – 1,111	1,102 - ND
R <sup>2</sup>	0,8167	0,9266	0,8375

\*representa uma diferença significativa para os valores de IC<sub>50</sub>, através do teste de comparação de ajustes em regressão não linear com função sigmoide, para a linha celular HaCaT. ND- o intervalo superior não foi detetado porque não está restrito à faixa de concentrações do modelo sigmoide.

## IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibir 50% na linha celular RAW 264.7

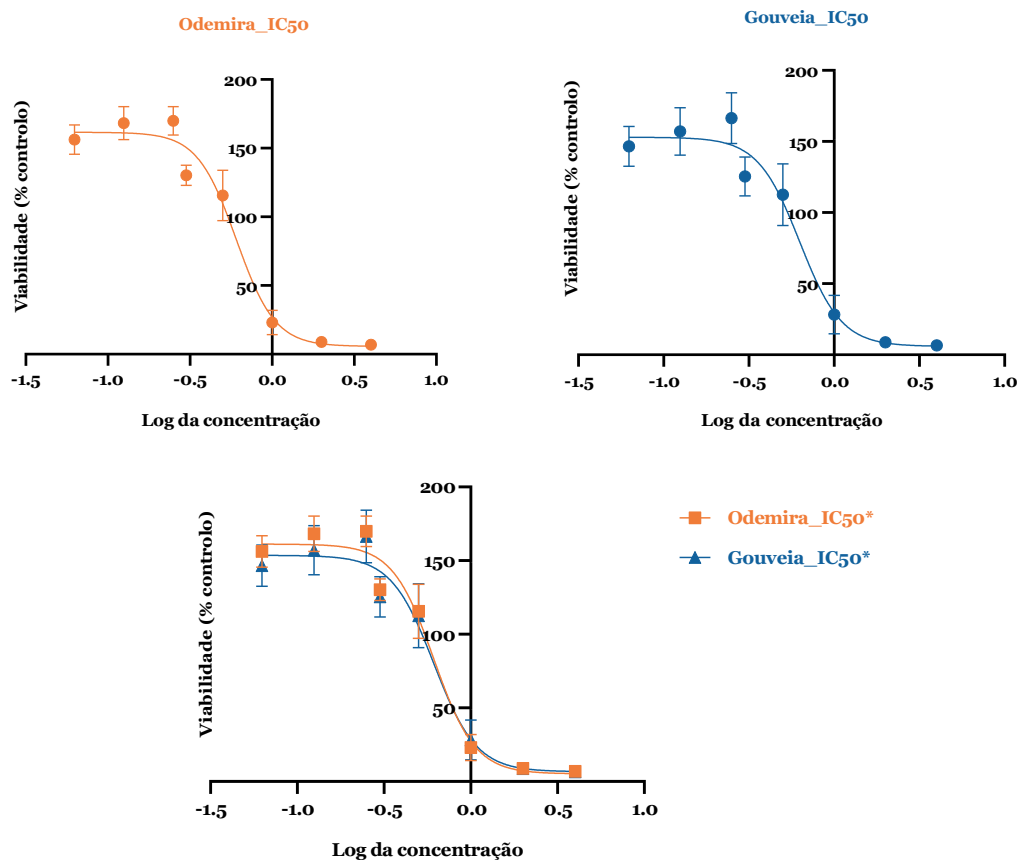


Figura A4 - Curvas de dose-resposta para a determinação do IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular) dos extratos aquosos de Odemira e Gouveia, pela linha celular de macrófagos de ratinho (RAW 264.7). Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

Tabela A4- Tabela com os valores de IC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da viabilidade celular, na linha celular RAW.

	Proença-a-Nova	Odemira	Gouveia
IC <sub>50</sub>	~ 0,9625	0,6046*	0,6282
Intervalo de confiança	ND	0,5764 - 0,6349	0,5788 - 0,6822
R <sup>2</sup>	0,9159	0,9590	0,9376

~ aproximadamente. ND- o intervalo de confiança não foi detetado porque não está restrito à faixa de concentrações do modelo sigmoide.

## Apêndice III – Concentração de extrato que resulta em 50% de inibição da produção de óxido nítrico

EC<sub>50</sub> – Concentração que reduz para metade o efeito máximo na linha celular RAW 264.7

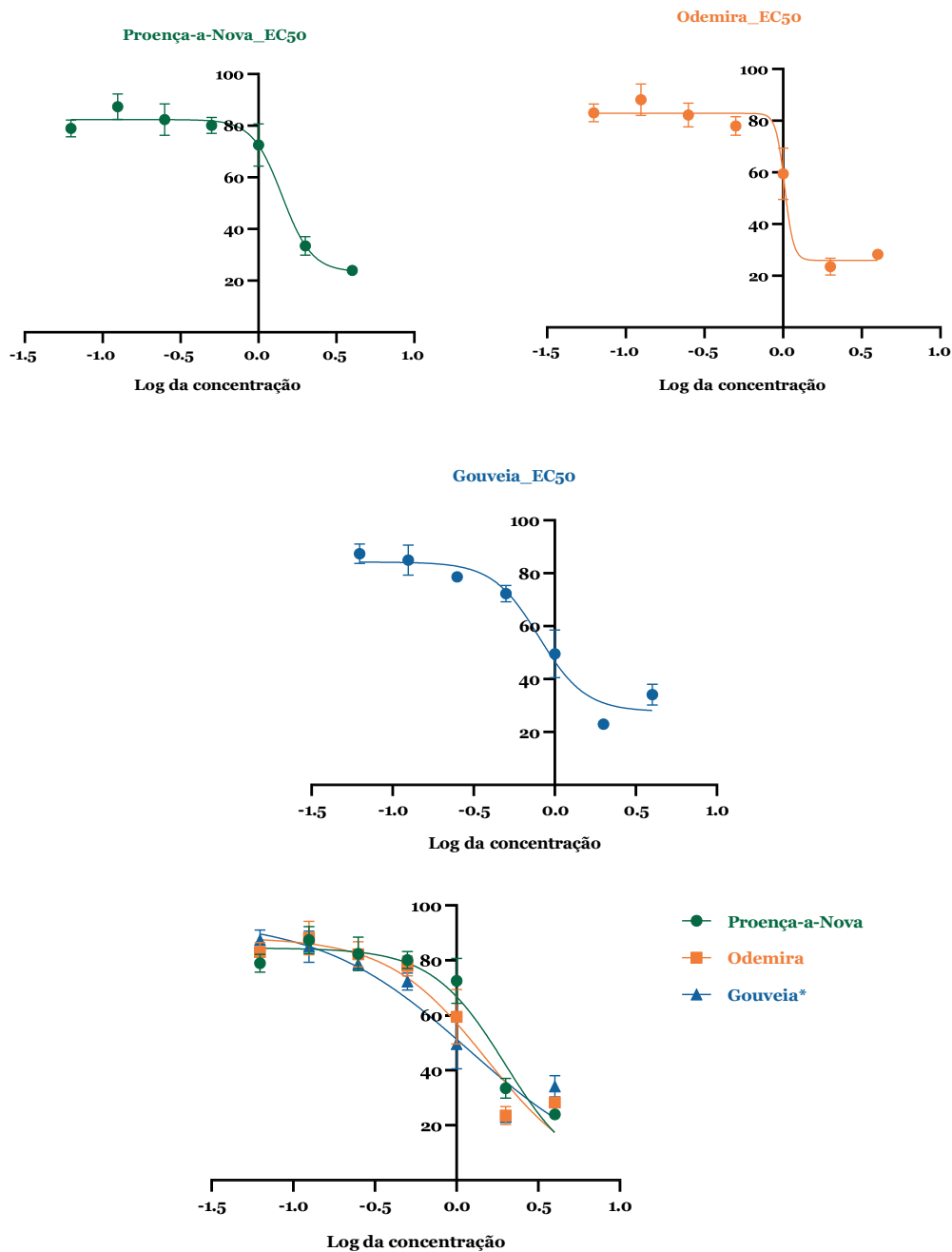


Figura A5 - Curvas de dose-resposta para a determinação do EC<sub>50</sub> dos extratos aquosos em estudo (Proença-a-Nova, Odemira e Gouveia), pelo efeito anti-inflamatório. Representação gráfica da atividade dos extratos individual e em conjunto.

## O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Tabela A5 - Tabela com os valores de EC<sub>50</sub>, intervalo de confiança (95%) e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) para cada extrato aquoso no estudo da atividade anti-inflamatória, na linha celular RAW 264.7.

	<b>Proença-a-Nova</b>	<b>Odemira</b>	<b>Gouveia</b>
<b>EC<sub>50</sub></b>	1,984	1,517	1,184*
<b>Intervalo de confiança</b>	1,805 - 2,186	1,315 - 1,746	0,8545 - 1,486
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9180	0,8946	0,8821

\*representa uma diferença significativa para os valores de EC<sub>50</sub>, através do teste de comparação de ajustes em regressão não linear com função sigmoidal.

## Folha em branco

## Anexo I – Relatório de Análise Cromatográfica

Tabela X - Lista de compostos identificados e supostamente identificados, nos extratos aquosos de Odemira (O), Gouveia (G) e Proença-a-Nova (PN) por HPLC-UV-MS/MS. Representação do tempo de retenção (TR min), UV máximo (nm), moléculas protonadas e desprotonadas ( $[M + H]^+$  m/z e  $[M - H]^-$  m/z), iões fragmentados obtidos pelo modo de varredura de iões de produto (PIS<sup>+</sup> e PIS<sup>-</sup>), peso molecular (PM) e nome dos compostos identificados. Os compostos confirmados por padrões de referência comerciais estão representados a negrito.

Pico	TR (min)	UV máx (nm)	$[M + H]^+$ m/z	$[M - H]^-$ m/z	PIS <sup>+</sup>	PIS <sup>-</sup>	PM	Nome do Composto
1 <sup>O,G,PN</sup>	0.961	282	357	191/195/355	193/247/219	264/193/233/337	356	Desconhecido
2 <sup>O,G,PN</sup>	1.078	282	175/332/354	191/289/433/453	?	?	?	Desconhecido
3 <sup>O,G,PN</sup>	1.231	281	345	317/343/437	109/125/127/153	127/ <b>191</b>	344	Galloylquinic acid isomer 1
4 <sup>O,G,PN</sup>	1.455	266	?	317/331	?	?	?	Desconhecido
5 <sup>O,G,PN</sup>	1.584	272	345	343/169	109/125/127/153	127/ <b>191</b>	344	Galloylquinic acid isomer 2
6 <sup>O,G,PN</sup>	1.791	243/290	?	345/697	139/154	137/139/199	346	Desconhecido
7 <sup>O,G,PN</sup>	2.485	274	595	593	?	?	594	(epi)Gallocatechin-(epi) catechin
8a <sup>O,G,PN</sup>	3.115	270	307	305	109/127/139/161/ 169/179/199/209/ 225	105/ <b>125</b> /153	306	(-)-Epigallocatechin
8b <sup>O,G,PN</sup>	3.115	270	327	325	109/125/153	107/ <b>125</b> /137/ <b>169</b>	326	Galloyl shikimic acid
9 <sup>O,G,PN</sup>	3.531	276	595	593	?	?	594	(epi)Catechin-(epi) gallocatechin
10 <sup>O,G,PN</sup>	4.182	273	?	345	107/123/125/ 153/177	124/151/169	346	Desconhecido
11 <sup>O,G,PN</sup>	4.773	266	?	343	?	?	?	Desconhecido
12 <sup>O,G,PN</sup>	5.718	261	477	475	?	135/277	476	Desconhecido
13 <sup>O,G,PN</sup>	6.661	273	?	183	?	78/106/124	184	Methylgallate
14 <sup>O,G,PN</sup>	7.286	278	579	577	127/163/205/ 233/259/287	125/161/205/245/25 6/289/ <b>407</b>	578	Procyanidin B1
15 <sup>O,G,PN</sup>	7.647	276	579	577	139/163/247/ 257/287/436	<b>125</b> /137/161/227/ <b>24</b> <b>5</b> /271/283/ <b>407</b> / <b>451</b>	578	(Epi)cat+(epi)cat

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

16 <sup>O,G,PN</sup>	7.951	275	497	495	139/153	125/ <b>169/191</b> /325/343	496	Digalloylquinic acid
17 <sup>O,G,PN</sup>	8.537	278	291	289/335 [M-H+HCOOH]-/579 [2M-H]-	<b>123</b> /139/147/161	109/123/145/159	290	(+)-Catechin
18 <sup>O,G,PN</sup>	8.953	275	497	495	111/125/153	125/ <b>143/169/191</b>	496	Digalloylquinic acid
19 <sup>O,G,PN</sup>	9.266	275	?	423/469[M-H+HCOOH]-/847[2M-H]-	109/125/153/195	109/124/151/ <b>169</b> /211/313/423	424	Galloylarbutin
20 <sup>O,G,PN</sup>	10.527	277	867	865	?	?	866	(Epi)cat+(epi)cat +(epi)cat
21 <sup>O,G,PN</sup>	12.181	?	?	431/477[M-H+HCOOH]-	?	119/153/161/205	432	Desconhecido
22a <sup>O,G,PN</sup>	14.115	275	649	647	125/153/309/387/435	<b>169</b> /216/263/ <b>343</b> /477/ <b>495</b>	648	Trigalloylquinic acid
22b <sup>O</sup>	14.115	275	479	477	?	?	478	Desconhecido
23 <sup>O,G,PN</sup>	14.321	267	?	633	?	207/ <b>229</b> /249/275/ <b>301</b> /463/633	634	Galloyl-HHDP-hexoside
24 <sup>O,G,PN</sup>	15.442	277	731	729	123/153/259/271/409	<b>125</b> /137/257/273/299/ <b>407</b> /437/ <b>577</b>	730	(Epi)catechgallate + (epi)cat
25 <sup>O,G,PN</sup>	15.868	254/360	?	463	275/303	255/ <b>301</b>	464	Quercetin-O-hexoside
26 <sup>O,G,PN</sup>	16.33	269	633	631	109/153	150/179/ <b>316</b>	632	Myricetin-O-galloylhexoside
27 <sup>O,G,PN</sup>	17.047	269	731	729	127/151/259/271/309/408	<b>125</b> /169/245/ <b>289</b> / <b>407</b> /451	730	(Epi)catechgallate + (epi)cat
28 <sup>O,G,PN</sup>	17.676	263/351	481	479	123/153/273/319	151/286/ <b>316</b> /334/432	480	Myricetin-O-hexoside
29 <sup>O,G,PN</sup>	18.117	263/351	481	479	117/153/171/189/301/319	169/271/ <b>316</b>	480	Myricetin 3-O-glucoside
30 <sup>O,G,PN</sup>	18.969	270	?	437	137/159	109/131/137/161/192/281/391	438	Desconhecido
31 <sup>O,G,PN</sup>	19.342	263/351	617	615	153/303	<b>151/169/271/300/463</b>	616	Quercetin-O-galloyl-glucoside
32 <sup>O,G,PN</sup>	19.974	250/360	435	433/867 [2M-H]-	153/303	<b>151/301</b>	434	Quercetin 3-O-pentoside isomer
33 <sup>O,G,PN</sup>	20.113	274	?	433/476/953[2M-H]-/499	?	107/125/169/275/300/313	477	Desconhecido
34 <sup>O,G,PN</sup>	20.265	264/351	617	615	125/153/171/303	169/ <b>301</b> /463	616	Quercetin hexose galloyl derivative
35 <sup>O,G,PN</sup>	20.546	256/348	465	463	129/153/245/319	<b>179</b> /271/ <b>316</b>	464	Myricetin-O-glycoside (rhamnoside)

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

36a <sup>O,G,PN</sup>	20.687	252/355	465	463	129/153/245/319	<b>179/271/316</b>	464	Myricetin- <i>O</i> -glycoside (rhamnoside)
36b <sup>O,G,PN</sup>	20.687	252/355	?	301	?	?	302	Ellagic acid
36c <sup>O,PN</sup>	20.687	252/355	539	537	153/171/191/257	151/169	538	Desconhecido
37 <sup>O,G,PN</sup>	21.134	254/351	465	463	303	<b>151/255/271/300</b>	464	Quercetin- <i>O</i> -glycoside (galactoside)
38a <sup>O,G,PN</sup>	21.836	255/351	465	463	165/303	125/ <b>151/255/271/300</b>	464	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside
38b <sup>O,G,PN</sup>	21.836	255/351	601	599	153/287	169/193/223/285/313/429/ <b>599</b>	600	Kaempferol galloylglucoside
39 <sup>O,G,PN</sup>	22.695	267/351	435	433	153/195/229/ <b>303</b>	<b>151/165/226/255/271/300</b>	434	Quercetin- <i>O</i> -pentoside(arabinose or xylose)
40 <sup>O,G,PN</sup>	23.246	267/351	435	433	133/189/223/ <b>303</b>	225/254/272/ <b>300/347</b>	434	Quercetin- <i>O</i> -pentoside(arabinose or xylose)
41 <sup>O,G,PN</sup>	23.954	266/343	601	599	109/153/171/287	124/151/169/284/313/447/ <b>599</b>	600	Kaempferol galloylglucoside
42a <sup>O,G,PN</sup>	24.173	254/351	435	433	<b>303</b>	<b>151/179/243/255/271/300</b>	434	Quercetin- <i>O</i> -pentoside(arabinose or xylose)
42b <sup>O,G,PN</sup>	24.173	254/351	595	593	287	152/255/ <b>285</b>	594	Kaempferol 3- <i>O</i> - rutinocide
43 <sup>O,G,PN</sup>	24.612	255/358	449	447/493 [M-H+HCOOH]-/895 [2M-H]-	287/303	<b>151/163/179/225/271/300</b>	448	(syn: Quercitrin) Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside
44 <sup>O,G,PN</sup>	26.709	264/343	419	417/463 [M-H+HCOOH]-/835 [2M-H]-	287	227/ <b>255/284</b>	418	Kaempferol 3- <i>O</i> -pentoside
45 <sup>O,G,PN</sup>	27.3	263/342	433	431/477[M-H+HCOOH]-	287	227/255/ <b>284</b>	432	Kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnoside

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

Tabela XX - Lista de compostos identificados e supostamente identificados nos extratos aquosos de *Arbutus unedo* L. por GC-MS. Para cada composto, o tempo de retenção (TR) e o espectro de massa (MS) foram comparados com a literatura, dando uma identificação provisória com um grau de similaridade.

<b>Pico</b>	<b>TR</b>	<b>MS</b>	<b>Nome do Composto</b>	<b>Similaridade (%)</b>
1	33.812	73,101,147,189,233	Malic acid 3TMS	94
2	46.355	73,147,204,245,273,319,375,465	Isocitric acid 4TMS	93
3	47.668	73,147,191,255,345	Desconhecido	
4	48.243	73,103,147,217,307	Monosaccharide TMS (Fructose 5TMS O-methyloxim)	94
5	48.620	73,103,147,217,307	Monosaccharide TMS (Fructose 5TMS O-methyloxim)	93
6	48.998	73,117,133,191,204	Monosaccharide TMS (glucose 4TMS methyl)	96
7	49.096	73,103,147,205,319	Monosaccharide TMS	87
8	49.654	73,103,147,205,319	Monosaccharide TMS	89
9	50.771	73,147,179,281,443,458	Trihydroxybenzoic acid 4TMS	92
10	55.121	73,147,191,217,265,305,318	Monosaccharide TMS (Inositol 6TMS)	90
11	69.617	73,103,147,169,217,254,361	Hydroquinone O-glucoside 5TMS	87
12	71.406	73,103,147,217,271,361,437	Disaccharide TMS (Saccarose 8TMS)	95
13	75.543	73,103,147,217,361	Disaccharide TMS	85
14	76.611	73,147,179,267,368	Catechin 5TMS	91
15	77.415	73,103,147,217,243,319,361	Disaccharide TMS	85
16	78.909	73, 103, 147, 191, 217, 361	Disaccharide TMS	83

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea

*Arbutus unedo* L. Odemira 2mg/mL  
*Arbutus unedo* L. Gouveia 2mg/mL  
*Arbutus unedo* L. Proença-a-Nova 2mg/mL

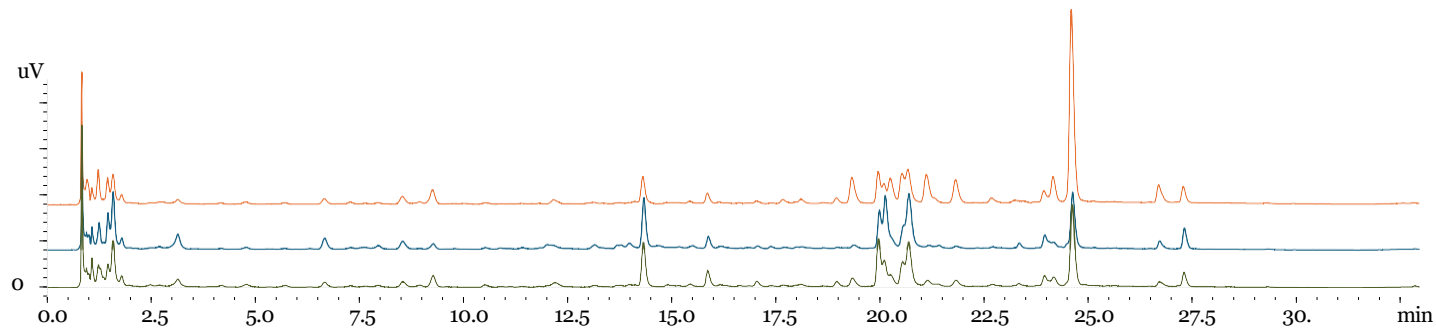


Figura X - Comparação dos perfis cromatográficos dos três extratos aquosos de *A. unedo* em estudo, mostrando a presença dos mesmos picos, com diferenças nas abundâncias relativas.

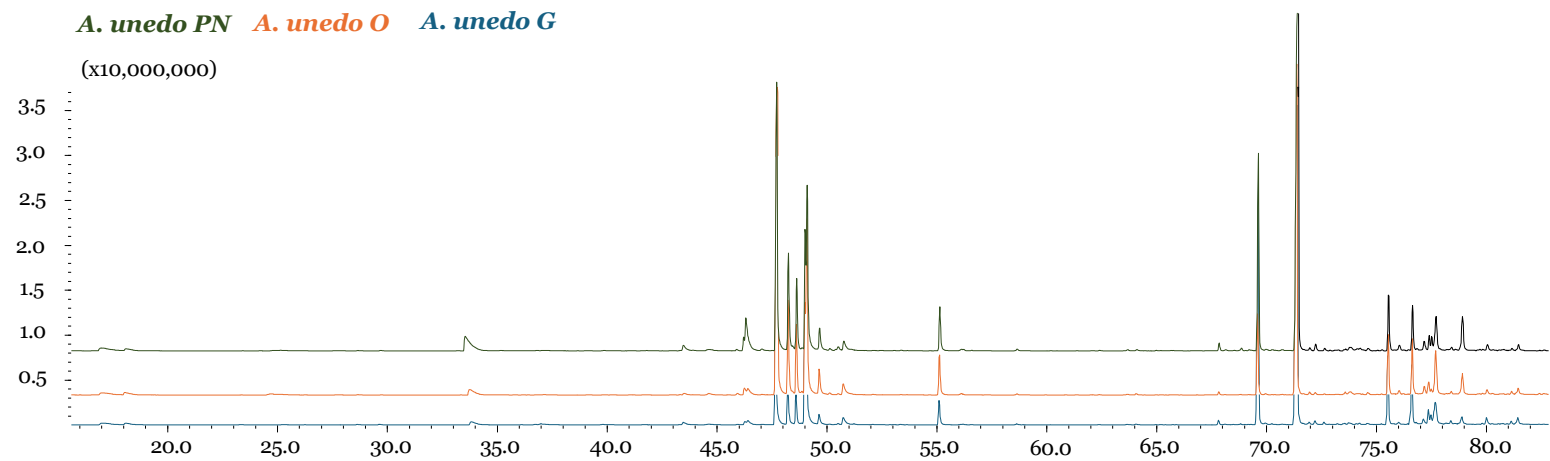


Figura XX - Perfil GC-MS dos três extratos aquosos de *A. unedo*, após a derivatização com BSTFA.

O valor de *Arbutus unedo* L. como ingrediente bioativo para aplicação cutânea